

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı

**TESTİS KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE
BLEOMİSİNİN TRAIL RESEPTÖRLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Müjgan TİMUR

Doktora Tezi

Antalya, 2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı

TESTİS KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE BLEOMİSİNİN TRAIL RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Müjgan TİMUR

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tomris ÖZBEN

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve COST-TUBİTAK Tarafından Desteklenmiştir.
(Proje No. 2006.03.0122.007)
(SBAG-COST-CM-0603-15 (107S291))

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul kararı ve Akdeniz Üniversitesi Senato'nun 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı Senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayın aşığıdadır (Orjinali ekte sunulmuştur).

1) The effect of Topotekan on oxidative stress in MCF-7 human breast cancer cell line. **Timur M**, Akbas SH, Ozben T. Acta Biochim Pol. 2005;52(4):897-902. Epub 2005 Nov 7.

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. /..... /.....

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Gül GÜNER
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Onay:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun /..... /..... tarih ve /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Testis kanseri genç erkekler arasında en sık rastlanan kanserdir. Çoğu hasta tedavi edilebilmesine rağmen, hastalık oldukça kötü bir prognoz göstermektedir. Bleomisin testis, özafagus, serviks, baş ve boyun kanserleri, hodgkin's ve non-hodgkin's lenfomalarda kullanılan antitümör bir antibiyotiktir. Apo-2 ligand olarak da bilinen tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) kanser hücrelerinde apoptozisi indükleyebilen proapoptotik bir sitokindir. Yapılan çalışmalarda doksorubisin, 5-fluorouracil, etoposid, irinotekan (CPT-11), sisplatin and kamptotesin gibi kemoterapötiklerin TRAIL ile kombinasyonunun çeşitli tümör hücrelerinde TRAIL aracılı apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir. Kemoterapötikler tarafından tümör hücrelerinin TRAIL'e hassaslaştırılmasının moleküler temeli TRAIL-R1/DR4 ve TRAIL-R2/DR5'in artması, antiapoptotik moleküller olan Bcl-2, Bcl-xL ve c-FLIP'in azalması ya da proapoptotik moleküller olan kaspazlar ve FADD'ın artması gibi nedenlere dayandırılmaktadır. Bu çalışmada testis kanser hücre dizilerinde bleomisin ve TRAIL kombinasyonunun apoptozis üzerine etkisi ve bleomisin'in TRAIL reseptörleri üzerine etkisi incelendi. TRAIL ve bleomisin kombinasyonunun apoptozis üzerine etkisini değerlendirmek için kaspaz-3 ölçümü yapıldı. Bleomisin'in TRAIL reseptörleri üzerine etkisi akış sitometri kullanılarak belirlendi.

Anahtar kelimeler: Testis kanseri, bleomisin, apoptozis, TRAIL

ABSTRACT

Testicular cancer is the most common solid tumor in young men. Although most patients are highly curable, a subset of patients have a grim prognosis. Bleomycin is an antitumor antibiotic that is used for the treatment of several malignancies, including testicular, esophagus, cervix carcinomas, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas, and squamous cell carcinomas of the head and neck. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), also known as Apo-2 ligand, is a proapoptotic cytokine that is capable of inducing apoptosis in a wide variety of cancer cells. Studies showed that, the combination of TRAIL with chemotherapeutics such as doxorubicin, 5-fluorouracil, etoposide, irinotecan (CPT-11), cisplatin and camptothecin had significantly enhanced TRAIL-mediated apoptosis in a variety of human tumour cell lines. The molecular basis for sensitization of tumour cells to TRAIL by chemotherapeutics may involve upregulation of TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5, downregulation of the antiapoptotic molecules Bcl-2, Bcl-xL or c-FLIP or upregulation of proapoptotic molecules including Bak, caspases or FADD. In this study, we investigated the effect of bleomycin and TRAIL combination on apoptosis and also the effect of bleomycin on TRAIL receptors in testis cancer cell line. We used caspase-3 assay to assess the effect of TRAIL and bleomycin combination on apoptosis. The effect of bleomycin on TRAIL receptors in testis cancer cell lines was investigated using flow cytometry.

Key words: Testis cancer, bleomycin, apoptosis, TRAIL

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve yürütülmesindeki değerli yardımları ve yürütücüsü olduğu Avrupa Birliği COST-TÜBİTAK projesi desteği ile Biyokimya Anabilim Dalımızda Hücre Kültür Laboratuvarı kurulması için tüm cihaz ve gereksinimleri karşılayan ve çalışmamın bu Hücre Kültür Laboratuvarında yapılmasını sağlayan akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Tomris ÖZBEN'e

Doktora eğitimim boyunca benimle yakından ilgilenerek gerekli eğitim ve öğrenimimi almamı sağlayan tüm hocalarıma,

Hücreleri sağlayan Sayın Prof. Dr. Peter ANDREWS ve bana ulaştırılmasında çok emeği olan Christine PIGOTT'a

Bu araştırma süresince her zaman destek ve ilgisini esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Mutay ASLAN'a

Çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen ve Gen Terapi Laboratuvarının kapılarını açan Sayın Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na

Akış sitometrisi ve diğer konulardaki yardımları ve bilgisiyle bana her zaman destek olan Sayın Doç. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'na

TRAIL reseptör çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Ayşen TİMURAĞAOĞLU'na

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ekip arkadaşlarım ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Sonsuz destekleri için aileme ve sonsuz sabrı ve desteği için eşim Uzm. Dr. Serdar TİMUR'a teşekkürlerimi sunarım.

Müjgan TİMUR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Risk Faktörleri	3
2.1.3. Patoloji	4
2.1.4. Evreleme	4
2.1.5. Tanı	5
2.1.6. Tedavi	8
2.2. Bleomisin	8
2.2.1. Bleomisin'in Kimyasal Yapısı	8
2.2.2. Bleomisin'in Etki Mekanizması	9
2.2.3. Bleomisin'in Tedavide Kullanımı	10
2.3. Apoptozis	11
2.3.1. Hücre Ölümünün İki Şekli : Apoptozis ve Nekroz	11
2.3.2. Apoptozisin Keşfi	11
2.3.3. Apoptozisin Aşamaları	12
2.3.4. Apoptozisin Önemi	13
2.3.5. Apoptozisde Meydana Gelen Biyokimyasal ve Morfolojik Değişimler	13
2.3.6. Ekstirinsik ve İntrinsik Yolak	14
2.3.7. Bcl-2 Ailesi	16
2.3.8. Kaspazlar	18
2.3.9. TRAIL	21

MATERYAL ve METOD	24
3.1. Hücre Kültürü	24
3.1.1. Hücre Dizileri ve İlaçlar	24
3.1.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Deneylere Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler	24
3.1.3. Hücrelerin Çoğaltılması	24
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması	25
3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi	25
3.2. Sitotoksosite Ölçümleri	26
3.3. Akış Sitometrisi	27
3.4. Hücre Lizatlarında Kaspaz-3 Aktivitesinin Ölçümü	27
3.5. İstatistiksel Analiz	28
3.6. Kullanılan Cihaz , Gereçler ve Kimyasal Maddeler	28
3.6.1. Cihaz ve Gereçler	28
3.6.2. Kimyasal Malzemeler	29
BULGULAR	30
4.1. NTERA Hücrelerinde Bleomisin'in IC ₅₀ Değeri	30
4.2. NCCIT hücrelerinde Bleomisin'in IC ₅₀ Değeri	31
4.3. NTERA Hücrelerinin TRAIL Hassasiyeti	32
4.4. NCCIT Hücrelerinin TRAIL Hassasiyeti	33
4.5. NCCIT Hücrelerinin Bazal Reseptör Seviyeleri	34
4.6. NCCIT Hücrelerinde Bleomisin'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi	35
4.7. NCCIT Hücrelerinde Bleomisin ve TRAIL'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi	36
4.8. NCCIT Hücrelerinde TRAIL'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi	37
4.9. NTERA Hücrelerinde TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4'ün Bazal Reseptör Seviyeleri	38
4.10. NTERA Hücrelerinde Bleomisin'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi	39
4.11. NTERA Hücrelerinde Bleomisin ve TRAIL'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi	40
4.12. NTERA Hücrelerinde TRAIL'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi	41
4.13. NTERA ve NCCIT Hücrelerinde Kaspaz-3 Düzeyleri	41

TARTIŞMA	42
SONUÇLAR	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	63
EKLER	64

EK-1: The Effect of Topotecan on Oxidative Stress in MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AFP	:	α -feto protein
AIF	:	Apoptozis inhibe edici faktör
APAF-1	:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör
ATP	:	Adenozin trifosfat
Bcl-2	:	B hücreli lenfoma
BEP	:	Bleomisin, etoposid, sisplatin
BH	:	Bcl-2 homoloji
β-HCG	:	Beta insan gonodotropin
BLM	:	Bleomisin
CAD	:	Kaspaz ile aktive edilen DNAaz
CARD	:	Kaspaz toplama birimi
dATP	:	Deoksiadenozin trifosfat
DcR	:	Yalancı reseptör
DED	:	Ölüm efektör birimi
DID	:	Ölüm indükleyici birim
DMEM	:	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DR	:	Ölüm reseptörü
DTT	:	Ditiyotritol
FADD	:	Fas ilişkili ölüm birimi
FBS	:	Fetal sığır serumu
GCT	:	Germ hücreli tümörler
HCL	:	Hidroklorik asit
ICAD	:	Kaspaz ile aktive edilen DNAaz inhibitör
LDH	:	Laktat dehidrogenaz
MTT	:	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid
NSGCT	:	Non seminomatöz germ hücreli tümörler
OPG	:	Osteoprotegerin
PBS	:	Fosfat tampon solüsyonu
RPMI	:	Roswell Park Memorial Institute
tBid	:	Kırılmış Bid
TNF	:	Tümör nekrozis faktör
TRADD	:	Tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili ölüm birimi
TRAIL	:	Tümör nekrozis faktör ilişkili apoptozis indükleyici faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Bleomisin'in kimyasal yapısı	9
2.2. Apoptozisde ekstrinsik ve intrinsik yolak	15
2.3. Bcl-2 protein ailesi [78].	17
2.4. Memeli kaspaz ailesi ve C. Elegans kaspaz CED-3	20
2.5. Prokaspazın temel yapısı ve kaspaz aktivasyonu	21
4.1. Farklı dozlardaki bleomisin'in NTERA hücrelerinde % canlılık üzerine etkisi.	30
4.2. Farklı dozlardaki bleomisin'in NCCIT hücrelerinde % canlılık üzerine etkisi.	31
4.3. Farklı dozlardaki TRAIL'in 72. saatte NTERA hücrelerinde % canlılık üzerine etkisi.	32
4.4. Farklı dozlardaki TRAIL'in 72. saatte NCCIT hücrelerinde % canlılık üzerine etkisi.	33
4.5. NCCIT hücrelerinin bazal TR-1 ve TR-2 reseptör seviyeleri	34
4.6. NCCIT hücrelerinin bazal TR-3 ve TR-4 reseptör seviyeleri	34
4.7. NCCIT hücrelerinde bleomisin'in 72. saatte TR-1 ve TR-2 reseptörleri üzerine etkisi	35
4.8. NCCIT hücrelerinde bleomisin'in 72. saatte TR-3 ve TR-4 reseptörleri üzerine etkisi	35
4.9. NCCIT hücrelerinde bleomisin ve TRAIL'in 72. saatte TR-1 ve TR-2 reseptörleri üzerine etkisi.	36
4.10. NCCIT hücrelerinde bleomisin ve TRAIL'in 72. saatte TR-3 ve TR-4 reseptörleri üzerine etkisi.	36
4.11. NTERA hücrelerinin bazal TR-1 ve TR-2 reseptör seviyeleri	38
4.12. NTERA hücrelerinin bazal TR-3 ve TR-4 reseptör seviyeleri	38
4.13. NTERA hücrelerinde bleomisin'in 72. saatte TR-1 ve TR-2 reseptörleri üzerine etkisi.	39
4.14. NTERA hücrelerinde bleomisin'in 72. saatte TR-3 ve TR-4 reseptörleri üzerine etkisi.	39
4.15. NTERA hücrelerinde bleomisin ve TRAIL'in 72. saatte TR-1 ve TR-2 reseptörleri üzerine etkisi.	40
4.16. NTERA hücrelerinde bleomisin ve TRAIL'in 72. saatte TR-3 ve TR-4 reseptörleri üzerine etkisi.	40
4.17. NCCIT ve NTERA hücrelerinde kaspaz-3 düzeyleri	41

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Testis kanserinin evrenmesi	6
2.2. Serum tümör belirteçleri	7
2.3. Evre Gruplandırılması	7

GİRİŞ

Testis kanseri 15-35 yaşları arasındaki erkeklerde en sık görülen kanserdir [1-3]. Testis kanseri erkeklerde görülen tümörlerin %1'ini oluşturmaktadır [2, 4-6].

Bleomisin başlıca testis, lenfoma, servikal ve baş ve boyun kanserlerinde kullanılmaktadır [7]. Bleomisin, DNA'ya direkt bağlanarak tek ve çift zincir kırılmalarına yol açarak, büyüyen hücrelerde apoptozisi tetikler. Bu aktivite oksijen ve bağlı ferröz iyonuna bağlıdır. Bleomisin, aynı zamanda süperoksid, hidrojen peroksid gibi reaktif oksijen türlerini üretir. Oluşan bu reaktif oksijen türlerinin DNA'ya atak yaparak zincirleri koparması, bleomisin'in toksisitesinde rol oynamaktadır [8]. Bleomisin'i inaktive eden enzim olan, bleomisin hidrolazın eksikliğinden dolayı bleomisin indüklü toksisite, başlıca akciğer ve deride meydana gelir [9].

Apoptozis iki ana yolla meydana gelir. Birincisi ekstrinsik ya da sitoplazmik yolak olarak bilinir ve reseptörler yoluyla meydana gelir. İkincisi intrinsik ya da mitokondriyal yolak olarak da bilinen çeşitli stimülasyonlarla mitokondriden sitokrom c salınımla ölüm sinyalinin aktive olduğu yolaktır [10].

TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) aynı zamanda Apo 2L olarak da bilinir [11]. TRAIL, TNF ailesine ait bir tip 2 transmembran proteinidir [12]. TRAIL fonksiyonunu hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak yapmaktadır. Diğer TNF ailesi üyeleri gibi TRAIL de bir homotrimer oluşturur. Hedef hücresi üzerindeki 3 reseptör molekülle çapraz bağ yapar. Şimdiye kadar TRAIL için 4 spesifik reseptör saptanmıştır. Bunlar; TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, TRAIL-R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2'dir [13]. TRAIL, proapoptotik reseptörler olan TRAIL-R1/DR4 ve TRAIL-R2/DR5 reseptörlerine bağlanarak apoptozise yol açar. Ancak TRAIL'in hücre ölümüne yol açmayan, fonksiyonel olmayan, ölüm birimi taşımayan çözülebilir reseptör osteoprotegerin (OPG) ya da yalancı reseptörlere TRAIL-R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2 bağlanması apoptozise yol açmaz [13, 14].

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların tedavi etkinliğinin artırılması ve seçiciliklerinin yükseltilecek yan etkilerinin azaltılması hedeflenen bir stratejidir. TRAIL'in normal hücrelere zarar vermeksizin kanser hücre dizilerinde apoptozisi indüklemesi son yıllarda en çok dikkat çeken konulardandır. Yapılan çalışmalarda TRAIL'in kemoterapötiklerin etkinliğini arttırdığı hatta toksik olmayan dozdaki kemoterapötiklerle bile apoptozisi sinerjistik olarak indüklediği gösterilmiştir. Bu bulgunun moleküler temeli uygulanan kemoterapötüğün hücre içindeki proapoptotik molekülleri arttırması,

antiapoptotik molekülleri azaltması ya da TRAIL'in ölüm reseptörlerinin ekspresyonlarını yükseltmesi olabilir. Bu kapsamda, çalışmamızda testis kanseri hücre dizilerinde TRAIL ve bleomisin'in tek başına ya da birlikte apoptozis ve TRAIL reseptörleri üzerine etkisini incelemeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda kullanılmak üzere testis kanser hücreleri olan NTERA ve NCCIT hücrelerini seçtik. p53 durumları açısından farklı olan bu iki hücreyi seçmemizin nedeni, elde ettiğimiz sonuçların p53 ile ilişkili olup olmadığına dair bir fikir verebileceğini düşünmemizdi. Her iki hücrede de daha önce TRAIL reseptör kompozisyonlarının gösterildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bunun yanında, klinik olarak testis kanserinin tedavisinde kullanılan bir ilaç olan bleomisin ile bu hücrelerde yapılmış bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu amaçla, ilk olarak testis kanser hücrelerinin reseptör kompozisyonunu ve bleomisin, TRAIL ve bleomisin ve TRAIL'in birlikte kullanımının bu reseptör kompozisyonu üzerine etkilerini gözlemledik. Bunun yanında, bleomisin, TRAIL ve bunların birlikte kullanımının apoptozis üzerine etkilerini kaspaz-3 deneyi yaparak tesbit ettik.

GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Kanseri

Testis kanseri, 15-35 yaşları arasındaki erkeklerde en sık görülen kanserdir [1-3]. Testis kanseri erkeklerde görülen tümörlerin %1'ini oluşturmaktadır [2, 4-6]. Testis kanserinin tedavisi batı tıp biliminin büyük başarı hikayelerinden biridir [15]. Geçmişte testis kanseri ölüme neden olan bir hastalık olarak bilinirdi [4]. Günümüzde ise testis kanser hastalarının %80'inden fazlası tedavi edilebilmektedir. Erken evredeki hastalarda ise tedavi oranı %100'e ulaşmaktadır.

Testis kanserinin tedavisindeki başlıca avantajlar hassas ve spesifik serum tümör belirteçlerinin bulunması, yüksek aktif kombinasyon kemoterapi rejimlerinin uygulanması ve cerrahi tedavilerdeki gelişmelerdir [2].

2.1.1. Epidemiyoloji

Testis kanserinin insidansında coğrafi çeşitlilik vardır ve bu insidans giderek artmaktadır [3, 16]. Testis kanseri insidansındaki çeşitlilik İskandinavya, İsviçre ve Almanya'da en yüksek düzeyde, Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere'de orta düzeyde, Afrika ve Asya'da ise en az düzeydedir [3]. Testisin germ hücre tümörleri daha çok beyaz ırkta, nadir olarak da Afrika orijinli Amerikalılarda görülmektedir. Yapılan çalışmalarda beyaz ırkta Afrika orijinli Amerikalılardan 5 kat daha fazla testis kanseri görüldüğü bildirilmiştir [16].

Son yıllarda testis tümöründe mortalite azalmasına rağmen, insidans bir çok popülasyonda durmadan artmaktadır [17]. İnsidanstaki bu artışın nedeni açıklanamamaktadır ancak mortalitenin azalmasının nedenleri ilerlemiş evredeki hastalarda tedavi edici kemoterapinin bulunmuş olması, erken evrede hastalığın yakalanmasındaki artış ve nonseminomlara göre seminomların daha fazla görülmesidir [18].

2.1.2. Risk Faktörleri

Germ hücreli tümörlerin (GCT) nedenleri bilinmemektedir [17]. GCT oluşumu için önemli risk faktörleri içerisinde kriptorşidizm, ailede GCT öyküsü, Klinefelter Sendromu, spermatik ve testiküler dizgenezisi yer almaktadır [19, 20].

Daha önce testis kanseri tanısı konmuş bir hastanın diğer testisinde ikinci bir kanser gelişme riski %2-3'dür [1]. Hastaların yaklaşık %2'si testis

kanseri olan bir aile üyesine sahiptir. Literatürde bildirilen ailelerin çoğunun testis kanseri olan iki üyesi vardır. Nadiren bazı ailelerde 3 ya da daha fazla üye testis kanseridir. Bu da çekinik ya da düşük baskınlıkta bir kalıtım olabileceğini önermektedir [21].

Diğer risk faktörleri testiküler atrofi, kasık fıtığı ve hidroseldir [22]. Kısır ya da çocuk sahibi olma olasılığı normale göre az olan erkeklerde testis kanseri riski artmaktadır [1].

2.1.3. Patoloji

Testis kanserinin %95'ini germ hücreli tümörler (GCT) oluşturmaktadır [4, 5, 23]. Testisin GCT'si seminoma ve nonseminoma olmak üzere başlıca iki alt gruba ayrılmaktadır. Seminoma germ hücre tümörlerinin %50'sini oluşturmaktadır ve sıklıkla 40'lı yaşlarda görülmektedir. Germ hücre tümörlerinin kalanını nonsemimatoz histoloji (embriyonal karsinom, yolk sac tümörü, koryokarsinom, ve teratoma) oluşturmaktadır ve sıklıkla 30'lu yaşlarda görülmektedir [3, 4, 16].

Seminomanın klasik (%85), anaplastik (%5-10) ve spermatositik(%4-6) olmak üzere 3 histolojik çeşiti vardır [24]. Klasik seminoma tüm seminomaların %85'ini oluşturur ve daha çok 40 yaşlarında görülmektedir. Anaplastik seminoma, seminomaların %10'unu oluşturmaktadır ve yüksek mitotik hıza sahiptir. Hayatta kalma oranı seminomadan daha düşüktür [2]. Spermatositik seminoma nadir olarak görülen bir seminomadır ve genellikle daha yaşlı erkeklerde görülür [3]. Bu tümörler genelde sadece orşiektomi ile tedavi olabilmesine rağmen birçok hasta koruyucu olarak radyasyon tedavisi de almaktadır [15]. Metastatik potansiyeli en düşük düzeydedir [3].

Nonseminoma tümörleri embriyonal karsinoma, yolk sac tümörü, koryokarsinoma ve teratomadan oluşmaktadır [3, 4, 16]. Embriyonal karsinoma testis tümörlerinin %20'sini oluşturmaktadır [25]. Kemoterapi ile bu tümörler tedavi edilebilmesine rağmen çok agresif ve seminomalardan daha öldürücü tümörlerdir [24]. Koryokarsinom nadir olarak görülür [4]. Erken dönemde kan ve lenfatik yolla yayılmasından dolayı germ hücreli tümörlerin en agresif olanıdır [25]. Yolk sac tümörü embriyonik yolk sac histolojisini taklit eder. Yenidoğan ve 3 yaşa kadar olan bebeklerde en sık görülen tümördür ve iyi prognoz gösterir [4]. Terotamalar en az 2 ya da 3 germinal tabaka içeren tümörlerdir. Diğer germ hücreli tümörlere göre metastatik potansiyeli en az olan tümörlerdir [1].

2.1.4. Evreleme

Testis kanserinin WHO (Dünya Sağlık Örgütü) kriterlerine göre histolojik klasifikasyonu genel olarak standart özellik göstermektedir [26]. Testis kanserinin 3 evresi vardır: 1. Evre: Testis, spermatik kord ve skrotumda sınırlıdır. 2. Evre: Retroperitoneal alana veya pelvik lenf nodlarına yayılım vardır. Serum tümör belirteçleri normaldir ya da orta derecede

artmıştır. 3. Evre: Farklı organlara ya da retroperitoneal alan dışındaki lenf nodlarına metastaz vardır. Serum tümör belirteçleri orta veya yüksek düzeyde artmıştır. Ayrıca orşiektomi sonrasında tümör belirteçlerinin normale dönmediği tüm olgular da radyografik bulgulara bakılmaksızın 3. evre olarak değerlendirilirler [1, 6, 18]. Metastatik testis kanserli hastalar tanımlanmış prognostik kriterlere göre iyi risk, orta risk veya zayıf risk olarak sınıflandırılabilirler [27]. Testis kanserinin evrelendirilmesi Tablo 2.1.'de verilmiştir.

2.1.5. Tanı

Testis tümörleri, genellikle bir testis içinde ağrısız, palpe edilebilen bir kitle olarak tesbit edilirler. Skrotumda ağrı ya da rahatsızlık hissi olguların sadece %20'sinde ortaya çıkan bulgulardır [28]. Hastaların %10'u boyun nodları, akciğer metastazı ya da karın nodal metastazları gibi uzak metastazlarla ilgili bulgular gösterirler [26]. Retroperitoneal adenopatiden dolayı sırt ağrısı başlıca bulgulardandır. Nadiren hastalarda sırtta bir kitle bulunabilir ve solunum ve sindirim sistemi ile ilgili şikayetler olabilir [2].

Hastalar testislerinde bir ağırlık ya da acı hissedebilirler, ya da hidrosel gelişebilir. Ağrı, nadir bir bulgudur [29]. Tüm olguların %5'inde serum gonodotropin (hCG)'nin yüksek düzeylerinden dolayı memede büyüme gelişebilir [2, 28]. Travma, testis kanserinin sebebi değildir ancak skrotum travmaları, hastaların tesadüfen testisteki bir kitleyi farketmelerine neden olabilir [28].

Eğer testiküler rahatsızlık 2-4 haftada normale dönmezse, ultrason çekilmesi gerekmektedir [3]. Testis kanseri tanısında karışıklığa neden olabilen en önemli durum, testis ve komşu dokulardaki enfeksiyon ve enflamasyondur. Epididimo-orşit ya da epididimit olarak bilinen bu rahatsızlıklar, seksüel olarak aktif olan genç erkeklerde sıklıkla izlenebilir ve testis kanserli olguların %10'unda tanısız karışıklığa neden olabilirler. Ayrıca hidrosel olarak bilinen skrotumda sıvı toplanması durumu da, birçok rahatsızlık sonucu oluşabileceği gibi testis kanserlerinde de oluşabilir ve testis kanserinin tanısında karışıklıklara yol açabilir [28].

Ultrason, testis içindeki bir kitlenin varlığını onaylayabilir ve karışıklığa neden olabilecek epididimit, orşit, hidrosel ya da herni gibi tanıları dışlayabilir [26]. Ultrasonun testis kanseri tanı yöntemleri içerisinde çok önemli bir yeri vardır. Güvenilir, hızlı, ucuz ve non-invaziv bir yöntemdir. Ultrason ile tümörün lokalizasyonu tespit edilebilir ve diğer testiste tutulum olup olmadığı kontrol edilebilir [28].

Hastaların çoğunda primer tümör vardır. Germ hücreli kanserin tanısındaki gecikme, ya hastanın semptomları önemsememesinden, ya da doktorun doğru teşhis koyamamasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle bu tip semptomlara sahip genç erkeklerde, testis kanseri konusunda şüpheli davranılmalıdır. Olguların çok daha küçük bir bölümünde, primer tümör

gonad dışında yerleşim gösterebilir. Tanı, α -fetoprotein (AFP) ya da β -insan gonadotropin (β -HCG)'nin serum düzeylerindeki artış ile desteklenebilir. Tümör belirteçlerinin normal düzeyde olduğu şüpheli testis kitlesine sahip olgularda kesin tanı için mutlaka biyopsi yapılmalıdır [30].

Tablo 2.1. Testis kanserinin evrenmesi. American Joint Committee'nin ve "International Union Against Cancer'in Testiküler Kanser Evreleme Sistemi: tümör-lenf nodu-metastaz evrelemesi [16].

Evre	Tanım
Primer Tümör (T)	
PTX	Primer tümör saptanamamış (Radikal orşiektomi yapılmamışsa TX kullanılır).
PTO	Primer tümör için kanıt yok (Testiste histolojik skar v.s).
Ptis	İnatübüler germ hücre neoplazisi (Karsinoma in situ).
PT1	Testis ve epididime sınırlı tümör var ancak vasküler veya lenfatik invazyon yok.
PT2	Testis ve epididime sınırlı tümör ve beraberinde vasküler ve lenfatik invazyon var veya tunika albuginea invazyonu var.
PT3	Spermatik kord invazyonu.
PT4	Vasküler/lenfatik invazyonun beraberinde olduğu ya da olmadığı skrotum invazyonu.
Bölgesel Lenf Nodları (N)	
Klinik olarak	
Nx	Bölgesel lenf nodları saptanamamış.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1	Boyutu ≤ 2 cm olan tek lenf nodu metastazı ya da 2 cm den büyük olmayan çoklu lenf nodu metastazı.
N2	Boyutları 2 cm'den büyük fakat 5 cm'den küçük tek ya da çoklu lenf nodu metastazı.
N3	5 cm'den büyük lenf nodu metastazı.
Patolojik olarak	
PNO	Lenf nodunda tümör metastazına ait herhangi bir bulgu yok
PN1	5 adetten az, 2 cm'den küçük lenf nodu metastazı
PN2	2-5 cm arası lenf nodu metastazı veya 5 cm'den küçük 5 lenf nodundan daha fazla metastaz veya ektranodal yayılım bulgusu.
PN3	5'cm den büyük lenf nodu metastazı.
Uzak Metastaz (M)	
M0	Uzak metastazı gösteren herhangi bir bulgu yok.
M1	Bölgesel olmayan nodlara veya akciğere uzak metastaz var.
M2	Akciğer dışındaki uzak organ metastazları var.

Tablo 2.2. Serum Tümör Belirteçleri [16].

Evre	LDH	HCG	AFP
S0	≤N(Normal sınırlarda)	≤N(Normal sınırlarda)	≤N(Normal sınırlarda)
S1	<1.5 x N	<5000	<1000
S2	1.5-10 x N	5000-50000	1000-10000
S3	>10 x N	>50000	>10000

LDH, laktat dehidrogenaz; HCG, insan koryonik gonadotropin; AFP, α-fetoprotein; N, normal

Tablo 2.3. Evre Gruplandırması [16].

Evre	T	N	M	S
0	pTis	N0	M0	S0
Ia	T1	N0	M0	S0
Ib	≥ T2	N0	M0	S0
IS	Herhangi Bir T	N0	M0	Herhangi Bir S
Ila	Herhangi Bir T	N1	M0	S0, S1
Ilb	Herhangi Bir T	N2	M0	S0, S1
Ilc	Herhangi Bir T	N3	M0	S0, S1
IIla	Herhangi Bir T	Herhangi Bir N	M1	S0, S1
IIlb	Herhangi Bir T	Herhangi Bir N	M0, M1	S2
IIlc	Herhangi Bir T	Herhangi Bir N	M0, M1	S3

T, tümör; N, lenf nodu; M, metastaz; S, serum tümör belirteçi.

Tanı bazen 6 aya kadar konulamamaktadır. Bu gecikme hasta ya da doktor kaynaklı olabilir ve prognozu kötü etkiler. Hasta eğitiminin ilerlemesi ve kendi kendine testis muayenesi gibi halk sağlığı tekniklerinin yaygınlaşması erken tanı konulması için olanak yaratmıştır [2]. Testis kanseri tanısı konulduktan sonra, dikkatli bir şekilde hastalığın evrelemesi yapılmalıdır. Bu işlem için tercih edilen yöntem bilgisayarlı tomografi taramasıdır. Abdomen, pelvis, göğüs ve hatta bazen beyin, vertebra ve kemik tomografileri de testis kanser evrelemesi için gerekli olabilmektedir [28].

Tümör belirteçleri, küçük ya da tesbit edilemeyen malign hücrelerin ve tümör tipinin belirlenmesi için bilgi sağlamaktadır. Testis kanserinde kullanılan 3 tümör belirteçi vardır. Bunlar fetüs serumunda büyük miktarlarda bulunan ve bir glikoprotein olan α-feto protein (AFP), hamile kadınların plasantası tarafından üretilen ve erkeklerde normalde bulunmayan bir hormon olan β-hCG ve normalde kas, karaciğer, böbrek ve beyinde bulunan ve hücrel bir enzim olan laktat dehidrogenazdır [4].

α-feto protein (AFP), özellikle yolk sac tümörü için olmak üzere nonseminoma için bir belirteçtir. β-insan gonadotropin (β-HCG), hem seminoma hem de nonseminomada üretilir. Ancak seminomada düşük düzeydedir [31]. β-insan gonadotropin (β-HCG) ve α-feto proteinin serolojik ölçümü, testis kanseri tanısında ve tedavisinin izlenmesinde kullanılır. α-feto protein, saf seminomada veya koryokarsinomda üretilmez. Ek olarak laktat dehidrogenaz enziminin ölçümleri tümörün büyüklüğünün bir işaretidir [29].

2.1.6. Tedavi

Kanser tanısı konduktan sonra klinik evreleme yapılmalıdır. Testis kanseri tedavisini, histopatoloji, serolojik belirteçler, hastalığın evresi, hasta ve doktorun tercihlerini içeren çeşitli faktörler belirler. Tedavi cerrahi, radyoterapi, kemoterapinin tümünü ya da bir kısmını içerebilir [29].

Testis kanseri, yüksek oranda tedavi edilebilir olmasına rağmen, bu kanserin tüm aşamalarda uygun tedavinin uygulanması önemini korumaktadır. Yerinde olmayan uygulamalar tedavi yükünü, hastalık ve ölüm oranını arttırmaktadır [16]. Kanserli testisler, her zaman cerrahi ile vücuttan alınırlar. Radyoterapi ile kanser hücrelerinin hasar görmesi ve büyümesinin durdurulması sağlanmaktadır. Anti-kanser ilaçlar, genellikle hastalığın vücudun başka kısımlarına metastaz yapması durumlarında tercih edilirler. Bu ilaçlar bazen tümörün cerrahi girişim öncesine kadar küçülmesini sağlamak amacıyla da kullanılabilirler [28]. Bleomisin, etoposid, ve sisplatin (BEP) kombinasyonu, metastatik non-seminomatöz tümörlerde tercih edilen en etkili tedavi kürüdür. Bu kür, 1. evre testis tümörü için uygulanan orşiektomi sonrasında tümör dokusunda saptanan vasküler invazyonun yaratabileceği yüksek nüks ihtimali için de kullanılabilir [7]. Tedavi edilen testis kanserli hastaların, tedavi sonrası beklenen sağlıklı yaşam süreleri, oldukça uzundur [32].

2.2. Bleomisin

2.2.1. Bleomisin'in Kimyasal Yapısı

Bleomisin (BLM) 1699 da Umezewa tarafından antitümör özelliği keşfedilmiş glikopeptid yapısında bir antibiyotiktir. Bleomisin orijinal olarak mantar *Streptomyces verticillus*'dan izole edilmiştir [9, 17]. Bleomisin grubu ilaçlar 200'ün üzerinde yakın ilişkili bileşik içerirken bleomisin'in uygulanan formu olan Blenoxane, başlıca A₂ ve B₂ formlarını içermektedir [33]. Bleomisin ailesi terminal amin kısmının bir diğerinden farklı olması ile ayrılır [34].

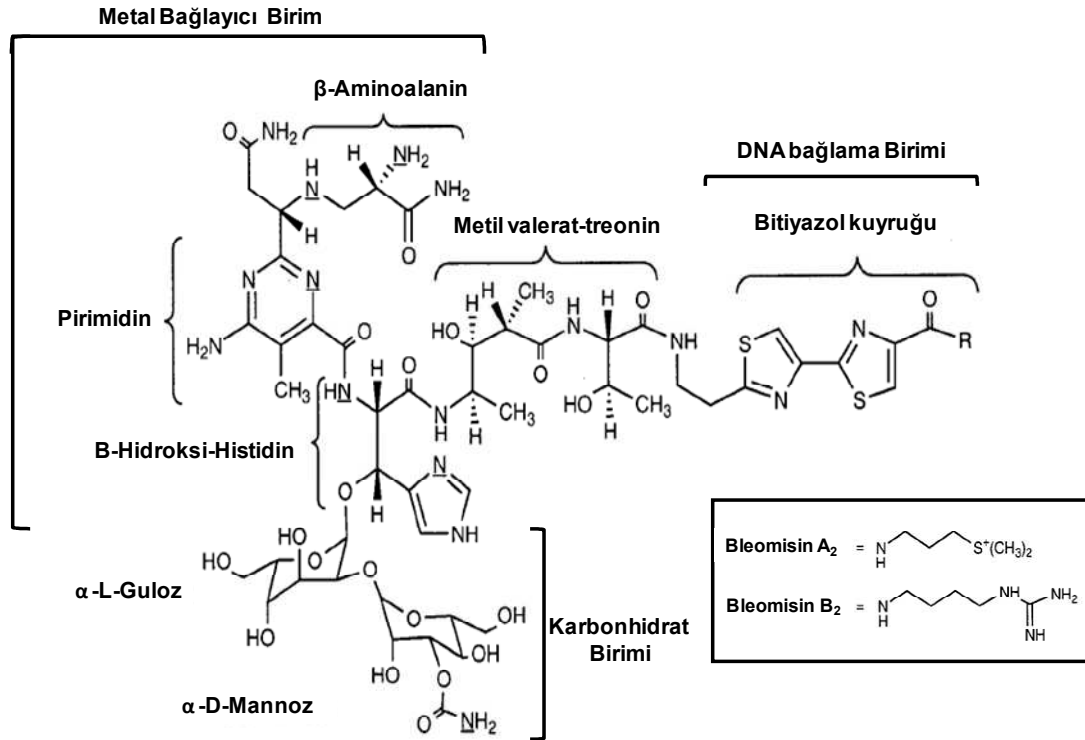
Demir bakır ve kobalt gibi bir çok metalin, bleomisin indüklü DNA kırılmasını desteklediği gösterilmiştir. Fakat demirin in vivo olarak etki gösteren başlıca metal olduğuna inanılmaktadır [35].

Bleomisin'in yapısının 4 ana bölgeden oluştuğu tespit edilmiştir.

- 1- N-terminal birim. Bu birim metal bağlamadan, oksijen aktivasyonundan, selektif DNA kırılmasından sorumludur.
- 2- Metilvalerat-treonin grubu.
- 3- C terminal birim. DNA bağlama affinitesini sağlayan bir bitiyazol fonksiyonel grubu içerir.

- 4- Glukoz ve mannoz şekerleri içeren bir disakkarit grubu. Disakkarit grubunun metal iyon bağlama, hücre yüzey tanıma ve bazı hücrelerde bleomisin'in selektif birikimi üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir [33].

Bleomisin'ler, kationik moleküllerdir ve hücre membranından bleomisin bağlayıcı protein ile zayıfça bağlanarak hücre içine alınırlar. Alınan bleomisin ya nükleusa transloke olur ya da bleomisin hidrolaz tarafından parçalanır. Bleomisin hidrolaz normal ve malign hücrelerde bulunan bir sistein proteazdır. Fakat akciğer ve deride çok az bulunmaktadır [36].



Şekil 2.1. Bleomisin'in kimyasal yapısı [33, 35].

2.2.2. Bleomisin'in Etki Mekanizması

Bleomisin, DNA'ya direkt bağlanarak tek ve çift zincir kırılmalarına yol açarak, büyüyen hücrelerde apoptozisi tetikler. Bu aktivite oksijen ve bağlı ferröz iyonuna bağlıdır [8].

Bleomisin'in antineoplastik etkisinin mekanizması bleomisin-demir kompleksinin, moleküler oksijeni, süperoksit ve hidroksil radikale redüklemesi esasına dayanmaktadır. Oluşan bu radikaller DNA'ya atak yaparak zincir kırılmalarına yol açmaktadır. Oksijen serbest radikallerinin rolü, süperoksit dismutazın, bleomisin indüklü DNA hasarını önlediğini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir [37]. Bleomisin aynı zamanda hücre siklusunu

etkileyen spesifik bir ilaçtır ve hücre siklusunun G2 fazında hücrelerin birikimine neden olur [38].

DNA kırılması için, DNA ile bleomisin'in metal bağlayıcı birimi ve bitiyazol kısmının etkileşimini gerektiren bir mekanizma önerilmiştir. Labil Fe (II)-BLM-O₂ kompleksinin, aktive edilmiş bleomisin'e dönüşümü, DNA'yı hasara uğratar. Bunun yanında son çalışmalar, bleomisin'in RNA'nın alışılmamış 3 boyutlu yapısını yıktığını göstermiştir [34].

Deneysel çalışmalar, bleomisin hassasiyetinin birçok nedeni olabileceğini göstermiştir. DNA tamir mekanizmasındaki bozukluklar, çift zincir kırılmalarının tamirinde gerekli olan genlerdeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bu mutasyonlar aşırı hassasiyete yol açarlar. Çift zincir tamirine katkıda bulunan bir gen olan RAD21'in inhibisyonu, hücrelerin bleomisin'e hassasiyetinin artmasına yol açar. Yapılan çalışmalarda, bleomisin direncinin birçok nedeni ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenler, bleomisin hidrolaz aktivitesindeki artış, taşıyıcı yetersizliğinden dolayı ilacın hücreye alınmasındaki azalma, artmış DNA tamir kapasitesi ya da serbest radikallerin artmış detoksifikasyonudur [18].

2.2.3. Bleomisin'in Tedavide Kullanımı

Bleomisin'ler (BLM), germ hücreli tümörler, lenfomalar, kaposi sarkoma, servikal kanserler ve baş ve boyun kanserlerinin kombinasyon tedavisinde kullanılan doğal bir ilaçtır [39].

Bu ilacın bir avantajı da derialtına, kasa veya kana verilebilmesidir. Kas içine enjeksiyondan sonra pik kan değerleri 30-60 dakika içinde görülmektedir. Benzer dozajların kana enjeksiyonu en yüksek pik konsantrasyonlarını vermektedir ve yarı ömrü yaklaşık 2,5 saattir [38]. Bleomisin'in eliminasyonu başlıca böbreklerde olur. Bleomisin'in alınmasından 24 saat sonra ilacın yaklaşık %60'ı değiştirilmemiş olarak atılır. Bleomisin, bleomisin hidrolaz adı verilen bir enzimle deaktive edilir. Bu enzim başlıca karaciğer, dalak, kemik iliği ve bağırsakta bulunur. Bleomisin'in uygulanması bazen ölümcül yan etkiler meydana getirebilmektedir. Bleomisin'i inaktive eden enzim olan bleomisin hidrolazın eksikliğinden dolayı bleomisin toksisitesi, başlıca akciğer ve deride meydana gelir. Bleomisin'in direkt olarak alımından sonra ateş ve bazen hipotansiyon görülmektedir [9].

Pulmoner toksisite, bleomisin için doz sınırlayıcı bir yan etkidir ve bu yan etki genellikle kendini fizik muayenede öksürük, dispne, kuru inspiratuvar raller ve röntgende toraks infiltrasyonları olarak gösterir. 400 üniteden daha fazla doz alanlarda ve bleomisin tedavisi öncesi mediastinal ya da göğüs bölgesine radyoterapi uygulanmış olanlarda, pulmoner yan etkilerin insidansı daha yüksektir. Nadir de olsa bazı olgularda pulmoner toksisite öldürücü olabilmektedir [38].

Bleomisin, akciğerde pulmoner fibrozisi olumsuz etkiler, çünkü bleomisin'i inaktive eden hidrolaz akciğerde yok denecek kadar azdır. Bu yüzden farelerde bleomisin indüklü pulmonar fibrozis modeli, özellikle oksijen serbest radikalleri indüklü fibröz mekanizmasını incelemek için yardımcı bir araçtır [37]

2.3. Apoptozis

2.3.1. Hücre Ölümünün İki Şekli : Apoptozis ve Nekroz

Yaşam ölümü gerektirir [40]. Hücre ölümü, nekroz ve apoptozis adı verilen iki farklı yolla meydana gelir [10]. Nekroz, hücrelerde meydana gelen çevresel etkenler tarafından geri dönüşümsüz hasar sonucu oluşturulan ve hücrenin ölümüne yol açan pasif bir olaydır [41]. Apoptozis ise aktif, enerji bağımlı, hücresel bir süreçtir [42, 43]. Apoptozis hayvanların çoğunun hayatlarını sürdürmesi ve gelişimi için önemli bir rol oynayan, morfolojik ve biyokimyasal olarak farklı, yaşlanmış, hasarlı ya da gereksiz hücrelerin organizmadan uzaklaştırılmasına olanak sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür [44, 45]. Nekroz patolojik bir olaydır; apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir [46].

Apoptotik süreç hem eksternal hem de internal faktörler tarafından başlatılır [47, 48]. Internal faktörler sıklıkla reseptör aracılıdır ve FAS reseptörü, TNF ailesi reseptörleri veya purinerjik reseptör P_{2Z} olabilir. Büyüme faktörlerinin eksikliğinin ve hormon konsantrasyonlarının değişiminin lenfosit, memeli ve prostatik hücreler gibi hassas hücrelerde, apoptozisi başlattığı gösterilmiştir. Apoptozisi indükleyen eksternal tetikleyiciler DNA hasarını, oksijen veya besin eksikliğini ve viral enfeksiyonları içermektedir. Apoptozis aynı zamanda iyonize ya da UV radyasyonun, kemoterapötik ilaçların ve ısı hasarının sebep olduğu onarılamayan DNA hasarından sonra başlayabilir.

DNA'ya hasar veren uyarılara maruz kalındığında, bir hücrenin apoptozis ya da nekrozis tarafından öldürüleceği DNA hasarının tipi yanısıra maruziyetin süresine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Ayrıca apoptozis kurtarıcı moleküllerinin varlığına ve tetikleyici moleküllerin fonksiyonuna da bağlıdır [48]. ATP'nin hücre içi konsantrasyonu, hücre ölüm şeklinin seçilmesinde önemlidir. ATP'nin yüksek konsantrasyonda olması apoptozisin baskın olmasına sebep olurken ATP'nin düşük konsantrasyonda olması hücrenin nekroza doğru kaymasına sebep olur [49].

2.3.2. Apoptozisin Keşfi

Apoptosis terimi ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından programlı hücre ölümünün bir şekli olarak tanımlanmıştır [50, 51]. Apoptozis 'apo' =ayrı, 'ptosis' =düşmek kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur [52]. Apoptozis Yunanca'dan gelmektedir ve bir ağaçtan düşen yapraklar anlamına gelmektedir [49, 51]. Apoptozis kelimesi Homeros tarafından sonbaharda

yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür ve klasik Yunan tarihçisi olan James Cormack'ın önerisiyle "apoptoz" olarak adlandırılmıştır [53].

Apoptozis yolağı evrim boyunca korunmuştur [54]. Nematod *Caenorhabditis elegans*, hücre ölüm makinasının çekirdek bileşenlerini çalışmak için iyi bir organizma modelidir [55]. Bu nematoddaki apoptozis sürecinin tanımlanması, büyük ölçüde H. Robert Horvitz 'in laboratuvarında yapılmıştır ve apoptozis için gerekli genler belirlenmiştir. Bu sürecin merkezinde ced-3, ced 4 ve ced 9 vardır [56]. Ced -3 ve ced-4, hücre ölümü için gerekliken ced-9 bunların fonksiyonları antagonize eder ve hücre ölümünü önler. Ced-9 proteini, memelilerde hücre ölümünü önleyen Bcl-2 ile sekans benzerliği gösterir [57]. Ced 3, proteinleri spesifik aspartik asit rezidülerinden sonra kıran, sistein proteaz olan kaspazlardandır. Bu kaspaz zimojen olarak bulunur ve kendi kendine kırılarak aktifleşir. Ced-4, ced-3'e bağlanır ve ced-3 aktivasyonunu iletir. Ced-9 ise ced-4' e bağlanarak ced-3'ün aktivasyonunu önler. Normal olarak, ced-9, ced-4 ve ced-3 ile kompleks oluşturur. Ced-3 inaktiftir. Apoptotik uyarılar, ced-9'un kompleksden ayrılmasına neden olur ve ced-3'ün aktivasyonu meydana gelir. Memeli kaspazları, ced-3'e benzerdir [55]. Bu genlerin üçünün de memelilerdeki homologları tanımlanmıştır. Solucanlardaki apoptotik hücre ölümündeki ced-3, memeli kaspazları ile akrabadır. Ced-4 ise, memelilerdeki Apaf-1 ile homologtur. Hücre ölümünün kontrolünü sağlayan anti-apoptotik faktör ced-9, memeli bcl-2 proteininin benzeridir [58].

2.3.3. Apoptozisin Aşamaları

Apoptozis 3 aşamaya ayrılabilir. İlk aşamada, hücre apoptotik bir sinyal alır. Hücreye, hem içten hem de dıştan gelen çeşitli uyarılar apoptotik yolları aktive edebilir. Bunlara örnek olarak, hücre yüzey reseptörlerinin bağlanma ile uyarılması, esansiyel büyüme faktörlerinin ortamdaki uzaklaştırılması ya da hücrelerin çeşitli kimyasal ajanlara maruz bırakılması verilebilir. Ek olarak, hücrelerin UV ya da iyonize radyasyona, ısıya, ve osmolarite değişikliklerine maruz kalmaları, apoptozisi uyarabilir.

Apoptozisin ikinci aşamasında hücreler tüm bu çeşitli sinyalleri toplar ve apoptozisi devam ettirir ya da ettirmez. Bu olaylar aktivasyon-inaktivasyon, serin/treonin ve tirozin kinaz ve fosfataz, seramidleri de içeren lipid ikincil mesajcıların sentezi, değişmiş gen ekspresyonları ve kaspaz olarak bilinen özel proteazların aktivasyonu gibi birçok sinyal yollarını içerir.

Apoptozisin devamı için son karar, apoptotik ve hayati faktörlerin (Bcl-2 grubu proteinleri içerir) göreceli düzeyleri, hücrelerin metabolik durumları ve hücre siklus durumu gibi birçok faktöre bağlıdır. Son çalışmalar birçok apoptotik uyarının mitokondri tarafından alınıp değerlendirildiğini göstermiştir. Apoptozisin son aşamasında genel yıkıcı bir sinyal yolağı aktive

olur ve apoptozis ile ilgili karakteristik morfolojik değişiklikler tetiklenir [47, 51].

2.3.4. Apoptozisin Önemi

Apoptozis, yaşamın gerekli bir parçasıdır. Bağışıklık sisteminde, gelişme ve hücreyel homeostazis gibi birçok biyolojik süreçte ve istenmeyen ya da fazla üretilmiş hücrelerin yok edilmesi için, apoptozis gereklidir [40, 49, 54, 59, 60]. Apoptozisin regülasyonunun bozulması, kanser, otoimmünite, nörodejenaratif hastalıklar, hemopoietik bozukluklar ve infertilite gibi klinik bozukluklarla ilişkilidir [49, 54, 60, 61]. Belirli beyin nöronlarındaki kontrolsüz apoptozis, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıkların oluşumunu destekleyebilir, tam tersine DNA hasarına maruz kalmış hücrelerin apoptozis ile yok edilememesi ise kanser oluşumuna neden olabilir [55].

Fizyolojik hücre ölümü, insan vücudunun büyümesinde ve sürekli yenilenmesinde önemli bir rol oynar. Sinir sistemi gelişiminde, uygun bağlantı oluşturamayan nöronlar bu yolla ölür. Fizyolojik hücre ölümü, enfekte hücrelerin sitotoksik T lenfositler tarafından ortadan kaldırılmalarında, oto-reaktif immün hücrelerin yok edilmelerinde, sindirim sisteminin, kıkırdak ve kemik gelişimlerinde de önemli rol oynar. Normalde gerçekleşmesi gereken fizyolojik hücre ölümü inhibe olursa, uygunsuz fizyolojik hücre ölümü gerçekleşebilir ve bu da birçok hastalığın temelini oluşturur. Örneğin, Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif nöral hastalıklarda, bazı grup nöronlarda prematür hücre ölümü izlenir. AIDS hastalığındaki T lenfosit ölümü de bir çeşit fizyolojik hücre ölümü formudur. İmmün sistemde hücre ölümü inhibisyonu, oto-reaktif B ve T lenfositlerin varlığını devam ettirmesine ve buna bağlı olarak da oto-immün hastalıklara neden olur [62].

2.3.5. Apoptozisde Meydana Gelen Biyokimyasal ve Morfolojik Değişimler

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü hücre büzüşmesi, kromatin kondansasyonu, nüklear fragmentasyon, membran cepcikleri ve apoptotik cisim oluşumu gibi morfolojik değişimler ile tanımlanır [50, 63-65]. Biyokimyasal olarak apoptotik hücreler, mitokondriyal transmembran potansiyelin azalması, hücre içi asidifikasyon, reaktif oksijen türlerinin üretimi, fosfotidilserinin membranın iç yüzünden dış tarafına çıkması gibi olaylarla karakterize edilir [65, 66].

Apoptozisin başlangıcında çok hafif değişiklikler meydana gelirken hücre membran bütünlüğü korunmaktadır. Daha sonra hücre, profesyonel fagositler (makrofaj ve dendritik hücreler) tarafından in vivo olarak alınan, membranla çevrili fragmentlere (apoptotik cisim) parçalanır. Hücre kültürlerinde apoptotik cisimler apoptozisin geç döneminde plazma membran bütünlüğünü kaybeder ve bu olay sekonder nekroz olarak tanımlanır [67]. Transglutaminazların ekspresyonu ve aktivasyonu ile meydana gelen yoğun protein çapraz bağlanmaları, apoptotik hücrelerin bir başka özelliğidir.

Kalsiyum ve magnezyum bağı endonükleazlar tarafından DNA'nın kırılması, 180-200 baz çiftlik DNA parçalarının oluşumu ile sonuçlanır. Bu kırıklar, UV ışığı altında etidyum bromid boyasıyla agaroz jel elektroforezinde "DNA merdiveni" olarak tanımlanan karakteristik merdiven görüntüsünü verir [68]. Sitolitik serbest kalsiyum ve magnezyumun artması ve sitolitik pH'ın ve potasyumun azalması apoptozise katkıda bulunmaktadır [7]. Fosfolipidlerin plazma membranının dış tarafına çıkması apoptozise uğrayan hücrelerde evrensel bir olaydır. Fosfolipidlerin dış tarafta bulunması, büyük olasılıkla, nekrozda oluşan inflamasyondan farklı olarak bir inflamasyona neden olmadan apoptotik hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması içindir. Fosfolipidlerin, membranın dış tarafından iç tarafına aminofosfolipid translokazlar tarafından geçirilir ve bu mekanizma tamamen anlaşılabilir. Apoptozis sırasında membranın dış tarafında fosfolipidlerin görülmesinin, hem aminofosfolipid translokaz aktivitesinin kaybolmasından, hem de fosfolipidlerin spesifik olmayan membran boyunca hareketinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür [69].

Nötral ya da asidik sfingomyelinazların aktivasyonu, apoptozisin pek çok modelinde meydana gelmektedir. Bu olay sfingomyelinazların seramid üretimine yol açar. Seramid, proapoptotik sinyal kaskadını aktive eder. Transglutaminazlar tarafından proteinlerin çapraz bağlanması, hücrenin parçalanması esnasında, apoptotik cisimlerin oluşmasında etkilidir [7].

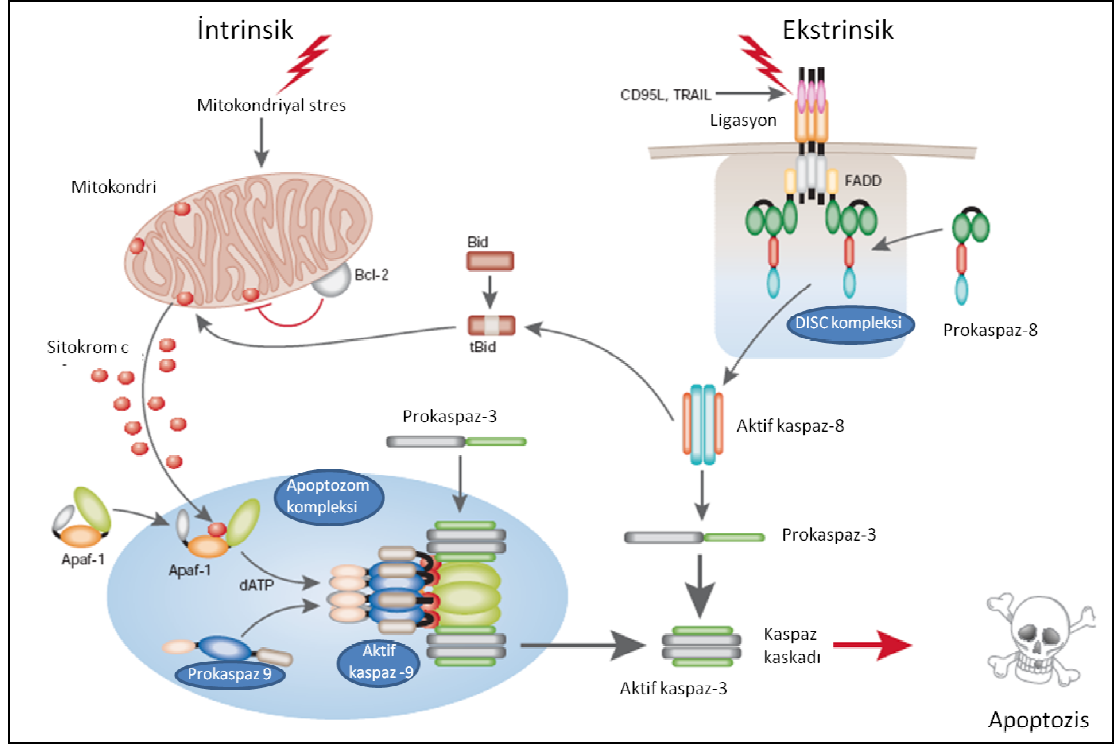
Apoptozis aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonun kaybı ile de karakterizedir. Apoptozis ile ölen hücreler, plazma membran bütünlüğünü korurlar. Ancak apoptotik hücrelerin plazma membranlarındaki değişim, fagositik hücreler tarafından alınmaları için sinyal verir ve böylece degradasyon süreci tamamlanır. Hücreler, apoptotik cisimlere parçalanarak fagositik hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptozisin önemli bir özelliği ölen hücrelerin inflamasyona yol açmadan ortadan kaldırılmasıdır. Buna karşın nekrotik hücreler, erken membran bütünlüklerini kaybederler. Bu da sitoplazmik içeriklerinin dış ortama sızması ve o bölgede inflamasyon gelişmesi ile sonuçlanır [70].

2.3.6. Ekstirinsik ve İntrinsik Yolak

Apoptozis iki ana yolla meydana gelir (Şekil 2.1). Birincisi ekstirinsik ya da sitoplazmik yolak olarak bilinir ve ligand bağı tümör nekrozis faktör (TNF), Fas ya da TRAIL reseptörleri yoluyla meydana gelir. İkincisi, intrinsik ya da mitokondriyal yolak olarak da bilinen, çeşitli stimülasyonlarla mitokondriden sitokrom c salınımıyla ölüm sinyalinin aktive olduğu yolaktır [10].

Bu apoptotik yollara ek olarak endoplazmik retikulum-indüklü apoptozis ve kaspaz bağımsız apoptozis olmak üzere iki yolak daha vardır [67]. Ayrıca T hücre aracılı sitotoksikite ve perforin/granzim bağımlı hücre ölümü de vardır. Perforin/granzim yolağı, apoptozisi, ya granzim A ya da granzim B yoluyla aktive eder. Ekstirinsik, intrinsik ve granzim B yolları aynı

uçta birleşmektedir. Bu yolak, kaspaz-3'ün kırılması ile başlar ve DNA fragmentasyonu, hücre iskeleti ve nüklear proteinlerin degradasyonu, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositik reseptörler için ligandların ekspresyonu ve sonuç olarak fagositik hücreler tarafından alımı ile sonuçlanır [68].



Şekil 2.2. Apoptozisde ekstrinsik ve intrinsik yolak [44].

Mitokondriyal apoptozis yolağı (intrinsik yolak) radyasyon, DNA'ya hasar veren ilaçlar, hormon ve büyüme faktörü eksikliği gibi stres sinyalleri tarafından indüklenir [71]. Mitokondri apoptozis sinyal yolağında, önemli bir düzenleyici organeldir. Çoğu ölüm sinyali, mitokondrinin geri dönüşümsüz olarak fonksiyonunun bozulmasına yol açar. Böylece mitokondri membranları arasında bulunan sitokrom c, apoptozis inhibe edici faktör (AIF), Smac/DIABLO, Endo G ve Omi/HtrA2 gibi proteinler apoptotik hücre ölümünde aktivasyonlarını gösterecekleri sitozole ya da nükleusa geçer [72].

Intrinsik yolak Bcl-2 ailesinin kontrolü altındadır ve mitokondri membranları arasından sitokrom c ve Smac/DIABLO'nun salınması ile başlar. Sitokrom c, kaspaz-9'u aktive etmek için Apaf-1 ile etkileşir. Apaf-1, kaspaz-9 ve sitokrom c, apoptozom olarak adlandırılır. Apoptozom, efektör kaspazlar olan kaspaz-3, -6 ve -7'yi aktive eder. Smac/DIABLO apoptozis protein inhibitörlerine bağlanarak fonksiyon gösterir. Bu yüzden, apoptozis protein inhibitörlerinin, kaspaz-3, -7, -9'nin aktivitelerini durdurması engellenir [73, 74].

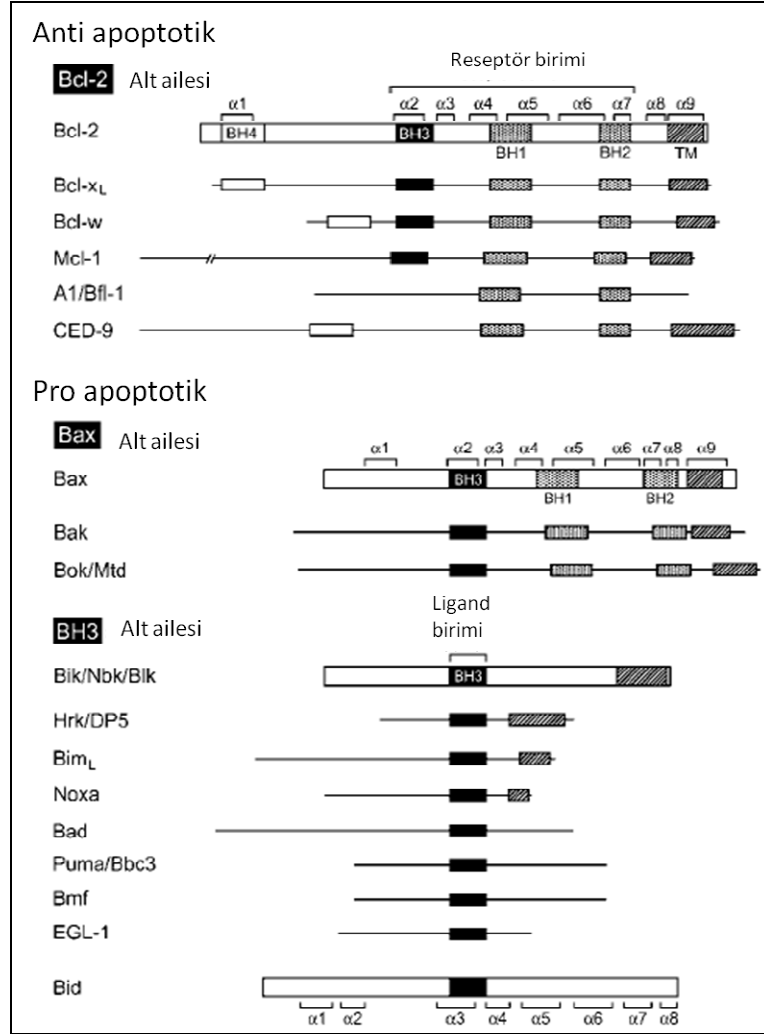
Ekstrinsik yolakda rol oynayan ölüm reseptörleri tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör süper ailesinin üyeleridir. Bu ailenin üyeleri hem sisteinden zengin hücre dışı birimlere hem de ölüm birimi olarak bilinen hücre içinde sitoplazmik kısımları olan birimlere sahiptir. En iyi bilinen reseptörler CD95/Fas/Apo1, TNFR1, TNFR2, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK2/Killer, ve DR6'dir. Ölüm reseptörlerinin kendi ligandları ya da agonistik antikörleri tarafından tetiklenmesi, reseptörün trimerize olması ve adaptör proteinlerin işe karışması ile sonuçlanır [69].

Fas reseptörü için adaptor protein, Fas ilişkili ölüm birimi (FADD); TNFR1 reseptörü için TNFR ilişkili ölüm birimi (TRADD)'dir [64]. Ligand bağlanması üzerine reseptörler adaptor protein ile sitozolik bir kompleks oluşturur ve prokaspaz-8 ve -10 ile etkileşerek bu kaspazların aktivasyonunu sağlar [68, 74]. Kaspaz-8 doğrudan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozise yol açar (tip 1 hücre ölümü) [75].

Ekstrinsik ve intrinsik yolak farklı düzeylerde birbirleriyle etkileşirler [76]. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 aktivasyonu, aynı zamanda intrinsik yolağı da hücre tipine bağlı olarak aktive eder [74]. Kaspaz-8, Bid'in kırılmasına (tBid) yol açar. tBid ve Bak'ın heterodimerizasyonu sitokrom c'nin mitokondriden salınımı ile sonuçlanır. Sitokrom c'nin salınımı da, sonuç olarak kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açar. Hangi yolağın daha baskın olduğu hücre tipine bağlıdır [75].

2.3.7. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi üyeleri apoptozisde anahtar rol oynar. Bcl-2 protein ailesi hem antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1, NR-13, BHRF1, LMW5-HL, ORF16, KS-Bcl-2, E1B-19K, ve CED-9) hem de proapoptotik (Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, BimL, Bad, Bid, ve EGL-1) fonksiyona sahip proteinleri içermektedir (Şekil 2.2) [77].



Şekil 2.3. Bcl-2 protein ailesi [78].

Bcl-2 geni ilk olarak, kromozom 14 ile 18 arasındaki translokasyon alanında bulunan konumu sonucu keşfedilmiştir ve çoğu foliküler lenfomalarda bulunur. Başlangıçta onkogen olarak kabul edilen Bcl-2'nin hücre siklusunun ilerlemesi ya da hücre çoğalması üzerinde artırıcı etkisinin etkisinin neredeyse hiç olmadığı saptanmıştır. Çeşitli uyarılar sonucunda Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun hücrelerde apoptozisin başlamasını engellediği belirlenmiştir [70]. Bcl-2 çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondri dış membranında bulunur. Benzer şekilde, Bcl-XL'nin de mitokondri dış membranında lokalize olduğu gösterilmiştir [79].

Bcl-2 proteinleri 4 sekans alanı içermektedirler. Bunlar Bcl-2 homologu (BH) olarak adlandırılır [43, 72]. Bcl-2 ailesi BH ye göre 3 farklı grupta sınıflandırılabilirler. Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik üyeler BH1'den BH4'e kadar tüm birimleri içerebilirler. Pro-apoptotik üyeler 2 gruba ayrılabilirler: 1. grupta Bax ve Bak gibi BH1, BH2 ve BH3 birimleri içerenler, 2. grupta ise Bad ve Bim gibi sadece BH3 birimi içerenler yer alır. Bu kategorilere istisna oluşturan Bcl-xS, Bcl-xL'nin diziliminin bir kısmından ibaret olan bir pro-

apoptotik proteindir ve BH3 ve BH4 birimleri içerir. Bu sekansların fonksiyonel ve yapısal önemleri vardır. Pro-apoptotik aile üyelerinin BH3 birimi, anti-apoptotik proteinlerin BH1, BH2 ve BH3 birimleri tarafından oluşturulan hidrofobik yarık ile etkileşime geçebilir ve bu etkileşim önemli bir düzenleyici mekanizma olabilir [64, 72, 80, 81].

Proapoptotik proteinlerdeki BH3 birimi, Bcl-2 proteinleri ailesinin öldürücü etkisi için gereklidir. Bu proteinlerin aktivitesi, homo ve heterokompleks oluşumu ile düzenlenmektedir. Bu modelde, proapoptotik proteinlerle anti-apoptotik proteinler arasında kompleks oluşumu, aktivitelerini inhibe eder ve apoptozisi engeller. Böylece protein konformasyonundaki post translasyonel modifikasyonlar ve değişimler, çeşitli proteinler arasındaki afiniteyi değiştirir ve kompleks oluşumunu düzenler [43].

Birden çok birim içeren pro-apoptotik proteinler, mitokondri membranındaki kanalları indükleyebilmeleri sayesinde, mitokondrinin bütünlüğünü değiştirme yeteneğine sahiptir. Anti-apoptotik ve birden çok birim içeren pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki oran, hücrenin ölüm uyarısına hassasiyetini belirlemede yardımcıdır [81].

Ortaya çıkan kanıtlar, Bid'in mitokondrinin fonksiyonunun bozulmasını ve kaspaz aktivasyonunu sağlayarak, çeşitli apoptozis yollarında önemli rol oynadığını göstermiştir. Fas gibi ölüm reseptörleri, Bid'i kıran kaspazları aktive eder. Kırılmış Bid'in C terminal kısmının (tBid) daha sonra mitokondriye göç ettiği ve mitokondride sitokrom c ve diğer proteinlerin salınmasını indüklediği öne sürülmüştür [82]. Bak eksikliğinde, kırılmış Bid tarafından sitokrom c'nin salınımının gerçekleşmemesi, kırılmış Bid ile Bak'ın etkileşiminin, en azından in vitro olarak önemli bir olay olduğunu göstermiştir [83]. Bcl-2, Bax ve Bcl-XL, C terminal uçlarında, bir membran çapası olarak görev yaptığına inanılan hidrofobik bir kısım içerirler [79].

Mitokondri apoptozisde önemli bir rol oynar. Özellikle bu organelden apoptozis indükleyici faktör ve sitokrom c salınır. Daha sonra Apaf-1-kaspaz-9 kompleks oluşumu ile kaspaz-9 aktivasyonu tetiklenir. Bcl-2 ailesi üyeleri sitokrom c salınımının düzenlenmesinde rol oynar. Bcl-2 ve Bcl-XL, sitokrom c salınımını baskımlarken, Bax bu olayı stimüle eder [77]. Bax pro-apoptotik bir Bcl-2 ailesi üyesidir, sitozolde bulunur ve apoptozis esnasında mitokondriye transloke olur [84]. Bax Bcl-2'nin apoptozisi bloke etme yeteneğini baskılar [85]. Son zamanlarda Bax'ın, sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu indüklediği in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir. Bu salınımın mitokondriyal permeabilite geçişinin indüksiyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir [84]. Bax sağlıklı hücrelerde daha çok sitozolde bulunur ve apoptotik bir uyarı olduğunda mitokondriye transloke olur [72, 84].

2.3.8. Kaspazlar

Kaspaz aktivasyonu apoptozisde anahtar bir basamaktır ve birçok uyarı kaspazları aktive eder [86]. Kaspazlar apoptozisde önemli rol oynayan sistein proteaz ailesidir [87]. Kaspazlar, tek bir polipeptid zinciri ve

inaktif bir zimojen olarak sentezlenirler [47, 88]. Sekans analizleri ve x-ray kristalografisi tüm kaspazların ortak bir yapısı olduğunu göstermiştir. Her zimojen bir N-terminal prodomain, korunmuş bir QACXG motif içinde aktif bölgesinde sistein bulunan büyük alt birim ve C terminalinde küçük alt birim içermektedir. Aspartat kırılma bölgeleri, büyük alt ünite ile prodomain arasında ve büyük ve küçük alt ünite arasında bulunur. [89]. Kaspazlar aktive olduğunda DNA kondensasyonu, fragmentasyonu ve membran cepciklerinin oluşumu gibi olaylara neden olan protein kırılmalarının oluşumuna yol açar [59].

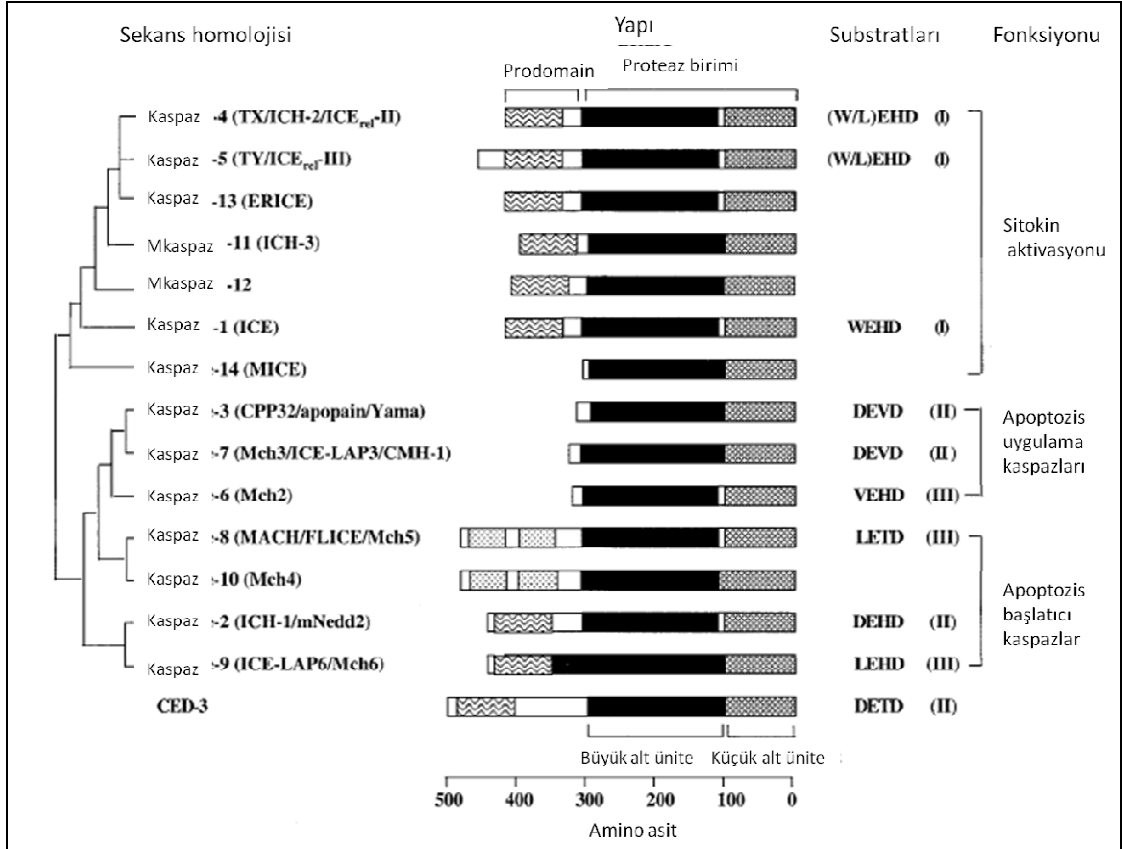
Kaspazlar, sekans benzerliklerine göre gruplandırılır. Sekans kimliklendirmesine göre kaspazlar 3 gruba ayrılır ve bu gruplandırma fizyolojik fonksiyonları ile uyumludur. Grup 1, inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5); Grup 2, uygulama kaspazları (kaspaz-3, -6, -7), Grup 3, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10) (Şekil 2.4.) [68, 90].

Kaspaz-3, -6, -7 gibi uygulama kaspazları, apoptozis ile ilişkili karakteristik değişikliklerin meydana gelmesine yol açan substrat kırılmalarını oluşturan kaspazlardır. Kaspaz-8 ve -9 gibi başlatıcı kaspazlar ise uygulama kaspazlarını aktive eder [86, 91]

Aktivasyon sırasında her polipeptid zinciri 20 kDa'luk bir büyük (p20) ve 10 kDa'luk bir de küçük alt üniteye (p10) ayrılır ve daha sonra dimerize olur. Enzimatik aktivitenin tam olması için 2 küçük 2 büyük alt ünite gereklidir (Şekil 2.5) [47]. Çoğu prokaspazda büyük ve küçük alt ünite arasında yaklaşık 10 aminoasitlik küçük bağlayıcı bir dizi vardır [90, 92]. Kaspazlar, spesifik aspartik asit rezidülerinden kırılarak hızlı bir şekilde aktive edilir [67, 93].

Bazı kaspazlar diğer proteinlerle etkileşerek aktive olurlar. Örneğin kaspaz-8, Fas ilişkili ölüm birimi (FADD) ile, kaspaz-9 ise sitokrom c, dATP (veya ATP) ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'in etkileşimi ile aktive olur. Bir başka aktivasyon mekanizması da kaspazların diğer kaspazlarla aktivasyonudur. Örneğin hem aktif kaspaz-8 hem de kaspaz-9 kırılarak kaspaz-3'ü aktive ederler [47, 93].

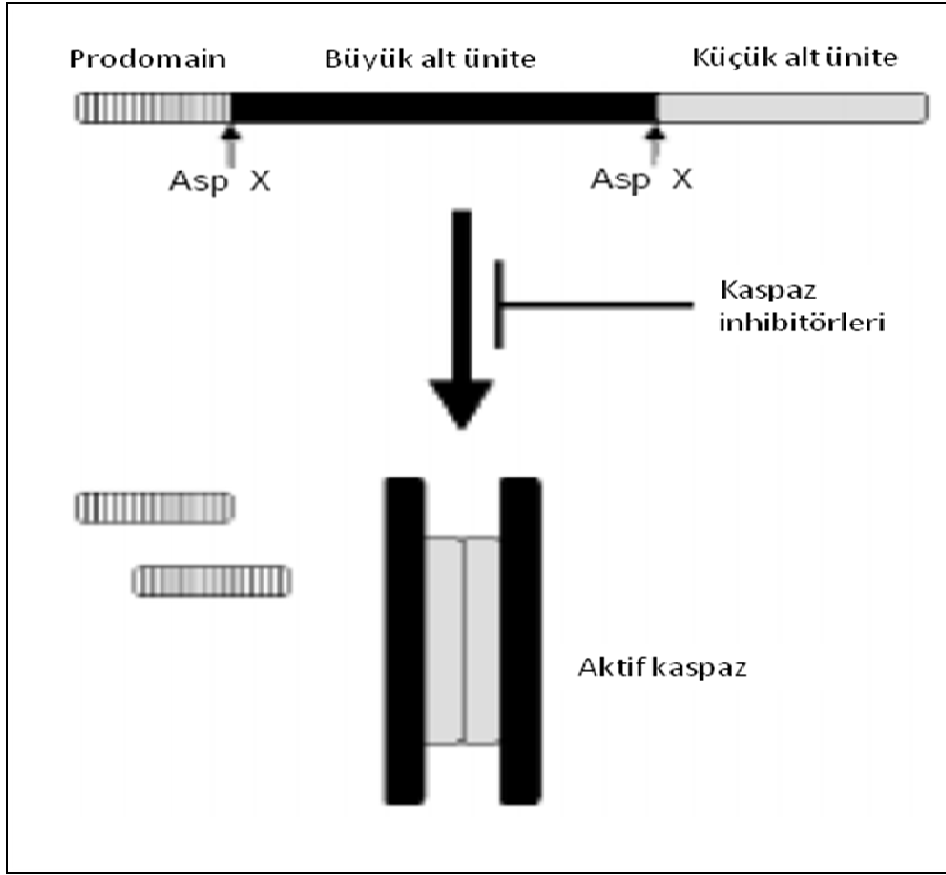
Kaspazlar kataliz için sistein kullanmaları ve sadece aspartat rezidülerinden sonra kırılmaları yönleriyle diğer proteazlardan farklıdır. Bu alışılmadık aspartat substrat spesifitesi, sadece bir proteaz olan granzim B'de de bulunur [47]. Memelilerde kaspazlar olarak bilinen 12 sistein proteaz tanımlanmıştır. Bunlar kaspaz 1-10, kaspaz-12 ve kaspaz-14 'dür. Kaspaz-13'ün daha sonradan sığır kaspaz-4'ü ile, kaspaz-11'in ise fare kaspaz-4 ve -5'i ile homolog olduğu bulunmuştur [90].



Şekil 2.4. Memeli kaspaz ailesi ve *C. Elegans* kaspaz CED-3 [92].

Kaspaz-3 en önemli uygulama kaspazıdır ve başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9, -10) tarafından aktive edilir. Kaspaz-3, spesifik bir endonükleaz olan, kaspaz ile aktive edilen DNAaz (CAD)'ı aktive eder. Çoğalan hücrelerde CAD inhibitörü olan, kaspaz ile aktive edilen DNAaz inhibitör (ICAD) ile birlikte bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerde aktive edilmiş kaspaz-3 ICAD'ı kırarak CAD'ı serbest bırakır. Daha sonra CAD, çekirdekte kromozomal DNA'yı yıkar ve kromatin kondensasyonuna neden olur [68]. Ek olarak asinüs ve helikardın kırılması, kromatin kondensasyonuna neden olur. ROCK-1 ve PAK-2 gibi kinazların yanı sıra gelsolinin gibi birçok substratın kırılması apoptozisin karakteristik bir özelliği olan membran tomurcuklanmasına neden olur. Kaspazlar bir ara filament olan sitokeratin 18 ve vimentin gibi hücre iskeleti için gerekli olan bir çok proteini de kırarlar. Bu kırılmalar, hücre şeklindeki apoptotik değişimlere yol açarlar [94].

Kaspaz-3, aynı zamanda hücre iskeletinin tekrar organize olmasını ve hücrenin apoptotik cisimlere parçalanmasını indükler. Bir aktin bağlayıcı protein olan gelsolin, aktive kaspaz-3'ün anahtar substratlarından biridir. Gelsolin, karakteristik olarak aktin polimerizasyonu için önemli bir rol oynar. Kaspaz-3 gelsolini parçalar ve gelsolinin kırılması kalsiyumdan bağımsız bir şekilde aktin filamentlerini kırar. Bu olay hücre iskeletinin, hücre içi taşınmanın ve sinyal iletiminin bozulması ile sonuçlanır [68, 95].



Şekil 2.5. Prokaspazın temel yapısı ve kaspaz aktivasyonu [96].

Her prokaspaz çeşitli uzunluklarda bir prodomain, büyük ve küçük alt ünite içerir. Efektör kaspazlarda 30'dan daha az aminoasid bulunurken, başlatıcı kaspazlar ve inflamatuvar kaspazlarda 100 aminoasidin üzerinde pro-domain bulunmaktadır. Uzun pro-domain özellikle ölüm efektör birimi (DED) ve kaspaz toplama birimi (CARD) gibi farklı motifler içermektedir. Ölüm indükleyici birim (DID) adı verilen yeni bir motif tanımlanmıştır. CARD birimi kaspaz-1, -2, -4, -5 ve -9'da bulunurken, prokaspaz-8 ve -10 DED'in, iki çift kopyasını içermektedir. Bu birimler, prokaspazlar ve onların adaptörleri arasındaki homofilik etkileşimde aracıdır. Buna karşın uygulama kaspazlarının kısa prodomaini protein-protein etkileşimlerinde aracı değildir [92].

2.3.9. TRAIL

Tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör süperailisi proliferasyon, differansiasyon ve apoptozisde gerekli proteinler içermektedir. Bu reseptörlerin bir alt grubu toplu olarak ölüm reseptörleri olarak adlandırılır. Bunlar TNF reseptörü, Fas(Apo 1, CD95) ölüm reseptörü 3 (DR3, Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), ölüm reseptörü 4 (DR4, TRAIL-R1) ve ölüm

reseptörü 5 (Apo-2, TRAIL-R2, TRICK2, KILLER)'dir. Bu reseptörlerin çoğu hücre tipinde olduğu bildirilmiştir [97].

Tümör nekrozis faktör (TNF)-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL), aynı zamanda Apo 2L olarak da bilinir [11]. TRAIL, TNF ailesine ait bir tip 2 transmembran proteindir [12]. Tümör nekrozis faktör (TNF)-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL, TNF10,Apo-2L) TNF ailesine ait bir sitokindir [98]. TRAIL, 1990'ların ortalarında TNF ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır. Bu ligand insanlarda hemen hemen tüm organlarda bol miktarda eksprese edilmektedir. Ancak beyin, karaciğer ve testiste eksprese edilmemektedir [45]. TRAIL, kanser hücrelerinde apoptozisi indükleme yeteneğinde olan proapoptotik bir sitokindir [11].

TRAIL fonksiyonunu, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak yapmaktadır. Diğer TNF ailesi üyeleri gibi TRAIL de, bir homotrimer oluşturur. Hedef hücre üzerindeki 3 reseptör molekülle çapraz bağ yapar Şimdiye kadar TRAIL için 4 spesifik reseptör saptanmıştır. Bunlar; DR4 (TR-1), DR5 (TR-2), DcR1 (TR-3), DcR2 (TR-4)'dir. TR-1 ve TR-2'nin sitoplazmik bölgeleri, Fas ve TNF-R1'e homolog bir ölüm domaini içermektedir. Son çalışmalarda TR-2'in (bu TR-1 için daha az açıktır) Fas 'a benzer bir yolla apoptozise yol açtığını bildirmişlerdir [13].

TRAIL proapoptotik reseptörler olan TR-1 ve TR-2 reseptörlerine bağlanarak apoptozise yol açar. Ancak bunun hücre ölümüne yol açmayan, fonksiyonel olmayan, ölüm domaini taşımayan solubl reseptör osteoprotegerin (OPG) ya da yalancı reseptörlere (TR-3, TR-4) bağlanması apoptozise yol açmaz [13, 14]. TR-1 ve TR-2 reseptörleri hücre içindeki ölüm birimleri ile TRAIL apoptotik sinyalini iletirler. TR-3 ve TR-4 fonksiyonel bir ölüm biriminden yoksundurlar ve TR-1 ve TR-2 ile yarışma olasılığından dolayı da yalancı reseptörler adını alırlar. TR-3 tamamen ölüm biriminden yoksunken, TR-4 apoptotik sinyali iletme yeteneğini kaybetmiş kesik bir birim içermektedir. Yapılan pek çok çalışmada akciğer, meme, kolon ve prostat gibi çeşitli tümör hücre dizilerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. TRAIL hayvan ksenograflarında in vivo olarak da test edilmiştir. Fare ve insan olmayan primatlarda ksenograflar TRAIL ile tedavi edildiklerinde tümör büyümesi inhibe olmuş ve normal hücrelerde herhangi bir yıkıcı etki göstermeksizin malignant hücrelerde apoptozis indüklenerek tümörün gerilemesi ile sonuçlanmıştır [45, 99, 100].

TRAIL, TR-1 ve/veya TR-2 reseptörlerinin aktivasyonu ile apoptozisi indükler. TR-1 ve/veya TR-2, ekstrinsik apoptozis yolağını indükler. TRAIL'in TR-1 ve TR-2'ye bağlanması, ölüm birimi içeren adaptor molekül Fas ilişkili ölüm domaini yoluyla apoptozisi başlatıcı olan kaspaz-8 ve 10'u aktive eder. Kaspaz-8 ve -10, sırasıyla efektör kaspazları (-3, -6, -7 gibi) aktive eder. Bazı kanser hücrelerinde kaspaz-3'ün, TRAIL indüklü aktivasyonu daha çok intrinsik apoptozis yolağı ile artırılır. Bu durumda kaspaz-8 ve -10, Bcl-2 ailesi üyesi pro-apoptotik Bid'i bölerek aktive eder. Bid, mitokondriden Smac/Diablo ve sitokrom c salınımını indüklemek için Bax ve Bak gibi

proapoptotik aile üyeleri ile etkileşir. Sitokrom c, Apaf-1 ile birlikte başlatıcı kaspaz-9'u aktive eder. Bu da kaspaz-3, -6 ve -7'nin daha fazla aktivasyonuna katkıda bulunur [101].

TRAIL mRNA'sı çeşitli normal dokularda eksprese edilirken, TRAIL proteinin fonksiyonel ekspresyonu daha çok immun hücrelerde (T hücreleri, natural killer hücreleri gibi) gözlenmektedir. TRAIL'in fizyolojik rolü tam olarak anlaşılmasına rağmen TRAIL'den yoksun fareler, otoimmün hastalıklara hassasiyet dışında büyük bir anormallik göstermemişlerdir. Bu TRAIL'in başlıca immun sistemde rolünün olduğunu önermektedir [13].

MATERYAL ve METOD

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Hücre Dizileri ve İlaçlar

Testis kanser hücreleri olan NCCIT ve NTERA hücreleri İngiltere'deki Sheffield Üniversitesinden Dr. Peter Andrews tarafından temin edildi. Bleomisin 15 mg/ml olacak şekilde steril distile su içinde çözülerek kısımlara ayrıldı ve -80°C de saklandı.

3.1.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Deneylere Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler

A) RPMI (Roswell Park Memorial Institute): ATCC'den alındı. Kullanılacağı zaman 50 ml steril, inaktive edilmiş FBS (Fetal Sığır Serumu) ve 5 ml steril penisilin-streptomisin çözeltisi eklendi. RPMI $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

B) DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium): ATCC'den alındı. Kullanılacağı zaman 50 ml steril, inaktive edilmiş FBS (Fetal Sığır Serumu) ve 5 ml steril penisilin-streptomisin çözeltisi eklendi. RPMI $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

C) FBS (Fetal Sığır Serumu): Sigma'dan inaktive edilmiş olarak temin edildi. 10 ml'lik tüplere bölünerek -20°C 'de saklandı.

D) Penisilin-Streptomisin: Biological Industries'den alındı. Kullanılmadığı sürece -20°C 'de saklandı.

E) DMSO (Dimetil Sülfoksit): Sigma'dan alındı. Oda ısısında saklandı.

F) Hücre Dondurma Çözeltisi: %5 DMSO içeren medyum steril bir tüpte hazırlandı ve hücre pelleti üzerine 1 ml eklendi. Bu solusyon hücreler dondurulacağı zaman taze olarak hazırlandı.

G) Tripan Mavisi Çözeltisi (%0.5'lik): Biological Industries'den hazır olarak alındı. Oda ısısında saklandı.

H) Tripsin-EDTA: Biological Industries'den hazır olarak alındı. Çözülerek kısımlara ayrıldı ve -20°C 'de saklandı.

3.1.3. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren steril RPMI besiyerinde, 37°C 'de, %5 CO_2 ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı.

Hücreler çok yoğunlaştıkları zaman yapıştıkları flasktan kaldırılarak yeni flasklara pasajlandı. Bunun için hücre tipine göre iki farklı hücre pasajlanması uygulandı. Birinci tip pasajlama işleminde tripsin, ikinci tip pasajlama işleminde ise kazıyıcı (scraper) denilen bir malzeme kullanıldı.

NTERA hücrelerinin pasajlanması kazıyıcı (scraper) kullanılarak yapıldı. Yeterli yoğunluğa ulaşmış flasklardan hücreler kazınarak pasajlandı. İlk olarak medyum flaskdan uzaklaştırıldı ve atıldı. Taze medyum (DMEM) eklendi ve hücreler kazıyıcı yardımıyla flasktan kazınarak kaldırıldı. Hücreler yeni flasklara dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe, uygun medyum içinde inkübe edilerek üretildi.

NCCIT hücrelerinin pasajlanması tripsin kullanılarak yapıldı. İlk olarak medyum flaskdan uzaklaştırıldı ve atıldı. 25 cm²'lik flasklara 1 ml tripsin-EDTA eklendi ve hücreler kalkana kadar inverted mikroskop altında gözlemlendi. Flaska 6-8 ml medyum (RPMI) eklenerek santrifüj tüpüne aktarıldı ve 150xg'de 5-7 dakika santrifüj edilerek pellet elde edildi. Bu pellet medyum ile tekrar süspansiyon edilerek yeni flasklara dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe uygun medyum içinde inkübe edilerek üretildi. Haftada iki ya da üç kez konfluent olmadan ya da yüzeyden kalkmadan alt kültürleme yapıldı.

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı stoklandı. Bunun için hücreler uygun şekilde donduruldu. Hücreler, hücre tipine göre flasktan uygun şekilde kaldırıldı ve medyum eklenerek 150 x g'de 5-7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pellet, %95 tam hücre medyumuna ve %5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO)'den oluşan dondurma medyumuna içerisinde tekrar süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonları, cryo tüplere dağıtıldı ve kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (freezing container) içinde 4 saat -80°C'de tutuldu. Daha sonra cryo tüpler sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulan bu hücreler deneylerde kullanılmak üzere hücreye ihtiyaç olduğunda çözüldü. Bu işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Hücreleri içeren vial 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü. Kontaminasyon olasılığını azaltmak için suyun yüzeyinde tutuldu. Çözdürme işlemi hızlı bir şekilde (yaklaşık 2 dakika) yapıldı. İçeriği çözülür çözülmez vial su banyosundan uzaklaştırıldı ve alkollendi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. Vial içeriği tüpe boşaltılıp üzerine damla damla medyum eklendi. 150xg'de 7 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre içeren pellet uygun medyumla tekrar süspansiyon edildi ve kültür

flasklarına dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de ve %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe üretildi.

3.2. Sitotoksosite Ölçümleri

Bleomisin'in IC₅₀ değeri ve TRAIL hassasiyeti, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) testi ile belirlendi ve IC₅₀ değeri bulundu. MTT, canlı hücreler tarafından parçalanarak koyu mavi renkte formazan ürünü veren açık sarı renkli bir maddedir. Oluşan mavi rengin yoğunluğu hücre canlılığının bir ölçütüdür.

Kullanılan MTT kiti aşağıdaki 3 maddeyi içermektedir.

Reaktif A : MTT, (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid), 50 mg/vial.

Solüsyon B : PBS pH 7.4, 15 ml

Solüsyon C : 0.04 N HCl içeren izopropanol, 100 ml

Sitotoksosite deneyleri 5 gün sürmektedir. Deneyin birinci günü hücreler flasklara ekildi. Bunun için hücreler, hücre tiplerine bağlı olarak tripsin ya da kazıyıcı ile kaldırıldı. Uygun medyum eklenerek 150xg'de 7 dakika santrifüj edildi. Pellet 1 ml medyum ile tekrar süspanse edildi. Hücre süspanسیونundan 10 µl alınarak hücreler inverted mikroskop altında hemasitometrede sayıldı. 50 000 hücre / kuyu olacak şekilde ayarlanarak hücreler kuyulara 100 µl (50 000 hücre) ekildi. Yapışmaları için 24 saat beklendi. Hücrelerin kuyulara ekilmesinden 24 saat sonra medyum atılarak, belirlenen dozlardaki bleomisin ve TRAIL içeren medyum kuyulara uygulandı. Hücreler, belirlenen dozlardaki bleomisin ile 72 saat süresince 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra bu hücrelerde bleomisin hassasiyeti, MTT sitotoksosite kiti çalışılarak belirlendi.

Çalışılacak her kuyucuğa 100 µl medyum ve 10 µl A+B solüsyonundan (MTT+PBS) eklendi. 4 saat 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. Inkübasyon sürecinin sonunda, canlı hücre içeren kuyularda MTT'den oluşan MTT formazan, kuyunun dibinde siyah, ince kristaller olarak görüldü. 0.1 mL solüsyon C'den her kuyuya eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Solüsyon C'deki izopropanol, formazanı çözerek absorbans ölçümü için uygun homojen mavi bir solüsyon meydana gelmesini sağladı. Solüsyon C eklendikten sonra en fazla 1 saat içinde, 570 nm'de ELISA plak okuyucusunda plağın okuması yapıldı.

Sadece hücre (kontrol) veya ilaç uygulanmış kuyuların absorbans değerlerinden, hücre içermeyen kuyuların absorbans değerleri çıkartıldı. Yaşayan hücre yüzdesi; kontrol grubunun absorbans değerlerinin ilaçlarla

inkübe edilen hücrelerin absorbands değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % canlılık olarak ifade edildi. Deneyler altı kere tekrarlandı.

3.3. Akış Sitometrisi

Hücrelerin yüzeyinde sentez edilen TRAIL reseptör oranlarını belirleyebilmek için, TR-1, TR-2, TR-3, ve TR-4 reseptörlerine karşı, işaretlenmemiş monoklonal antikorlar içeren akış sitometrisi seti kullanıldı. İzotip kontrol olarak, saflaştırılmış fare IgG1 (MOPC 31C) antikor kullanıldı. Bunun için hücreler 50 000 hücre/kuyu olacak şekilde ayarlanarak hücreler kuyulara 100 µL (50 000 hücre) ekildi. Yapışmaları için 24 saat beklendi. 24 saat 37°C de yapılan inkübasyon sonrası, mikropalak'ta kullanılan medyumlar atılarak yenilendi. Kontrol, bleomisin, TRAIL ve bleomisin'nin TRAIL ile birlikte uygulandığı gruplara belirlenen dozlarda inkübasyonlar yapılarak deneye alındı. Bu gruplarda, her bir reseptör için bir reaksiyon tüpü ve bunların yanında boyanmamış bir kontrol ve bir izotip kontrol tüpü kullanıldı. Boyanmamış kontrol tüpüne herhangi bir antikor uygulaması yapılmadı. Primer antikorlarla 30 dakika buzda inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrası hücreler akış sitometri tamponu ile yıkandı ve ardından 2000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin hemen sonrasında, primer antikor ile muamele edilmiş olan hücreler, FITC ile işaretli sekonder antikor ile karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler yine akış sitometrisi tamponu ile yıkandı ve ardından 2000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Her bir tüp üzerine tampon eklenerek akış sitometrisi cihazında ölçümleri yapıldı.

3.4. Hücre Lizatlarında Kaspaz-3 Aktivitesinin Ölçümü

Kaspaz-3 aktivitesi ölçümleri ticari bir kit (Katalog no: KHZ0022. BioSource International, Inc.) ile yapıldı.

Prensip: Kaspaz-3, DEVD (asp-glu-val-asp) aminoasit sekansını tanır. DEVD-pNA (Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide) substratının kaspaz-3 tarafından kırılması sonucu açığa çıkan serbest pNA 405 nm'de absorbands artışına neden olur.

Reaktifler :

- 1) Hücre Lizis Tamponu (25 ml ya da 100 ml): Tris tamponlu serum fizyolojik içeren deterjan.
- 2) 2x Reaksiyon Tamponu (2 ml ya da 16 ml): Tamponlanmış salin, gliserol ve deterjan.
- 3) Substrat (125 µl ya da 1000 µl): DMSO içerisinde 4 mM pNA kromoforuna konjuge sentetik peptid (sekans: DEVD).
- 4) Dilüsyon Tamponu (25 ml ya da 200 ml): HEPES, Tris ve NaCl içeren tampon solüsyonu.
- 5) DTT (100 µl ya da 800 µl): 1 M ditiyotreitöl.

İşlemler: Hücrelerde apoptozis uyarıldıktan sonra hücreler sayılarak her örnek peletinde 4×10^5 ya da 1×10^6 hücre olacak şekilde ayarlandı. Kontrol hücrelerinde apoptozis uyarımı yapılmadı. Hücreler 20 μ L soğutulmuş lizis tamponu ile resuspanse edilerek 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Ardından $10,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Sitolitik ekstrakt olan süpernatant yeni tüpe aktarılarak buz üzerine alındı. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi. Her bir sitozolik ekstrakt her 50 μ L lizis tamponunda 0,2-1 mg/ml konsantrasyonunda protein olacak şekilde dilüe edildi. Ölçülen örneklerin sayısı belirlenerek her örneğe 10 mM DTT içeren 50 μ L 2x reaksiyon tamponu konuldu. 4 mM DEVD-pNA substratından 5 μ L eklenerek 37°C de ve karanlıkta 2 saat inkübasyona bırakıldı. 405 nm'de mikropalak okuyucuda okuma yapıldı.

Kaspaz-3 Aktivitesinin Hesaplanması: Kaspaz-3 aktivite seviyesindeki artış apoptozis uyarımının yapılmadığı kontrol hücrelerinin kaspaz-3 aktive seviyesi ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Sitotoksikite testinden elde edilen verilerin istatistiksel analizi Sigma Stat 2.03 programıyla yapıldı. Tek yönlü varyans analizini takiben gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Tukey testi ile değerlendirildi.

Kaspaz-3 deneylerinde grupların anlamlılığı kruskal wallis testi ile yapıldı. İkili karşılaştırmalar ise Man Whitney U testi ile yapıldı. İstatistiksel analiz için SPSS 17 programı kullanıldı.

3.6. Kullanılan Cihaz , Gereçler ve Kimyasal Maddeler

3.6.1. Cihaz ve Gereçler

Laminer flow	: Esco
CO ₂ inkübatörü	: Heraeus
İnverted mikroskop	: Leica
Santrifüj	: Eppendorf
Otomatik pipetör	: Gilson
pH metre	: İnolab
Hassas terazi	: Shimadzu
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph
Derin dondurucu	: Sanyo
Su banyosu	: Memmert
Buzdolabı	: Arçelik No-frost
Otomatik pipet	: 5-50, 20-200, 100-1000 μ l'lik Gilson
Cam pipet	: 1, 2, 5 ve 10 ml'lik
25 cm ² lik, 75 cm ² lik steril hücre doku kültürü flaskları	
Cam balon jojeler, beherler, erlen mayerler, huniler, mezürler	
Santrifüj tüpleri, deney tüpleri ve eppendorf tüpler	

3.6.2. Kimyasal Malzemeler

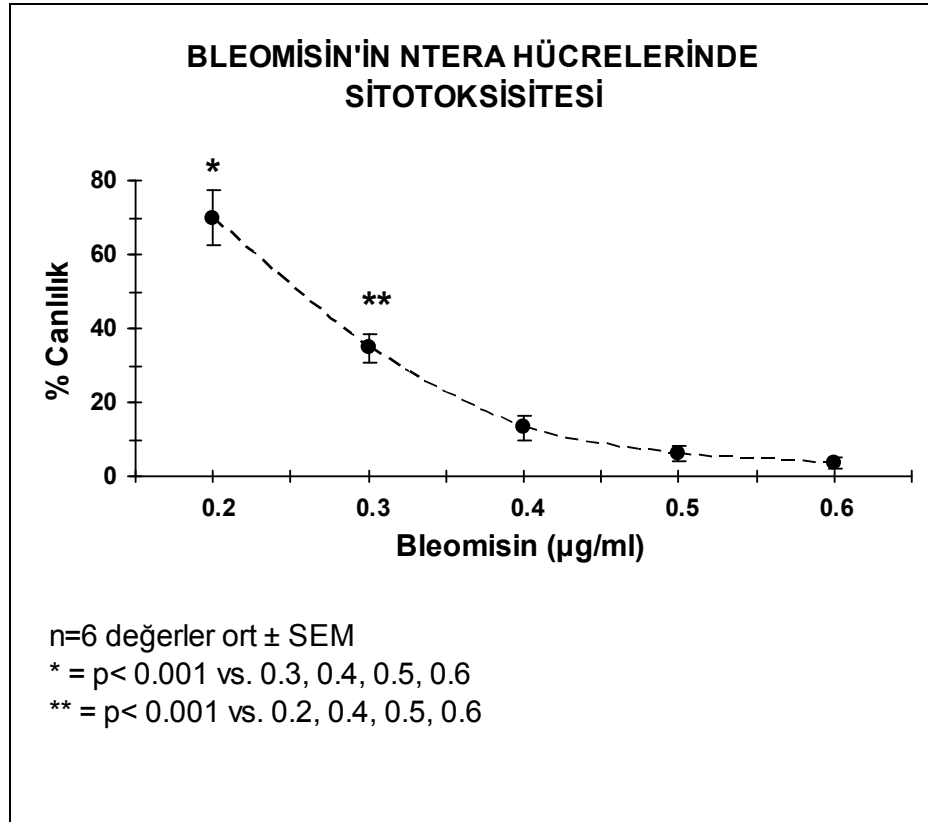
Tüm kimyasal maddeler "ATCC", "Sigma" ve "Biological Industries" den temin edildi.

BULGULAR

4.1. NTERA Hücrelerinde Bleomisin'in IC₅₀ Değeri

Bleomisin'in testis kanseri hücre dizilerindeki sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) deneyi ile belirlendi ve hücrelerin %50'sine sitotoksik olan konsantrasyonu (IC₅₀ değerini) bulundu. Bleomisin'in değişen konsantrasyonları ile hücreler inkübe edildi ve sitotoksisite testi ile hücrelerin %50'sini öldüren IC₅₀ değeri saptandı.

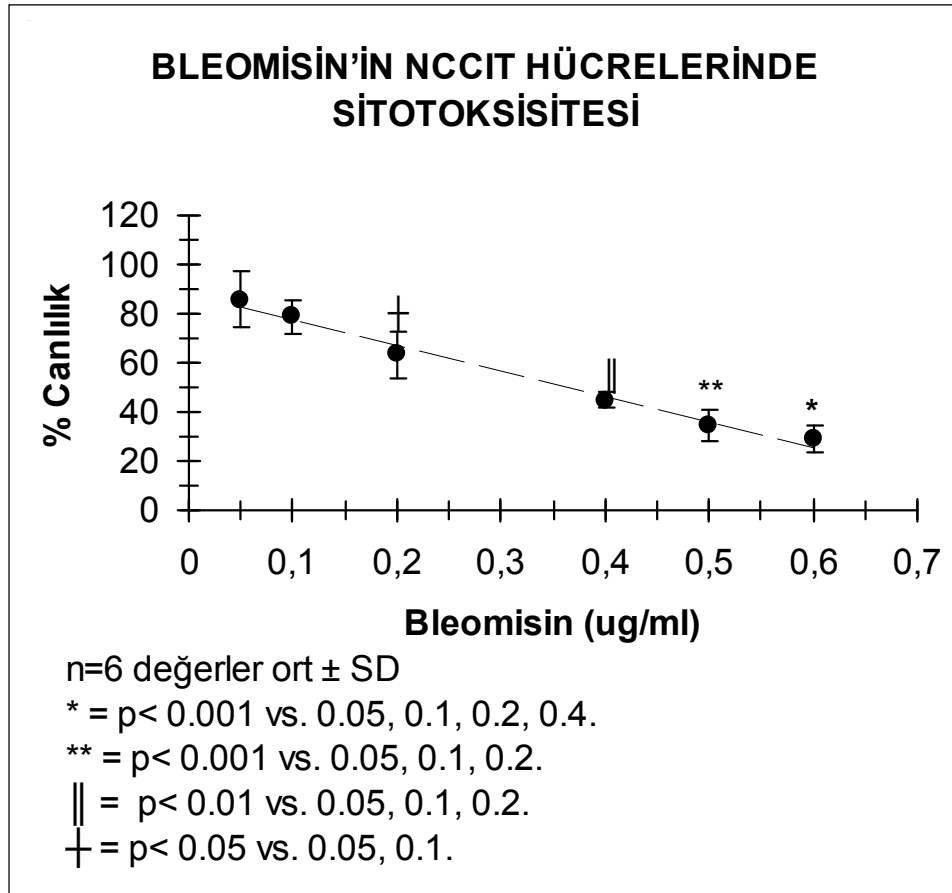
NTERA hücrelerinde bağımsız 6 deney yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alındı. NTERA hücrelerinde bleomisin'in 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 µg/ml dozları denendi. 0.2 µg/ml bleomisin dozu 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 µg/ml dozlarından; 0.3 µg/ml bleomisin dozu 0.2, 0.4, 0.5 ve 0.6 µg/ml dozlarından anlamlı olarak farklı bulundu (Şekil 4.1). Elde edilen değerlerle çizilen grafikten IC₅₀ değeri hesaplandı. NTERA hücreleri için bleomisin'in IC₅₀ dozu 0.25 µg/ml olarak bulundu.



Şekil 4.1. Farklı dozlardaki bleomisin'in NTERA hücrelerinde % canlılık üzerine etkisi.

4.2. NCCIT hücrelerinde Bleomisin'in IC₅₀ Değeri

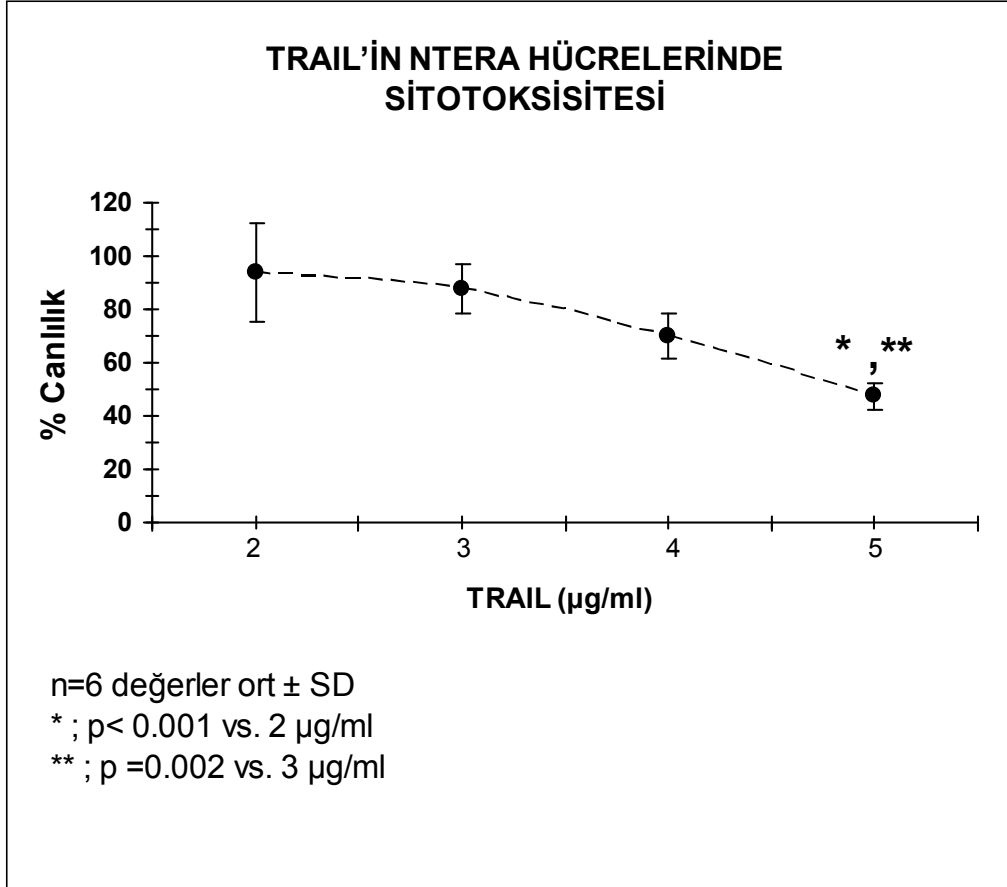
NCCIT hücrelerinde bağımsız 6 deney yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alındı. NCCIT hücrelerinde bleomisin'in 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 µg/ml dozları denendi. 0.2 µg/ml bleomisin dozu 0.05 ve 0.1 µg/ml dozlarından; 0.4 µg/ml bleomisin dozu 0.05, 0.1 ve 0.2 µg/ml dozlarından; 0.5 bleomisin dozu 0.05, 0.1 ve 0.2 µg/ml dozlarından, 0.6 bleomisin dozu 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 µg/ml dozlarından anlamlı olarak farklı bulundu (Şekil 4.2). Elde edilen değerlerle çizilen grafikten IC₅₀ değeri hesaplandı. NCCIT hücreleri için bleomisin'in IC₅₀ dozu 0,37 µg/ml olarak bulundu.



Şekil 4.2. Farklı dozlardaki bleomisin'in NCCIT hücrelerinde % canlılık üzerine etkisi.

4.3. NTERA Hücrelerinin TRAIL Hassasiyeti

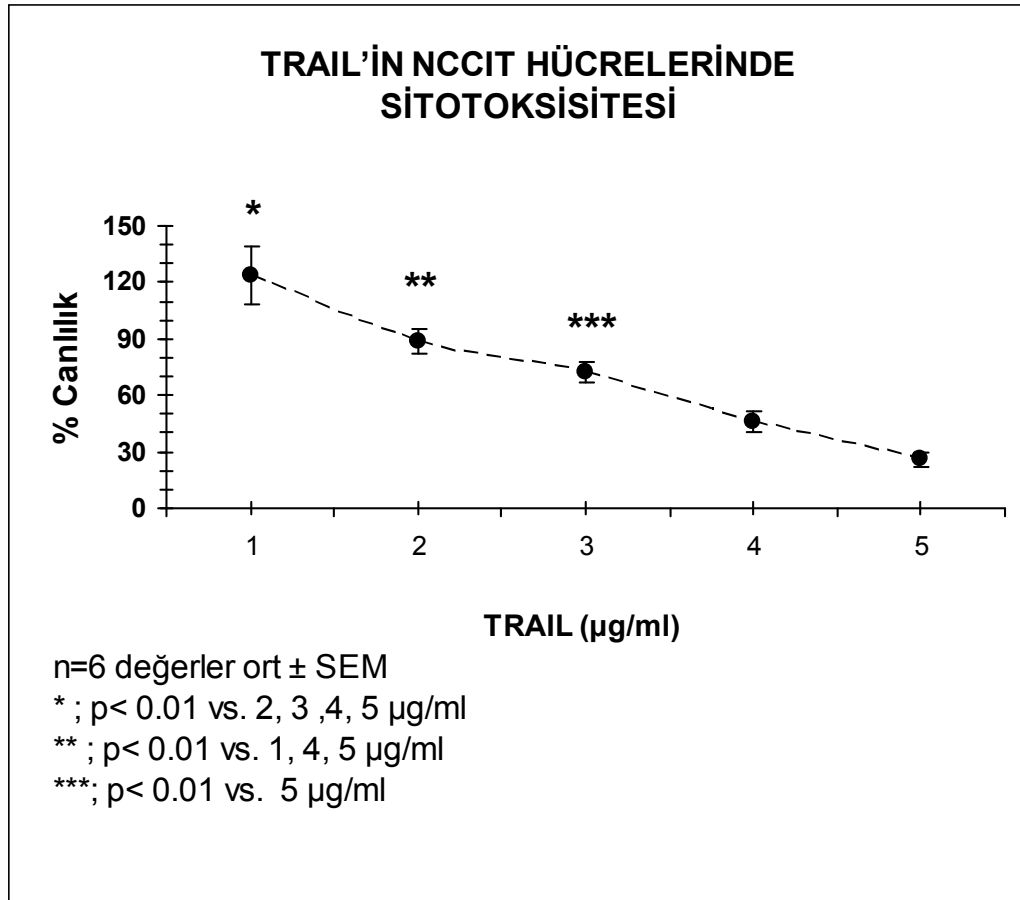
NTERA hücrelerinde TRAIL'in 1, 2, 3, 4, 5 µg/ml dozları denendi. Yaptığımız 6 deneyde NTERA hücrelerinde, TRAIL 2 µg/ml dozundan sonra hücreleri öldürmeye başladı. NTERA hücrelerinin %50'sini öldüren TRAIL dozu yaklaşık 5 µg/ml olarak bulundu. İstatistikleri yapılan veriler grafik şeklinde sunulmuştur (Şekil 4.3). 5 µg/ml TRAIL dozu 2 ve 3 µg/ml TRAIL dozlarından anlamlı ($p < 0.001$ ve $p = 0.002$) olarak farklıdır.



Şekil 4.3. Farklı dozlardaki TRAIL'in 72. saatte NTERA hücrelerinde % canlılık üzerine etkisi.

4.4. NCCIT Hücrelerinin TRAIL Hassasiyeti

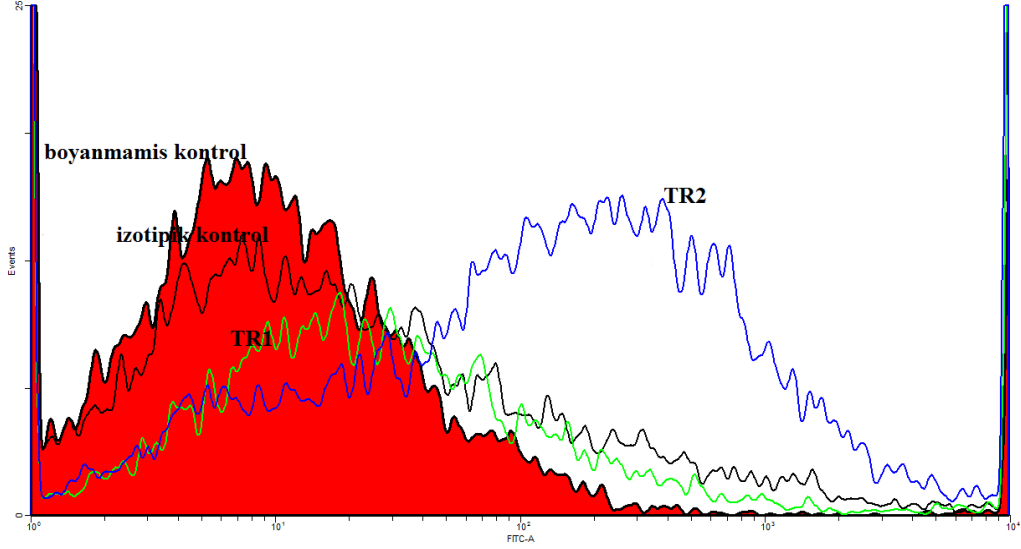
NCCIT hücrelerinde TRAIL'in 1, 2, 3, 4, 5 µg/ml dozları denendi. NCCIT hücrelerinde yaptığımız 6 deneyde 1 µg/ml dozundan sonra TRAIL hücreleri öldürmeye başladı. NCCIT hücrelerinin %50'sini öldüren TRAIL dozunu 4 µg/ml olarak bulundu. İstatistikleri yapılan veriler grafik şeklinde sunulmuştur (Şekil 4.4). 1 µg/ml TRAIL dozu 2, 3, 4 ve 5 µg/ml TRAIL dozlarından; 2 µg/ml TRAIL dozu 1, 4 ve 5 µg/ml TRAIL dozlarından; 3 µg/ml TRAIL dozu 5 µg/ml TRAIL dozundan anlamlı ($p < 0.01$) olarak farklıdır.



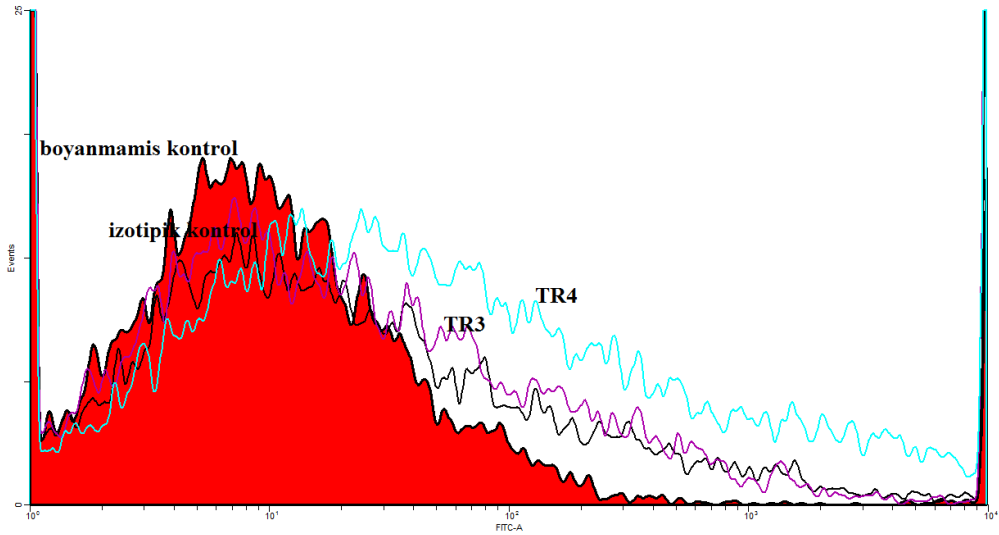
Şekil 4.4. Farklı dozlardaki TRAIL'in 72. saatte NCCIT hücrelerinde % canlılık üzerine etkisi.

4.5. NCCIT Hücrelerinin Bazal Reseptör Seviyeleri

Deney sonuçlarına göre, bu hücrelerde TRAIL ölüm reseptörü TR-2 ve yalancı reseptör TR-4 belirgin oranda sentezlenmektedir. Diğer ölüm reseptörü olan TR-1 ve yalancı reseptör TR-3 ekspresyonu ise yok denecek kadar azdır (Şekil 4.5 ve 4.6). Ekspresyonu en yüksek olan reseptör, TR-2 ölüm reseptörüdür. Bunu takiben, TR-4 yalancı reseptör ekspresyonu gelmektedir.



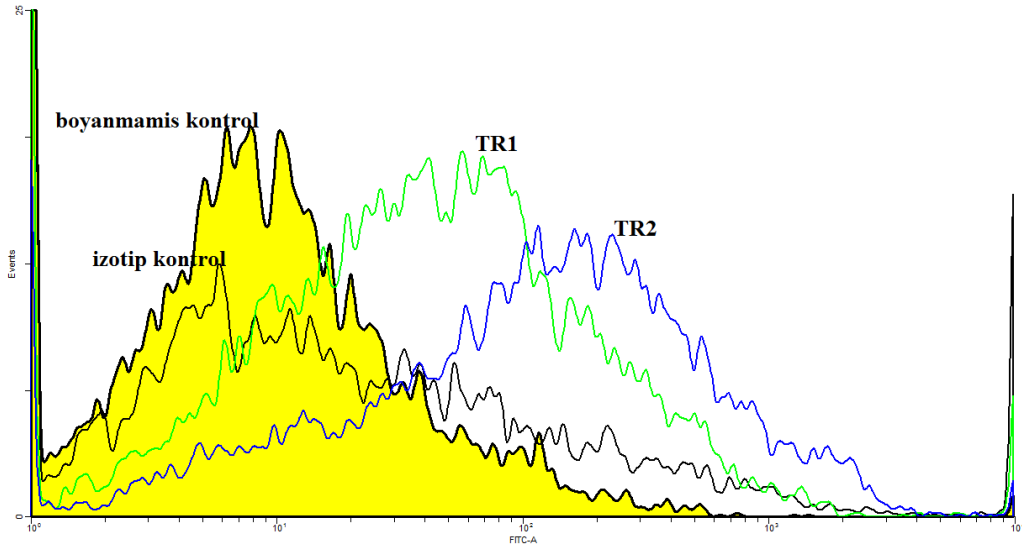
Şekil 4.5. NCCIT hücrelerinin bazal TR-1 ve TR-2 reseptör seviyeleri



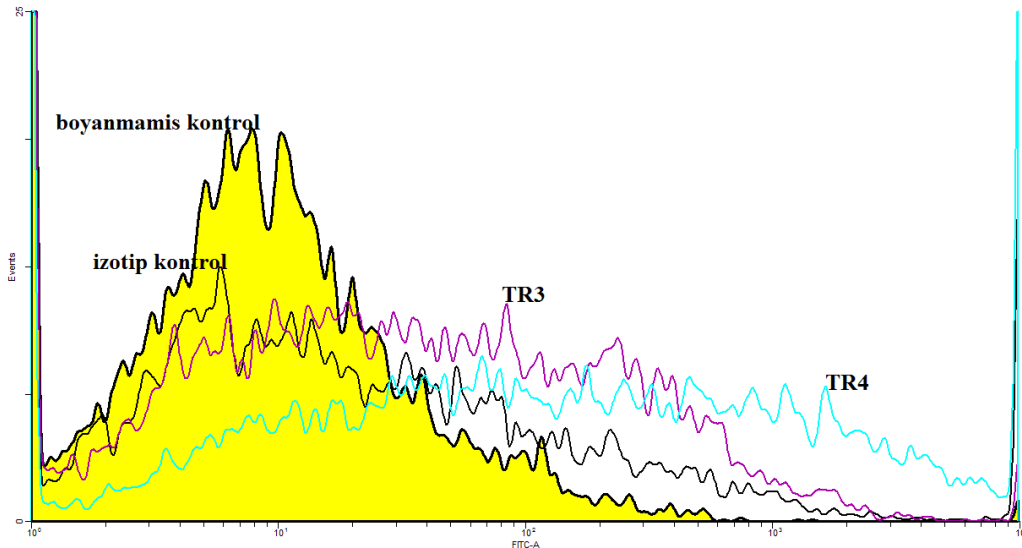
Şekil 4.6. NCCIT hücrelerinin bazal TR-3 ve TR-4 reseptör seviyeleri

4.6. NCCIT Hücrelerinde Bleomisin'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi

NCCIT hücrelerinde bleomisin uygulanmasından 24, 48 ve 72 saat sonra TRAIL reseptör kompozisyonu incelenmiştir. Bleomisin uygulanmasından 24 saat sonra ölüm reseptörü olan TR-1 reseptörü bazal seviyeye göre anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 4.7). 48. ve 72. saatlerde ise bu artış gözlenmemiştir. TR-2, TR-3 ve TR-4 reseptörleri ise 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol hücreleri ile aynı düzeyde bulunmuştur (Şekil 4.7 ve 4.8).



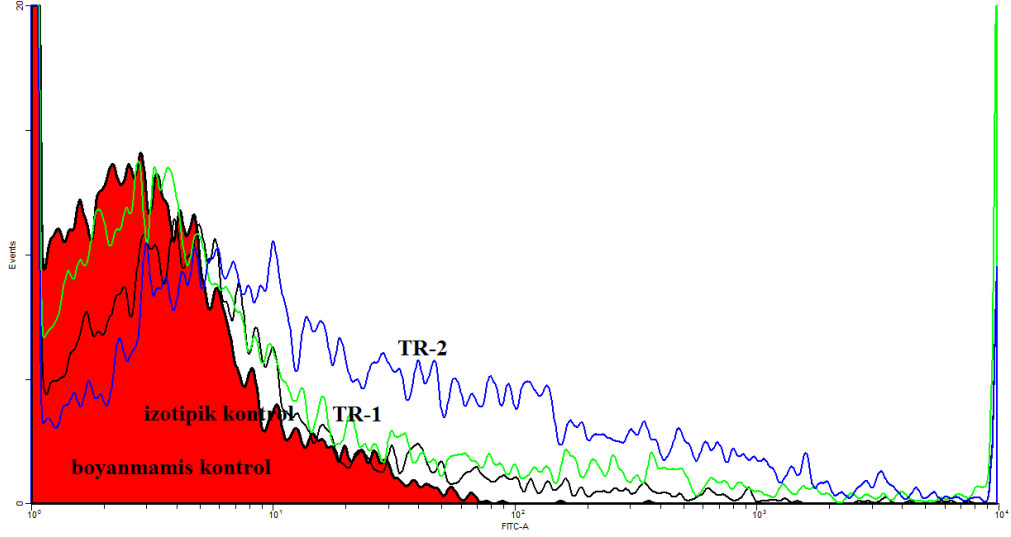
Şekil 4.7. NCCIT hücrelerinde bleomisin'in 24. saatte TR-1 ve TR-2 reseptörleri üzerine etkisi



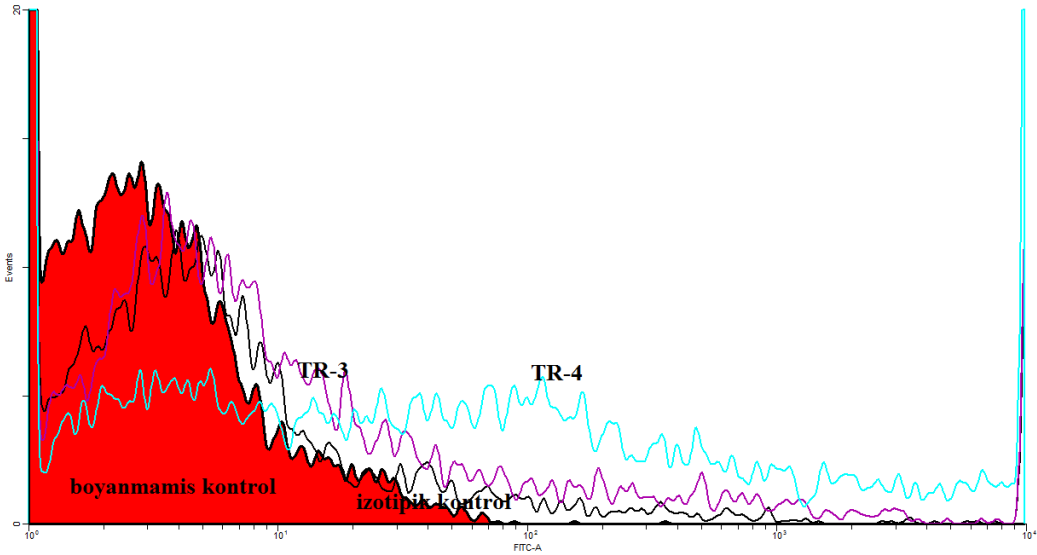
Şekil 4.8. NCCIT hücrelerinde bleomisin'in 24. saatte TR-3 ve TR-4 reseptörleri üzerine etkisi

4.7. NCCIT Hücrelerinde Bleomisin ve TRAIL'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi

NCCIT hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonra bleomisin ve TRAIL'in birlikte uygulanması ile TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 reseptörleri kontrol hücreleri ile aynı düzeyde bulunmuştur (Şekil 4.9 ve 4.10).



Şekil 4.9. NCCIT hücrelerinde bleomisin ve TRAIL'in 24. saatte TR-1 ve TR-2 reseptörleri üzerine etkisi.



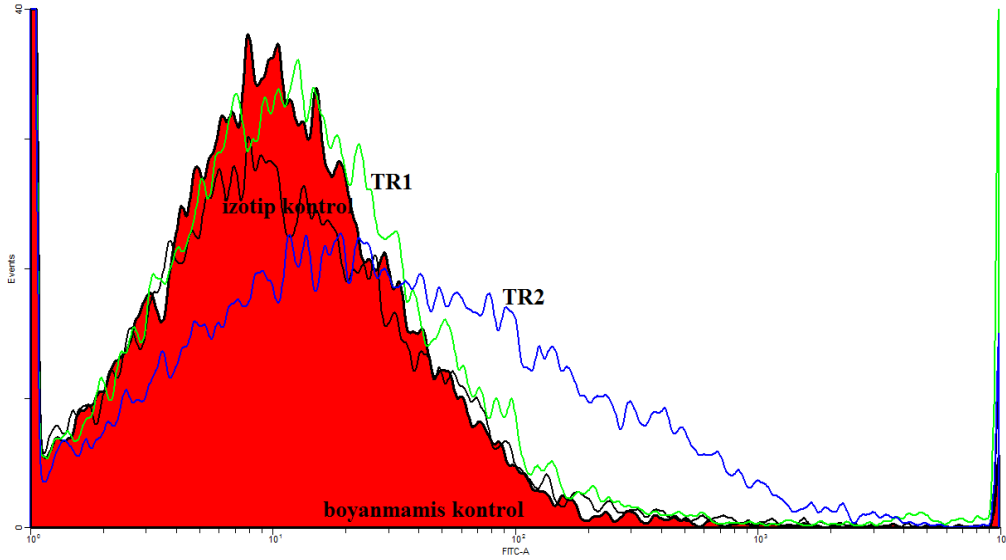
Şekil 4.10. NCCIT hücrelerinde bleomisin ve TRAIL'in 24. saatte TR-3 ve TR-4 reseptörleri üzerine etkisi.

4.8. NCCIT Hücreslerinde TRAIL'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi

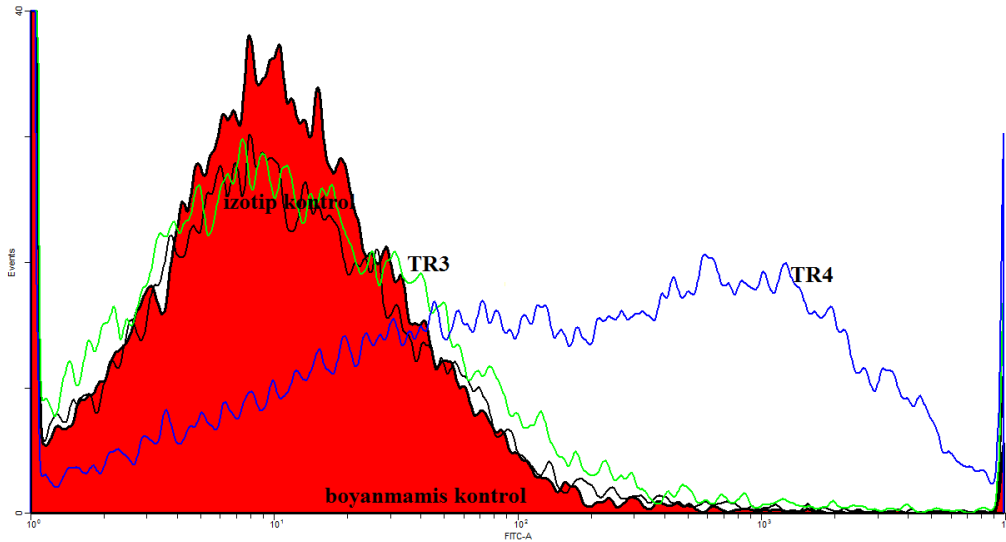
NCCIT hücrelerinde TRAIL uygulanmasından 24, 48 ve 72 saat sonra TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 reseptörleri kontrol hücreleri ile aynı düzeyde bulunmuştur (Şekiller gösterilmemiştir).

4.9. NTERA Hücrelerinde TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4'ün Bazal Reseptör Seviyeleri

NTERA hücrelerinde TRAIL ölüm reseptörü TR-2 ve yalancı reseptör TR-4 sentezlenmektedir. Diğer ölüm reseptörü olan TR-1 ve yalancı reseptör TR-3 ekspresyonu ise yok denecek kadar azdır (Şekil 4.11 ve 4.12). Ekspresyonu en yüksek olan reseptör, TR-4 reseptörüdür. Bunu takiben, TR-2 reseptör ekspresyonu gelmektedir.



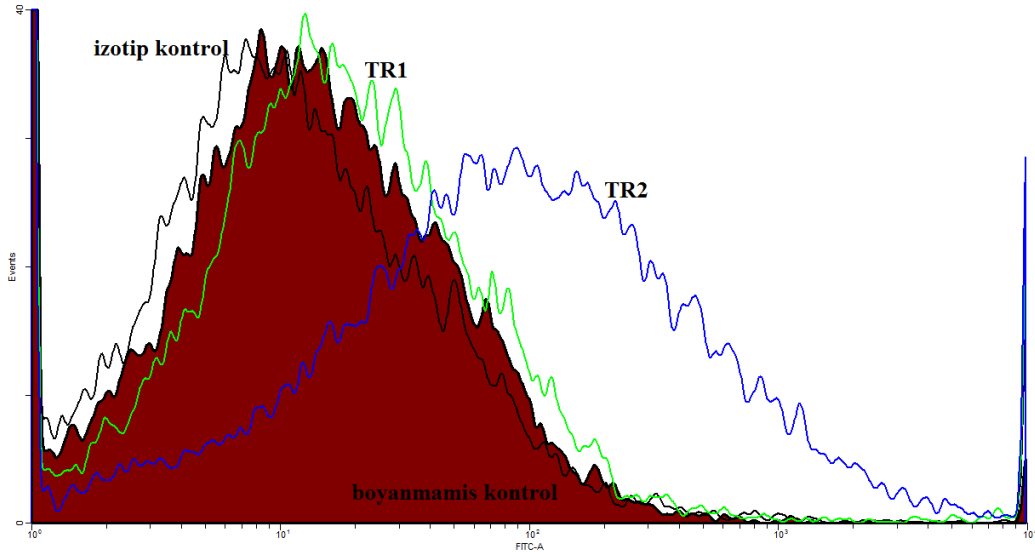
Şekil 4.11. NTERA hücrelerinin bazal TR-1 ve TR-2 reseptör seviyeleri



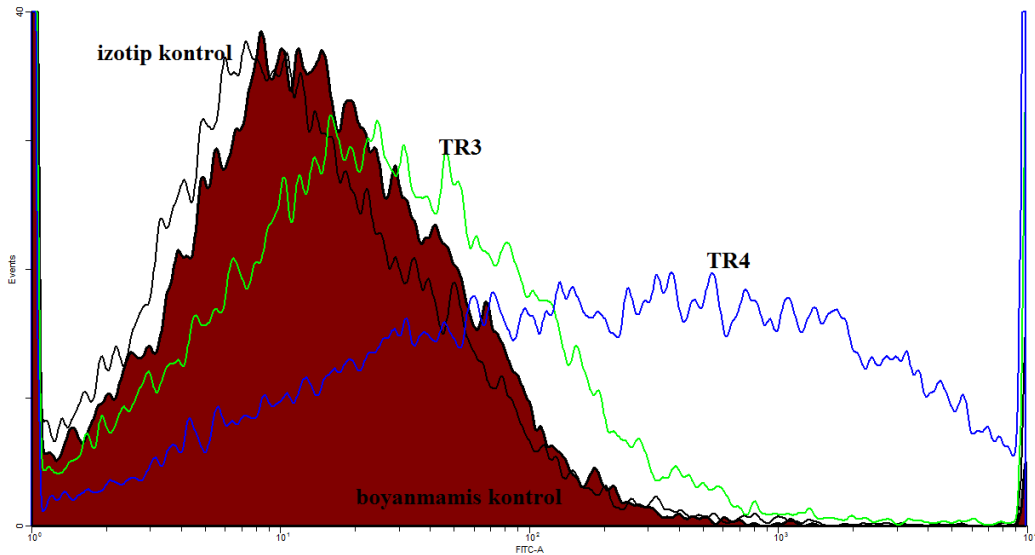
Şekil 4.12. NTERA hücrelerinin bazal TR-3 ve TR-4 reseptör seviyeleri

4.10. NTERA Hücrelerinde Bleomisin'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi

NTERA hücrelerinde bleomisin uygulanmasından 24, 48 ve 72 saat sonra TRAIL reseptör kompozisyonu incelenmiştir. Bulgularımıza göre, NTERA hücrelerinde bleomisin uygulanmasından 72 saat sonra TRAIL ölüm reseptörü olan TR-2 reseptörü bazal seviyeye göre anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 4.13). TR-2, TR-3 ve TR-4 reseptörleri ise kontrol hücreleri ile aynı düzeyde bulunmuştur (Şekil 4.13 ve 4.14).



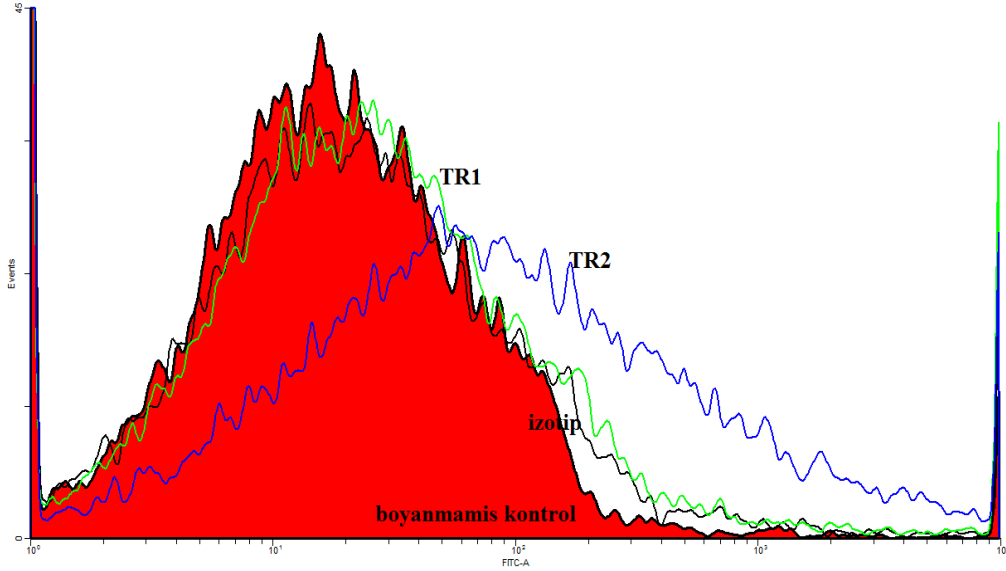
Şekil 4.13. NTERA hücrelerinde bleomisin'in 72. saatte TR-1 ve TR-2 reseptörleri üzerine etkisi.



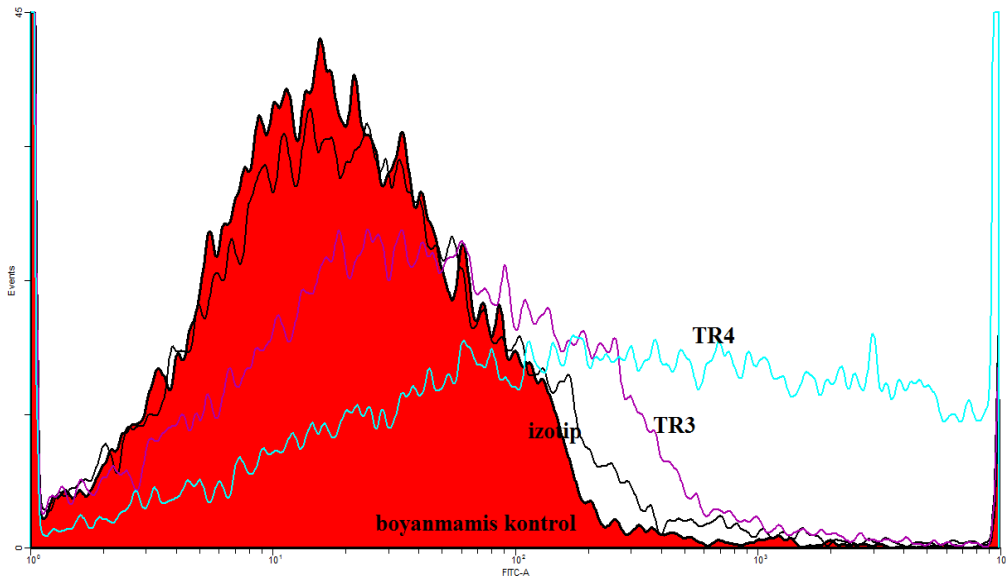
Şekil 4.14. NTERA hücrelerinde bleomisin'in 72. saatte TR-3 ve TR-4 reseptörleri üzerine etkisi.

4.11. NTERA Hücrelerinde Bleomisin ve TRAIL'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi

NTERA hücrelerinde 72 saat sonra bleomisin ve TRAIL'in birlikte uygulanması ile bleomisin'in tek başına uygulanması TR-2 reseptörü üzerinde aynı düzeyde etki göstermektedir. TRAIL ölüm reseptörü TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 reseptörleri kontrol hücreleri ile aynı düzeyde bulunmuştur (Şekil 4.15 ve 4.16).



Şekil 4.15. NTERA hücrelerinde bleomisin ve TRAIL'in 72. saatte TR-1 ve TR-2 reseptörleri üzerine etkisi.



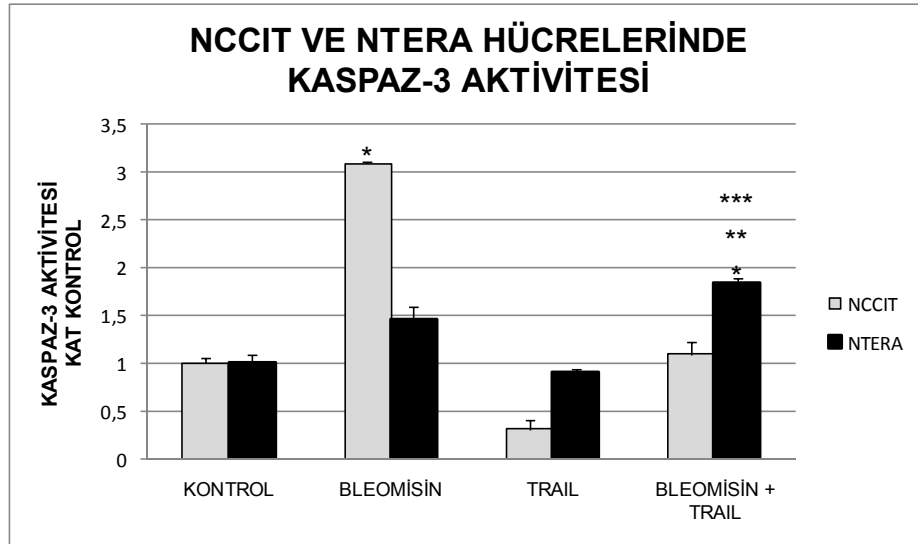
Şekil 4.16. NTERA hücrelerinde bleomisin ve TRAIL'in 72. saatte TR-3 ve TR-4 reseptörleri üzerine etkisi.

4.12. NTERA Hücrelerinde TRAIL'in TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 Reseptör Seviyeleri Üzerine Etkisi

NTERA hücrelerinde TRAIL uygulanmasından 24, 48 ve 72 saat sonra TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 reseptörleri kontrol hücreleri ile aynı düzeyde bulunmuştur (Şekiller gösterilmemiştir).

4.13. NTERA ve NCCIT Hücrelerinde Kaspaz 3 Düzeyleri

NCCIT hücrelerinde bleomisin uygulanan grubun kaspaz-3 düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığını bulduk. TRAIL ya da bleomisin ile TRAIL grubunda bir artış gözlenmedi. NTERA hücrelerinde ise kontrole göre bleomisin uygulanan grupta artış gözlenirken TRAIL uygulanan grupta kontrole göre büyük bir artış gözlenmemektedir. Ancak TRAIL ve bleomisin'in birlikte uygulanması kaspaz-3 seviyelerinde belirgin bir artışa yol açmıştır.



Şekil 4.17. NCCIT ve NTERA hücrelerinde kaspaz-3 düzeyleri

n=6 değerler ort ± SEM

* p<0.01 kontrol ile karşılaştırıldığında

** p<0.05 bleomisin grubu ile karşılaştırıldığında

*** p<0.01 TRAIL grubu ile karşılaştırıldığında

TARTIŞMA

Testis kanseri 15-35 yaşları arasındaki erkeklerde en sık görülen kanserdir ve erkeklerde görülen tümörlerin %1'ini oluşturmaktadır [1, 3]. Testis kanseri geçmişte ölüme neden olan bir hastalık olarak bilinirken, günümüzde testis kanser hastalarının %80'inden fazlası tedavi edilebilmektedir. Erken evredeki hastalarda ise tedavi oranı %100'e ulaşmaktadır [2, 3]. Tedavi edilen testis kanserli hastaların, tedavi sonrası beklenen sağlıklı yaşam süreleri, oldukça uzundur [32].

Bleomisin, etoposid, ve sisplatin (BEP) kombinasyonu, metastatik non-seminomatöz tümörlerde tercih edilen en etkili tedavi kürüdür [7]. Testis kanserinde, anti-kanser ilaçlar, genellikle hastalığın vücudun başka kısımlarına metastaz yapması durumlarında tercih edilirler. Bu ilaçlar bazen tümörün cerrahi girişim öncesine kadar küçülmesini sağlamak amacıyla ve 1.evre testis tümörü için uygulanan orşiektomi sonrasında tümör dokusunda saptanan vasküler invazyonun yaratabileceği yüksek nüks ihtimali için de kullanılabilir [7, 28]. Bleomisin gibi kanser tedavisinde kullanılan ilaçların birçok yan etkisi vardır. Bleomisin'in uygulanması bazen ölümcül yan etkiler meydana getirebilmektedir. Bleomisin'i inaktive eden bir enzim olan bleomisin hidrolazın eksikliğinden dolayı ortaya çıkan bleomisin indüklü toksisite, başlıca akciğer ve deride oluşur [9].

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, testis kanserinin tedavisinde de, mevcut yöntemlerin seçiciliğinin artırılması ve terapötik etkinin mümkün olduğunca en yüksek düzeye getirilmesi hedeflenmektedir. Bu amaca uygun olarak kullanımı gündemde olan en önemli moleküllerden biri TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)'dır. TRAIL, 1990'ların ortalarında TNF ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır [45]. FasL ve TNF- α 'dan farklı olarak, TRAIL'in normal hücrelere etki etmeksizin kanser hücrelerini apoptozise uğratması yeni tedaviler için umut vericidir. TRAIL gibi sadece kanser hücrelerine zarar veren bir ajanın kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanılması tedavinin etkinliğini artırarak, bu ilaçların dozunun azaltılması açısından yeni bir tedavi stratejisi olabilir. Kullanılan kemoterapötik ilaçların hastada oluşturduğu yan etkilerden dolayı en azından bu ilaçların dozunun azaltılması hastanın yaşam kalitesini yükseltebilir. Literatürde tedavi etkinliğini arttırmak ve kanser hücrelerinin TRAIL'e direncini kırmak amacıyla kemoterapötiklerle TRAIL'in birlikte kullanımının hem in vitro hem de in vivo olarak apoptozisi arttırdığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda in vitro ve in vivo olarak bir çok kanserde çeşitli kanser ilaçlarının TRAIL ile birlikte apoptozisi tetiklediği, tümör büyümesini durdurduğu, hatta geriletmediği gösterilmiştir [102, 103]. Testis kanseri hücrelerinde, daha önce TRAIL ya da reseptörleri ile yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. NTERA ve NCCIT hücrelerinde testis kanserinin tedavisinde kullanılan bleomisin'in, TRAIL ile birlikte kullanımının apoptozisi arttırıp arttırmadığını bildiren in vitro ya da in vivo bir çalışma bulunmamaktadır. Bu kapsamda, çalışmamızda testis kanseri hücre

dizilerinde TRAIL ve bleomisin'in tek başına ya da birlikte apoptozis ve TRAIL reseptörleri üzerine etkisini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızın yürütülmesi için NTERA ve NCCIT hücre dizilerini seçtik. Her iki hücre hattı da, malign non-seminomatöz germ hücre tümörlerinden köken alır. İki hücre hattında da, TRAIL ve bleomisin'in toksik etkileri üzerine çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra, NCCIT hücreleri p53 mutant iken, NTERA hücreleri fonksiyonel p53 bulunduran hücrelerdir [104]. Hücrelerin bu özelliklerinin, yapmış olduğumuz deneylerde gözleyeceğimiz olası değişimlerin p53 ile ilişkili olup olmadığı konusunda fikir vermesi açısından önemli olacağını düşündük.

TRAIL'in sadece kanser hücrelerinde etkili olan, normal hücrelerde etkili olmayan seçici apoptotik etkisi bilinmektedir. Ancak, yapılan çalışmalarda, bazı kanser hücrelerinin de TRAIL'a dirençli olabildiği görülmüştür. Testis kanserinde daha önce TRAIL ile ilişkili çalışma yapılmadığından, testis kanser hücrelerinin TRAIL'e duyarlı olup olmadığı, duyarlı iseler hangi dozlarda hassasiyet gösterecekleri bilinmiyordu. Literatürde prostat, meme kanser hücre dizileri gibi farklı hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda kullanılan dozlara benzer olarak, çalışmalarımızda 1 ng/ml, 10 ng/ml, ve 100 ng/ml TRAIL dozlarını denedik. Ancak belirlenen dozlardaki TRAIL, NCCIT ve NTERA hücre dizilerinde sitotoksik etki göstermedi. Bu nedenle daha yüksek dozların denenmesine karar vererek 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, ve 5 µg/ml dozlarını seçtik. TRAIL sitotoksitesini MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) testi ile belirledik. NTERA hücrelerinin %50'sini öldüren TRAIL dozunu 5 µg/ml, NCCIT hücrelerinin %50'sini öldüren TRAIL dozunu ise 4 µg/ml olarak bulduk. Yaklaşık %70 canlılık dozunu ise NCCIT için 3 µg/ml, NTERA hücreleri içinse 4 µg/ml olarak belirledik. Bu dozlar, literatürde bildirilen yaklaşık 100 ng/ml'lik dozdan çok daha yüksektir [12, 105, 106]. Ayrıca kullanılan 100 ng/ml dozu literatürde 6, 24 ya da 48 saat için kullanılmıştır. 72 saatte yapılan bir çalışmada ise TRAIL dozu 50 ng/ml olarak kullanılmıştır [107]. Çalışmalarda, kullanılan hücrelerde 24 saatte 100 ng/ml dozlarında TRAIL kullanıldığında hücre canlılığında azalma olmuyorsa bu hücreler TRAIL'a dirençli olarak ifade edilmiştir [108]. Çalışmamızda bulduğumuz NCCIT hücreleri için 3 µg/ml, NTERA hücreleri içinse 4 µg/ml dozlarının, literatürde TRAIL'a duyarlılığın gözlemlendiği dozlardan çok yüksek olması, NCCIT ve NTERA hücrelerinin TRAIL'a çok dirençli hücre dizileri olduğunu göstermiştir.

TRAIL molekülünün, apoptotik etkisini proapoptotik reseptörler olan TRAIL-R1/DR4 (TR-1) ve TRAIL-R2/DR5 (TR-2) reseptörlerine bağlanarak gösterdiği bilinmektedir. Ancak aynı molekülün hücre ölümüne yol açmayan, fonksiyonel olmayan, ölüm birimi taşımayan çözülebilir reseptör osteoprotegerine (OPG) ya da yalancı reseptörler olan TRAIL-R3/DcR1 ve TRAIL-R4/DcR2'ye bağlanmasının apoptozise yol açmadığı görülmüştür [13, 14]. Hücrelerde ifade edilen bazal TRAIL reseptör oranları hücre tipine göre değişir. Reseptör ekspresyon oranlarının, hücrelerde TRAIL duyarlılığını

etkileyebildiği bilinmektedir. Deney sonuçlarımıza göre, NCCIT hücrelerinde TRAIL ölüm reseptörü TR-2 ve yalancı reseptör TR-4 belirgin oranda sentezlenmektedir. Diğer ölüm reseptörü olan TR-1 ve yalancı reseptör TR-3 ekspresyonu ise yok denecek kadar azdır. Ekspresyonu en yüksek olan reseptör, TR-2 ölüm reseptörü olarak bulunurken, bunu TR-4 yalancı reseptörü takip etmektedir. NTERA hücrelerinde de benzer bir şekilde, TR-2 ve TR-4 ekspresyonlarının varlığı çalışmamızda belirgin bir şekilde ortaya konabilirken, TR-1 ve TR-3 reseptörlerinin ekspresyonu akış sitometrisi ile yapılan deneylerde gözlenmemiştir.

Kanser hücrelerinin ve bunun yanı sıra normal hücrelerin de TRAIL'a dirençliliğinin farklı sebepleri olabildiği bilinmektedir. Bu dirençlilik, farklı TRAIL reseptör sentez oranlarına bağlı olabileceği gibi, hücre içi anti-apoptotik moleküllerin yüksek sentez oranlarına da bağlı olabilir [109-112]. Ancak reseptör oranlarının bu dirençlilikteki rolünün oldukça önemli olduğu bilinmektedir, çünkü bu reseptörlerin kendileri de hücre içi antiapoptotik yolları tetikleyebilmektedir. Ayrıca, hücre yüzeyinde özellikle TR-3 ve TR-4 gibi yalancı reseptör sentezinin, dirençlilikte özellikle önemli olduğu gösterilmiştir [113].

Kemoterapötik ilaçlar ya da radyasyonun hem in vitro hem de in vivo olarak TRAIL indüklü apoptozisi arttırdığı yapılan bir çok çalışmada bildirilmiştir [114-116]. Bleomisin, testis kanserin tedavisinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapötiktir. DNA'ya direk bağlanarak tek ve çift zincir kırılmalarına yol açar ve büyüyen hücrelerde apoptozisi tetikler [8]. Çalışmamızda bleomisin'in testis kanseri hücre dizilerindeki sitotoksik etkisini MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) deneyi ile belirledik ve hücrelerin %50'sine sitotoksik olan konsantrasyonunu (IC_{50} değeri) bulduk. NTERA hücrelerini 0.2-0.6 $\mu\text{g/ml}$, NCCIT hücrelerini ise 0.1-0.7 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişen bleomisin konsantrasyonları ile inkübe ederek sitotoksikite testi ile hücrelerin %50'sini öldüren IC_{50} değerini saptadık. NTERA hücreleri için bleomisin'in IC_{50} dozunu 0.25 $\mu\text{g/ml}$, NCCIT hücreleri için bleomisin'in IC_{50} dozunu 0.37 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulduk. NCCIT hücrelerinin, NTERA hücrelerine göre bleomisin'e daha dirençli olduğunu gözledik. Deneylerde kullanılmak üzere seçilen dozu, TRAIL ve bleomisin birlikte uygulandığında hücrelerin tamamını öldürmemesi için yaklaşık %70 sitotoksik etki gösteren doz olarak düşündük. 0.2 $\mu\text{g/ml}$ bleomisin dozunu tüm deneylerde her iki hücre dizisi için de uyguladık. 2009 yılında yapılan bir çalışmada bleomisin ve TRAIL'ın karaciğer kanseri hücrelerinde reseptörler üzerine etkisi incelenmiş ve bleomisin dozu 3 $\mu\text{g/ml}$ kullanılmıştır [117]. Bizim dozumuz bu dozun çok altındadır. Bu farklılık çalıştığımız hücre dizilerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Bleomisin'in klinik dozu 1.5-3 $\mu\text{g/ml}$ dir [117, 118]. Bizim uygulamış olduğumuz doz, klinik dozun da altındadır.

Kemoterapötiklerin tümör hücrelerinin TRAIL'e duyarlılığını arttırmasının, moleküler düzeyde TR-1 ve/veya TR-2 reseptör ekspresyonlarında meydana gelen artışa bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu reseptörler Bcl-2, Bcl-XL veya FLIP gibi antiapoptotik moleküllerin azalmasını

ya da Bak, kaspazlar veya FADD gibi proapoptotik moleküllerin artmasını sağlar [119]. Multiple myeloma hücre dizilerinde doksorubisin ile ön muamelenin TRAIL'in apoptotik etkisini arttırdığı, bu etkinin de TR-2 ekspresyonunda artış ile gerçekleştiği gösterilmiştir [120]. Prostat kanser hücre dizilerinde paklitaksel, vinkristin, vinblastin, etoposid, doksorubisin ve kamptotesinin, TR-1, TR-2, Bax ve Bak düzeylerini arttırarak ve kaspaz aktivasyonunu tetikleyerek apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir. Mitokondriyal yolağın da, bu ilaçlar ve TRAIL arasındaki sinerjistik etkiyi arttırdığı belirtilmiştir. İn vivo çalışmalarla da, multiple myeloma fare modellerinde ilaç ve TRAIL'in birlikte kullanımının apoptozisi ve yaşam süresini arttırdığı bildirilmiştir [121].

Kemoterapötik ilaçların TRAIL'in apoptotik etkisini artırıcı özelliğinin anlaşılmasına yönelik bir başka çalışmada, glioma hücrelerinin TR-2 reseptörünü eksprese ettiği ve topotekan uygulanması ile, bu reseptörün ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur [122]. DeJozet et. al. tarafından da, TRAIL'e dirençli renal kanser hücre dizilerinde topotekan'ın TR-2 düzeylerini yükselterek TRAIL indüklü apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir [12]. Prostat kanser hücrelerinde (PC-3, DU-145, LNCap) paklitaksel ve taksoter'in TR-1 ve TR-2 düzeyini arttırarak TRAIL indüklü apoptozisi arttırdığı bildirilmiştir. Paklitaksel ve TRAIL'in birlikte uygulanması sitozolik sitokrom c, kaspaz-8 ve kaspaz-10 düzeylerini arttırmıştır [123].

Kim et. al., TRAIL'e dirençli ve duyarlı hücre dizilerinde yapmış oldukları çalışmalarda TRAIL'e dirençli TR-2 veya FLIP düzeyleri ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, doksorubisinin, TRAIL'e dirençli hücreleri TR-2 reseptör seviyelerini arttırarak TRAIL indüklü apoptozise hassaslaştırdığını göstermişlerdir. TRAIL'e duyarlı hücrelerde kaspaz-8, -9 ve -3 aktivitesi gözlenmiştir. Doksorubisin ve TRAIL uygulanmış dirençli hücrelerde de kaspaz aktivasyonları gözlenirken doksorubisin ve TRAIL tek başına uygulandığında kaspaz aktivasyonları gözlenmemiştir [124]. Farklı evrelerdeki over kanseri hastalarından alınan dokularda gerçekleştirilen bir çalışmada ise, sisplatin ya da karboplatin kullanılarak uygulanan kemoterapinin öncesi ve sonrasında TR-1, TR-3 ve TRAIL miktarları değişmezken, TR-2 seviyelerinin kemoterapi sonrasında yükseldiği gözlenmiştir [125].

Bir başka çalışmada Gibson et. al. insan embriyonik böbrek hücre dizileri olan HEK 293 ve T47D'de ve meme kanseri hücre dizisi olan MDA-MD-468 hücrelerinde etoposid ve TRAIL'in birlikte kullanımının apoptozisi arttırdığını bildirmiştir. TR-1 antikoru (TR-1:Fc) ile TR-1 ve TR-2'in engellenmesi ile etoposid indüklü apoptozisin önüne geçilebilmiştir. Bu durum, TRAIL duyarlılığında TR-1 ve TR-2'in önemini vurgulamaktadır [97]. Griffith et. al. yapmış oldukları çalışmalarında kemoterapötik ilaçların, TRAIL'e dirençli DU145 prostat kanser hücrelerinde apoptozisi arttırdığını göstermişlerdir. TRAIL indüklü apoptozisteki artışın TR-1 ve TR-2 düzeylerindeki artışa ya da antiapoptotik bir protein olan survivin'in hücre içinde azalmasına bağlı olarak meydana geldiğini göstermişlerdir [126].

Bu çalışmaların yanında, TRAIL ligandının kendisinin de ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu arttırıcı etkisi olabileceğini bildiren çalışmalar yayınlanmıştır. Örneğin Shetty et. al. tarafından 2002 yılında, TRAIL aracılı NF-kB aktivasyonunun epitel kökenli hücrelerde TR-2 ekspresyonunu arttırarak TRAIL'in apoptotik etkisini güçlendirdiği gösterilmiştir. Çalışmada insan embriyonik böbrek hücre dizisi HEK 293 ve meme hücre hatları MCF-7 ile MDA-MB-231 kullanılmış ve NF-kB blokasyonunun, TRAIL'in indüklediği TR-2 ekspresyon artışını inhibe ettiği belirtilmiştir [127]. 2009 yılında yapılan başka bir çalışmada bleomisin'in hem ekstrinsik hem de intrinsik yolakla apoptozisi arttırdığını göstermişlerdir. Kemoterapinin uygulanmasından sonra kaspaz-2, -3, -6, -8 ve -9 artmıştır. Bleomisin uygulanması sonucu TRAIL reseptörlerinin de arttığı ve bu reseptörlerin antikör ile engellenmesinin bleomisin indüklü apoptozisi azalttığı gösterilmiştir [117].

Yukarıda sıralanan çalışmaların ışığında biz de çalışmamızda, öncelikle bleomisin, TRAIL, veya bleomisin ile TRAIL'in birlikte uygulanmasının, NCCIT ve NTERA hücrelerinde belirlemiş olduğumuz bazal reseptör ekspresyon seviyelerinde bir değişiklik yapıp yapmadığına baktık. Akış sitometrisinde yapılan deneyler sonucunda, NCCIT hücrelerinde bleomisin uygulaması ile 24. saatte TR-1 reseptör seviyelerinde artış olduğunu gözlemledik (Şekil 4.7). NTERA hücrelerinde ise, aynı etkiyi yine bleomisin uygulamasının 24. saatinden itibaren 48 ve 72. saatlerde TR-2 reseptör seviyelerinde gözledik (Şekil 4.13). En fazla etki 72. saatte gözlemlendi. Bunun yanında, TRAIL uygulamasının bu hücre dizilerinde ölüm reseptör ekspresyonlarını arttırıcı etki göstermediğini bulduk (şekil verilmemiştir). TRAIL ve bleomisin'in birlikte uygulamasının önemli bir etkisinin olmadığını gördük (Şekil 4.9 ve 4.15). Bu durumda bleomisin'in testisin germ hücre kökenli kanserinde TRAIL ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu arttırıcı etkisinden bahsedebilirken, TRAIL ligandının bu hücrelerde ölüm reseptör ekspresyonları üzerine etkisi görülmemektedir.

Bleomisin ile 2007 yılında lenfoma hücre dizisi olan U937'de yapılmış bir çalışmada, bleomisin'in TR-1 ve TR-2 reseptörlerini kontrole göre arttırmadığı gösterilmiştir. Bleomisin'in TRAIL reseptörlerini bloke ettiklerinde de apoptozise yol açması bleomisin indüklü apoptozisin TRAIL reseptörlerinden bağımsız olarak meydana geldiğini göstermektedir [128]. Aynı araştırmacıların 2008 ve 2009 yıllarında yapmış oldukları iki çalışmada bleomisin'in kaspazlar yoluyla apoptozise yol açtığı ve meydana gelen apoptozisin TRAIL reseptörlerinden bağımsız olarak meydana geldiği bulunmuştur [129, 130].

Yapılan çalışmalardan bazıları, kemoterapötiklerin TRAIL indüklü apoptozisi arttırıcı etkisinin reseptör aracılı olmadığını savunmaktadır. Doksorubisin ve sisplatin'in TRAIL'e dirençli insan osteosarkoma U2OS hücrelerini TRAIL reseptörlerini etkilemeksizin TRAIL'e hassaslaştırdığı ve bunu X-linked inhibitor of apoptosis protein'i (X-IAP) azaltarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir [131]. Sisplatin, taksol ya da aktinomisin D ve TRAIL'in

kombinasyonu A549 hücre dizilerinde sinerjistik antitümör bir etki yaratmıştır. Ancak bu etkinin, reseptör aracılı olmadığı gösterilmiştir [132]. Peregö et.al. yapmış oldukları çalışmalarda prostat kanseri hücre dizileri olan PC3 ve DU145 hücrelerinde kamptotesin türevleri olan gimetecan ve topotekan'ın TR-1 ve TR-2 reseptörlerini arttırdığını bulmuşlardır. Prostat kanser hücre hatları olan DU 145 hücreleri de, PC3 hücrelerine göre TRAIL'e daha hassastır. Bu göreceli direncin Akt aktivasyonu, FLIP ve Bcl-2'nin yüksek düzeyleri ve Bax'ın düşük düzeyleri ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür [133]. Bu çalışmalardan görüldüğü gibi, TRAIL'in apoptotik etkisi ve bu etkinin düzenlenmesi reseptör ekspresyonlarındaki farklılıklara dayanmayabilir. Ancak biz çalışmamızda reseptör oranlarının bu etkilerin gerçekleşmesindeki rolünü araştırdık.

Çalışmamızda ayrıca, bleomisin, TRAIL ve bleomisin ile birlikte TRAIL uygulamalarının hücreler üzerindeki apoptotik etkilerini araştırmak için hücrelerde aktif kaspaz-3 oranlarını belirledik. Kaspaz-3 en önemli uygulama kaspazıdır ve intrinsik ve ekstrinsik yollardaki başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9, -10) tarafından aktive edilir. Kaspaz-3, apoptozisde meydana gelen endonükleaz aktivasyonuna, kromatin kondensasyonuna ve membran cepciklerinin oluşumuna aracılık eder [68, 94]. NCCIT hücrelerinde, kontrol grubuna göre bleomisin uygulanan grubun kaspaz-3 düzeylerinin arttığını bulduk. TRAIL tek başına uygulandığında ya da bleomisin ile birlikte uygulandığında ise bu artışı gözleyemedik. NTERA hücrelerinde kontrole göre bleomisin uygulanan grupta artış gözlerken, TRAIL uygulanan grupta kontrole göre büyük bir artış gözlemedik. Ancak NTERA hücrelerinde kontrol grubuna göre TRAIL ve bleomisin'in birlikte uygulandığı gruptaki kaspaz-3 seviyelerinin belirgin olarak arttığını bulduk.

Evdokıou et. al. yapmış oldukları çalışmalarında osteosarkoma hücre dizilerinde ve normal insan kemik primer kültüründe TRAIL ve kanser ilaçlarının etkisi araştırılmıştır. Doksorubisin, sisplatin ve etoposid'in TRAIL aracılı apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir. Bu hücrelerde, apoptozisin kaspaz-8 ve kaspaz-3 aracılığı ile olduğu bildirilmiştir. Bu enzimlerin inhibitörleri ortama eklendiğinde ilacın TRAIL indüklü apoptozis üzerine olumlu etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca ilaçlar ve TRAIL birlikte uygulandığında ölüm reseptörleri olan DR-4 ve DR-5 hem protein hem de mRNA düzeyi artmıştır [108].

Ray et. al. yapmış oldukları bir çalışmada in vitro olarak C4-2 prostat kanser hücreleri, in vivo olarak da 6 haftalık erkek fareler kullanılmış ve CPT-11 (irinotekan)'in TRAIL ile birlikte apoptozis üzerine etkisini gözlemişlerdir. Bu çalışmada C4-2 prostat kanser hücrelerinde CPT-11'in TRAIL ile birlikte apoptozisi indüklediğini, kaspaz-3, -8 ve Bax aktivasyonunun arttığını ve antiapoptotik Bcl-XL'nin azaldığını göstermişlerdir. İn vivo olarak yapılan çalışmada farelerde TRAIL ve CPT-11'in birlikte kullanılmasının tümör büyümesini geriletmediğini ve farelerin tümör kesitlerinde immunohistokimyasal olarak kaspaz-3, -8, -7 ve -9, PARP'ı ve Bak'ı arttırdıkları da göstermişlerdir [103]. Çalışmamızda NTERA hücre dizilerinde bleomisin ve TRAIL'in birlikte

kullanımının göstermiş olduğu sinerjistik etki literatürdeki benzer çalışmalarla uyumludur. Ancak bleomisin ve TRAIL'in NCCIT hücrelerinde sinerjistik etkisinin gözlenememiş olması bu çalışmalarla uyumlu bulunmamıştır.

Yapılan benzer bir çok çalışmada, gözlenen etkilerin p53 bağımlı olup olmadığı, p53 mutant hücrelerin yanısıra fonksiyonel p53 proteini bulunduran hücrelerin kullanılmasıyla gösterilmiştir. Pek çok kanser ilacı ile yapılan çalışmalarda p53'ün her iki ölüm reseptörünü de (TR-1 ve TR-2) arttırdığı bildirilmiştir [108]. Çalışmamızda, bleomisin uygulandıktan sonra p53 bulunduran hücreler olan NTERA hücrelerinde TR-2 seviyelerinin, p53 mutant olan NCCIT hücrelerinde ise TR-1 seviyelerinin arttığını bulduk. Bu sonucumuz bleomisin aracılı apoptozisin NTERA hücrelerinde TR-2, NCCIT hücrelerinde ise TR-1 aracılığı ile olabileceğini önermektedir. Çalışmamızda bleomisin'in her iki hücre dizisinde de apoptozisi arttırması meydana gelen apoptozisin p53 bağımlı olmadığını göstermektedir. Renal kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada p53 mutasyonu olan ve olmayan hücrelerde topotekan indüklü TR-2 reseptörü artışının farklı olmadığı gözlenmiştir. [12]. Başka bir çalışmada çeşitli meme, kolon, akciğer, over kanseri hücre dizilerinde TR-2 ekspresyonunun p53 bağımlı ya da bağımsız olarak düzenlendiği gözlenmiştir [134].

Bir başka çalışmada ise osteosarkom hücre dizilerine uygulanan kemoterapötiklerle TRAIL indüklü apoptozisin aynı şekilde artmış olması kombine tedavinin p53 bağımlı olmadığını göstermiştir [108]. Bleomisin ve TRAIL'in NTERA hücrelerinde gözlenen ve NCCIT hücrelerinde gözlenmeyen sinerjistik apoptotik etkisi ise p53 bağımlı olabilir. NTERA hücrelerinde, bleomisin uygulanmış grupta, bleomisinle birlikte TRAIL uygulanmış grubun reseptör düzeylerinin aynı olması sinerjistik etkinin reseptörlerden bağımsız olarak ve p53 bağımlı başka mekanizmalar yoluyla gerçekteğiğini önerebilir.

Sonuç olarak, testis kanserinin tedavisinde halen sıklıkla kullanılan bir kemoterapötik olan bleomisin'in yanında, TRAIL apoptotik ligandının kullanılmasının, birçok diğer kanserde olduğu gibi bu kanserde de terapötik etki potansiyelini arttırabileceği görülmüştür. TRAIL'in bu kemoterapötik ile birlikte kullanımı, daha ileri düzeyde yapılacak çalışmalar ve iyileştirmelerle, yeni bir tedavi stratejisi olabilir ve kanser hastalarının yaşam kalitesini yükseltebilir.

SONUÇLAR

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Yapılan sitotoksisite çalışmalarında NTERA hücrelerinin %50'sini öldüren bleomisin dozunu 0.25 µg/ml olarak bulduk.
2. Yapılan sitotoksisite çalışmalarında NCCIT hücrelerinin %50'sini öldüren bleomisin dozunu 0.37 µg/ml olarak bulduk.
3. Yapılan sitotoksisite çalışmalarında NTERA hücrelerinin %50'sini öldüren TRAIL dozunu yaklaşık 5 µg/ml olarak bulduk.
4. Yapılan sitotoksisite çalışmalarında NCCIT hücrelerinin %50'sini öldüren TRAIL dozunu 4 µg/ml olarak bulduk.
5. NTERA ve NCCIT hücrelerinin TR-2 ve TR-4 reseptörlerini sentezlediğini; TR-1 ve TR-3 reseptör ekspresyonlarının ise yok denecek kadar az olduğunu bulduk.
6. NTERA hücrelerinde, bleomisin uygulanan grupta kontrole göre TR-2 düzeyinde artış gözledik. Diğer reseptörler olan TR-1, TR-3 ve TR-4 seviyelerinde farklılık bulamadık.
7. NTERA hücrelerinde, TRAIL uygulanması ile TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 reseptörleri düzeyini kontrol hücreleri ile aynı düzeyde bulduk.
8. NTERA hücrelerinde, bleomisin ve TRAIL'in birlikte uygulanması ile bleomisin'in tek başına uygulanmasının TR-2 reseptörü üzerinde aynı düzeyde etki gösterdiğini bulduk.
9. NCCIT hücrelerinde, bleomisin uygulanan grupta kontrole göre TR-1 düzeyinde artış gözlerken; diğer reseptörler olan TR-2, TR-3 ve TR-4 seviyelerinde farklılık bulamadık.
10. NCCIT hücrelerinde, TRAIL uygulanması sonrasında TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4 reseptörlerinin ekspresyon düzeyini kontrol hücreleri ile aynı düzeyde bulduk.
11. NCCIT hücrelerinde, bleomisin ve TRAIL'in birlikte uygulanması ile, TR-1 reseptöründe artış gözlemedik.
12. NCCIT hücrelerinde yapılan kaspaz-3 ölçümlerinde, bleomisin uygulanan grubun, kontrol grubuna göre kaspaz-3 seviyelerinde

artış sergilediğini gözledik. Ancak TRAIL ve bleomisin'in TRAIL ile birlikte uygulandığı gruplarda ise kaspaz-3 seviyelerinde herhangi bir artış gözlemedik.

- 13.** NTERA hücrelerinde ise kontrole göre bleomisin uygulanan grupta artış gözlerken, TRAIL uygulanan grupta kontrole göre büyük bir artış gözlemedik. Ancak TRAIL ve bleomisin'in birlikte uygulanmasının kaspaz-3 seviyelerinde belirgin bir artışa yol açtığını gözlemedik.

KAYNAKLAR

1. Gilligan T. Testis cancer: rare, but curable with prompt referral. *Cleve Clin J Med.* 2007;74(11):817-25.
2. Hainsworth JD, Greco FA. Testis. In: *Cancer Treatment.* Haskell CM, Berek JS. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 2001, 5th edition, 880-97.
3. Bosl GJ, Bajorin DF, Sheinfeld J, Motzer RJ, Chaganti RSK. Cancer of the Testis. In: *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer, Principles & Practice of Oncology.* DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business Inc., Philadelphia, 2008, 8th edition, Vol 1, 1463-85.
4. Zuccarini M, Kogut H, Raczkowski T, Schiff D, Ewan H, Kors E. *Essentials of Pathophysiology, Concepts of Altered Health States.* Lippincott Williams & Wilkins Inc., Philadelphia, 2007, 2th edition, 912-13.
5. Huyghe E, Plante P, Thonneau PF. Testicular cancer variations in time and space in Europe. *Eur Urol.* 2007;51(3):621-8.
6. Chan JS, Saxman SB, Nichols CR. Urologic and Male Genital Cancers. In: *Handbook of Cancer Chemotherapy.* Skeel RT. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business Inc., Philadelphia, 2007, 7th edition, 360-6.
7. Jones RH, Vasey PA. Part I: testicular cancer--management of early disease. *Lancet Oncol.* 2003;4(12):730-7.
8. Day RM, Suzuki YJ, Lum JM, White AC, Fanburg BL. Bleomycin upregulates expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(6):L1349-57.
9. Sleijfer S. Bleomycin-induced pneumonitis. *Chest.* 2001;120(2):617-24.
10. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(3):178-94.

11. Asakuma J, Sumitomo M, Asano T, Hayakawa M. Selective Akt inactivation and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitization of renal cancer cells by low concentrations of paclitaxel. *Cancer Res.* 2003;63(6):1365-70.
12. Dejosez M, Ramp U, Mahotka C, Krieg A, Walczak H, Gabbert HE, Gerharz CD. Sensitivity to TRAIL/APO-2L-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan. *Cell Death Differ.* 2000;7(11):1127-36.
13. Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Okumura K. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci.* 2004;95(10):777-83.
14. Tomek S, Horak P, Pribill I, Haller G, Rossler M, Zielinski CC, Pils D, Krainer M. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cell lines is overcome by co-treatment with cytotoxic drugs. *Gynecol Oncol.* 2004;94(1):107-14.
15. Gilligan T. KPW. Testis Cancer. In: *Oncology An Evidence-Based Approach.* Chang A.E., Ganz P.A., Hayes D.F., Kinsella T.J., Pass H.I., Schiller J.H., Stone R.M., Strecher V.J. Springer Science Business Media Inc, New York, 2006, 2th edition, pp: 844-873.
16. Carver BS, Sheinfeld J. Germ cell tumors of the testis. *Ann Surg Oncol.* 2005;12(11):871-80.
17. Zunino F, Pratesi G. Scientific Basis of Cancer Treatment. In: *Oxford Textbook of Oncology.* Souhami RL, Tannock I, Hohenberger P, Horiot J-C. Oxford University Press, New York, 2002, 2th edition, Vol 1, 723.
18. Chabner BA. Bleomycin. In: *Harrison's Manual of Oncology,* Chabner B.A., Lynch T.J., Longo D.L. McGraw-Hill Companies Inc., New York, 2008, 60-63.
19. Di Pietro A, Vries EG, Gietema JA, Spierings DC, de Jong S. Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumours. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(12):2437-56.
20. Goljan EF. *Rapid Review Pathology.* Mosby Inc., Philadelphia, 2007, 2nd edition, 436-545
21. Chaganti RS, Houldsworth J. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res.* 2000;60(6):1475-82.
22. Lutke Holzik MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Nolte IM, Sijmons RH. Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *Lancet Oncol.* 2004;5(6):363-71.

23. Sesterhenn IA, Davis CJ, Jr. Pathology of germ cell tumors of the testis. *Cancer Control*. 2004;11(6):374-87.
24. Robbins S.L. CRS, Kumar V. . *Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1984, 3th edition, 1090-1097.
25. Nichols CR. Testicular cancer. *Curr Probl Cancer*. 1998;22(4):187-274.
26. Chan AT, Cheung MM, Lau WH, Johnson PJ. Germ cell tumours--- local perspectives on a curable cancer. *Hong Kong Med J*. 1997;3(3):305-11.
27. Vaughn DJ, Gignac GA, Meadows AT. Long-term medical care of testicular cancer survivors. *Ann Intern Med*. 2002;136(6):463-70.
28. Shabbir M, Morgan RJ. Testicular cancer. *J R Soc Promot Health*. 2004;124(5):217-8.
29. Sokoloff M.H. JGF, Wise M. Testicular Cancer. In: *Urologic Diseases in America*, Litwin M.S., Saigal C.S. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. DC: US Government Printing Office, Washington, 2007, 553-586.
30. Schmoll HJ, Souchon R, Krege S, Albers P, Beyer J, Kollmannsberger C, Fossa SD, Skakkebaek NE, de Wit R, Fizazi K, Droz JP, Pizzocaro G, Daugaard G, de Mulder PH, Horwich A, Oliver T, Huddart R, Rosti G, Paz Ares L, Pont O, Hartmann JT, Aass N, Algaba F, Bamberg M, Bodrogi I, Bokemeyer C, Classen J, Clemm S, Culine S, de Wit M, Derigs HG, Dieckmann KP, Flasshove M, Garcia del Muro X, Gerl A, Germa-Lluch JR, Hartmann M, Heidenreich A, Hoeltl W, Joffe J, Jones W, Kaiser G, Klepp O, Kliesch S, Kisbenedek L, Koehrmann KU, Kuczyk M, Laguna MP, Leiva O, Loy V, Mason MD, Mead GM, Mueller RP, Nicolai N, Oosterhof GO, Pottek T, Rick O, Schmidberger H, Sedlmayer F, Siegert W, Studer U, Tjulandin S, von der Maase H, Walz P, Weinknecht S, Weissbach L, Winter E, Wittekind C. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). *Ann Oncol*. 2004;15(9):1377-99.
31. Lawton AJ, Mead GM. Staging and prognostic factors in testicular cancer. *Semin Surg Oncol*. 1999;17(4):223-9.
32. Huddart RA, Norman A, Moynihan C, Horwich A, Parker C, Nicholls E, et al. Fertility, gonadal and sexual function in survivors of testicular cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(2):200-7.

33. Claussen CA, Long EC. Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem Rev.* 1999;99(9):2797-816.
34. Sugiyama M, Kumagai T, Hayashida M, Maruyama M, Matoba Y. The 1.6-Å crystal structure of the copper(II)-bound bleomycin complexed with the bleomycin-binding protein from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus*. *J Biol Chem.* 2002;277(3):2311-20.
35. Abraham AT, Zhou X, Hecht SM. Metalbleomycin-mediated cleavage of DNA not involving a threading-intercalation mechanism. *J Am Chem Soc.* 2001;123(22):5167-75.
36. Page CP, Curtis MJ, Walker MJA, Hoffman BB. *Integrated Pharmacology.* Elsevier Mosby Inc., Philadelphia, 2006, 3th edition, 174-175.
37. Hagiwara SI, Ishii Y, Kitamura S. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(1):225-31.
38. Chu E. SAC. *Cancer Chemotherapy.* In: *Basic & Clinical Pharmacology,* Katzung B.G. McGraw-Hill Companies Inc., New York, 2007, 10th edition, 895.
39. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Curr Opin Chem Biol.* 2004;8(2):175-81.
40. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281(5381):1322-6.
41. Kim WH, Choi CH, Kang SK, Kwon CH, Kim YK. Ceramide induces non-apoptotic cell death in human glioma cells. *Neurochem Res.* 2005;30(8):969-79.
42. Bretz JD, Baker JR, Jr. Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;55(1):1-11.
43. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res.* 2001;306(3):347-61.
44. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett.* 2003;139(2-3):89-97.
45. Abdollahi T, Robertson NM, Abdollahi A, Litwack G. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by IL-8 is mediated by the p38-MAPK pathway in OVCAR3 cells. *Apoptosis.* 2005;10(6):1383-93.
46. Öztürk. Apoptoz. İnönü Tıp Fak Der 2002;9:143-8.

47. Blatt NB, Glick GD. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg Med Chem.* 2001;9(6):1371-84.
48. Guchelaar HJ, Vermes A, Vermes I, Haanen C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm World Sci.* 1997;19(3):119-25.
49. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta.* 2002;326(1-2):27-45.
50. Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep.* 2001;6(2):77-90.
51. Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228(9):995-1003.
52. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997;21(1):88-101.
53. Öniz. Apoptoz: Ölmeye Yatmak. *SSK Tepecik Hast Derg* 2004;14:1-20.
54. Moriishi K, Huang DC, Cory S, Adams JM. Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(17):9683-8.
55. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381):1305-8.
56. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev.* 2004;84(2):411-30.
57. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326 (Pt 1):1-16.
58. Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene.* 1998;17(25):3207-13.
59. Hunot S, Flavell RA. Apoptosis. Death of a monopoly? *Science.* 2001;292(5518):865-6.
60. Bouillet P, Cory S, Zhang LC, Strasser A, Adams JM. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev Cell.* 2001 Nov;1(5):645-53.
61. Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser D, Metcalf D, Kontgen F, Adams JM, Cory S. Apoptosis

regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12424-31.

62. Kataoka S, Tsuruo T. Physician Education: Apoptosis. *Oncologist*. 1996;1(6):399-401.
63. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*. 2003;15(11):983-92.
64. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol*. 2003;23(6):447-59.
65. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998;17(25):3237-45.
66. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev*. 1998;12(11):1551-70.
67. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol*. 2005;84(10):627-39.
68. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
69. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26159-65.
70. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267(5203):1456-62.
71. Yin XM. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res*. 2000;10(3):161-7.
72. Yamaguchi H, Wang HG. Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL. *J Biol Chem*. 2002;277(44):41604-12.
73. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644(2-3):133-47.
74. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol*. 2008;9(10):1002-11.
75. Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer*. 2005;103(8):1551-60.

76. Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53(3):153-9.
77. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 2000;20(3):929-35.
78. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003;22(53):8590-607.
79. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(8):3668-72.
80. Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ.* 2000;7(12):1182-91.
81. Moreau C, Cartron PF, Hunt A, Meflah K, Green DR, Evan G, et al. Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J Biol Chem.* 2003;278(21):19426-35.
82. Esposti MD, Eler JT, Hickman JA, Dive C. Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity. *Mol Cell Biol.* 2001;21(21):7268-76.
83. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727-30.
84. Finucane DM, Bossy-Wetzell E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem.* 1999;274(4):2225-33.
85. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 1996;10(1):1-15.
86. Cummings BS, Schnellmann RG. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(1):8-17.
87. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods.* 2002;265(1-2):49-72.
88. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie.* 2002;84(2-3):203-14.

89. Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(29):20049-52.
90. Graf D, Bode JG, Haussinger D. Caspases and receptor cleavage. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462(2):162-70.
91. D'Amelio M, Tino E, Cecconi F. The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design. *Pharm Res*. 2008;25(4):740-51.
92. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):821-46.
93. Hill MM, Adrain C, Martin SJ. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv*. 2003;3(1):19-26.
94. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):76-100.
95. Yang JY, Michod D, Walicki J, Widmann C. Surviving the kiss of death. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(6):1027-31.
96. Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32(9):1053-61.
97. Gibson SB, Oyer R, Spalding AC, Anderson SM, Johnson GL. Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Mol Cell Biol*. 2000;20(1):205-12.
98. Hyer ML, Croxton R, Krajewska M, Krajewski S, Kress CL, Lu M, et al. Synthetic triterpenoids cooperate with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to induce apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(11):4799-808.
99. Daniels RA, Turley H, Kimberley FC, Liu XS, Mongkolsapaya J, Ch'En P, et al. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Res*. 2005;15(6):430-8.
100. Altucci L, Gronemeyer H. Retinoids and TRAIL: two cooperating actors to fight against cancer. *Vitam Horm*. 2004;67:319-45.
101. Kelley SK, Ashkenazi A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(4):333-9.
102. Gliniak B, Le T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res*. 1999;59(24):6153-8.

103. Ray S, Bucur O, Almasan A. Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor. *Apoptosis*. 2005;10(6):1411-8.
104. Schweyer S, Soruri A, Heintze A, Radzun HJ, Fayyazi A. The role of reactive oxygen species in cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines. *Int J Oncol*. 2004;25(6):1671-6.
105. Hernandez A, Wang QD, Schwartz SA, Evers BM. Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *J Gastrointest Surg*. 2001;5(1):56-65.
106. Jazirehi AR, Ng CP, Gan XH, Schiller G, Bonavida B. Adriamycin sensitizes the adriamycin-resistant 8226/Dox40 human multiple myeloma cells to Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated (TRAIL) apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):3874-83.
107. Sinicrope FA, Penington RC, Tang XM. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8284-92.
108. Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ, Chai F, Hay S, Clayer M, et al. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer*. 2002;99(4):491-504.
109. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277(5327):818-21.
110. Sanlioglu AD, Koksall IT, Ciftcioglu A, Baykara M, Luleci G, Sanlioglu S. Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues. *J Urol*. 2007;177(1):359-64.
111. Sanlioglu AD, Dirice E, Elpek O, Korcum AF, Balci MK, Omer A, Griffith TS, Sanlioglu S. High levels of endogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression correlate with increased cell death in human pancreas. *Pancreas*. 2008;36(4):385-93.
112. Sanlioglu AD, Dirice E, Aydin C, Erin N, Koksoy S, Sanlioglu S. Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2005;5:54.
113. Sanlioglu AD, Koksall IT, Karacay B, Baykara M, Luleci G, Sanlioglu S. Adenovirus-mediated IKKbetaKA expression sensitizes prostate

carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 2006;13(1):21-31.

114. Mizutani Y, Yoshida O, Miki T, Bonavida B. Synergistic cytotoxicity and apoptosis by Apo-2 ligand and adriamycin against bladder cancer cells. *Clin Cancer Res.* 1999;5(9):2605-12.
115. Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2000;60(4):847-53.
116. Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, et al. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(4):1754-9.
117. Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Muller M. Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int J Cancer.* 2009.
118. Sproll KC, Ballo H, Hoffmann TK, Scheckenbach K, Koldovsky U, Balz V, et al. Is there a role for the Fas-/Fas-Ligand pathway in chemoresistance of human squamous cell carcinomas of the head and neck (SCCHN)? *Oral Oncol.* 2009;45(1):69-84.
119. Cretney E, Shanker A, Yagita H, Smyth MJ, Sayers TJ. TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(1):87-98.
120. Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, Shima Y, Richardson P, Schlossman R, et al. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood.* 2001;98(3):795-804.
121. Shankar S, Chen X, Srivastava RK. Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate.* 2005;62(2):165-86.
122. Ciusani E, Croci D, Gelati M, Calatuzzolo C, Sciacca F, Fumagalli L, Balzarotti M, Fariselli L, Boiardi A, Salmaggi A. In vitro effects of topotecan and ionizing radiation on TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis in malignant glioma. *J Neurooncol.* 2005;71(1):19-25.
123. Nimmanapalli R, Perkins CL, Orlando M, O'Bryan E, Nguyen D, Bhalla KN. Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor

necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *Cancer Res.* 2001;61(2):759-63.

124. Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, el-Deiry WS. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2000;6(2):335-46.
125. Arts HJ, de Jong S, Hollema H, ten Hoor K, van der Zee AG, de Vries EG. Chemotherapy induces death receptor 5 in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004;92(3):794-800.
126. Griffith TS, Kemp TJ. The topoisomerase I inhibitor topotecan increases the sensitivity of prostate tumor cells to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;52(3):175-84.
127. Shetty S, Gladden JB, Henson ES, Hu X, Villanueva J, Haney N, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) up-regulates death receptor 5 (DR5) mediated by NFkappaB activation in epithelial derived cell lines. *Apoptosis.* 2002;7(5):413-20.
128. Souhir B, Laurent P, Sonia Y, Delphine M, Marion C, Cedric R, et al. Deglycosylated bleomycin induces apoptosis in lymphoma cell via c-jun NH2-terminal kinase but not reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(10):1445-55.
129. Brahim S, Aroui S, Abid K, Kenani A. Involvement of C-jun NH2-terminal kinase and apoptosis induced factor in apoptosis induced by deglycosylated bleomycin in laryngeal carcinoma cells. *Cell Biol Int.* 2009;33(9):964-70.
130. Brahim S, Bettaieb A, Kenani A. Deglycosylated bleomycin triggers apoptosis in laryngeal carcinoma cells in a caspase and reactive oxygen species independent manner. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(6):352-7.
131. Mirandola P, Sponzilli I, Gobbi G, Marmiroli S, Rinaldi L, Binazzi R, Piccari GG, Ramazzotti G, Gaboardi GC, Cocco L, Vitale M. Anticancer agents sensitize osteosarcoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand downmodulating IAP family proteins. *Int J Oncol.* 2006;28(1):127-33.
132. Fan QL, Zou WY, Song LH, Wei W. Synergistic antitumor activity of TRAIL combined with chemotherapeutic agents in A549 cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(2):189-96.
133. Perego P, Ciusani E, Gatti L, Carenini N, Corna E, Zunino F. Sensitization to gimatecan-induced apoptosis by tumor necrosis factor-

related apoptosis inducing ligand in prostate carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(6):791-8.

- 134.** Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, Wu GS, Amundson S, Brooks KS, Fornace AJ, Jr., el-Deiry WS. p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 1998;58(8):1593-8.

ÖZGEÇMİŞ

Müjgan TİMUR, 01.09.1977 yılında Denizli'de doğdu. İlkokul öğrenimini 1988 yılında Ankara Abdullah Tokur İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini 1991 yılında Erzurum Oltu Ortaokulu'nda, lise öğrenimini 1994 yılında Antalya Çağlayan Lisesinde tamamladı. Yüksek öğrenimini 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladı. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğretime başladı. 2003 yılında yüksek lisans eğitimini bitirerek doktora eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir. Yabancı dili İngilizcedir.

EKLER

The effect of Topotecan on oxidative stress in MCF-7 human breast cancer cell line

Mujgan Timur, S. Halide Akbas and Tomris Ozben[✉]

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey;
[✉]e-mail: ozben@akdeniz.edu.tr

Received: 10 February, 2005; revised: 23 June, 2005; accepted: 30 June, 2005
available on-line: 07 November, 2005

Purpose. Topotecan, a semisynthetic water-soluble derivative of camptothecin exerts its cytotoxic effect by inhibiting topoisomerase I and causes double-strand DNA breaks which inhibit DNA function and ultimately lead to cell death. In previous studies it was shown that camptothecin causes ROS formation. The aim of this study was to investigate if Topotecan like camptothecin causes oxidative stress in MCF-7 human breast cancer cell line. Determining the oxidant effect of Topotecan may elucidate a possible alternative mechanism for its cytotoxicity. **Experimental design.** MCF-7 cells were cultured and exposed to Topotecan for 24 h at 37°C. The viability of the cells (% of control) was measured using the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Lipid peroxidation (TBARS), protein oxidation (carbonyl content), sulfhydryl, glutathione (GSH) levels, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities were determined in MCF-7 cells with and without Topotecan incubation. **Results.** We found the IC₅₀ concentration of Topotecan as 0.218 µM in MCF-7 cells. This concentration of Topotecan was used in the incubations of the cells. Our data indicated increased oxidative status, as revealed by increased lipid peroxidation and protein oxidation, and decreased GSH and sulfhydryl levels in MCF-7 cells exposed to Topotecan compared to control cells. In contrast, there was a slight increase in SOD and a significant increase in GPx and catalase activity in MCF-7 cells incubated with Topotecan compared to the control. **Conclusions.** These results support our hypothesis that Topotecan increases oxidative stress in MCF-7 cells.

Keywords: Topotecan, MCF-7 cells, breast cancer, oxidative stress, antioxidants

Breast cancer is the second most common cancer among women in developed countries (Hulka & Stark, 1995). Although many cytotoxic agents are used in the treatment of this disease, their efficiency is limited due to several factors. Novel therapeutic agents against breast cancer are needed. The semisynthetic camptothecin analogue Topotecan [9-(dimethylamino)methyl-10-hydroxy camptothecin] is used to treat a variety of malignancies (Erlichman *et al.*, 2001). The mechanism of Topotecan cytotoxicity involves inhibition of nuclear topoisomerase I enzyme and causes irreversible double-strand DNA breaks. These DNA breaks are thought to be the lesions responsible for camptothecin-induced cell death (Kaufmann *et al.*, 1996). Sensitivity of cells to topoisomerase I poisons is modulated by a variety of factors, including topo I content, cell cycle dis-

tribution and DNA repair capability (Erlichman *et al.*, 2001).

Numerous investigations have documented cellular changes resulting from oxidative stress induced in cells following exposure to cytotoxic drugs. Although cytotoxic agents such as doxorubicin, daunorubicin, mitoxantrone, bleomycin and cisplatin used in these studies were structurally dissimilar and acted on different cellular targets, they induced oxidative stress by generation of reactive oxygen species (ROS) in tumour cells. Formation of ROS increased the cytotoxic activity of the drugs in cancer cells *via* inducing apoptosis (Sinha & Mimnaugh, 1990; Kinnula *et al.*, 1998). H₂O₂ generation was found in the process of apoptosis induced by physiological concentrations of camptothecin (Simizu *et al.*, 1998). There are some stud-

Abbreviations: CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GSH, glutathione; IC₅₀, 50% inhibitory concentration; MTT, 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; PCO, protein carbonyl; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

ies supporting the hypothesis that oxidative stress might modulate the cytotoxicity of camptothecin, but experiments demonstrating the effect of Topotecan on oxidative stress are very limited. Recently, Muluk *et al.* (2005) revealed the efficacy of Topotecan treatment on antioxidant enzymes and TBARS levels in submandibular glands of rabbits. In our recently published study, we found increased ROS and nitrite levels as indicators of oxidative stress in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines following Topotecan incubation (Akbas *et al.*, 2005). In our present study, we expanded our investigations to the effects of Topotecan on other oxidative stress markers and antioxidants in MCF-7 cells. For oxidative stress markers, we measured thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) as a marker for lipid peroxidation, and protein carbonyl content as an indicator of oxidative protein damage. The best marker for intracellular oxidative stress-dependent cellular damage is protein carbonyl content. High ROS level leads to protein oxidation which converts proteins to protein carbonyl derivatives (Telci *et al.*, 2000). Oxidative protein damage cannot be repaired and causes irreversible modifications in proteins (Stadtman, 2002). The unique advantage of carbonyl measurement as a good marker for oxidative stress is the fact that it covers a much wider range of oxidative damage than other markers (Reznick & Packer, 1994; Evans *et al.*, 1999; Carrard *et al.*, 2002; Cakaty *et al.*, 2003). Other markers for protein oxidation such as nitrotyrosine, hydroxylation of aromatic and hydrophobic amino acids are at a very low level in comparison to the carbonyl content. Since oxidative stress has been defined as a loss of balance between free radical or reactive oxygen species production and the antioxidant systems, we measured antioxidants such as sulfhydryl, glutathione (GSH) and activities of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). Protein sulfhydryl (thiol) groups and the tripeptide glutathione (GSH) are particularly important for antioxidative defense in cells. Reduced glutathione (GSH) is the most abundant cellular thiol compound and an important intracellular antioxidant (Stadtman & Levine, 2000). Measurement of protein sulfhydryl groups is useful as well as protein carbonyl content to determine oxidative protein damage.

No study has been carried out so far to show the effects of Topotecan on these oxidative stress markers and the antioxidant profile in human breast cancer cell lines. In order to clarify if Topotecan causes oxidative stress, we measured levels of TBARS, protein carbonyl content, sulfhydryl, glutathione and activities of antioxidant enzymes including SOD, CAT, and GPx in MCF-7 cells incubated with and without Topotecan.

MATERIALS AND METHODS

Cell line. MCF-7 human breast cancer cell line was kindly supplied by Dr. J. Lemontt and H.F. Pross from Queen's University in Canada. The MCF-7 cell line (estrogen receptor positive) was derived from primary breast tumor of a patient. Cells were grown in monolayer culture in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 10 µg/ml bovine insulin, and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic agent. Cells were grown to confluence at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air and were passaged weekly using 0.25% trypsin.

Chemicals and drugs. All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). A stock solution of 1 mg/ml Topotecan was prepared by dissolving Topotecan hydrochloride (Hycamtin®, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Philadelphia, PA, USA) in sterile dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -80°C. The stock solution was diluted from 218 µM to 0.001 µM with MEM. The final vehicle concentration did not exceed 0.5% (v/v) either in control or in treated samples throughout the experiments.

Viability assay. The number of viable cells (% of control) was measured using the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann, 1983; Sladowski *et al.*, 1993). The MTT method allows one to measure the number of viable cells in a given sample as the percentage of viable cells present in the control sample. The principle of this method is based on cellular reduction of MTT to a blue formazan product by mitochondrial dehydrogenases of viable cells. The intensity of the blue color formed by this procedure is proportional to cell viability. Cells were trypsinized and separated from the surface of the flask. Trypan Blue (0.4%) dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) was used for cell counting. Trypsinized cell suspension (0.2 ml) was put in a tube and mixed with 0.3 ml medium and 0.5 ml 0.4% Trypan Blue. After 5 min, cells were counted in a hemocytometer. Cell suspension (0.1 ml) containing 1×10^5 MCF-7 cells was added into each well of a 96 well, flat-bottomed tissue culture microplate and incubated for 24 h. Fresh culture medium was exchanged before the addition of Topotecan. A sample of 10 µl Topotecan from each dilution was added into three wells containing cells. Cells were incubated with Topotecan for 24 h at 37°C. Control cells treated with medium only were applied to the same plate. At the end of incubation, MTT (10 µl) at a concentration of 5 mg/ml in PBS was added into each well, the plates were wrapped with aluminum foil and incubated for 4 h at 37°C. Following incubation, 180 µl DMSO was put into each well, mixed and the plates were kept at dark overnight. A microplate reader (Sirios,

Seac Radim Group, Italy) was used to measure the absorbances at 570 nm (Mosmann, 1983; Sladowski *et al.*, 1993). The average absorbance values of the cells incubated with Topotecan were compared with the average absorbance values of the control cells to calculate the percentage of viable cells (% of control). The results were given as the mean \pm S.D. of eight independent experiments performed in triplicate. The IC_{50} concentration of Topotecan which inhibits 50% of cell proliferation was found to be 0.218 μ M. This concentration of Topotecan was applied in the rest of the experiments.

Preparation of cell lysate. MCF-7 cells were incubated with the IC_{50} level of Topotecan whereas control cells were incubated with vehicle only for 24 h. Following incubation, cells were collected using trypsin, washed with PBS (pH 7.4) three times and the pellet was transferred into extraction solution which contained 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7) and a protease inhibitor cocktail. Cells were sonicated using a Biosonic IV sonicator with 15-s bursts for a total of 4 min on ice and centrifuged at $15000 \times g$ for 45 min in a refrigerated centrifuge. The supernatant obtained was used in the experiments.

Determination of antioxidants and oxidative stress markers. TBARS in cells were determined using the fluorometric method of Wasowicz *et al.* (1993) and the results were expressed as nmol/mg protein. Carbonyl content in oxidatively modified proteins was determined by the method of Levine *et al.* (1990). Absorbance of the samples was measured at 360 nm and carbonyl results were given as μ mol/g protein using ϵ_{\max} $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Sulfhydryl concentration was determined by the method of Koster *et al.* (1986). The method of Fairbanks and Klee (1986) was used to measure the concentration of GSH in the cells.

The spectrophotometric indirect inhibition method of Misra and Fridovich (1972) based on the ability of superoxide dismutase to inhibit autooxidation of adrenaline to adrenochrome at alkaline pH was used in the assay of Cu,Zn-SOD activity. Catalase activity was measured using the method of Aebi (1987) with hydrogen peroxide as a substrate. The method is based on decomposition of hydrogen peroxide which is indicated by a decrease in absorbance at 240 nm. The coupled method of Paglia and Valentine (1967) using t-butyl hydroperoxide as a substrate was used to measure activity of GPx in cells. Protein levels were measured by the method of Lowry *et al.* (1951). The results were expressed as U/g protein for SOD and GPx, and as k/g protein for CAT, where k is the rate constant for CAT activity.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U test with the SPSS program for Windows version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All the experiments were repeated eight times. Mean values and standard de-

viations (mean \pm S.D.) were calculated for every variable in each cell group and were compared between two cell groups treated with and without Topotecan. $P < 0.05$ was selected as statistically significant.

RESULTS

Cytotoxic activity of Topotecan

The experiments were repeated 8 times and similar results obtained from these repetitions were averaged. The cytotoxic effect of different concentrations of Topotecan on MCF-7 cells is shown in Fig. 1. The inhibitory concentration (IC_{50}) of Topotecan for MCF-7 cells was found as to be 0.218 μ M using MTT assay. This concentration of Topotecan was applied for incubation of the cells in subsequent experiments.

Effects of Topotecan on antioxidants and oxidative stress markers

The TBARS level in cells incubated with Topotecan for 24 h showed a significant increase in comparison to the level in control cells (Table 1). A similar increase was observed in protein carbonyl levels in MCF-7 cells treated with Topotecan compared to the level found in control cells not treated with Topotecan (Table 1).

A significant decrease was observed in glutathione levels of the cells treated with Topotecan compared to the control groups (Table 1). Sulfhydryl levels of the cells treated with Topotecan were lower than the level measured in control cells (Table 1).

The superoxide dismutase activities of the cells incubated with Topotecan showed a statistically non-significant increase in comparison to the control cells (Table 1), whereas the catalase and glutathione peroxidase activities were found to be significantly higher in the cells treated with Topotecan (Table 1).

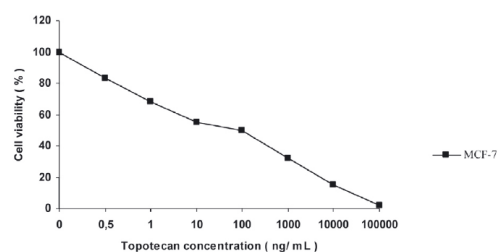


Figure 1. Cell viability of MCF-7 cells against different concentrations of Topotecan.

Cell viability experiments were done after 24 h of Topotecan incubation as described in Methods. The mean value of eight experiments is shown. The S.D. of the means were less than 10% and were omitted.

Table 1. Oxidative stress markers and antioxidants in control and Topotecan-treated MCF-7 cells

	Control	Topotecan
TBARS (nmol/g protein)	0.44 ± 0.19	2.37 ± 0.32*
Protein carbonyl content (µmol/g protein)	2.26 ± 0.59	4.37 ± 0.98*
Glutathione (mg/g protein)	46.0 ± 10.99	28.30 ± 5.95*
Sulfhydryl (µmol/g protein)	5.60 ± 1.07	3.88 ± 0.55*
Cu,Zn-SOD (U/g protein)	47765 ± 15 637	69105 ± 27497
Catalase (k/g protein)	162.94 ± 30.48	223.86 ± 30.73*
Glutathione peroxi- dase (GPx) (U/g protein)	7.26 ± 0.87	11.59 ± 1.80*

The results are expressed as mean ±S.D. of eight experiments. *P<0.05: significantly different compared to the controls.

DISCUSSION

It is known that some cytotoxic agents with different structures and targets other than Topotecan increase the levels of ROS. Chemotherapeutic agents such as doxorubicin, daunorubicin, mitoxantrone, bleomycin, and cisplatin promote oxidative stress by generating ROS (Russo *et al.*, 1984; Novak & Kharasch, 1985; Baliga *et al.*, 1999; Mansat-de Mas *et al.*, 1999; Hagiwara *et al.*, 2000; Minotti *et al.*, 2001; Baek *et al.*, 2003). Doroshow (1986) and Sinha *et al.* (1987) proposed that oxygen free radicals generated by adriamycin may be directly related to their cytotoxic effect in MCF-7 human tumour cells. These researchers found that the cytotoxicity of these drugs in MCF-7 cells was diminished by supplementation with radical scavenger antioxidants. In their studies, Gorman *et al.* (1997) showed increased ROS formation in a promyelotic leukemia HL-60 cell line after treatment with camptothecin and SN-38 which is an analogue of camptothecin. Exogenous catalase supplementation decreased the cytotoxic effects of these drugs in these cells. Wenzel *et al.* (2004) tested the effects of ascorbic acid on apoptosis which was induced by two potent apoptosis inducers, the classical anti-tumour drug camptothecin and a flavonoid, flavone, in HT-29 human colon carcinoma cells. They found that camptothecin and flavone increased generation of mitochondrial superoxide which preceded the downregulation of bcl-X_L. Ascorbic acid at 1 mM concentration prevented generation of superoxide, thereby blocking drug-mediated apoptosis (Wenzel *et al.*, 2004). Somasundaram *et al.* (2002) in their tissue culture studies revealed that curcumin inhibited camptothecin-, mechlorethamine-, and doxorubicin-induced apoptosis in MCF-7, MDA-MB-231, and BT-474 human breast cancer cells

by up to 70%. They found that under these conditions, curcumin exhibited antioxidant properties and inhibited chemotherapy-induced apoptosis through inhibition of ROS generation and blockade of the c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) pathway. Although it is proposed that camptothecin induces apoptosis *via* superoxide formation, the mechanism of ROS formation by camptothecin remains to be further clarified. Simizu *et al.* (1998) demonstrated that inhibition of NADPH oxidase by diphenyleneiodonium chloride suppressed both camptothecin-induced apoptosis and camptothecin-induced H₂O₂ production in both SCLC and leukemia cells. These results indicate that NADPH oxidase increases H₂O₂ generation during camptothecin-induced apoptosis. Hiraoka *et al.* (1998) investigated the role of phagocyte NADPH oxidase in apoptosis in human leukemia and in neutrophilic-differentiated cells and found that generation of ROS by NADPH oxidase may be related directly or indirectly to camptothecin-induced apoptosis. Although it is known that camptothecin induces ROS formation, no study so far has been carried out to show the effects of Topotecan on the oxidative stress markers and antioxidant profile in human breast cancer cell lines (Hiraoka *et al.*, 1998). There is also no data or study about the interaction of Topotecan with cellular enzymes involved in ROS formation.

Our data showed that lipid peroxidation expressed as TBARS increased in MCF-7 cells treated with Topotecan. Similar results with different drugs were reported by other researchers. Bustamante *et al.* (1990) reported increased lipid peroxidation in MCF-7 cell lines treated with adriamycin.

In our study, we found significantly higher protein carbonyl (PCO) levels in Topotecan treated cell lines compared to the control cells which contained only vehicle. On the other hand, levels of protein sulfhydryl groups and of GSH were significantly lower in Topotecan treated cells in comparison to the control cells. The decrease in GSH and protein sulfhydryl groups might be due to increased oxidation of thiol groups to struggle with high ROS levels in cells incubated with Topotecan. These data support our hypothesis of increased oxidative stress in MCF-7 cell lines incubated with Topotecan. Similar results were observed by other researchers. Geng *et al.* (2003) treated SMMC-7721 human hepatoma cell line with docetaxel for 24 h. They found that levels of ROS significantly increased, while levels of glutathione significantly decreased. Hug *et al.* (1997) reported that the treatment of HEPG2 hepatoma cell line with bleomycin caused GSH depletion and generated ROS. Mans *et al.* (1992) showed that GSH depletion increased sensitivity to etoposide.

In our study, Cu,Zn-SOD activity in MCF-7 cell line treated with Topotecan showed a non-significant increase (P>0.05). In contrast to Cu,Zn-SOD

activity, the increases in catalase and glutathione peroxidase activities were significant in comparison to the control cells. These increased antioxidant enzyme activities might be considered as a response to increased oxidative stress in cells treated with Topotecan. The results of the study of Sarvazyan *et al.* (1995) indicate that doxorubicin increases formation of superoxide anion in isolated cardiac myocytes. They propose that intracellular SOD activity protects adult rat cardiomyocytes from increased intracellular oxidative stress.

Recent studies demonstrate that increased non-enzymatic and enzymatic antioxidant levels are responsible for enhanced resistance to some anticancer drugs (Russo & Mitchell, 1985; Kahlos *et al.*, 2001; Chung-man *et al.*, 2001; Ghazizadeh, 2003). These studies suggest that oxygen radical formation caused by these drugs used for chemotherapy might be an alternative mechanism for their cytotoxic effect on cells and antioxidant supplementation should be avoided in cancer patients in order not to prevent chemotherapy-induced apoptosis of cancer cells (Doroshov, 1986; Sinha *et al.*, 1987).

These findings support our hypothesis that Topotecan increases the oxidative stress in MCF-7 cells. However, the mechanisms by which Topotecan increases oxidative stress and if this can be an alternative mechanism for Topotecan toxicity need further investigations.

CONCLUSIONS

Further studies are needed to clarify why increased oxidative stress was found in Topotecan-treated MCF-7 cells. More precisely, Topotecan might induce oxidative stress in a manner independent of its stabilization of the topoisomerase I cleavage complex. Alternatively, increased oxidative stress might be just a side effect caused by inhibition of transcription and replication, induction of DNA damage, necrosis, or apoptosis. In order to discriminate between ROS induced by Topotecan and oxidative stress as a cellular symptom of the lethal inhibition of topoisomerase I, an experimental setup should be designed using cell lines in which the topoisomerase I-DNA cleavage complex is not stabilized by Topotecan (Desai *et al.*, 2003). Thus, a comparison of the amount of oxidative stress in such a cell line with its parental wild type cells would directly resolve this question. These studies may help in developing new strategies for the treatment of cancer.

Acknowledgement

This study was supported by Akdeniz University Research Fund (project number: 21.01.0122.07).

REFERENCES

- Aebi H (1987) Catalase of enzymatic analysis. In: *Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases*. Bergmeyer H, ed, pp 273-285. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Akbas SH, Timur M, Ozben T (2005) The effect of quercetin on Topotecan cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Surg Res* **125**: 49-55.
- Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK (2003) Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med* **142**: 178-186.
- Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV (1999) Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev* **31**: 971-997.
- Bustamante J, Galleano M, Medrano EE, Boveris A (1990) Adriamycin effects on hydroperoxide metabolism and growth of human breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat* **17**: 145-153.
- Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akcay T, Sivas A (2003) Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin Biochem* **36**: 51-55.
- Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B (2002) Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: 1461-1474.
- Chung-man Ho J, Zheng S, Comhair SA, Farver C, Erzurum SC (2001) Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* **61**: 8578-8585.
- Desai SD, Zhang H, Rodriguez-Bauman A, Yang JM, Wu X, Gounder MK, Rubin EH, Liu LF (2003) Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Mol Cell Biol* **23**: 2341-2350.
- Doroshov JH (1986) Prevention of doxorubicin-induced killing of MCF-7 human breast cancer cells by oxygen radical scavengers and iron chelating agents. *Biochem Biophys Res Commun* **135**: 330-335.
- Erlichman C, Boerner SA, Hallgren CG, Spieker R, Wang XY, James CD, Scheffer GL, Maliepaard M, Ross DD, Bible KC, Kaufmann SH (2001) The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and Topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux. *Cancer Res* **61**: 739-748.
- Evans P, Lyras L, Halliwell B (1999) Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol* **300**: 145-156.
- Fairbanks V, Klee GG (1986) Biochemical aspects of hematology. In: *Textbook of Clinical Chemistry*. Tietz N, ed, pp 1498-1535. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Geng CX, Zeng ZC, Wang JY (2003) Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. *World J Gastroenterol* **9**: 696-700.
- Ghazizadeh M (2003) Cisplatin may induce frataxin expression. *J Nippon Med Sch* **70**: 367-371.
- Gorman A, McGowan A, Cotter TG (1997) Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett* **404**: 27-33.
- Hagiwara SI, Ishii Y, Kitamura S (2000) Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med* **162**: 225-231.
- Hiraoka W, Vazquez N, Nieves-Neira W, Chanock SJ, Pommier Y (1998) Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J Clin Invest* **102**: 1961-1968.

- Hug H, Strand S, Grambihler A, Galle J, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR (1997) Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem* **272**: 28191–28193.
- Hulka BS, Stark AT (1995) Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* **346**: 883–887.
- Kahlous K, Soini Y, Sormunen R, Kaarteenaho-Wiik R, Paakko P, Linnainmaa K, Kinnula VL (2001) Expression and prognostic significance of catalase in malignant mesothelioma. *Cancer* **91**: 1349–1357.
- Kaufmann SH, Peereboom D, Buckwalter CA, Svingen PA, Grochow LB, Donehower RC, Rowinsky EK (1996) Cytotoxic effects of Topotecan combined with various anticancer agents in human cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* **88**: 734–741.
- Kinnula K, Linnainmaa K, Raivio KO, Kinnula VL (1998) Endogenous antioxidant enzymes and glutathione S-transferase in protection of mesothelioma cells against hydrogen peroxide and epirubicin toxicity. *Br J Cancer* **77**: 1097–1102.
- Koster JF, Biemond P, Swaak AJ (1986) Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **45**: 44–46.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent J, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **186**: 464–478.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275.
- Mans DR, Lafleur MV, Westmijze EJ, Horn IR, Bets D, Schuurhuis GJ, Lankelma J, Retel J (1992) Reactions of glutathione with the catechol, the ortho-quinone and the semi-quinone free radical of etoposide. Consequences for DNA inactivation. *Biochem Pharmacol* **43**: 1761–1768.
- Mansat-de Mas V, Bezombes C, Quillet-Mary A, Bettaieb A, D'Orgeix AD, Laurent G, Jaffrezou JP (1999) Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis induced by daunorubicin. *Mol Pharmacol* **56**: 867–874.
- Minotti G, Ronchi R, Salvatorelli E, Menna P, Cairo G (2001) Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy. *Cancer Res* **61**: 8422–8428.
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **247**: 3170–3175.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55–63.
- Muluk NB, Kisa U, Kacmaz M, Apan A, Koc C (2005) Efficacy of Topotecan treatment on antioxidant enzymes and TBA-RS levels in submandibular glands of rabbits: an experimental study. *Otolaryngol Head Neck Surg* **132**: 136–140.
- Novak RF, Kharasch ED (1985) Mitoxantrone: propensity for free radical formation and lipid peroxidation — implications for cardiotoxicity. *Invest New Drugs* **3**: 95–99.
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**: 158–169.
- Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* **233**: 357–363.
- Russo A, Mitchell JB (1985) Potentiation and protection of doxorubicin cytotoxicity by cellular glutathione modulation. *Cancer Treat Rep* **69**: 1293–1296.
- Russo A, Mitchell JB, McPherson S, Friedman N (1984) Alteration of bleomycin cytotoxicity by glutathione depletion or elevation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **10**: 1675–1678.
- Sarvazyan NA, Askari A, Huang WH (1995) Effects of doxorubicin on cardiomyocytes with reduced level of superoxide dismutase. *Life Sci* **57**: 1003–1010.
- Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M (1998) Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* **273**: 26900–26907.
- Sinha BK, Katki AG, Batist G, Cowan KH, Myers CE (1987) Adriamycin-stimulated hydroxyl radical formation in human breast tumor cells. *Biochem Pharmacol* **36**: 793–796.
- Sinha BK, Mimnaugh EG (1990) Free radicals and anticancer drug resistance: oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors. *Free Radic Biol Med* **8**: 567–581.
- Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M (1993) An improved MTT assay. *J Immunol Methods* **157**: 203–207.
- Somasundaram S, Edmund NA, Moore DT, Small GW, Shi YY, Orłowski RZ (2002) Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res* **62**: 3868–3875.
- Stadtman ER (2002) Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* **33**: 597–604.
- Stadtman ER, Levine RL (2000) Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* **899**: 191–208.
- Telci A, Cakatay U, Kayali R, Erdogan C, Orhan Y, Sivas A, Akcay T (2000) Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* **32**: 40–43.
- Wasowicz W, Neve J, Peretz A (1993) Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* **39**: 2522–2526.
- Wenzel U, Nickel A, Kuntz S, Daniel H (2004) Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis* **25**: 703–712.