

T913/i-1

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

**Nilüfer GÜLMEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**1997**

1913

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

Nilüfer GÜLMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

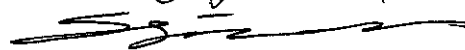
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 17/06/1997 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından 85(.....) not takdir edilerek  
Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. O.Nidai ÖZEŞ (Danışman)



Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU



Yrd. Doç. Dr. Burhan SAVAŞ

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

**ÖZ**

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

**Nilüfer GÜLMEN**

**Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı**

**Haziran 1997, 57 + x Sayfa**

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

**ANAHTAR KELİMELER:** Lökemik hücre, Interferon, 5-FU, Hidroksiüre, sitotoksik etki, apoptosis, DNA fragmentasyonu.

**Jüri:** Doç. Dr. O.Nidai ÖZEŞ

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Burhan SAVAŞ

## **ABSTRACT**

# **ANTITUMOR AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF INTERFERON ALPHA ON SEVERAL LEUKEMIC CELLS**

**Nilüfer GÜLMEN**

**M.S. in Biology**

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

**June 1997, 57 + x pages**

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

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

**COMMITTEE:** Assoc. Prof. Dr. O. Nidai ÖZEŞ  
Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU  
Assist. Prof. Dr. Burhan SAVAŞ

## ÖNSÖZ

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

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

## İÇİNDEKİLER

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

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

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



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
kDa	Kilodalton
U	Unit
ml	Mililitre
mg	Miligram
ng	Nanogram
$\mu$ g	Mikrogram
$^{\circ}$ C	Derece Santigrat
nm	Nanometre
mAmp	Miliamper

### Kisaltmalar

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

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

## ÇİZELGELER DİZİNİ

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

## ŞEKİLLER DİZİNİ

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

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

## 1.GİRİŞ:

### 1.1. İnterferonlar ve Özellikleri

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

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

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

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

**Çizelge 1.1 İnterferon Tipleri ve Özellikleri**

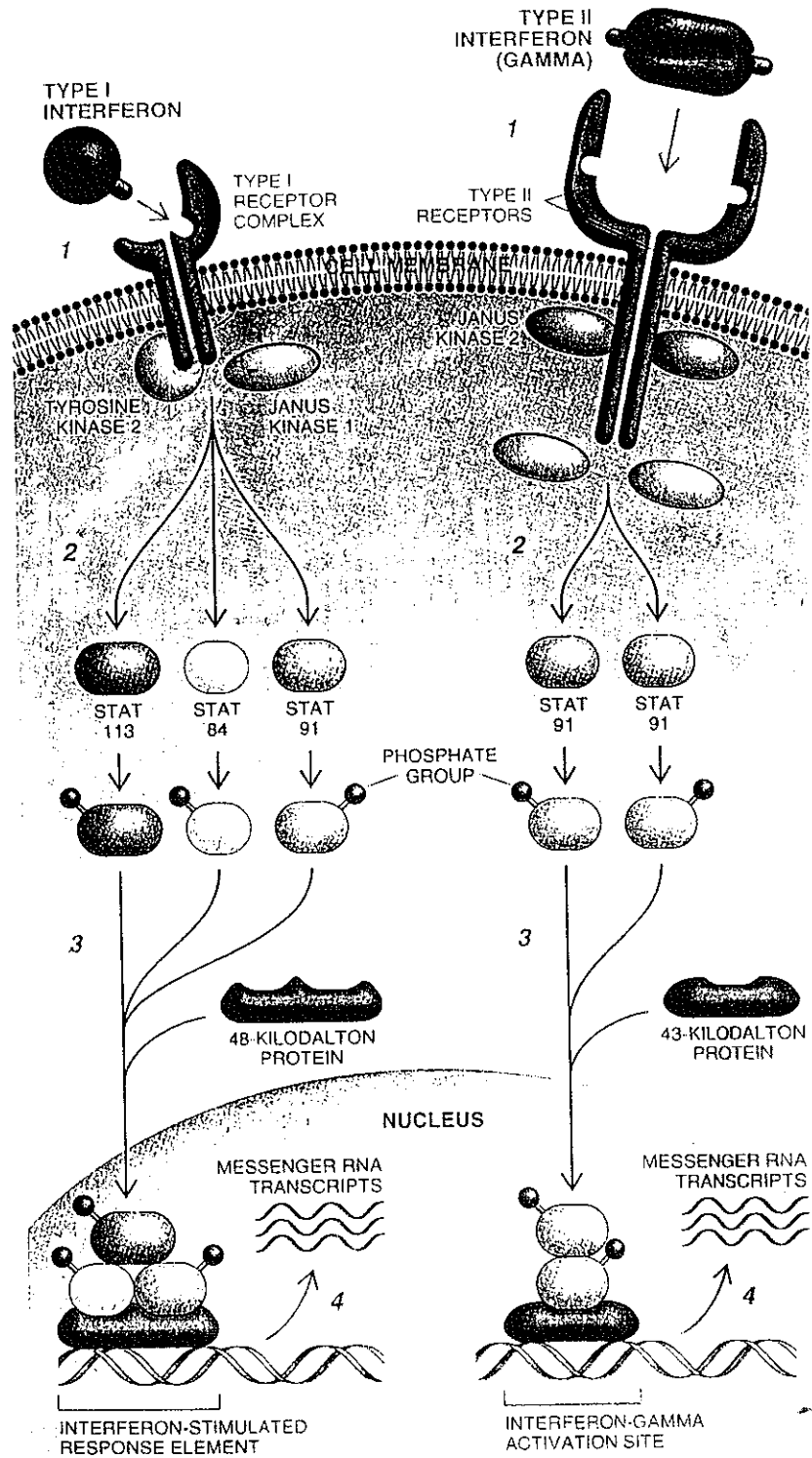
	<u>IFN-<math>\alpha</math></u>	<u>IFN-<math>\beta</math></u>	<u>IFN-<math>\gamma</math></u>
<b>Gen Sayısı</b>	20 ...	1	1
<b>Lokasyon</b>	9 kromozomun kısa kolu	9 kromozomun kısa kolu	12 kromozomun uzun kolu
<b>İntron Sayısı</b>	-	-	3
<b>Aminoasit Sayısı</b>	189	189	146
<b>Glikolizasyon</b>	-	-	+
<b>pH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

## 1.2. İnterferon Alfa Sinyal İletim Mekanizması

İlk keşfedildiklerinden günümüze kadar interferonlar üzerinde yapılan çalışmaların çoğu interferonların gen indüksiyonunu nasıl bir mekanizma ile yaptıkları konusunda olmuştur. Bu çalışmalar sonucunda TipI ve TipII interferonların gen indüksiyon mekanizmalarının farklı olduğu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 1.2 1.)

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





Şekil 1.1 Interferon Alfa'nın Sinyal İletim Mekanizmasının Şematik Görünümü

### 1.3. Kronik Myelogenik Lösemi ve İnsan Burkitt Lenfoma

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

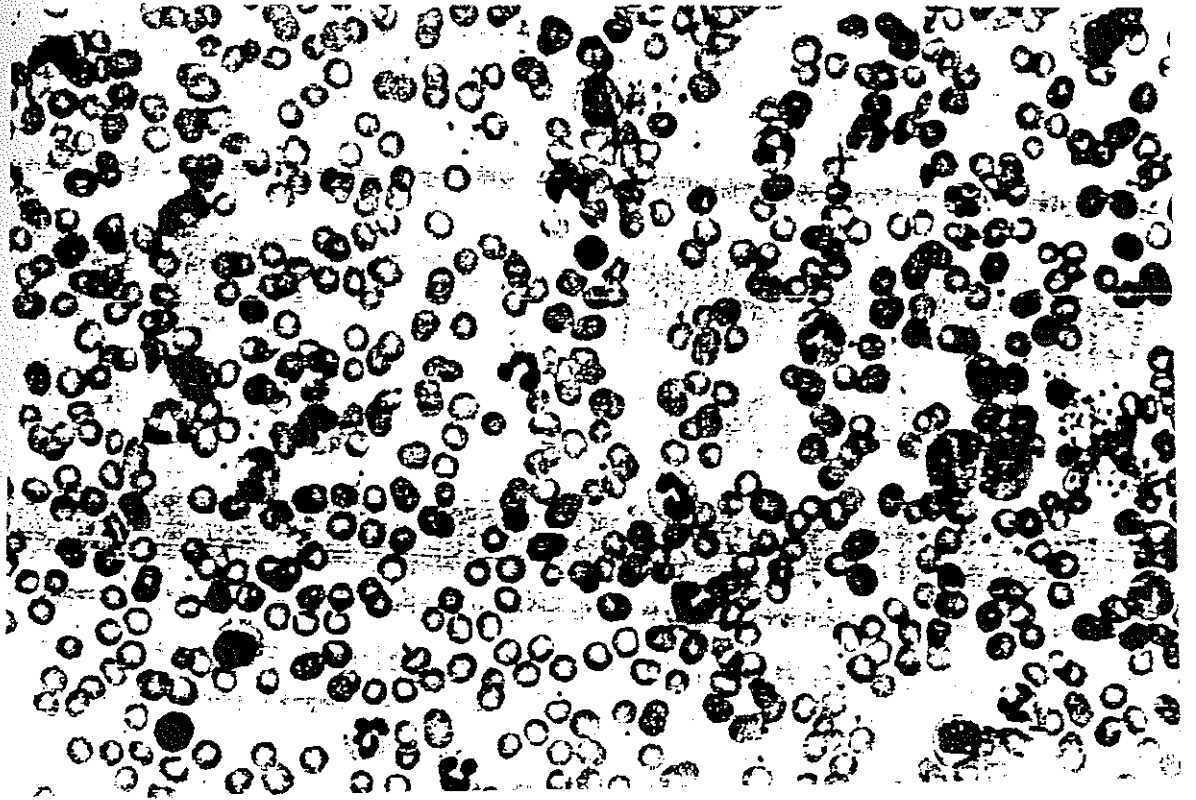
#### 1.3.1. Kronik myelogenik lösemi (CML)

CML (Kronik Myelogenik Lösemi), ilk kez Virchow (1845), Craigie (1845) ve Bennett (1845) tarafından tanımlanmıştır (Şekil 13.1.1). Bu hastalığın önemli özelliklerini içeren en iyi tanımlama Craigie'nin yaptığı tanımlamadır: "neşesizlik, ... sol epigastrik bölgede şişme ve sertleşme, ... geceleri terleme, ... kan damarlarının lenf ya da irin içeren pıhtı ile kaplanması". Ayrıca, CML myeloid hiperplazi ve dalak büyümesi ile karakterize edilir ve son safhasında blast krizi olarak bilinen akut lösemiye dönüşür.

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

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

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



Şekil 1.2 Kronik Myelogenous Lösemi (Chikkappa 1976)

### 1.3.2. İnsan burkit lenfoma

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

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

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

## 1.4. Apoptosis Nedir, Nasıl Gözlenir ve

### Apoptosis İndükleyicileri ve İnhibitörleri

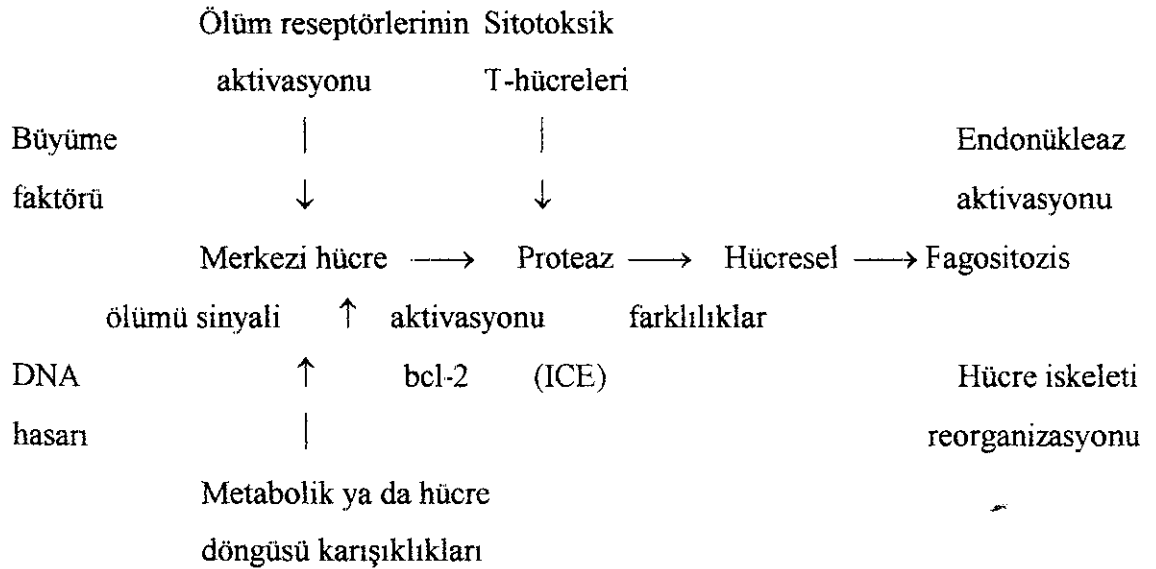
#### 1.4.1. Apoptosis nedir, nasıl gözlenir

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

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

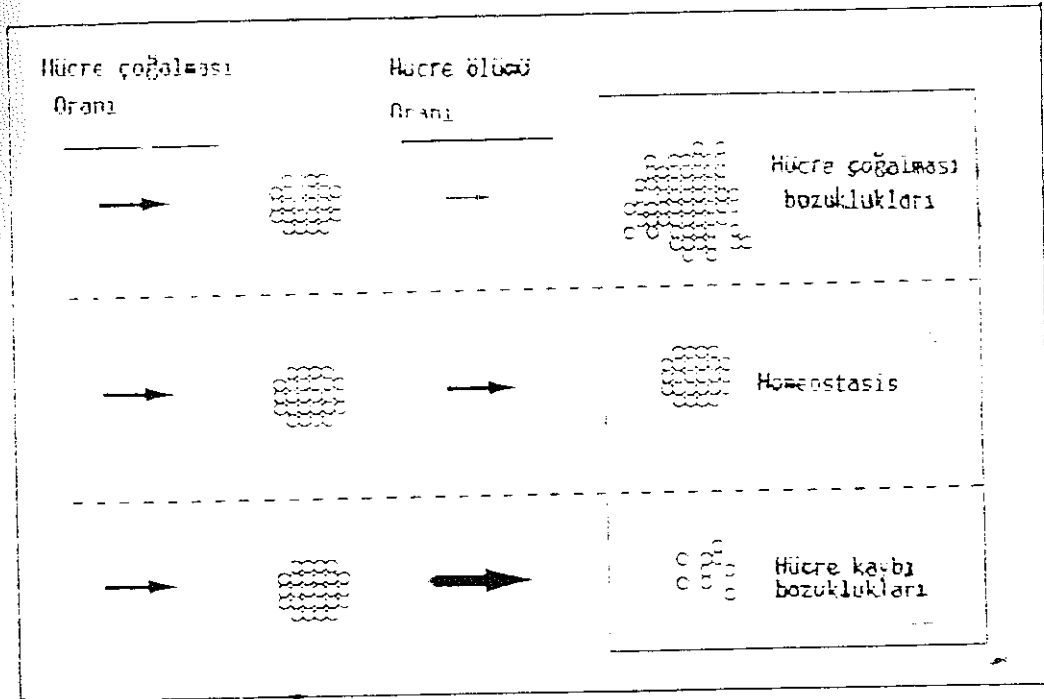
Ölmekte olan bir hücre kendi plazma membranının bütünlüğünü korur. Bununla birlikte apoptotik hücrelerin plazma membranındaki değişiklikler yakınındaki fagositik hücrelere onları içine almaları için bir sinyal oluşturur ve böylece hücrel yıkım başlar. Hücreler hemen fagosite olmazlar, önce "Apoptotik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

**Çizelge 1.2 Apoptotik Hücre Ölümünün Regülasyonu İçin Kuramsal Model**





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



Şekil 1.3 Hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki denge

## 1.4.2. Apoptosis indükleyicileri ve inhibitörleri

### 1.4.2.1. Hücreyi apoptosise yönlendiren faktörler:

#### A- Fizyolojik Aktivatörler

- 1- TNF ailesi
  - Fas ligand
  - TNF
- 2- Transforming(dönüştürücü) Büyüme Faktörü  $\beta$
- 3- Nörotransmittler
  - Glutamat
  - Dopamine
  - N-metil-D aspartat
- 4- Büyüme faktörü
- 5- Matriks bağının kaybı
- 6- Kalsiyum
- 7- Glukokortikoidler

#### B- Zarar Yaratan İndükleyiciler

- 1-Isı şoku
- 2- Viral enfeksiyon
- 3- Bakteriyel toksinler
- 4- Onkogenler
  - c-myc, rel, E1A
- 5- Tümör baskılayıcılar
  - p53
- 6- Sitolitik T-hücreleri
- 7- Oksidanlar
- 8- Serbest radikaller
- 9- Besin kaybı-antimetabolitler



### C- Terapik Ajanlar

#### 1- Kemoterapik ilaçlar

Doxorubicin

Cytosine arabinoside

Vincristine

5-Florourasil

#### 2- Gama radyasyon

#### 3- UV radyasyon

### D- Toksinler

1- Etanol

2-  $\beta$ -amiloid peptit

### 1.4.2.2. Apoptosisi inhibe eden faktörler:

#### A- Fizyolojik İnhibitörler

1- Büyüme faktörleri

2- Hücre dışı matriks

3- CD40 ligand

4- Nötral aminoasitler

5- Çinko

6- Östrojen

7- Androjenler

#### B- Viral Genler

1- Calpain inhibitörleri

2- Sistein proteaz inhibitörleri

3- Tümör promotörleri

PMA(Phorbol Myristat Asetat)

Phenobarbital

$\alpha$ -Hekzaklorosiklo heksan

## 1.5. Interferon Alfa'nın Terapide Kullanımı

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

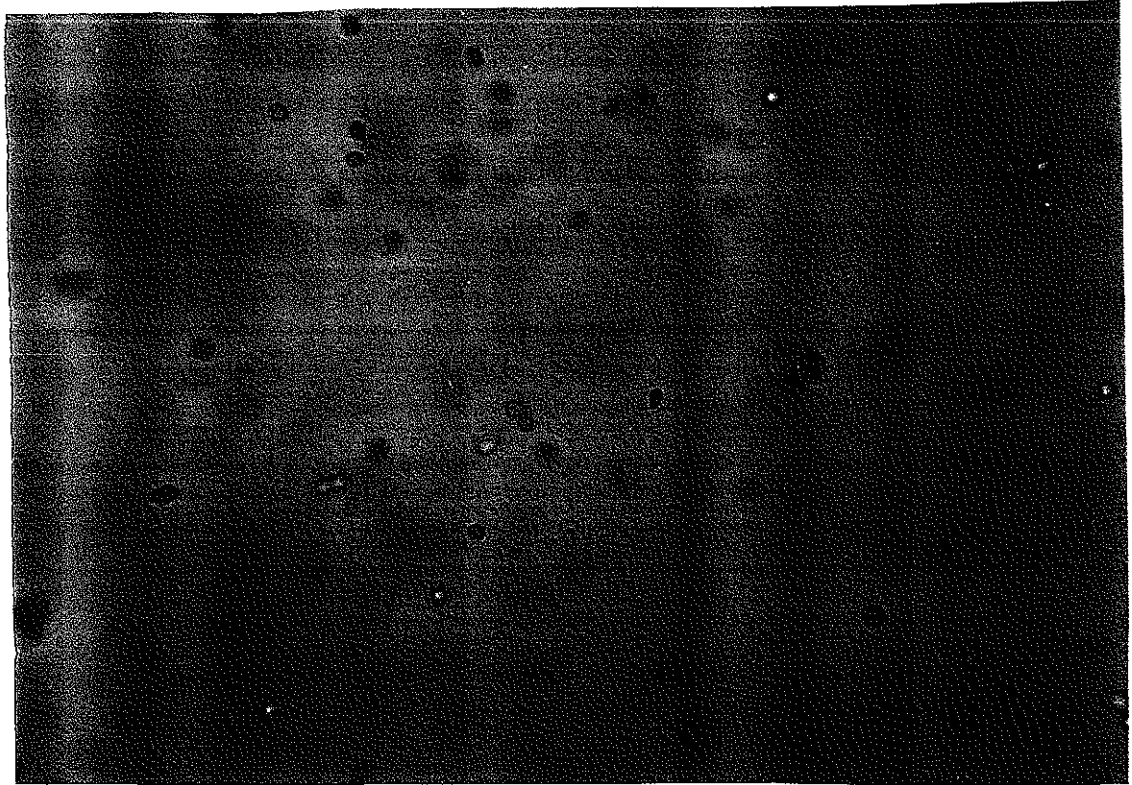
## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Hücreler ve kültürasyonları

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

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

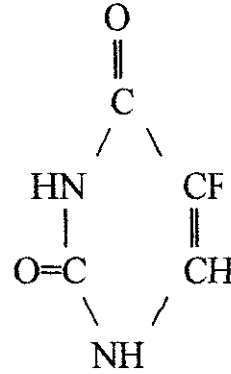


Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan Daudi hücrelerinin inverted mikroskopta görünümü

### 2.1.2. Çalışmada kullanılan sitokin ve kemoterapikler

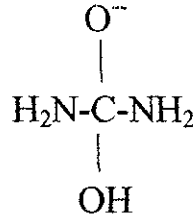
**Interferon:** Çalışma boyunca kullanılan Interferon  $\alpha$ -con 1 AMGEN şirketinden tedarik edilmiştir.

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



Şekil 2.2 5-FU'in Kimyasal Yapısı

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



Şekil 2.3 Hidroksi Üre'nin Kimyasal Yapısı

## 2.2. METOD

### 2.2.1. PRO.ML hücrelerinin izolasyonu

Hastadan alınan 10ml kan EDTA'lı tüpe konulmuştur. Bu kan 3 misli PBS (8gr/lt NaCl, 0.2gr/lt KCl, 1.15gr/lt Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2gr/lt KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH:7.0) tamponu ile sulandırılıp karıştırılmıştır. Histopaque altta, kan üstte olmak üzere bire-bir oranda tüplere konmuştur. Daha sonra bu örnekler 1700-1900 rpm hızla 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonunda serum ve plazma proteinleri yukarıda kalır. Makrofaj ve eritrositler daha ağır oldukları için tüpün dibine çökerler. Ortada beyaz pamuğumsu bir kitle kalır ki; bunlar lenfositlerdir. Bu beyaz tabaka pastör pipeti yardımıyla bir tüpe toplanmıştır. Daha sonra bu tüpe toplanan lenfositler 2-3 kez serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile 2500 rpm hızla santrifüj edilerek yıkanmıştır. Son santrifügasyondan sonra hücre kitlesi üzerine 5-10ml %10 fetal calf serum içeren RPMI-1640 besiyeri konarak 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültüre bırakılmıştır.

Tüm bu işlemler doku kültürü odasında steril şartlar altında yapılmıştır.

### 2.2.2. Büyüme inhibisyonunun ölçülmesi

Bütün hücreler 1x10<sup>5</sup> hücre/ml yoğunluğunda RPMI-1640 besiyerinde bir gece ön inkübasyona tutulduktan sonra Interferon-alfa con 1, 5-Florourasil, Hidroksiüre ve bunların kombinasyonları verilmiş ve bu hücreler 96 saat boyunca 37°C %5 karbondioksitli ortamda inkübe edilmiştir.

Çizelge 2 1 Daudi hücreleri için kullanılan sitokin ve kemoterapiklerin konsantrasyonları

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

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

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

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

$$\% \text{ Ölüm} = \frac{I_n - K_n}{K_n - K_0} \times 100$$

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

$K_n$ =Kontrol hücrelerin n. gündeki sayısı.

$K_0$ =Kontrol hücrelerin 0. gündeki sayısı.



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

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

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

$$\% \text{ Ölüm} = \frac{I_n - K_n}{K_n - K_0} \times 100$$

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

$K_n$ =Kontrol hücrelerin n. gündeki sayısı

$K_0$ =Kontrol hücrelerin 0. gündeki sayısı

### 2.2.3. DNA İzolasyonu ve Jel Elektroforezi

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

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

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

$\text{OD}_{260}$  = 260 nm'deki absorban değeri.

SF = Sulandırma faktörü

DNA miktarları hesaplandıktan sonra herbir örnekten 10 $\mu\text{g}$  alınarak %1'lik Agaroz jel elektroforezine (150V:30mAmp) tabi tutulmuştur. Sonuçlar UV transüliminatörde gözlenmiş ve jellerin fotoğrafları çekilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Çoğalma İnhibisyonunun Ölçülmesi

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

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

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

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

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

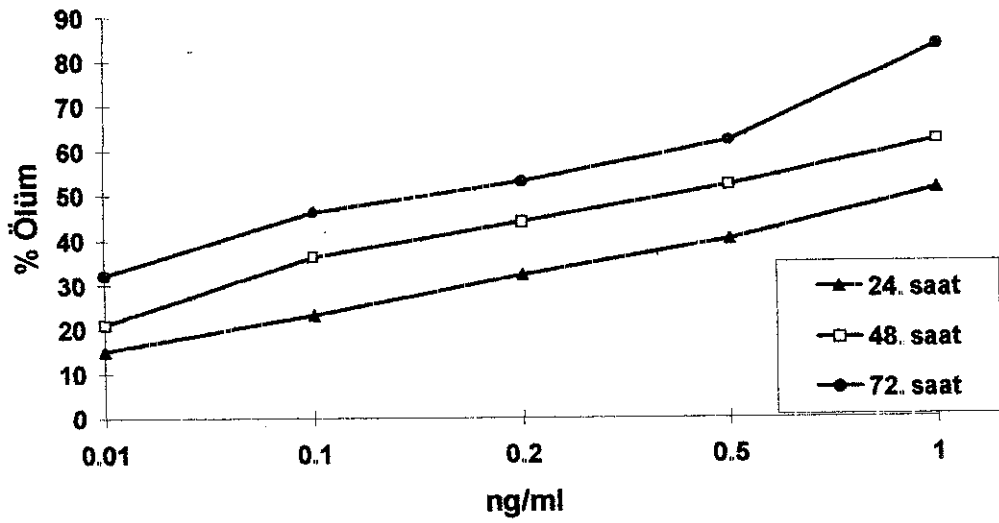
Çalışmada IFN $\alpha$ -con 1'in 5-Florourasil ve Hidroksiüre ile birlikte gösterdiği sitotoksik etki de araştırılmıştır. IFN $\alpha$ -con 1'in sabit bir dozuyla (0.2ng/ml) 5-Florourasil'in 45ng/ml ile 900ng/ml arasında değişen dozları çalışmada kullanılan üç hücre hattında da farklı sitotoksik etki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

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

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

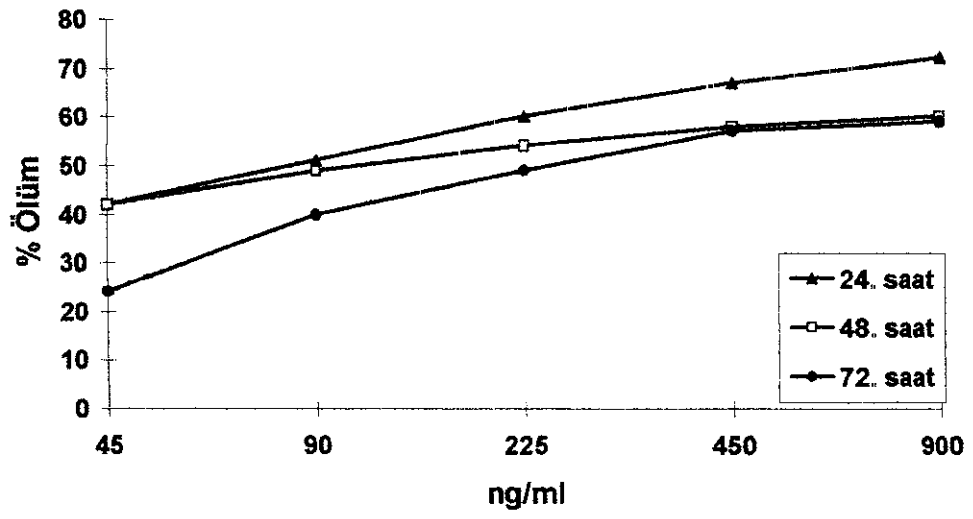
konsantrasyona ve zamana bağlı olarak artan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 250 ng/ml IFN $\alpha$ -con 1 ve 50 ng/ml Hidroksi üre ile muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte %44 olan çoğalma inhibisyonu 96 saatte %92'ye kadar çıkmıştır. Aynı şekilde 200 ng/ml Hidroksiüre'nin IFN $\alpha$ -con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



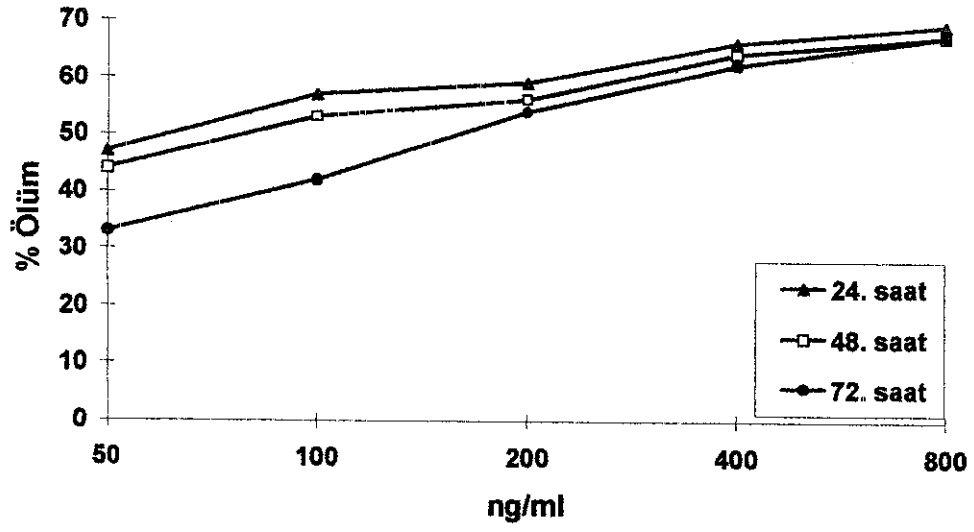


Şekil 3.1 IFN-alfa'nın Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır)

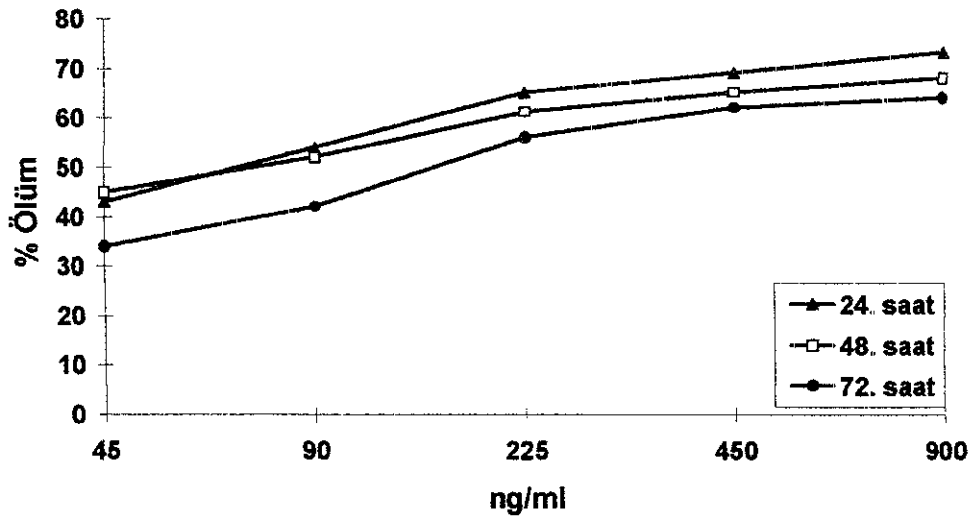




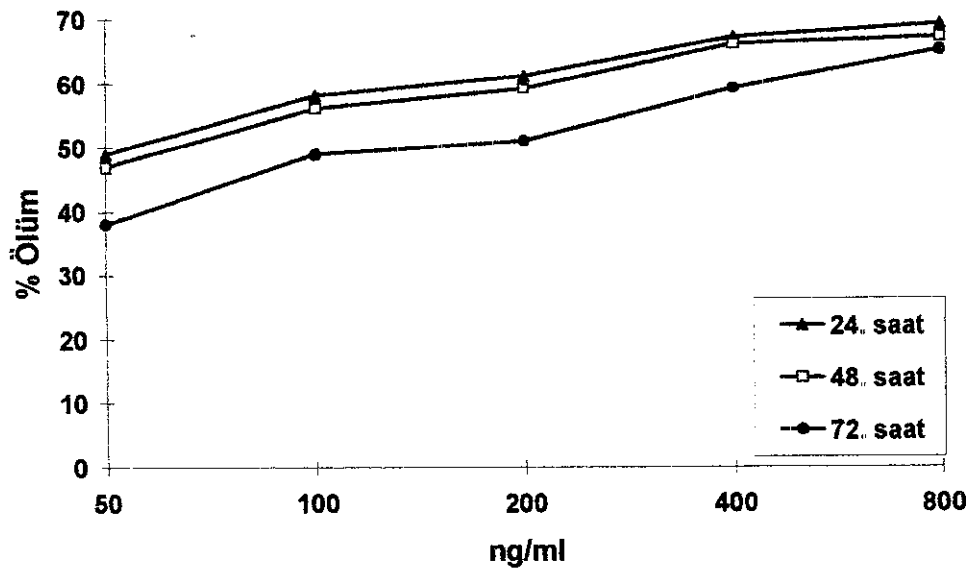
Şekil 3.2 5-FU'in Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır)



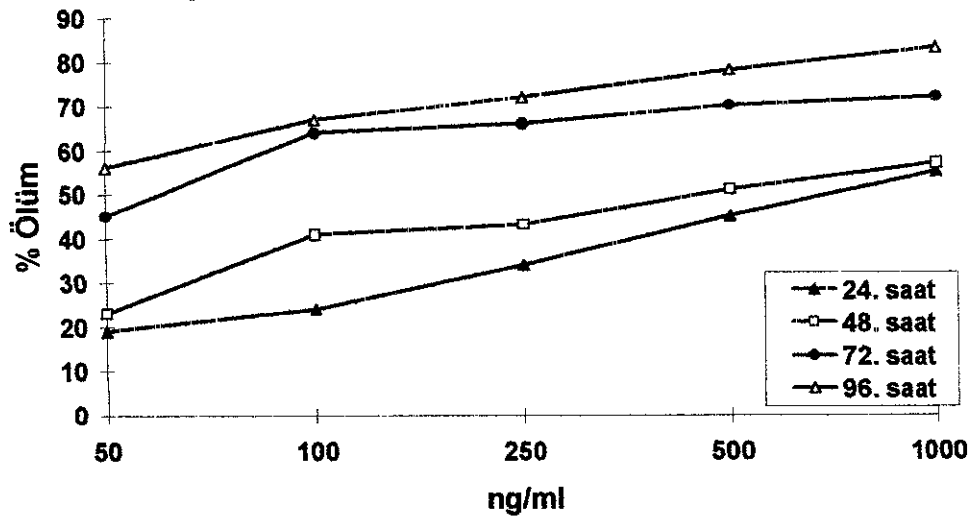
Şekil 3.3 H.Üre'nin Daudi Hücreleri Üzerinde gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır)



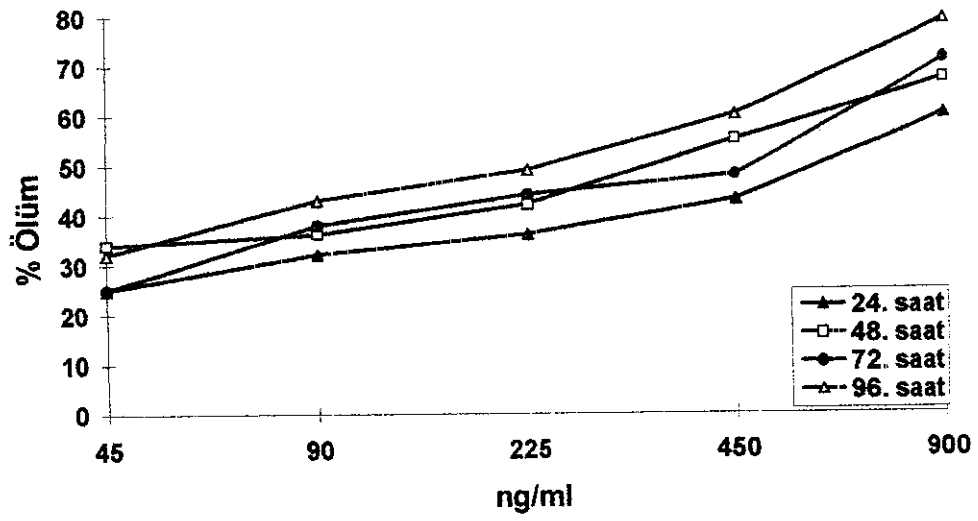
Şekil 3.4 IFN-alfa + 5-FU Kombinasyonunun Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki (Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)



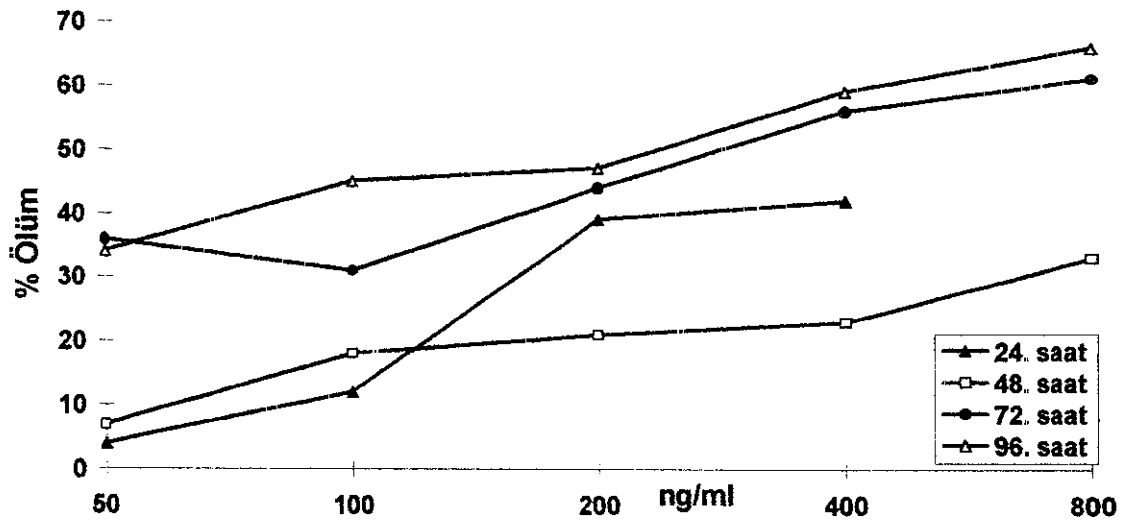
Şekil 3 5 IFN-alfa + H Üre Kombinasyonunun Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)



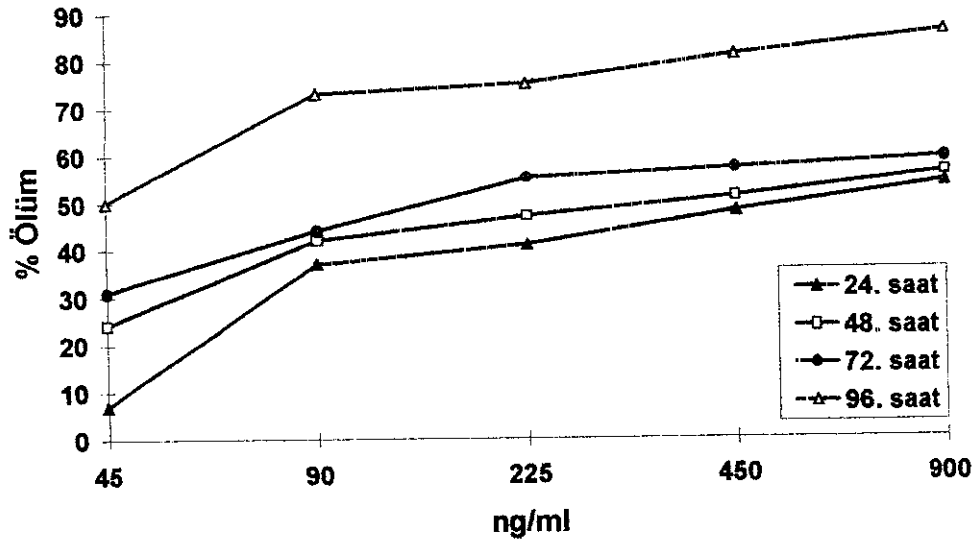
Şekil 3.6 IFN-alfa'nın K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır)



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

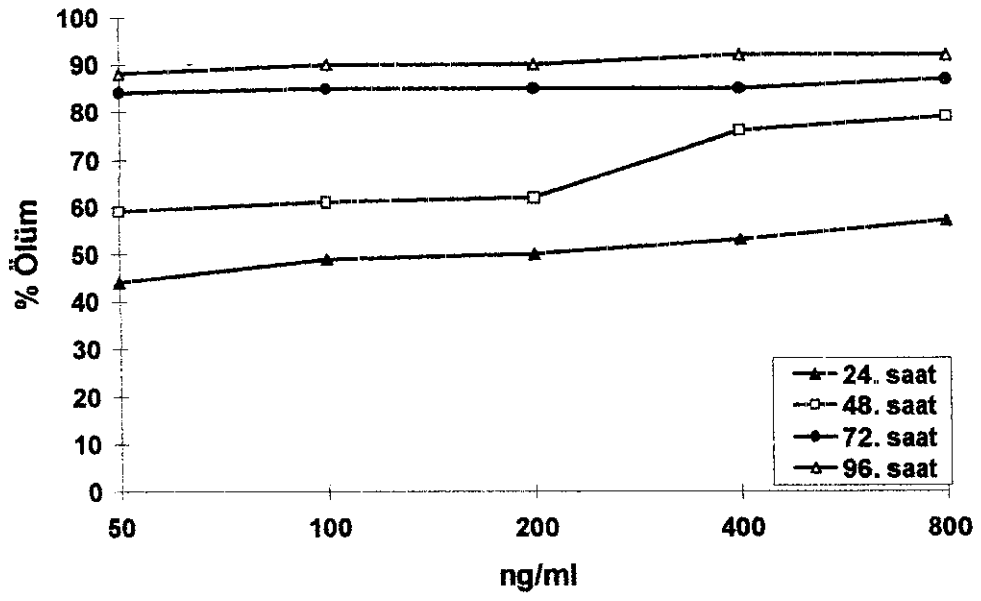


Şekil 3.8 H Üre'nin K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)

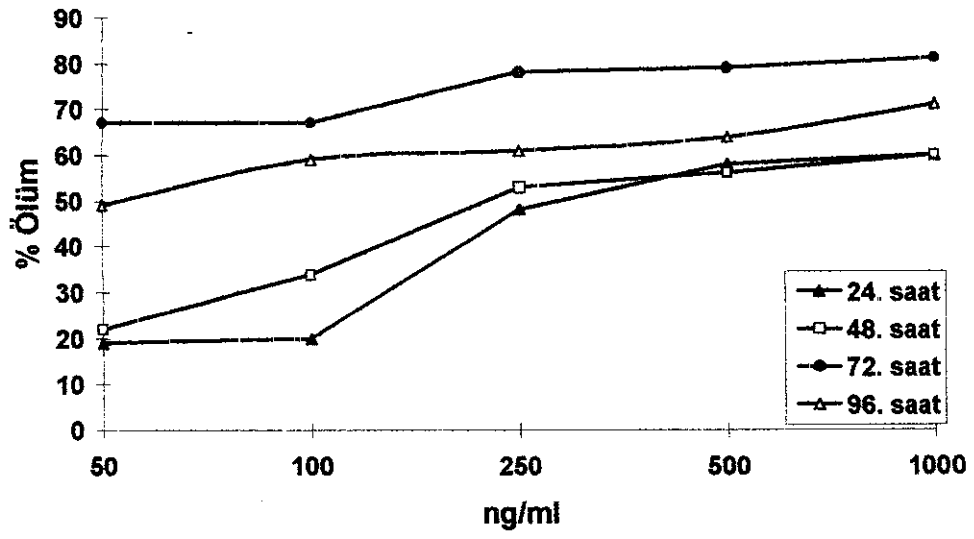


Şekil 3.9 IFN-alfa + 5-FU Kombinasyonunun K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır).

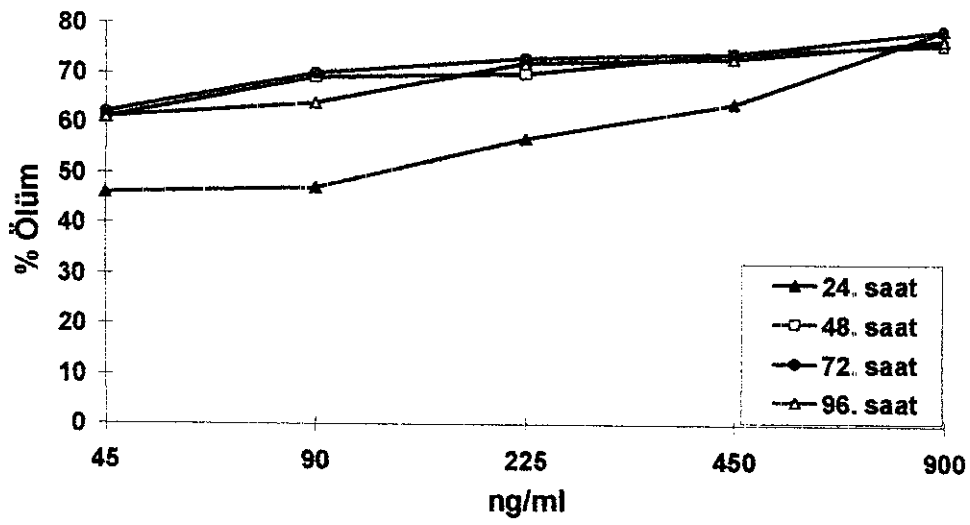




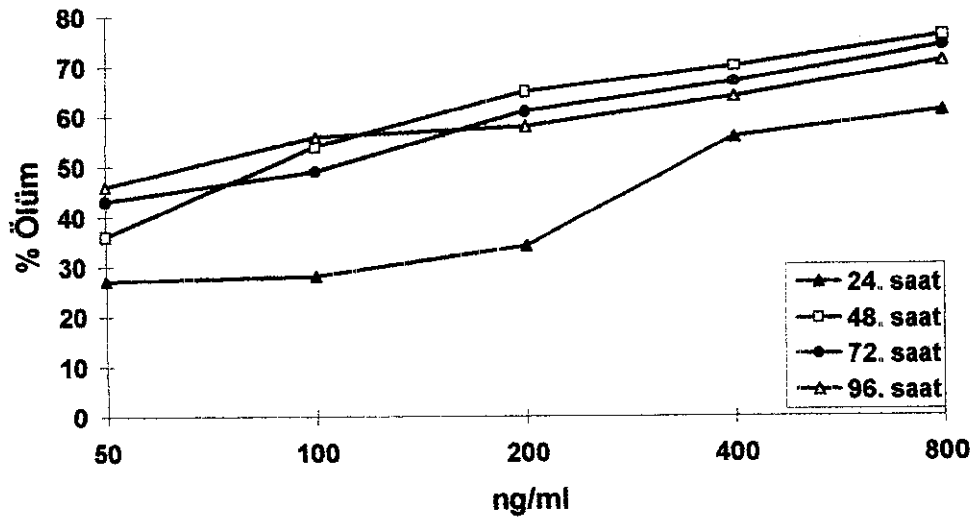
Şekil 3.10 IFN-alfa + H Üre Kombinasyonunun K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır )



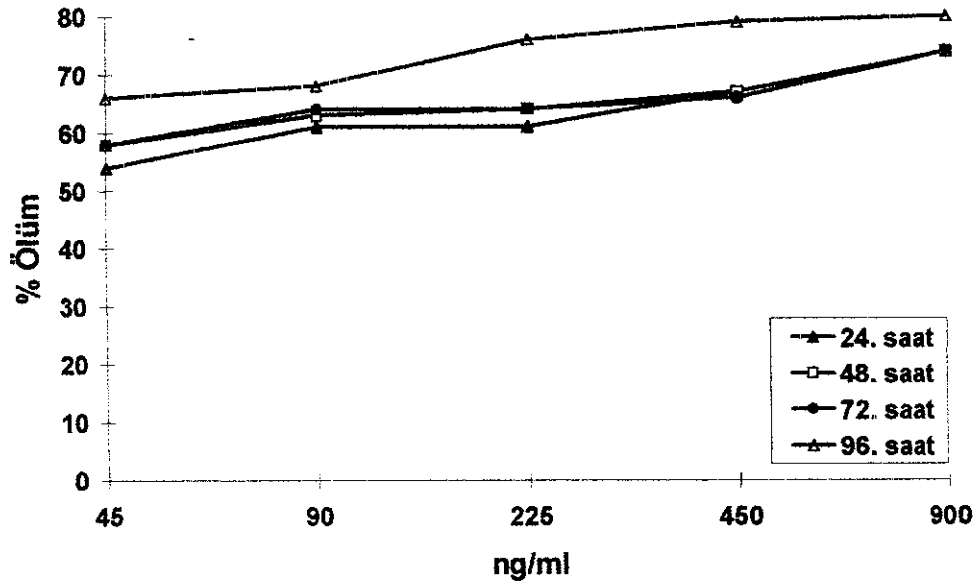
Şekil 3.11 IFN-alfa'nın PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)



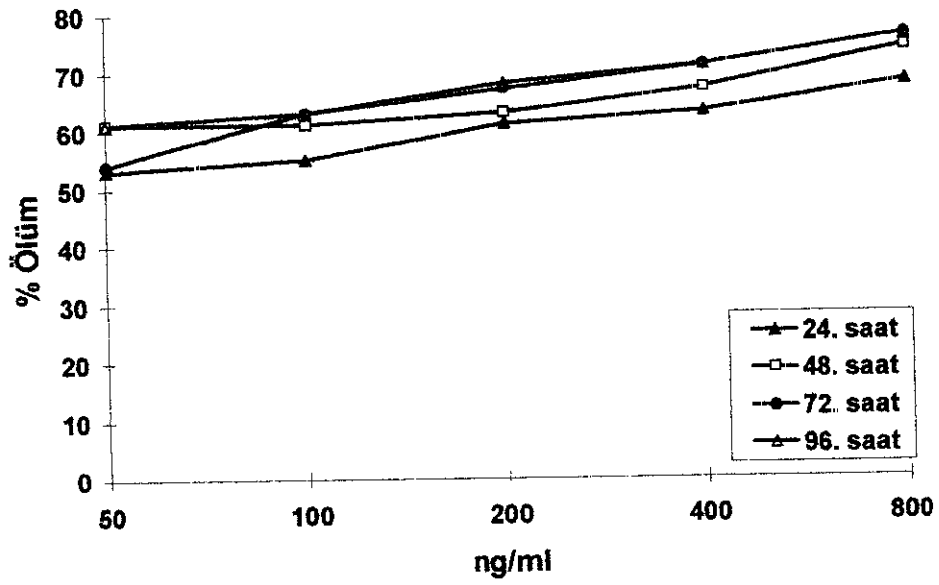
Şekil 3 12 5-FU'in PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)



Şekil 3 13 H Üre'nin PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki  
( Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)



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



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

### 3.2. DNA Fragmentasyonu

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

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

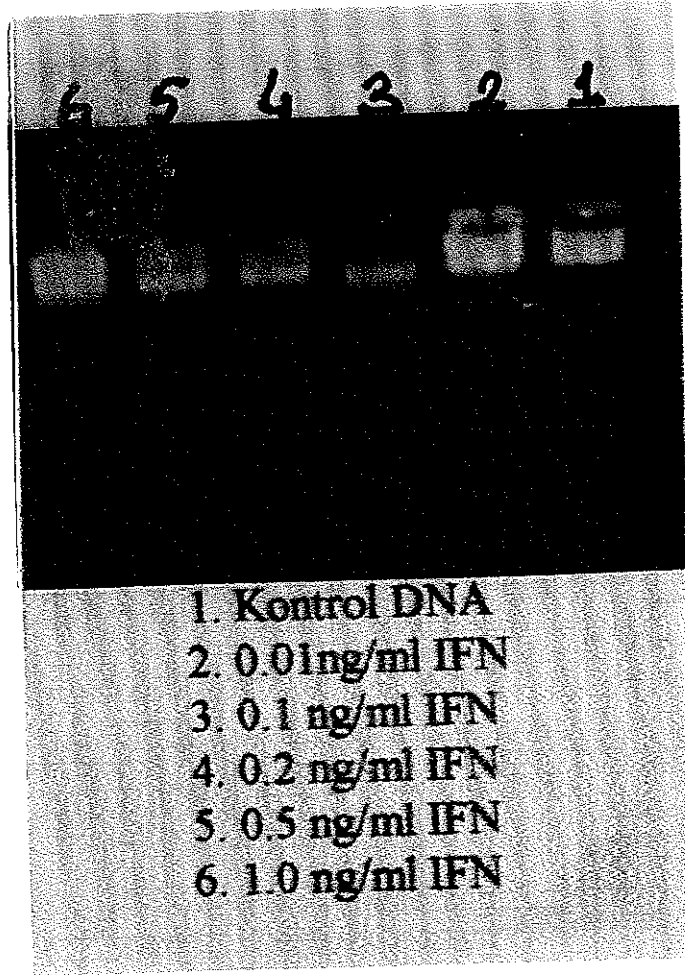
Hidroksiüre'nin Daudi hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etki diğer kemoterapiklerin söz konusu hücrelerde gösterdiği sitotoksik etkiden farklı olarak konsantrasyona bağlı olarak artmış, ancak zamana bağlı olarak azalmıştır. Buna bağlı olarak Hidroksiüre'nin 50-800 ng/ml arasında değişen 5 farklı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

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

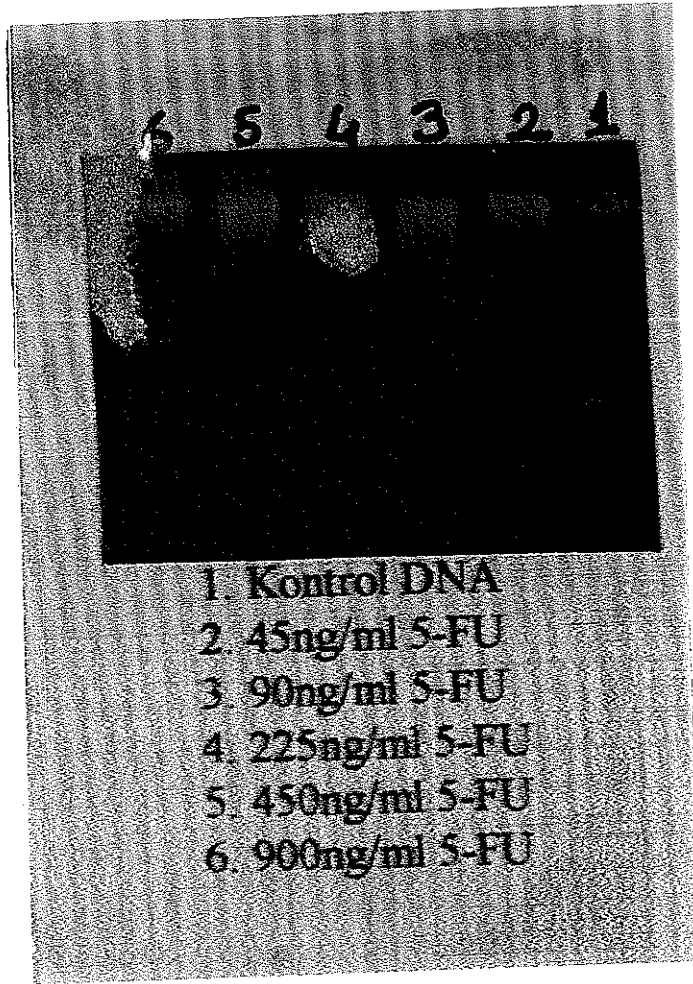
inkübe edilen Daudi hücrelerinde görülen DNA fragmentasyonundan daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.19).

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

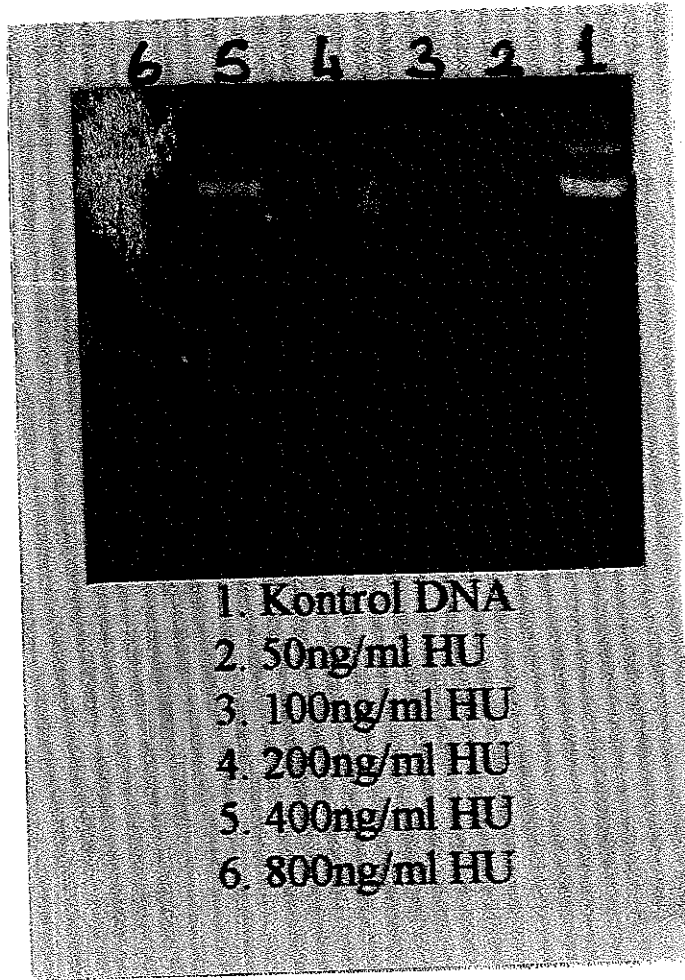




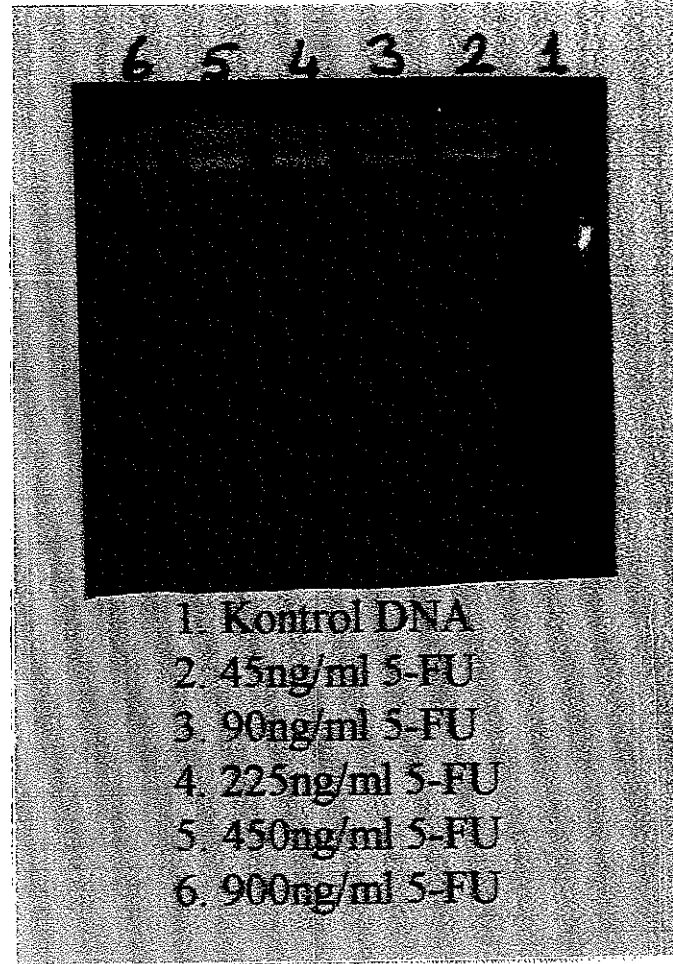
Şekil 3 16 Daudi hücrelerinde IFN $\alpha$ -con 1'in Apoptosisi İndüksiyonu.



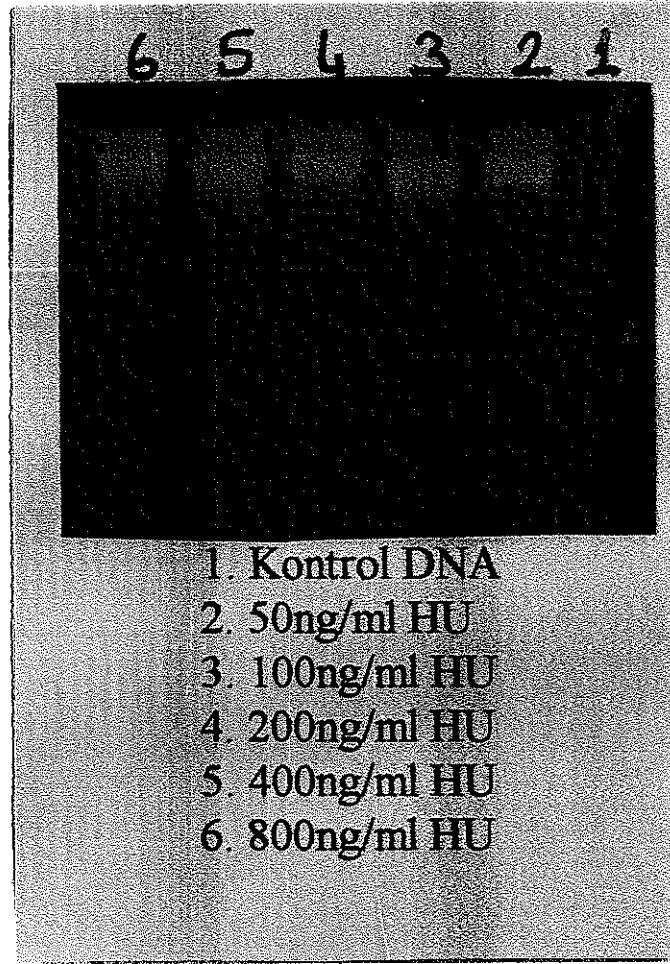
Şekil 3.17 Daudi Hücrelerinde 5-Florourasil'in Apoptosisi İndüksiyonu



Şekil 3.18 Daudi Hücrelerinde Hidroksiüre'nin Apoptosisi İndüksiyonu.



Şekil 3 19 Daudi Hücrelerinde IFN $\alpha$ -con 1 + 5-Florourasil'in Apoptosisi İndüksiyonu



Şekil 3.20 Daudi Hücrelerinde IFN $\alpha$ -con 1 + Hidroksiüre'nin Apoptosisi İndüksiyonu.

#### 4. TARTIŞMA

Yapılan çalışmada IFN $\alpha$ -con1, 5-Florourasil ve Hidroksi Üre ile bunların kombinasyonlarının lökemik hücreler üzerinde gösterdiği büyümeyü durdurucu etkisi konsantrasyon bağımlı olarak ortaya çıkmıştır. Bu kemoterapiklerin lökemik hücrelerin büyümesini inhibe etme özelliği bunların sözkonusu hücrelerde DNA fragmentasyonunu başlatmasıyla ilgili görünmektedir. Çünkü IFN, 5-Florourasil ve Hidroksi Üre ile bunların kombinasyonlarının artan konsantrasyonları, artan miktarda DNA fragmentasyonu ve buna orantılı şekilde de büyüme inhibisyonu sağlamaktadır.

Çalışmada kullanılan üç lösemik hücrenin IFN $\alpha$ -con 1'e karşı olan duyarlılıkları büyük farklılıklar göstermiştir. Daudi hücreleri IFN $\alpha$ -con 1'e duyarlı iken K562 ve PRO.ML hücreleri daha fazla direnç göstermişlerdir. Ozes vd (1992), tarafından yapılan bir çalışmada IFN $\alpha$ -con1'in Daudi hücreleri üzerinde gösterdiği antiproliferatif (büyümeyi durdurucu) etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmada sözkonusu lökemik hücrelerde bu IFN- $\alpha$ 'nın çoğalma inhibisyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Ozes vd 1992). Benzer bir çalışma da HCL (Saçlı Hücre Lösemisi) teşhisi konan bir hastadan izole edilen Eskol hücrelerinde de yapılmış ve IFN $\alpha$ -con1'in bu hücreler üzerinde de çoğalmayı durdurucu bir etki gösterdiği gözlenmiştir (Ozes vd 1993).

IFN-alfanın çeşitli kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisi olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Örneğin Maeda vd (1988), insan kolon kanseri hücre hattı olan RPMI 4788 hücrelerinde IFN- $\alpha$ 'yı test etmişler ve IFN- $\alpha$ 'nın sözkonusu hücrelerde antiproliferatif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Maeda vd. 1988).

IFN-alfa tedavi amaçlı olarak tek başına kullanıldığı gibi çeşitli kemoterapik ilaçlarla birlikte de kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, gebelik dönemindeki kronik lösemili hastaların yaşam sürelerinin IFN- $\alpha$ , 2-deoksikoformisin ve 2-klorodeoksiadenozin gibi terapitik ajanların tedavisiyle uzatılabildiği gösterilmiştir ( Talpaz vd. 1991, Piro vd 1990)



Yapılan bu çalışmada IFN $\alpha$ -con 1'in 5-Florourasil ve Hidroksiüre ile kombinasyonlarının üç lösemik hücre hattı üzerinde gösterdikleri antiproliferatif etkileri araştırılmıştır ve sonuçta IFN $\alpha$ -con 1'in her iki kemoterapik ilaçla olan kombinasyonunda da sinerjistik etki gözlenmiştir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda farklı tümör hücre hatlarında IFN- $\alpha$  ve 5-Florourasil'in aralarında sinerjik etki gösterdiği saptanmıştır. Servikal karsinoma hücre hattı ( ME180), saçlı hücre lösemisi hücre hattı ( Eskol), eritroblastik lösemi hücre hattı ( K562) ve AIDS-bağımlı Kaposi's sarkoma hücrelerinin primer kültürlerinde IFN- $\alpha$  ve 5-Florourasil'in birlikte zamana ve konsantrasyona bağlı olarak artan bir sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir ( Reiter vd. 1992).

IFN- $\alpha$  ve 5-Florourasil'in birlikte gösterdikleri sitotoksik etki, Wadler vd. (1996) tarafından özafagus kanserli hastalar üzerinde test edilmiş ve bu etkilerini gösterirken DNA fragmentasyonuna da sebep oldukları saptanmıştır (Wadler vd. 1996).

Sugimachi vd. (1996) da rektal kanserlerde 5-Florourasil tedavisinin olumlu sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir ( Sugimachi vd. 1996).

Hidroksiüre'nin Burkitt lenfoma'da apoptosisi indüklediği Johnson vd. (1994) tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir ( Johnson vd. 1994).

Hidroksiüre, Busulfan ve IFN- $\alpha$  gibi terapatik ajanlar genellikle kronik fazdaki kronik myelogenous lösemi tedavisinde kullanılmaktadır. Hidroksiüre ve Busulfan DNA sentezini inhibe eder ve böylece doğuştan sakatlık, fetusun büyümesini geciktirme ve düşük olmasına potansiyel sağlar ( Doll vd. 1989).

## 5. SONUÇ

Trypan mavisi ile sayım yöntemi ölü ve canlı hücrelerin miktarını belirlemede bilim dünyasında kullanılan etkin bir yöntemdir. Bu yöntemle IFN $\alpha$ -con 1 ve kemoterapik ilaçlar olan 5-Florourasil ile Hidroksiüre'nin lösemik hücreler üzerindeki büyümeyi durdurucu etkisi saptanmıştır. IFN $\alpha$ -con 1 ve kemoterapiklerin bulunduğu ortamda inkübe edilen hücrelerden izole edilen DNA'ların fragmentasyona uğrayıp uğramadıklarının agaroz jel elektroforezinde belirlenmesiyle IFN $\alpha$ -con 1 ve bu kemoterapiklerin apoptosisi indükledikleri açıklanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar lösemik hücre çeşidi olan insan Burkitt lenfoma'nın IFN-alfa kullanarak yapılan tedavisinde, bu interferonun nasıl bir mekanizma kullanarak söz konusu hücreleri öldürdüğünün aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca IFN-alfa'ya dirençli olan K562 ve yeni geliştirdiğimiz PRO.ML hücrelerinin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar da IFN-alfa'ya cevap vermenin ardındaki mekanizmanın açığa çıkarılmasında bizlere faydalı olacaktır.



## 6. ÖZET

Bu çalışmada, IFN $\alpha$ -con 1'in kemoterapik ilaçlar olan 5-Florourasil ve Hidroksiüre ile kombinasyonlarının lösemik hücreler üzerine olan antiproliferatif etkisi araştırılmıştır

Antiproliferatif etkinin gösterilmesi Tripan mavisi varlığında ölü ve canlı hücrelerin miktarının tespitiyle, Apoptosisin indüksiyonu ise DNA fragmentasyonu esas alınarak belirlenmiştir

Çalışmada kullanılan 3 lösemik hücrenin IFN $\alpha$ -con 1'e karşı olan duyarlılıkları büyük farklılık göstermiştir Daudi hücreleri IFN $\alpha$ -con 1'e duyarlı iken K562 ve PRO ML hücreleri daha fazla direnç göstermişlerdir. 5-Florourasil Daudi hücrelerinde % 51 oranında büyüme inhibisyonu gösterirken bu oran K562 hücrelerinde % 79, PRO ML hücrelerinde ise % 73 olarak saptanmıştır. IFN $\alpha$ -con 1 ile 5-Florourasil'in kombinasyonları ise her üç hücrede de sinerjik etki göstermiştir. Hidroksiüre'nin büyümeyi durdurucu etkisi Daudi hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak artarken zamana bağlı olarak azalmaktadır. K562 ve PRO ML hücreleri üzerinde ise hem konsantrasyona hem de zamana bağlı olarak artan bir büyüme inhibisyonu göstermiştir. Hidroksiüre'nin IFN $\alpha$ -con 1 ile kombinasyonu yine Daudi hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak artan, zamana bağlı olarak azalan büyüme inhibisyonu gösterirken K562 ve PRO ML hücrelerinde hem konsantrasyona hem de zamana bağlı olarak artan bir büyüme inhibisyonu gösterdiği saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre, IFN $\alpha$ 'nın çeşitli lökemik hücreler üzerindeki büyümeyi durdurucu etkisi bu hücrelerde apoptosisi indüklemesiyle açıklanabilir.

## 7. SUMMARY

In this investigation, antiproliferative effects of IFN $\alpha$ -con 1 and its combinations with 5-Fluorouracil and Hydroxyurea have been studied on leukemic cells. Antiproliferative effect has been determined by counting live and dead cells in the presence of Trypan blue. Induction of apoptosis is determined on the base of DNA fragmentation.

Interferon sensitivity of three different cells, K562, Daudi and PRO.ML, used in this study showed big differences. While Daudi cells were very sensitive to IFN $\alpha$ -con 1, K562 and PRO.ML were relatively resistant to this interferon. While the highest dose of 5-Fluorouracil showed 51 % growth inhibition on Daudi cells, this was 79 % on K562 and 73 % on PRO.ML cells. Combinations of 5-FU IFN $\alpha$ -con 1 showed synergistic effect on all three cells. While growth inhibitory effect of HU on Daudi cells increases on concentration dependent manner, it diminishes by time and growth inhibitory effect of HU on K562 and PRO.ML increases both on the time and dose dependent manner. While combination of HU with IFN $\alpha$ -con 1 showed increasing antiproliferative effect on dose dependent and decreasing by time dependent manner on Daudi cells, this combination showed increased antiproliferative effect on both time and dose dependent manner on K562 and PRO.ML cells.

On the base of this results, it has been concluded that antiproliferative effect of IFN $\alpha$ -con 1 on leukemic cells can be explained by induction of apoptosis

## 8. KAYNAKLAR

- BARON,S, COPENHAVER,D H, DIANZANI,F, FLEISHMANN,W R, HUGHES,T K, KLIMPEL,G R, NIELSE,D W, STANTON,G J and TYRING,S K. 1992. Interferon, *Principles and Medical Applications*, 212-213.
- BRANCA,A and BAGLIONI,C. 1981 Evidence that type I and type II IFNs have different receptors. *Nature*, Vol: 294, 768-770.
- BAER,M R, OZER,H, FOON,K A. 1992 Interferon- $\alpha$  therapy during pregnancy in chronic myelogenous leukemia and hairy cell leukemia. *British Journal of Haematology*, Vol:81, No: 2, 167-169.
- BENNETT,J H. 1845. Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med. Surg. J.* Vol: 64, 413-423.
- CARON-LESLIE, L-A. M, EVANS,R B, CIDLOWSKI,J A. 1994. Bcl-2 inhibits glucocorticoid-induced apoptosis but only partially blocks calcium ionophore or cycloheximide regulated apoptosis in S49 cells. *Faseb Journal*, Vol: 8, 639-645.
- CHAOUCHI,N WALLON,C, TAIEB,J, AUFFREDOU,M T, TERTIAN,G, LEMONIE,F M, DELFRAISSY,J F. and VAZQUEZ,A. 1994. Interferon- $\alpha$  mediated prevention of in vitro apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B cells: Role of bcl-2 and c-myc. *Clinical Immunology and Immunopathology*, Vol: 73, No: 2, 197-204.
- CRAIGIE,D. 1845. Case of disease of the spleen in which death took place in consequence of the presence of purulent matter in the blood. *Edinburgh Med. Surg. J.* Vol: 64, 400-413.
- DOLL,D C, RINGENBERG,Q S and YARBRO,J W. 1989. Antineoplastic agents and pregnancy. *Seminars in Oncology*, Num.:16, 337-346.
- FIALKOW,P. 1967. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol: 58, 1468-71.
- GIBSON,J, GALLGHER,K, CAMERON,K. 1988. Peripheral blood lymphocyte subsets and naturel killer cell number and function during alpha-interferon treatment for hairy cell leukemia. *Aust.N.Z.J. Med.*, Vol: 18, 897-899.
- GOLOMB,H. 1986. Alpha-2 interferon therapy of hairy cell leukemia: a multicenter study of 64 patients. *Journal of Clinical Oncology*, Vol: 4, 900-905.
- GOLOMB, H M, RATAIN,M J, FEFER,A, THOMPSON,J, GOLDE,D W, OZER,H, PORTLOCK,C, SILBER,R, RAPPEPORT,J, BONNEM,E, et al. 1988. Randomized study of the duration of treatment with IFN alpha-2b in patients with hairy cell leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol: 80, 369.
- ISAAC,A and LINDENMANN,J. 1957. Virüs interference. The Interferon. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci. B*, Vol: 147, 258-267.
- JACOBS,A D, CHAMPLIN,R E, GOLDE,D W. 1985. Recombinant alpha-2 interferon for hairy cell leukemia. *Blood*, Vol: 65, 1017-1020.

- JOHNSON,M.H., BAZER,F.W., SZENTE,B.E and JARPE,M.A 1994. How Interferon Fight Disease. *Scientific American*, 68-75
- KAUPPILA,A, CANTELL,K, JANNE,O, KOKKO,E and VIHKO,R. 1982. Serum sex steroid and peptide hormone concentrations, and endometrial estrogen and progesterin receptor levels during administration of human leukocyte interferon *International Journal of Cancer*, Vol:29, 291-294.
- KOEFLER,P. 1981. Chronic myelogenous leukemia: new concepts. *N. Engl. J. Med.* Vol: 315, 1433-38
- LOWE,S.W, RULEY,H.E., JACKS,I. and HOUSMAN,D.E 1993. p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents *Cell*, Vol: 74, 957-967
- MAEDA,I., FUCHIMOTO,S. and ORITA,K. 1988. Hyperthermic enhancement of the antitumor effect of natural human tumor necrosis factor-alpha and beta: and in vivo study *Jpn. J. Cancer Res.* Vol:79, 1054-1061.
- METCALF,D. 1974. Responsiveness of human granulocytic leukemia cell to colony-stimulating factor. *Blood*, Vol : 43, 847-859
- NIELSEN,B., HOKLAND,M, JUSTESEN,J, HASSELBACH,H, ELLEGARD,J, HOKLAND,P. 1989. Immunological recovery of and dose evaluation in IFN-alpha treatment of hairy cell leukemia: Analysis of leucocyte differentiation antigens. *Eur. J. Hematol.*, Vol: 42, 50-59.
- OZES,O.N., REITER,Z., KLEIN,S., BLATT,L. and TAYLOR,M.W. 1992. A comparison of interferon-con 1 with natural recombinant interferon-alphas. antiviral, antiproliferative and natural killer cell inducing activities. *J. of Interferon Research*, Vol: 12, 55-59.
- OBEID,L.M., LINARDIC,C.M., KAROLAK,L.A, HANNUN,Y.A 1993. Programmed cell death induced by Ceramide *Science*, Vol: 259, 1769-1771.
- PELLEGRINI,S. and SCHINDLER,C. 1993. Early events in signalling by Interferons. *Trends in Biological Science*, Vol: 18, 338-342.
- PIRO,L.D., CARRERA,C.J., CARSON,D.A. and BEUTLER,E. 1990. Lasting remission in hairy-cell leukemia induced by a single infusion of 2-chlorodeoxyadenosine. *New England Journal of Medicine*, Vol:322, 1117-1121.
- QUESADA,J.R., REUBEN,J.R., MANNING,J.T., HERSH,E.M., GUTTERMAN,J.U. 1984. Alpha interferons for induction of remission in hairy cell leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 310-315.
- QUESADA,J.R., HERSH,E.M., MANNING,J., REUBEN,J., KEATING,M. and GUTTERMAN,J.U. 1986. Treatment of hairy cell leukemia with recombinant interferon alpha. *Blood*, Vol: 68, 493-497
- RATAIN,M.J., GOLOMB,H.M., VARDIMAN,J.W., VOKES,E.E., JACOBS,R.H., DALY,K. 1985. Treatment of hairy cell leukemia with interferon alpha. *Blood*, Vol: 65, 644-648
- REITER,Z., OZES,O.N., BLATT,L.M. and TAYLOR,M.W. 1992. Cytokine and natural killing regulation of a growth hairy cell leukemia-like cell line: The role of interferon-alpha and interleukin-2. *J. Immunotherapy*, Vol: 11, 40-49.

- REITER,Z. OZES,O.N., BLATT,L.M and TAYLOR M.W. 1992. A dual anti-tumor effect of a combination of interferon-alpha or interleukin-2 and 5-Fluorouracil on natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity *Clinical Immunology and Immunopathology*, Vol:62, No:1, 103-111.
- SIGAUX,F., CASTAIGNE,S., LEHN,P 1987. Alpha interferon in hairy cell leukemia: Direct effects on hairy cells or indirect cytotoxicity *Int. J. Cancer*, Vol: 1, 2-8.
- SPIERS,A 1984. Chronic granulocytic leukemia *Med. Clin. North Am.* Vol:68, 713-727
- SOLARY,E., BERTRAND,R., KOHN,K. and POMMIER,Y 1993. Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood*, Vol: 81, 1359-1368
- SUGIMACHI,B.J., AGGARVAL,B.B., HASS,P.E., FIGARI,I.S., PALLODINO,M.A. and SHEPARD,H.M. 1985. Recombinant tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro *Science*, Vol:230, 943-945.
- TALPAZ,M 1988. Therapy of chronic myelogenous leukemia: chemotherapy and interferons. *Semin Hematology*, Vol: 25, 67-73
- TALPAZ,M, KANTARJIAN,H.M., KURZROCK,R., TRUJILLO,J.M. and GUTTERMAN,J. 1991. Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. *Annals of Internal medicine*, Vol:114, 532-538
- THOMPSON,C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, Vol: 267, 1456-1462.
- THOMPSON,J.A., BRYADY,J., KIDD,P., FEFER,A 1985. Recombinant alpha-2 interferon in the treatment of hairy-cell leukemia *Cancer Treat. Rep.*, Vol: 69, 791
- TURGEON,M.L. 1988. *Clinical Hematology, Theory and Procedures*, 442 pp
- VAUX,D.L., WEISSMAN,I.L., KIM,S.K. 1992. Prevention of Programmed cell Death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, Vol: 258, 1955-1957.
- VEDENTHAM,S., GAMLIEL,G. and GOLOMB,H.M. 1992. Mechanism of interferon action in hairy cell leukemia: A model of effective cancer biotherapy. *Cancer Research*, Vol: 52, 1056-1066.
- von WUSSOW,P., PRALLE,H., HOCHKEPPEL,K., JAKSCHIES,D., SONNEN,S., SCHMIDT,H., ROSENAU,D.M., FRANKE,M., HAFERLACH,I., ZWINGERS,I., RAPP,U and DEICHER, H 1991. Effective Natural Interferon-alpha in Recombinant Interferon-alpha-Resistant Patients With Hairy Cell Leukemia. *Blood*, Vol: 78, No:1, 38-43
- WADLER,S., HAYNES,H., BEITLER,J.J., HU,X., FELS,S., CAMACHO,M., LEVINE,B. and WIERNIK,P.H. 1996. Phase II clinical trial with 5-FU, recombinant interferon-alpha con1, and cisplatin for patients with metastatic or regionally advanced carcinoma of the esophagus. *Cancer*, Vol:78, No:1, 30-34
- WEISSMAN,C. and WEBER,H 1986. The Interferon genes. *Prog Nuc Acid Res. Mol. Biol.*, Vol: 33, 251-261

- WILLIAMS,G I. and CHRISTOPHER,A.S. 1993. Molecular Regulation of Apoptosis: Genetic Controls on Cell Death. *Cell*, Vol: 74,777-779.
- WRIGHT,S.C, ZHONG,J, LARRICK,J W 1994. Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion *Faseb Journal*, Vol: 8, 654-660.
- WORMAN,C P, CATOVSKY,D, BEVAN,P.C. 1985. Interferon is effective in hairy cell leukemia. *Br. J. Haematol.* Vol: 60, 1759-1763
- WYLLIE,A.H, KERR,J.F.R. and CURRIE,A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, Vol:68, 251.
- ZINZANI,P.L., TOSI,P., VISANI,G, MARTINELLI,G, FARABEGOLI, P, BUZZI,A, TURA,S 1994. Apoptosis Induction with three nucleoside analogs on freshly isolated B-Chronic lymphocytic leukemia cells. *American Journal of Hematology*, Vol: 47, 301-306.

## ÖZGEÇMİŞ

Nilüfer GÜLMEN Ocak 1973 yılında İzmir'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir'de tamamladı. 1990 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1994 yılında Biyolog ünvanını alarak mezun oldu. Aynı yılda Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu Yüksek Lisans sınavını kazanarak Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen bu görevine devam etmektedir.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ