

**A549, HeLa ve NIH3T3 Hücree
Kültürlerinde Paklitaksel ve Sodyum
Nitroprussid'in Tek Başlarına ve
Kombine Etkileri: Nitrikoksid'in
Antiproliferatif Etkideki Rolü**

**Ecz. Qasem M. A. ABDALLAH
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı
Temmuz 2003**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Qasem Mahmoud Aref ABDALLAH'ın “ A549, HeLa ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde Paklitaksel ve Sodyum Nitroprussid'in Tek Başlarına ve Kombine Etkileri: Nitrikoksid'in Antiproliferatif Etkideki Rolü” başlıklı Farmakoloji Anabilim Dalındaki Yüksek lisans tezi 07.07.2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Üye : Prof.Dr. Nuray ARI

Üye : Doç. Dr. Süleyman AYDIN

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
27.06.2003 tarih ve 1871 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

A549, HeLa VE NIH3T3 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE PAKLİTAKSEL VE
SODYUM NİTROPRUSSİD'İN TEK BAŞLARINA VE KOMBİNE ETKİLERİ:
NİTRİKOKSİD'İN ANTİPROLİFERATİF ETKİDEKİ ROLÜ

Ecz. QASEM MAHMOUD AREF ABDALLAH

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK

2003

Bu tez çalışmasında, paklitaksel ve sodyum nitroprussid'in tek başlarına ve kombine halde hücre kültüründe A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve HeLa serviks adenokarsinomu üzerindeki antiproliferatif etkileri ve nitrikoksit'in bu etkilerdeki rolü araştırılmıştır. Ayrıca, normal (sağlıklı) hücelere örnek olarak da NIH3T3 hücreleri karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. Antiproliferatif etkileri araştırmak için MTT ölçümü ve akridin oranj boyama yöntemleri kullanılmıştır. Etkilerde nitrik oksidin muhtemel rolünü araştırmak için de Griess reaktifi ile spektrofotometrik nitrit tayini yöntemi uygulanmıştır.

Paklitaksel, sodyum nitroprussid ve bunların çeşitli oranlarda kombinasyonlarının, A549, HeLa ve NIH3T3 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerinin komponenti olan apoptotik, sitostatik ve sitotoksik etkileri yukarıda söz edilen yöntemler kullanılarak araştırıldı. Elde edilen bulgular, her iki maddenin de antiproliferatif etkilerinin olduğunu ve bu etkilere nitrikoksit'in katıldığını düşündürmektedir. Sodyum nitroprussid'in ortamına ilavesinin paklitaksel'in antiproliferatif etkilerini arttırdığı gözlenmiştir. Buna göre, sodyum nitroprussid'in paklitaksel ile antineoplastik tedaviye katkı olarak ilave edilmesi olası görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, literatür verileri ışığında tartışılmıştır .

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

EFFECTS OF PACLITAXEL AND SODIUM NITROPRUSSIDE ALONE AND
IN COMBINATION ON CELL A549, HeLa AND NIH3T3 CELL CULTURES:
THE ROLE OF NITRICOXIDE IN THE ANTIPROLIFERATIVE EFFECT

QASEM MAHMOUD AREF ABDALLAH

Anadolu University
Graduate School of Health Sciences
Department of Pharmacology

Supervisor: Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK

2003

In this study, antiproliferative effects of paclitaxel and sodium nitroprusside alone and in combination were investigated hücre kültüründe on cultured A549 non-small cell lung carcinoma ve HeLa cervix adenocarcinoma cells as well as the role of nitricoxide in these effects. In order to compare with them, NIH3T3 cells were also used as a representative of normal (healthy) cells. MTT measurement and acridine orange staining method were used to study antiproliferative effects. To examine the possible role of nitricoxide in these effects, a spectrophotometical determination method was applied using Griess reagent.

Being a component of antiproliferative effect, apoptotic, cytostatic and cytotoxic actions of Paclitaxel, sodium nitroprusside and their combinations in various ratio were evaluated on A549, HeLa ve NIH3T3 cells using above-mentioned methods. Findings obtained here suggested that both compounds possess antiproliferative effects and nitricoxide is involved in these effects. I was observed that the addition of sodium nitroprusside to culture media increases the antiproliferative effects of paclitaxel. Therefore, it seems likely that sodium nitroprusside may be used as a useful adjunct to antineoplastic therapy with pactitaxel. Findings obtained in this study are discussed on the basis of literature data.

**Bu tez çalışmasını çok değerli
babamın yüce ruhuna ithaf
ediyorum....**

TEŞEKKÜR

Öncelikle Yüksek lisans aşamasının ilk gününden itibaren beni destekleyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e yaptığı her şey için.

Ders aşamasında iken değerli bilgilerini benimle paylaşan sayın hocam Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a

Hücre kültürünü öğreten ve sevdiren, her konuda yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Seval KORKMAZ'a

AÜBİBAM müdürü Prof. Dr. Mustafa ŞENYEL'e ve tüm AÜBİBAM Çalışanlarına

Bazı maddeleri sağladığı için sayın Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK'a ve bazı malzemeleri sağladığı için sayın Yrd. Doç. Dr. Tansu KOPARAL'a

Tez hazırlarken yardımını esirgemeyen geceleri bana yardım ederek uyukusuz kalan sevgili kardeşim Yahya ABDALLAH'a

Duaları ile her zaman yanımda olan biricik annema ve babalık görevi sürdüren ağabeylerim Yrd. Doç. Dr. Ayman ABDALLAH ve Uzm. Dr. Aref ABDALLAH'a ve diğer kardeşlerime

Her zaman beni destekleyen, hep mural veren sevgili nişanlım Duaa'a

Tezimin çeşitli basamaklarında yardım eden tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler....

İÇİNDEKİLER

Sayfa

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. NORMAL VE KANSERLİ DOKU ARASINDAKİ FARKLAR.....	2
2.1. Normal Hücreler ve Dokular.....	2
2.2. Kanserli Hücreler.....	2
2.2.1. Tümörlerin İsimlendirilmesi.....	3
2.2.2. Kansere neden olan faktörler.....	4
2.2.3. Hücre siklusu, bölünmesi ve kanser.....	5
2.2.4. İnterfaz ve mitoz evrelerine ait kontrol sistemi.....	6
2.2.5. Kanserli hücrelerin büyüme profili.....	7
2.2.6. Anjiyojenezis ve kanser.....	8
2.2.7. Metastaz ve kanser.....	8
2.2.8. Apoptozis ve kanser.....	9
2.2.8.1. Apoptozis ve p53.....	10
2.2.8.2. Apoptozis ve seramid.....	11
3. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN HÜCRELER, TEST MADDELERİ VE YÖNTEMLER	12
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Hücrelerin Özellikleri	12
3.1.1. A549 küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu....	12
3.1.2. HeLa serviks adenokarsinomu.....	12
3.1.3. NIH3T3 fibroblast hücreleri.....	13
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Maddelerin Özellikleri.....	13

3.2.1. Paklitaksel (Taxol®).....	13
3.2.1.1 Paklitakselin hücre siklusu üzerine etkileri...	14
3.2.1.2. Paklitaksel'in aracılık ettiği apoptozis.....	15
3.2.1.3 Paklitaksel ve NO.....	17
3.2.1.4. Paklitaksel'e karşı gelişen rezistans.....	17
3.2.2. Sodium Nitroprusside ve NO.....	18
3.3. Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler Hakkında Genel Bilgiler.....	22
3.3.1. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Testler ve MTT Ölçümü.....	22
3.3.2. Nitrit kantitatif tayini.....	22
3.3.3. Hücrelerdeki DNA ve RNA miktarları ve akridin oranj ile boyama.....	23
4. MATERYAL YÖNTEM.....	24
4.1. Gereçler.....	24
4.1.1. Kimyasallar ve çözeltiler.....	24
4.1.2. Malzemeler.....	24
4.1.3. Cihazlar.....	25
4.2. Yöntemler.....	25
4.2.1. Hücrelerin testler için hazırlanması.....	25
4.2.2. MTT ölçümü.....	26
4.2.3. Nitrit kantitatif tayini.....	27
4.2.4. Akridin oranj ile floresan DNA ve RNA boyaması...	27
4.2.5. İstatistiksel değerlendirmeler.....	27
5. AMAÇ.....	28
6. BULGULAR.....	29
6.1. Paklitaksel Sonuçları.....	29
6.1.1. Paklitakselin MTT ölçümü Sonuçları.....	29
6.1.2. Paklitakselin nitrit ölçümü sonuçları.....	30
6.1.3. Paklitakselin akridin oranj boyama sonuçları.....	34
6.2. Paklitaksel ve SNP 20 µM kombinasyonu sonuçları.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Formül 1: Paklitaksel kimyasal formülü	14
1. Paklitakselin NIH3T3 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	29
2. Paklitakselin A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	29
3. Paklitakselin HeLa hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	30
4. Paklitakselin NIH3T3 hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	30
5. Paklitakselin %NIH3T3 hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	31
6. Paklitakselin A549 hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	31
7. Paklitakselin %A549 hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	32
8. Paklitakselin HeLa hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	32
9. Paklitakselin %HeLa hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	33
10. Paklitakselin NIH3T3 hücrelerinde AO sonuçları grafiği.....	34
11. Paklitakselin A549 hücrelerinde AO sonuçları grafiği.....	35
12. Paklitakselin HeLa hücrelerinde AO sonuçları grafiği.....	36
13. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu NIH3T3 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	37
14. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	37
15. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu HeLa hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	38
16. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu NIH3T3 hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	38
17. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu A549 hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	39
18. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu HeLa hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	39
19. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu NIH3T3 hücrelerinde AO sonuçları	40

7.1.3.3. Paklitaksel ve SNP 100 µM kombinasyonunun akridin oranj boyama sonuçları.....	54
7.2. TARTIŞMA	55
8. KAYNAKLAR.....	58

6.2.1. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonunun MTT ölçümü sonuçları.....	37
6.2.2. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonunun nitrit ölçümü sonuçları.....	38
6.2.3. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonunun akridin oranj boyama sonuçları.....	40
6.3. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu sonuçları.....	43
6.3.1. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonunun MTT ölçümü sonuçları.....	43
6.3.2. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonunun nitrit ölçümü sonuçları.....	44
6.3.3. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonunun akridin oranj boyama sonuçları.....	46
7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	49
7.1. SONUÇLAR.....	49
7.1.1. Paklitaksel Sonuçları.....	49
7.1.1.1. Paklitakselin MTT ölçümü Sonuçları.....	49
7.1.1.2. Paklitakselin nitrit ölçümü sonuçları.....	49
7.1.1.3. Paklitakselin akridin oranj boyama sonuçları.....	50
7.1.2. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonu sonuçları.....	51
7.1.2.1. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonunun MTT ölçümü sonuçları.....	51
7.1.2.2. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonunun nitrit ölçümü sonuçları.....	51
7.1.2.3. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonunun akridin oranj boyama sonuçları.....	52
7.1.3. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu sonuçları.....	53
7.1.3.1. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonunun MTT ölçümü sonuçları.....	53
7.1.3.2. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonunun nitrit ölçümü sonuçları.....	54

20. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonu A549 hücrelerinde AO sonuçları	41
21. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonu HeLa hücrelerinde AO sonuçları	42
22. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu NIH3T3 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	43
23. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	43
24. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu HeLa hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	44
25. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu NIH3T3 hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	44
26. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu A549 hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	45
27. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu HeLa hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları grafiği.....	45
28. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu NIH3T3 hücrelerinde AO sonuçları	46
29. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu A549 hücrelerinde AO sonuçları	47
30. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu HeLa hücrelerinde AO sonuçları	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta\Psi_m$: mitokondriyal transmembran potasyali
AO	: Acridine Orange – Akridin Turuncusu
Apaf-1	: apoptotic protease activating factor-1
APC	: Anaphase promoting kompleks
ATP	: adenosine 5'-triphosphate
CAPP	: Ceramid activated protein phosphatase
Cdk	: Siklin-bağımlı kinazlar (Cyclin dependent kinase)
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDRF	: endothelium-derived relaxing factor
EDTA	: Etilen-diamintetra asetik asit
ELISA	: Enzyme- Linked Immunosorbent Assay
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
HIF-I	: Hipoksi inducible faktör-I
IFN- α	: İnterferon- α
IFN- γ	: İnterferon- γ
JNK	: c-jun N-terminal kinase
mdr	: multi drug rezistans
MMP	: Matriks Metalloproteinazlar
MPT	: M- faz promoting faktör
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NO	: Nitrik oksid
NOS	: Nitrik oksid sentaz
NSCLC	: Küçük hücreli dışı akciğer kanserleri (Non Small Cell Lung Cancer)
Pac	: Paklitaksel
PARP	: poly (ADP-ribose)polymerase
PBS	: Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffer Saline)
PCNA	: Proliferation Cell Nucleus Antigen
pRB	: Retinoblastoma süpressör
PTP	: mitokondriyal por tanzisyon permeabilitesi

pRB	: Retinoblastoma süpressör
PTP	: mitokondriyal por tanzisyon permeabilitesi
Rb	: Retino-blastoma
RNOS	: reaktif nitric oxide species
ROS	: reaktif oxygen species
SNP	: sodium nitroprusside
TIMP	: Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri
TNF-α	:Tümör nekrozis Faktör- α
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Tarihin yazılmaya başladığından bugüne kadar kanser hastalığı hakkında yapılan yoğun çalışmalara rağmen radikal tedavisi henüz bulunmamıştır. Son iki yüzyıl içinde kanser hastalarının sayısı hızlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (Franks, 1998). Kanser tiplerinin insidensi, coğrafik faktörler, cinsiyet, yaş, ırk, genetik predispozisyon ve çevresel karsinogenlere maruziyet gibi pek çok faktörlerle ilişki göstermektedir. Kanserinin sebebi ne olursa olsun, kanser esas olarak hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını idare eden kontrol mekanizmalarındaki sapma ile karakterize olan bir hücre hastalığıdır (Katzung, 1995). Gelişmiş ülkelerde örneğin A.B.D.'de kalp hastalığından sonra ölümün en başta gelen nedenidir ve yılda 500.000'in üzerinde hastanın ölmesine sebep olmaktadır (Kayaalp, 1998; Katzung, 1995). Bu verilerin total kanser insidensinin yaklaşık % 70'ini oluşturan en sık görülen 10 kanser çeşidine ait olduğunu Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society) tarafından yayımlanmıştır. En sık görülen kanser çeşitleri, ülkeden ülkeye oran olarak değişmekle beraber pek çok ülkede hemen hemen aynı sıraya sahiptir. Erkeklerde akciğer, prostat ve kolorektal kanserler; kadınlarda ise meme, kolorektal, akciğer ve uterus kanserleri bu sıralamaların başında yer almaktadır (Kayaalp, 98).

Ampirik tarama ve bilgisayar destekli rasyonel tasarım ile yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi için gösterilen büyük çabalara rağmen, ne yazık ki, geliştirilen ilaçların hiçbiri kanser dokusuna selektif etkili değildir. Bu ilaçların rasyonel klinik kullanımına uygun terapötik indeks elde etmek için yapılan araştırmalar, toksisiteye karşı yararlılığın kıyaslanması esasına dayanmaktadır (Katzung 1995). Kanserinin radikal tedavisinin henüz bulunmaması nedeniyle, diğer hastalıklara göre hem hastada hem de hastanın yakınlarında yol açtığı duygusal ve fiziksel sıkıntılar yüzünden trajik bir şekil kazandığı için, tedavisinde daha iyi ilaçların gereksinimi şiddete vurgulamaktadır.

2. NORMAL VE KANSERLİ DOKU ARASINDAKİ FARKLAR

2.1. Normal Hücreler ve Dokular

Vücuttaki dokular genel olarak, defans hücrelerinden oluşan retiküloendotelial sistem dokusu, sinir sistemi dokusu, mezenkim-bağ dokusu ve epitelial doku şeklinde dört temel gruba ayrılabilir.

Retiküloendotelial dokunun büyük kısmı kemik iliğinden çıkan kırmızı ve beyaz kan hücrelerini oluşturan prekürsör hücrelerdir. Sinir dokusu, beyin, omurilik ve periferik sinirlerden oluşur. Mezenkim bağ dokusu, kollajen liflerini sentezleyen fibroblastlar, kemik, kan damarları, kas ve lenfatikleri içermektedir. Epitelial doku ise, deri, bağırsak, salgı bezleri ve karaciğer gibi spesifik hücreler içermektedir.

Embriyodaki hücrelerin çoğu çoğalabilme yeteneğine sahip olmasına rağmen, erişkin dokularda – birkaç tipi hariç – bu yetenek yitirilmiştir. Örneğin erişkinlerde çok farklılaşmış hücreler olan sinir ve kas hücreleri sadece embriyo safhasındayken ve farklılaşmadan önce çoğalabilmekte, ancak farklılaştıktan sonra çoğalması durmaktadır. Diğer bazı erişkin dokularda, son derece iyi düzenlenmiş hassas mekanizmalarla dokunun hacmini arttırmak veya doku zedelenmesi söz konusu olduğunda hasar yerini kapatmak için hücre çoğalması görülebilmektedir (Franks, 1998). Embriyo safhasından gelişmeye kadar geçen süre içinde, her biri çok az fonksiyonel aktivite gösteren farklılaşmamış hücreler, çok daha etkin ve spesifik fonksiyonlar gösterebilen bir dizi farklılaşmış hücreye dönüşmektedir. Hücrenin bu özelleşme işlemi, “hücre farklılaşması (diferansiyasyon)” olarak bilinmektedir. Bu esnada, “kök hücreler” olarak adlandırılan embriyonik hücreler farklılaşarak özel işlevleri olan hücrelere dönüşmektedir. Farklılaşma esnasında morfolojik değişiklikler, kimyasal değişikliklere ve hücre fonksiyonlarına uyum gösterecek şekilde düzenlenmektedir (Jungueira, 1993; Karp, 1999).

2.2. Kanserli Hücreler

Kanser hücrelerinin maliynitesini belirleyici üç temel özelliği bulunmaktadır: 1) büyüme kontrolünün kaybolması; 2) lokal dokulara invazyon;

3) vücudun diğer kısımlarına yayılma veya metastaz. Beniyn (iyicil) tümör hücrelerinde büyümede azalmış olan bir kontrol gözlenmektedir, fakat bunlar lokal dokuları istila etmemekte ve/veya vücudun diğer kısımlarına yayılarak metastaz yapmamaktadır.

Bir hücre tümör hücresi haline dönüşümünde bu hücreye ait kuşakların yukarıdaki üç özellikle tanımlanan davranışı sabit kalmamaktadır, aksine malinyitenin daha da artması yönünde bir eğilim vardır. Bu da giderek artan anormal karyotipler, artmış büyüme hızları ve artan yayılma ve metastaz bulguları ile kendini belli etmektedir. Henüz yeni transforme olmuş hücrelerin biyokimyasal profillerini, ileri derece maliyn hızlı büyüyen tümör hücrelerinininkinden ayırt etmek çok önemlidir. Baştaki hücreler, kansere yönelen ana değişiklikler dışında normal hücrelerden farklı olan çok az sayıda değişiklik gösterirler ve bu değişiklikler de genelde transformasyon ile ilişkili olanlardır. İleri derecede maliyn olan hücrelerin biyokimyasal profili normal hücrelerinininkinden çok farklı olabilir; enzim profilinde ve diğer biyokimyasal parametrelerde pek çok değişiklik gözlenebilir, diğer bir deyişle kanser hücresi hemen hemen tamamen çoğalma üzerinde yoğunlaşmaktadır. Değişen biyokimyasal profil nedeniyle klinikte tümör işaretleyicileri olarak kullanılan bazı fetal proteinlerin sentezi artarken, büyüme faktörleri veya hormonların uygunsuz üretimi gibi gen düzenlenişini yansıtan biyokimyasal değişiklikleri de oluşmaktadır. (Murray, 1993)

2.2.1. Tümörlerin İsimlendirilmesi

Mikroskobik ve makroskobik özellikleri ile nispeten sessiz kabul edilen, yani lokalize kalarak diğer bölgelere yayılmayan bir tümörün beniyn olduğu ve bu nedenle lokal cerrahiyle çıkarılma ile hastanın sağ kalacağı kabul edilmektedir. Ama komşu yapılara yayılarak istila eden ve uzak bölgelere sıçrayarak metastaz ile ölüme yol açan tümörler veya lezyonlar maliyn olarak kabul edilmektedir. Maliyn tümörler, genel olarak “kanser” adı ile tanımlanmaktadır.

Beniyn tümörler, genel olarak tümörün kaynaklandığı hücre tipinin sonuna “-om” ya da “-oma” ilavesi ile adlandırılırlar. Örneğin “fibröz” dokudan kaynaklanan beniyn tümör “fibrom” adını alır.

Maliyn tümörlerin isimlendirilmesi de bazı istisnalar hariç esas olarak belirli eklemeler ile beniyin tümörlere benzemektedir. Mezenkimal doku ve türevlerinden kaynaklanan maliyn tümörlere sarkoma denilir. Örneğin “fibröz” doku kanserine “fibrosarkoma” denilmektedir. Eitelial hücre kökenli maliyn nepolazmlara ise “karsinom” adı verilmektedir (Kumar ve ark. 2000).

2.2.2. Kansere Neden Olan Faktörler

Başlıca olarak kansere neden olabilen faktörler; 1- Fiziksel, 2- Kimyasal ve 3- Biyolojik Faktörler şeklinde üç katagoriye ayrılmaktadır. Fiziksel nedenlerin başında radyasyon enerjisi yer almaktadır. Ultraviyole ışınları, X ışınları ve γ ışınları mutajenik ve karsinojeniktir. Bu ışınlar DNA’yı çeşitli yönlerinde zedelemektedir. Ultraviyole radyasyonu primidin dimerlerinin oluşmasına neden olabilmektedir. Ayrıca, X ışınları ve γ ışınları dokularda serbest radikallerin oluşmasına neden olmakta ve sonuçta meydana gelen $-OH$, superoksid ve diğer radikaller DNA ve başka makromoleküller ile etkileşerek moleküler hasara yol açmaktadır.

Kimyasal bileşiklerin pek çok çeşidi karsinojeniktir. İnsan kanserinin % 80 kadarının başta kimyasallar olmak üzere çevresel faktörler nedeni ile meydana geldikleri belirlenmiştir. Kişinin mesleğinden yaşadığı ortam (kalabalık şehir, fabrika çevresi v.s.) veya yaşam tarzından ve alışkanlıklardan (sigara içimi gibi) bir çok karsinojenik kimyasal maddeye maruz kalabilmektedir. Kimyasal karsinojenler başlıca iki alt sınıfa ayrılır;

1) Direkt karsinojenler (azotlu hardal gibi): Bunlar hedef moleküller ile direkt etkileşirler.

2) Prokarsinojenler: Bunlar bir veya daha fazla enzimin katalizlediği reaksiyonlar ile karsinojenlerle dönüşür. Prokarsinojenlerin karsinojenlere dönüşme olayına metabolik aktivasyon ve bu olay sırasında oluşan ara ürünlere proksimal karsinojen adı verilmektedir.

Biyolojik karsinojenler arasında RNA ve DNA virüsler yer almaktadır. Örneğin Polmavirüs ve SV-40 gibi onkojen virüsler genomolarak ya DNA yada RNA molükülü taşımaktadır (Murray, 1993).

2.2.3. Hücre Siklusu, Bölünmesi ve Kanser

Hücre bölünmesi ve olgunlaşması embriyonik gelişimde ve doku zedelenmesi sonrası doku tamirinde görülen fizyolojik olaylardandır. Ancak bu olayların regülasyonunun bozulması, hücre gelişmesi, farklılaşması ve bölünmesindeki kontrolün kaybolmasına neden olmakta ve anormal hücre gelişmesi görülmektedir (Tripathy, 2000).

Genellikle hücreler istirahat fazındadır ("G₀ fazı"), ancak hücre dışarıdan gelen sinyallere cevap vererek ya farklılaşmaya başlar ya da bölünmek için mitotik sıklusa girer. Hücre mitotik siklusu, G₁ fazı ile başlar ve sırasıyla S fazı → G₂ fazı → M fazı olarak devam eder. M fazından sonra hücre ya G₀ fazına döner ya da tekrar bölünmek için G₁ fazına girerek yeni bir sıklusa başlar. G₁ fazı yaklaşık 10 saat sürer, sitokinler gibi büyüme faktörleri ve hücre adhezyonu ve/veya hücre-hücre etkileşimi tarafından kontrol edilir. G₁ süreci içinde RNA sentezi ve protein sentezi yapılır. DNA tamiri ve yeterli proliferasyon da olur. Başka bir deyişle S evresi için gerekli hazırlıklar yapılır. G₁ sonuna doğru hücre apoptozise de girebilir. S fazı yaklaşık 9 saat sürer. DNA sentezi başlaması ile başlar ve bitişi ile biter. Bu evrede protein sentezi zirveye ulaşır. RNA sentezi ise, G₁ fazındaki gibi devam eder. Evrenin başlaması ile kromatin paketleri açılır ve evre sona erdiğinde ise tekrar katlanır. G₂ fazı yaklaşık 4 saat sürer. DNA sentezi durması ile başlar ve mitoz'un birinci safhası olan profaz'ın başlaması ile biter. Bu evrede RNA sentezi devam eder. Protein sentezi ise, G₁ evresindeki düzeye iner, DNA tamiri ve kromatine ipliklerinin düzenlenmesi ve kontrolü gerçekleşir. Hücre bu evrenin sonuna doğru apoptozise girebilir. G₁, S ve G₂'nin tümüne "interfaz" adı da verilemektedir.

M fazı veya mitoz fazı'nda interfaz'da hazırlıkları başarıyla tamamlanan hücre 1 saat içinde bölünür. M fazı kendi içinde profaz; prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz olarak ayrılır. Profaz'da nükleus kromatini giderek spiralleşir ve yoğunluk kazanır. Nükleus membranı değişmiştir. Kromozomlar nükleusta kıvrımlanmış olarak görünür. Sentriyoller ayrılır ve her bir çifti hücrenin bir kutbuna göç eder. Mikrotübüller sentriyol çiftleri arasında belirginleşir. Prometafaz'da mikrotübüllerin ipçikleri nükleus zarını parçalayarak içine girer ve

hala birbirine bağılı olan çiftleşmiş kromatidlere sentromerlerden tutunur. Metafaz da ise nükleus zarı ve nükleolus tamamen kaybolur. Kromatidler hücre merkezine dizilirler. Anafazda eş kromatidler birbirinden ayrılır ve mekik mikrotübüllerin proteini olan “tübülün”, aktin ve miyozin mekik bölgesinde bulunmuştur. Bu proteinlerin kromozomların kutuplara göçünde bir yardımcı rolü olasıdır. Telofazda kardeş hücrelerin nükleuslarının yeniden görünmesi ile karakterizedir. Kromozomlar yarı dağınık halleri ile geri döner. Nükleuslar, kromatin ve nükleus kılıfı yeniden belirlenir. Nükleuslar bu değişmeler olurken, ana hücrenin membranında ekvator düzleminde bir kasılma oluşur. Bu kasılma aktin ve miyozin filamintlerden oluşan “kontraktıl halka” tarafından gerçekleştirilir. Sitoplazma ve sitoplazmanın içerdiği organüllerin yarı yarıya bölünmesine kadar devam eder. Böylece yukarıda anlatılan aşamalardan sonra, ana hücreye genetik olarak benzeyen iki hücre çıkmaktadır. (Başaran ; 2002 ; Alberts ve ark., 2002; Karp, 1999; Franks, 1998; Alberts ve ark. 1998).

2.2.4. İnterfaz ve Mitoz Evrelerine Ait Kontrol sistemi

Hücre siklusunu, hem enzim hem de enzim olmayan çeşitli proteinler kontrol etmektedir. Bunlardan en belli başlıları şunlardır:

1- Siklin-bağımlı kinazlar: Siklin-bağımlı kinazların (Cyclin deperdent kinase-Cdk) kompleks oluşturması gerekir. Bu kompleks, kontrol noktasındaki olaylar tamamlanınca ya da bir sonraki evreye geçerken parçalanır. Parçalanmazsa bir sonraki evreye geçiş olamaz ve hücre siklusu bulunduğu evrede kalır.

2- Siklinler: Siklinler aynen Cdk'larda olduğu gibi ancak Cdk ile kompleks oluşturduklarında aktifleşerek hücre siklusunun kontrolünde rol oynarlar.

Hücre mitoz siklusunun çeşitli aşamalarda kontrol noktaları bulunmaktadır:

1- G₁ kontrol noktası: G₁ fazındaki hücrelerin S fazına geçişinde ve G₁ nükleusunun aniden DNA sentezini başlatacak faktörlerin varlığında aktive olur. Bu kontrol noktasında INK4 (P16 proteini kodları), p53, Rb (Retino-blastoma), p21 gibi tümör süpressör genlerinin ürettiği proteinlerle kontrol sağlanır. İnsan normal hücrelerinde görüldüğü gibi interfaz hücresinin G₁ kontrol noktasındaki bekleme süresi 17. kromozom'daki p53 geni ile kodlanan p53 proteini tarafından

düzenlenir. Eğer normal p53 genine sahip bir hücrede DNA'da bir hasar meydana gelirse kontrol noktalarında Cdk/siklin inhibisyonunu sağlayan p53 proteininin sentezi hızla artar ve hasarlı DNA'nın onarımı için hücre G₁ kontrol noktasında durur. Bu mekanizmada p53 proteinin karboksil ucu çift sarmallı DNA'ya değil, kırılarak tek iplikçikli hale geçmiş DNA'yı tanıyarak ona bağlanır. Bunun sonucu olarak p21 proteini sentezlenir. p21 Proteini ise, G₁ fazından S fazına geçişe yardım eden Cdk2/Siklin E kompleksine bağlanarak inhibe etmekte ve böylece G₁/S geçişi olamamaktadır. Ayrıca p21, PCNA (Proliferation Cell Nucleus Antigen) ile bağlanarak S fazındaki hücrelerde hasarlı DNA replikasyonunu durdurur. Bazı insan kanserlerinde p53 geni mutasyona uğrar. Bu mutasyondan dolayı p53 proteini üretilmez ve dolayısıyla hasarlı DNA tamir edilmeden hücre mutasyonu sayısı artar ve genom dengesi bozulur.

2- G₂ kontrol noktası : G₂ fazındaki hücreler S fazındaki hücrelerde bir araya konulduğunda G₂ fazındaki hücrelerde DNA sentezi gerçekleşmediğini görülmüştür. Böylece G₂ den S fazına geri dönüş olmadığı görülmüştür. Bunu engelleyen, "lisansing faktör" adlı bir mekanizmadır. Bu mekanizma faktörün mitoz süresince kromozoma bağlı kalmasını sağlamaktadır ve DNA replikasyonu süresince inaktiftir.

3- Mitoz kontrol noktası: Bu kontrol noktasında en çok rol oynayan protein M- faz promoting faktör (MPT) Cdk ile bağlanmış mitotik siklin kompleksinden ibarettir. Mitoz'un metafaz/anafaz sınırında mitotik siklinin kompleksinden ayrılıp dağılması ile MPT inaktifleşir ve hücre mitozu tamamlayarak mitozdan çıkar (Başaran, 2002).

2.2.5. Kanserli Hücrelerin Büyüme Profili

Solid tümörlerin bir çoğunda (akciğer, uterus gibi) büyüme hızı tümör büyüdükçe azalır. Bu kısmen tümör kanlanması azalmasının nekroza neden olması ve kısmen de her hücrenin sürekli çoğalmamasından kaynaklanır. Bir solid tümörün hücreleri 3 tabaka oluşturur. A tabakası bölünen hücreleri içerir, muhtemelen hücreler sürekli olarak siklustadır. B tabakası istirahat halindeki hücreleri (G₀) , yani bölünmeyen ancak bölünmeye potansiyel olan hücreleri içerir. C tabakası ise artık bölünmeyen ama tümörün hacmine katkı da bulunana

hücreleri içerir. Esas olarak bazı solid tümörlerin %'5 'ini oluşturan A tabakasındaki hücreler halen mevcut olan ilaçlara duyarlıdır. C tabakasındaki hücreler ise bir sorun yaratmaz. Ancak B tabakasındaki hücreler sikluste olmadıkları için kemoterapiye cevap vermezler, ancak zamanda A tabakasındaki tümör hücreleri kemoterapi ile öldürdükten sonra B tabakasındaki hücreler bölünmeye başlar (Bozkurt, 2002).

2.2.6. Anjiyojenezis ve Kanser

Erişkinlerde anjiyojenezin tamamlanmış olduğu ve çoğunlukla patolojik doku büyümesi durumlarında olduğu bilinmektedir. Bazı kardiyak iskemisi ve yara iyileşmesi gibi durumlarda anjiyojenez oluşması istenilen, ancak tümör büyümesi ve inflamasyon gibi durumlarda ise anjiyojenez oluşması istenmeyen bir durumdur (Augudtin, 1998).

Solid tümörlerin çoğu, 1-2 mm³ kitleye sahip olduğunda kitlenin içindeki oksijen basıncı azalır ve hipoksi durumu oluşur (Dachs 2000). Hipoksiye bağlı olarak HIF-I (Hipoksi inducible faktör-I) indüklenir. HIF-I ise VEGF (Vasküler endotelial growth faktör) up-regülasyonuna neden olur ve anjiyojenez mekanizmasını devam ettirir (Risau 1977). Anjiyojenez oluşması ile hem tümörün metabolik gereksinimi için yeni arteriyol ve venüller sağlanmış olur hem de tümör metastaz yapma şansı kazanmış olur (Xie ve ark., 1998; Xie ve ark., 1996).

Antianjiyojenik ilaçların kullanım amacı tümörün kanlanması engelleyerek tümörün büyümesini inhibe etmektir. Bu ilaçların tercih nedenleri ise 1) erişkinlerde sadece patolojik durumlarda görülen anjiyojenezi engelledikleri için yan etkileri olmayacaktır. 2) anjiyojenez fizyolojik bir olay olduğundan ona karşı rezistans gelişmez. 3) tümör yeni damarlar oluşması yüzlerce tümör hücresi kanlanması sağlar ve antianjiyojenik ilaçları kullanımı ile antitümöral etki sağlanabilir (Augustin, 1998). Yeni damar oluşumunun engellenmesi, tümör hücrelerinin başka organlara metastaz yapmalarını zorlaştırır.

2.2.7. Metastaz ve Kanser

Kanser hastalığının ilerlemesinin ve kansere bağlı ölümün en önemli nedenlerinden birisi metastazdır (Duffy, 1998; Fidler, 1990). Aynı zamanda

kanserli hastaların çoğuna primer tümör tanısı konulduğunda, metastaz ile kanserin lenf nodlarına veya başka organlara sıçraması gerçekleşmiş olabilmektedir (Xie ve ark., 1998). Metastazın genel olarak evreleri:

1. Metastazın gerçekleşmesi için tümör hücrelerinin gelişme adımlarını tamamlaması şarttır (Poste, 1979).

2. Tümör kitlesi 2 mm^3 den küçükken oksijen ve beslenmesi diffüzyon ile gerçekleşir (Xie ve ark., 1996). Ancak 2 mm civarında olduğunda hipoksi gelişir ve beslenme için yeniden damarlanma olayına yani "anjiojenez" e ihtiyaç duyar (Griffioen, 1990). Anjiojenezin gerçekleşmesi için büyük sayıda anjiojenik faktör molekülleri üretimi başlar. Bunların en belli başlıları, HIF-1 (Hipoksi inducible faktör-1), TNF- α ve IFN- α ve IFN- γ dir

3. Tümör hücreleri hareket etmeyi kolaylaştıran enzimleri (tip IV kollajenaz ve sistein proteaz gibi) sentezleyerek hücrelerin ekstrasellüler matrikse ve sonra da kan ve lenf damarlarına girerek dolaşıma katılmalarını sağlamaktadır.

4. Dolaşıma katıldıktan sonra lökositlerle ve/veya trombositlerle homotipik agregat veya heterotipik agregat oluşturmaktadır. Bunlar ise kapiller damarlarda durabilir.

5. Tümör hücreleri organ parankimasına girerek proliferasyon gösterir.

Klinik çalışmalar göstermiştir ki, hastalarda tümör kitlesinden çok fazla sayıda hücre dolaşıma katılırken, vücudun savunma mekanizmaları nedeniyle sadece birkaç tanesi canlı ve çoğalabilecek durumda kalmaktadır (Xie ve ark., 1996).

2.2.8. Apoptozis ve Kanser

Maliyn hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz ve aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa proliferasyonun yanında, apoptotik hücre ölümü yani "programlanmış hücre ölümü" hızında azalmanın da maliynite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen, dolayısıyla beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisi ile maliyn hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar (Bratton ve Cohen, 2001). Hücrelerin ölümü ya nekroz ya da apoptozis şeklinde gerçekleşebilir (Alberts, 1998), nekroz ile

apoptozis arasında belirgin farklar olduğu ilk kez Kerr ve arkadaşları (1972) tarafından anlaşılmıştır. Nekroz patolojik bir olay sonucunda görülür, hücre şişmesi sitoplazma organüllerinin dağılması ve sonucu olarak hücre membranının bozulması ve patlaması şeklinde olur, dokunun nekroza verdiği yanıt genellikle inflamasyon şeklindedir. Apoptozis ise patolojik olarak görülebilir, ancak esas olarak normal fizyolojik durumlarda çok yaygındır. Apoptotik hücreler morfolojik inceleme sonucunda hücre büzülmesi, girintili çıkıntılı "blebbing" görüntüsü, sitoplazma organülleri bozulmamış ama DNA'sı parçalanmış görülmektedir (Studzinski, 1999). Sonuç olarak doku inflamasyon cevabı vermeden hücre parçalanır ve makrofajlar gibi fagositoz özelliği olan hücreler tarafından fagosit edilir (Ward, 1999).

2.2.8.1. Apoptozis ve p53

p53 proteini apoptoziste G₁/S ve G₂/M fazlarında check-point "geçiş noktası" kontrolünde önemli rol oynamaktadır, ancak bu protein kanser tiplerin çoğunda ya inaktif durumdadır ya da bulunmamaktadır (Das ve ark., 2001; Lane ve Lain, 2002).

Çok sayıda stress sinyalleri, DNA hasarına yol açıklamaktadır, bu hasarın oluşumu p53 aktivasyonuna neden olur. p53 aktivasyonu hem hücre membranında bulunan ve ölüm reseptörleri olarak adlandırılan reseptörleri aktive eder hem de sitoplazmada bulunan Bas proteini aktif hale getirir. Ölüm reseptörlerinden örnek olarak FADD reseptörü (Fas-associated death domain protein), bu reseptör p53 tarafından aktif hale getirildikten sonra Kaspaz 8'i aktiveleştirerek apoptotik kaspaz yolağını başlatır. Aktif bax proteini ise mitokondri membranına yapışarak uyarır, uyarı sonucu mitokondriden sitokrom c salıverilir, sitokrom c salıverilmesi irreversible apoptozis dönemi başlangıcı olarak bilinir çünkü bu aşamadan sonra ne yapılırsa yapılsın apoptozis engellenemez.

Mitokondriden salıverilen sitokrom c sitoplazmadaki bulunan Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) ile bağlanarak ve sonra da oluşan komplekse ATP (adenosine 5'-triphosphate) molekülü katılarak aktif apoptozom kompleksi oluşmaktadır. Apoptozom kompleksi ise prokaspaz-9'u aktiveleştirerek

kaspaz-9 ortaya çıkar, kaspaz-9 ise prokaspaz-3'ü aktifleştirerek kaspaz-3 meydana gelir.

Aktif kaspaz-3 sitoplazmada aktif durumda bulunan ICAD (Inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease)'i inaktivasyonunu yaparak CAD (caspase activated deoxyribonuclease) serbestlenmesine neden olmaktadır. Serbestlenen bu molekül hem kromatin kondansasyonu (yoğunlaşması) hem de DNAaz enzimi aktive ederek oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Ulukaya, 2003; Schulze-Osthoff ve Peter 1999; Bálint ve Vousden, 2001).

2.2.8.2. Apoptozis ve Seramid

Seramid, bir fosfolipid olan sfingomiyelin'in hidrolizi sonucunda meydana gelen bir ikincil ulaktır (Kasof ve ark., 1999; Schulze-Osthoff ve Peter 1999). Seramid'in TNF- α ve IL-1'in aracılık ettiği apoptoziste rol oynadığını düşünülmektedir. Seramid ayrıca CAPP (Ceramide activated protein phosphatase) enzimini aktive etmektedir. Söz konusu bu enzim hem apoptozisi indüklemekte hem de hücre siklusuna katılmak isteyen hücreleri G₀/G₁ geçiş noktasında bloke etmektedir. Seramid'in apoptozisi indüklemesinin Bcl-2 ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Long ve Hannun, 1999). Bcl-2 antiapoptotik özelliğe sahip bir protein olup fosforilasyon durumuna bağlı olarak aktif veya inaktif biçimde bulunmaktadır. JNK (c-jun N-terminal kinase) tarafından Bcl-2 fosforilasyonunun gerçekleştirilmesi Bcl-2'nin inaktivasyonuna neden olmaktadır. Bcl-2'nin inaktivasyonu sonucu antiapoptotik etkisi kalkmış olur, çünkü Bcl-2, mitokondri membranına bağlanarak sitokrom c salıverilmesini engelleyebilmektedir (Kasof ve ark., 1999; Schulze-Osthoff ve Peter 1999; Bratton ve Cohen, 2001; Ward, 1999). Bcl-2 proteinlerinin antiapoptotik fonksiyonunun ilaçla bloke edilmesi gelecekte kanser tedavisi için yeni bir terapötik modalite oluşturabilir (Kinloch ve ark., 1999).

3. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN HÜCRELER, TEST MADDELERİ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Hücrelerin Özellikleri

3.1.1. A549 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu

Akciğer kanseri, dünyada kanser bağı olarak oluşan ölümlerin en başta gelenlerindedir. Akciğer kanserinin yaklaşık olarak %80'i küçük olmayan hücreli (Non Small Cell- NSCLC) akciğer kanserleridir. Bunlardan arasında adenokarsinoma yer almaktadır (Michael ve ark., 2002). Küçük olmayan hücreli akciğer kanseri agresif tümörlerdir. Tanı anında bölgesel ya da uzak metastaz sıklığı %70 kadar yüksektir (Guarino ve ark., 2002). Epidemiyolojik verilere göre akciğer kanserinin kadınlarda tüm kansere bağı ölümlerin %25'inden ve erkeklerde ise %30'undan sorumlu olduğunu göstermektedir (Greenlee ve ark., 2001). A549 kanser hücreleri küçük olmayan hücreli epiteliyal akciğer adenokarsinomudur. 58 yaşında Orta Asyalı bir erkekten D.J.Giard tarafından alınmıştır. Bu hücreler keratin üretmektedir, tümörde p53 düzeyinin normal olduğu, IL-1B ve TNF- α ile indüklenebilen iNOS enziminin bulunduğu ancak eNOS bulunmadığı tespit edilmiştir (Evdokiou ve ark., 1998; Delar ve ark., 2001; Kwon ve George 1999; Lewis; ve ark., 1996).

3.1.2. HeLa Serviks Adenokarsinomu

HeLa 31 yaşında zenci bir kadının serviks adenokarsinomundan W.F. Scherer tarafından stoklanmış adherent, epiteliyal serviks adenokarsinoma hücreleridir. HeLa hücrelerinin pRB (retinoblastoma supresör) düzeyi normal (Baldi ve ark., 1996), ancak p53 ekspresyonu düşüktür. HeLa hücrelerinin ekzojen NO'ye karşı verdiği cevap, esas olarak Bax ekspresyonuna bağı olup kaspazların aktivitesinden ve p53 ekspresyonundan bağımsız bir yolak izleyerek apoptozis oluşturmaktadır. Bu hücrelerde ekzojen NO, LDH (laktat dehidrojenaz) enzimi üzerine etkisizdir (Okuno ve ark., 1998). HeLa hücreleri tek sıra çoğalan özelliindedir ve kendine özgü dört tipik marker kromozom tespit edilmiştir. Hücrelerin %98'inde küçük telosentrik kromozom bulunmuştur. Restgele seçilmiş 1385 hücrenin tümü inceleyerek anöploidii olduğu bulunmuştur. HeLa hücreleri

ayrıca adenovirüs'e duyarlı olup IL-8 ekspresyonuna neden olmaktadır. Hücrelerde AP-1 ve c-jun-terminal kinaz aktivitesi oluşabilmektedir (Jang ve ark., 1996; Chen, 1995; Loffeler ve ark., 1997; Lee ve ark., 1996; Kumenis ve ark., 1997; Zhao ve ark., 1996; Macville ve ark., 1999; Burder ve ark., 1997; Scheffener ve ark., 1991; Schwarz ve ark., 1985; Schnider-Gadiche ve Schwarz, 1986).

3.1.3. NIH3T3 Fibroblast Hücreleri

Aoronson tarafından NIH/SWISS fare embriyosundan elde edilen adherent, fibroblast hücrelerdir. Kültür ortamında kontakt inhibisyona çok duyalıdır. Çoğalma eğilimi göstermekle beraber stabil morfolojik özelliklere sahiptir. Bu özelliklere sahip olduğundan, DNA transfeksiyon ve transformasyon çalışmaları için uygun ve kullanışlıdır. Fare sarkoma virüsleri ve murine leukemia virüslerine duyarlıdır. Ectcpmelia virüsü için yapılan test negatif sonuç vermiştir (Anonim, 2000; Chang ve ark., 1996; Jainchill ve ark., 1969; Anderson, 1979).

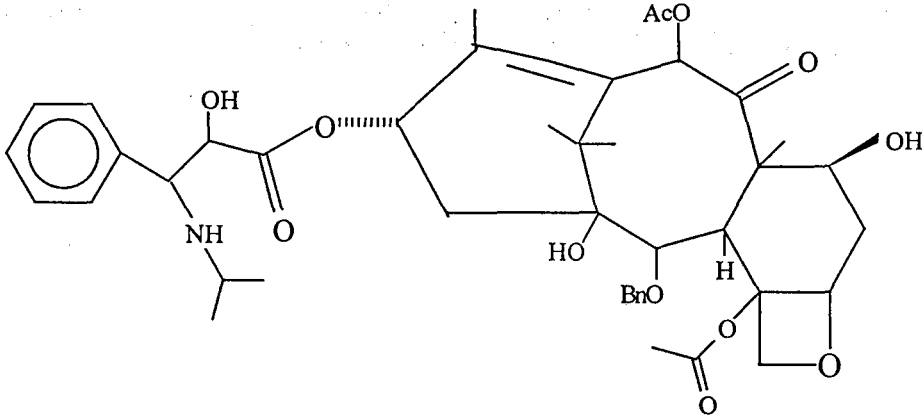
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Maddelerin Özellikleri

3.2.1. Paklitaksel (Taxol®)

1960'lı yıllarda Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından *Taxus brevifolia* ağaçlarının dal kabuğundan hazırlanan ekstrede antitümör aktiviteli sitotoksik bir bileşik bulunduğu açıklanmıştır (Wani ve ark., 1971; Verena ve ark., 1999). Faz I denemelerine sunulduğu andan itibaren çok sayıda kanser tipine özellikle de sisplatine dirençli over karsinomuna karşı (Runowicz ve ark., 1995) yüksek etki gösteren antineoplastik bir ajan olduğu anlaşılmıştır (Makino ve ark., 2001). Paklitaksel, primer ve sekonder over kanserlerinde, erken evre ve ilerlemiş metastatik meme kanserlerinde, küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde, Kaposi sarkomunda, küçük hücreli akciğer kanserlerinde, melanoma'da, Lösemi'de ve daha pek çok kanser çeşidinde etkili bulunmuştur (Preisler ve ark., 1999; Runowicz ve ark., 1995; Nicholson ve ark., 1997; Ranzandi ve ark., 2000). Paklitaksel, tübülün polimerizasyonu ve mikrotübül stabilizasyonu yapmakta, hücre siklusunu bloke etmekte ve apoptozise neden olmakta, bu arada gen ekspresyonu da değiştirebilmektedir (Makino ve ark., 2001).

Paklitaksel, kolşisin ve Vinca alkaloidleri gibi klasik antimikrotübül ajanların aksine mikrotübül depolimerizasyonunu sağlayarak değil mikrotübül polimerizasyonunu stabilize ederek etkili olmaktadır. Mikrotübüllerin normal dinamik reorganizasyonunu inhibe ederek ve fonksiyonsuz ve stabil olmalarına yol açarak hücre siklusunda daha çok G₂/M fazında blokaja yol açması ile etki gösterir (Makino ve ark., 2001; Preisler ve ark., 1999; Charles ve ark., 2001).

Paklitaksel çekirdeğinde kompleks taksan halkaları içeren bir diterpenoid yapıda semisentetik bir bileşiktir (Preisler ve ark., 1999). Yan zincir taksan halkaları, aktivite için gerekli olan 13 nolu karbon atomundan bağlanmıştır (Bakınız: Formül 1). Yan zincirin modifikasyonu, meme ve over kanserlerine karşı daha yüksek klinik aktiviteye sahip bir analog olan dosetaksel'e önderlik etmiştir. Molekülün çözünürlüğü düşüktür ve taşıyıcı olarak %50 etanol ve %50 polietoksillenmiş hint yağı (Cremophor EL) içinde uygulanmaktadır (Korkmaz, 2002).



Formül 1 Paklitaksel'in formülü (Runowicz ve ark 1993)

3.2.1.1 Paklitakselin Hücre Siklusu Üzerine Etkileri

Genel olarak paklitaksel'in antineoplastik etkisi, mikrotübül fonksiyonu üzerine bozucu etkisinden ibaret olup, hücreyi mitozu tamamlamayacak hale getirmektedir (Saunders ve ark., 1997). Mitotik dönüşlerin formasyonunu inhibe etmeye neden olan düşük doz paklitaksel, yüksek dozda bağlama formasyonunu kolaylaştırarak polimer kitleyi artırır ve bunun sonucu mikrotübüllerde aşırı hasar oluşturur. Paklitaksel mikrotübüllerin α - ve β -alt ünitelerine spesifik olarak

bağlanır (Day, 2000) ve böylece tübülün polimerizasyonu gerçekleştirerek mikrotübüllerin stabilizasyonuna ve mitotik spindellerin oluşumunun inhibasyonuna (Makino ve ark., 2001; Zobel ve ark., 2000) neden olup hücre siklusunun esas olarak G₂/M fazında durmasına neden olmaktadır (Makino ve ark., 2001). Bunun yanısıra 3T3, HeLa ve MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan araştırmalar, paklitakselin P55Cdc'ye bağımlı myelin protein kinaz aktivitesi arttırarak hücreyi hem metafaz/anafaz geçiş noktasında hem de G₂/M fazında durdurabildiğini göstermektedir. Bu etki paklitaksel'in hem P55Cdc gen ekspresyonu hem de P34 cdc2 kinaz protein aktivitesini arttırarak P55Cdc-bağımlı siklozom/APC (Anaphase promoting kompleks) aktivasyonuna yol açıp hücre siklusunu G₂/M fazında (Makino ve ark., 2001; Charles ve ark., 2001) veya metafaz/anafaz geçiş noktasında durdurabildiğini gösterilmiştir. P55Cdc gen ekspresyonu farklılaşmış hücrelerde değil, proliferasyon eğilimi gösteren hücrelerin büyümesini durdurup hücrelerin apoptozise gitmelerine neden olduğu ileri sürülmektedir (Makino ve ark., 2001).

A549 p53(+/+) ve H1299 p53(-/-) küçük hücreli olmayan akciğer adenokarsinoma hücreleri üzerinde yapılan bir araştırma G₂/M fazda kalan hücre sayısı, uygulanan paklitaksel dozları ile doğru orantılı bir şekilde artarken G₁ fazındaki kalan hücre sayısı ters orantı ile azaldığını göstermektedir. Yine aynı çalışmada, paklitakselin 2-25 nM arası dozları uygulandığında S fazında kalan hücre sayısının hafifçe artmakta olduğu, ancak daha yüksek dozlarda (50-1000 nM) doza bağımlı olarak A549 p53(+/+) hücrelerinde dramatik bir azalma olduğu, H1299 p53(-/-) hücrelerindeki azalmanın daha az olduğu görülmüştür (Das ve ark 2001). Palitakselin epitop 3t3/2 proteinin refosforilasyonu ve bazı birleştirilmemiş kinetokorlara neden olup Mad2 proteinin seviyesini arttırdığı HeLa hücrelerinde gösterilmiştir (Abal ve ark., 2001; Waters ve ark., 1998). Mad2 proteini hücrenin metafaz/anafaz da kalmasına, dolayısıyla anormal mitoz veya apoptozis oluşumuna neden olmaktadır (Jordan ve ark 1996).

3.2.1.2. Paklitaksel'in Aracılık Ettiği Apoptozis

Paklitaksel, A549 ve HeLa hücrelerini de içeren bir kaç farklı kanser tipi üzerine *in vivo* koşullarda uygulandığında (Das ve ark., 2001; Olah. ve ark., 1996;

Abal ve ark., 2001) veya implante edilmiş tümörlerde apoptozis oluşturduğu gösterilmiştir (Saunders ve ark., 1997).

Paklitakselin 2-25 nM konsantrasyonlarına maruz kalmış MCF-7 hücrelerinde DNA bantlarında kırılma insidensinin maruziyet zamanı ile doğru orantılı olduğu ve bu kırılmanın hızlı ve gayrimuntazam büyük (50-300 kbp) DNA fragmanlar oluşturarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu artış eğrisi paklitaksel'in indüklediği apoptozis'in eğrisine benzemektedir (Huang ve ark., 1997; Saunders ve ark., 1997). A549 üzerinde yapılan başka bir çalışmada, uygulanan paklitakselin ≤ 25 nM dozları ile benzer apoptik cevaplar alınırken, daha yüksek dozlarda (50-1000nM) oluşan genel sitotoksik etki doza bağımlı olarak artarken apoptotik etki düşmekte olduğunu göstermiştir (Das ve ark., 2001). A549 dışında bir kaç farklı kanser hücre tipinde de aynı cevaplar alınmıştır (Das ve ark., 2001; Charles ve ark., 2001). Buna karşın *Allium sativum* hücreleri üzerine uygulanan yüksek paklitaksel konsantrasyonu (10^{-6} - 10^{-3} M), 1-3 saat içinde sitotoksik etki gösterip kromozomların bozulmasına ve 24 saat içinde hücre ölümüne neden olduğunu gösterilmiştir. Bu dozların uygulanması ile birlikte hücrelerde mikronükleus, binükleus oluşumu ve hücre iskeleti yokluğu 1-3 saat inkübe ettikten sonra morfolojik olarak gösterilmiştir (Zobel ve ark., 2000).

Paklitaksel'in oluşturduğu apoptotik etkinin mikrotübül üzerine olan etkisinden bağımsız olduğunu gösterilmiştir (Das ve ark., 2001; Charles ve ark., 2001). Aynı zamanda paklitaksel farklı yolları aktive ederek apoptozise ve hücre siklusunun durmasına neden olabildiği düşünülmektedir (Halder ve ark., 1996; Shtil ve ark., 1999). A549 hücreleri üzerine yapılan diğer bir çalışmada paklitaksel'in p53 protein düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (Tishler ve ark., 1995). Ancak p53 protein yokluğu, paklitakselin oluşturduğu apoptozis'in maksimum yanıtını etkilemezken, paklitaksel'in istenen yanıt için gerekli dozunun yükseltilmesine sebep olmuştur (Das ve ark., 2001). Meme, over ve lösemi hücrelerinde Paklitaksel p53 gen ekspresyonu değiştirmedini ve bu proteinin paklitaksel'in etkisinde rol oynamadığı gösterilmiştir (Olah ve ark., 1996).

Paklitaksel MCF-7 hücrelerinde Bcl-2 down-regülasyonu yapmazken (Saunders ve ark., 1997), c-jun N-terminal kinaz (JNK) aktivitesini stimüle

etmektedir. Stimüle edilmiş JNK, Bcl-2 ve Bcl-x1 fosforilasyonu yaparak inaktif duruma getirmektedir. Böylece bu proteinlerinin apoptozise baskılı etkilerini azaltarak prokaspaz-9 aktivasyonu dolaylı bir şekilde gerçekleşmektedir. Bunun sonucu ise DNA fragmentasyonu ve apoptozis oluşmaktadır (Razandi ve ark., 2000).

Paklitaksel ayrıca hücreSEL ikinci haberci olarak apoptozisi indükleyen seramid'in oluşumuna aracılık ederek apoptozis'i indüklemektedir. MCF-7 üzerinde yapılan bir çalışma hücreSEL seramid miktarı uygulanan paklitaksel konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğunu gösterilmiştir. Seramid jenerasyonu hücre siklusunun durması ile ilişkili olmadığı için seramid paklitaksel'in genel sitotoksitesinin sadece bir kısmını teşkil ettiğini düşünülmektedir (Charles ve ark., 2001).

3.2.1.3 Paklitaksel ve Nitrikoksit

Paklitaksel endotelial hücrelerde, (Su ve ark., 2002) M ϕ Makrofaj hücrelerinde (Mullins ve ark., 1997) ve lösemi hücrelerinde (Al-alamî ve ark., 1998) nitrik oksidin (NO) üretimini artırdığı, insan C6 *glioblastoma multiforma* hücrelerinde NO üretimini değiştirdiğini gösterilmiştir (Abdallah ve ark., 2003). Hem normal hem de lösemik monositlerde paklitakselin aracılık ettiği apoptozis'te NO'in esas rol oynadığı gösterilmiştir (Al-alamî, ve ark., 1998). Paklitaksel M ϕ makrofajlarda, TNF- α sentezini artırarak NO üretimini artırır. Bu şekilde hem parakrin hem de otokrin yolla sitostatik etki gösterdiği belirtilmektedir (Mullins ve ark., 1998). Paklitaksel'in ayrıca fare meme kanserlerinde ve makrofajlarda iNOS ve IL-1 β gen upregulasyonuna neden olduğunu gösterilmiştir (Zaks-Zilberman ve ark.2001).

3.2.1.4. Paklitaksel'e Karşı Gelişen rezistans

Diğer antitümör ajanlarda olduğu gibi kanser hücreleri paklitaksele karşı rezistans geliştirebilmektedir. Bu rezistans olayı, birden fazla mekanizma ile gerçekleşebilmektedir. Bunlar:

- 1) α - ve β - tübülün modifikasyonu gerçekleştirerek

- 2) mdr (multi drug rezistans) genin olaya karışması (Runowcz ve ark., 1993; Day ve ark., 2000).
- 3) P-glikoprotein düzeyinin yükselmesi (Sheppard ve ark., 1999; Broxterman ve ark., 2003).
- 4) paklitaksel'in penetrasyonunun azalması (Nicholson ve ark., 1997; Broxterman ve ark., 2003).

Ayrıca solid tümörlerin oluşturduğu sferoidlerin paklitaksel'e karşı gösterdiği rezistans kültürde tek sıra çoğalan hücrelerden fazla ve daha hızlı gelişmektedir (Nicholson ve ark., 1997). Paklitaksel'in yüksek dozuna karşı gelişen rezistans düşük dozuna nazaran daha hızlıdır (Sheppard ve ark., 1999). Uzun süreli düşük doz paklitaksel uygulanması sonucundaki görülen etki kısa süreli yüksek doz uygulanmasından daha fazla bulunmuştur (Nicholson ve ark., 1997).

3.2.2. Sodium Nitroprussid ve NO

NO'nin keşfine yol açan araştırmalar 1979 yılında Furchgott ve Zawadzki'nin ilginç bir gözlemi ile başlamıştır. Furchgott, endotelial hücrelerden salınan bu maddeye endotel kökenli gevşetici faktor (endothelium-derived relaxing factor) EDRF adını vermiştir. Hücrelerde NO sentezinde kullanılan amino asit L-arjinindir. Bu amino asit, proteinlerin parçalanması sonucunda intresellüler ortamda bulunabildiği gibi, endojen olarak sentez edilebilmekte ya da dış kaynaklardan sağlanabilmektedir (Akar, 2000). NO kısa yarılanma ömre sahip inorganik serbest bir radikaldir, çeşitli dokularda farklı fonksiyonlara sahiptir. NO biosentezi L-arjinin'in NOS (Nitrik oksid sentaz) enzimi aracılığıyla L-sitrülin ve NO'e dönüşmesinden ibarettir. NOS enziminin 3 izoformu vardır, nöral NOS "nNOS", endotelial NOS "eNOS" ve indüklenebilir NOS "iNOS", ilk iki izoform kalsiyum intresellüler düzeyine bağlı olarak kalmodulin ile bağlanarak aktifleşirler, iNOS'un aktivitesi ise kalsiyum düzeyine bağlı değildir (Al-almi ve martin, 1998; moncada ve ark., 1990; Esteévez ve jordan, 2002; Rang ve ark., 1995; Tomson ve Miles, 1998) ancak aktivasyonu için kalmodulin ile bağlanması şarttır (Akar, 2002). Son zamanlarda, mitokondride de bir NOS "mtNOS" varlığından söz edilmektedir. Mitokondriden sitokrom c salınmasında rol

oynadığı düşünülmektedir. nNOS ve eNOS aktivasyonu post-translasyonel aşamada pirimer olarak regüle edilir, genellikle bu enzimlerin aktivasyonu kısa süreli olduğundan intresellüler NO düzeyi pikomolar ile nanomolar arasında kalır. iNOS regülasyonu transkripsiyonal aşamada gerçekleşmektedir. NO sentezi sürekli ve uzun süreli olduğundan NO intresellüler düzeyi mikromalara kadar yükselebilir. NO, NOS'deki bulunan hem ile bağlanıp kendi sentezini "negatif feed-back" mekanizma ile inhibe ederek durdurabilir (Kim ve ark., 2001).

NO hücre sinyalleri üzerine etkisi cGMP ile sınırlı değildir, hücrenin tipine ve NO düzeyine bağlı olarak apoptotik veya antiapoptotik; mitokondriyal veya non-mitokondriyal yollar izleyerek gerçekleşir (Boyd, 2002). NO süperoksit ile reaksiyona girerek ONOO⁻ peroksinitrit oluşmaktadır (Kim ve ark., 2001). Peroksinitrit potent nükleofilik bir RNOS (reaktif NO türü) olup, fenol içeren bileşikler, örneğin proteinlerde bulunan tirozin artığının nitrolasyonu yaparak tirozinin fosforilasyonu inhibe etmektedir. Genellikle RNOS oluşturduğu reaksiyonlar ile hücre ölümüne neden olmaktadır. (Kim ve ark., 2001). (Kim ve ark., 2001; Cocks, 1996). NO tek başına proteinlerle veya nükleik asitlerle etkileşmediği halde, O₂ veya O₂⁻ ile reaksiyona girerek NO₂, N₂O₃ ve N₂O₄ gibi reaktif NO türleri oluşturabilir. NO'nin önemli fizyopatolojik rollerinden birisi de enzimlerdeki pozitif yüklü kompleks oluşturan metal iyonlarıyla bağlanmasıdır. Çeşitli hücrelerde NO, guanilil siklaz enzimindeki demirle bağlanarak demir-nitrosil kompleksi oluşturur. NO ayrıca genellikle değişen afinitelerle sitokrom "P450" enzimi ile reaksiyona girmektedir. Bunların bazıları reversibl bazıları da irreversibl, bazıları inhibisyon şeklinde ve bazıları stimülasyon şeklinde olur ki, bu değişkenlik P450 çeşitli izotiplerile ilişkilidir. N₂O₃ potant bir S-nitrozilleme ajanıdır. Aktif bölgesinde sistein aminoasidi ile sülfidril gruplarından birini taşıyan enzimlerde N₂O₃ ile S-nitrozilasyon olur. Bu reaksiyon sonucunda enzimlerin aktif bölgelerinde değişiklik oluşmakta ve buna bağlı olarak fonksiyonu değişebilmektedir (Kim ve ark, 2001).

NO ve peroksinitrit hem DNA üzerine direkt etki ederek hem de mitokondri üzerine direkt ve indirekt etki ederek apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır (Kim ve ark, 2001; Kim ve ark, 2002; Lamas ve ark., 1998), ancak NO'nin apoptotik etkisi hücre tipine, NO konsantrasyonuna ve maruz kalma

süresine bağılı olarak bazen antiapoptotik etki şeklinde karşımıza çıkabilmektedir (Kim ve ark, 2001; Ambs ve ark., 1997). NO etkisini üç şekilde göstermektedir:

1. NO'in oluşturduğu ROS (reaktif oksijen türleri) ve RNOS, DNA ile direkt bir reaksiyona girerek DNA hasarı oluşturmaktadır (Kim ve ark, 2001).
2. DNA tamirini inhibe ederek hasarın kalıcı ve uzun süreli olmasını sağlamaktadır (Kim ve ark, 2001), bu etki ribonükleotid reduktaz enziminin inhibisyonuna bağılı olduğunu gösterilmiştir (Kolb, 2000).
3. "N-nitroso bileşikler" gibi genotoksiklerin oluşmalarına neden olmaktadır (Tamir ve Tannenbum, 1996).

DNA'da oluşan bu hasarlar, p53 proteini (Ambs ve ark., 1997), PARP (poly(ADP-ribose)polymerase) aktivasyonuna ve bcl-2 down-regülasyonuna neden olup apoptozisi indüklemektedir (Kolb, 2000; Pieper ve ark., 1999; Nicotera ve ark., 1997; Tamir ve Tannenbum, 1996). Endojen NO'in (Tamir ve Tannenbum, 1996) ve NO donörlerin (Takuma, 2002) gösterdiği sitotoksik etkinin büyük kısmı bu şekilde gerçekleştiğini gösterilmiştir. SNP'in (sodyum nitroprussid) mezanjiyal hücrelerde (MC) apoptozisi indüklediği, makrofajlarda hem endojen NO hem de SNP'in p53 ekspresyonu arttırdığını gösterilmiştir (Patel ve ark., 2000). NO'in, HeLa üzerinde proapoptotik özelliğinin olduğu da görülmüştür (Kim ve ark., 2001). NO, proteozomu inhibe ederek p53 proteininin birikmesine neden olmaktadır (Kolb, 2000). Bu etkinin, iNOS down-regülasyonu ile azatıldığı gösterilmiştir (Ambs ve ark., 1997). Sıçan serebral kortikal kültüründe NO donörlerinin oluşturduğu sitotoksitenin, PARP inhibitörleri tarafından engellendiği görülmüştür (Tamir ve Tannenbum, 1996). NO'in, izole kaspazları *in vitro* koşullarda inhibe ettiği, ancak *in vivo* koşullarda indirekt yolla aktive ederek apoptozisi indükleyebildiği gösterilmiştir. İnsan miyelomonositik HL60 hücrelerinde SNP'in, kaspaz-3'ü stimüle ettiği görülmüştür (Kolb, 2000).

NO, nöron hücrelerinde protein fosforilasyonu veya defosforilasyonu ve/veya protease aktivasyonu gibi mekanizmalar ile sitoskeletal organizasyonunu bozarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Başka bir deyişle, hücredeki mikrofilament veya mikrotübül dağılması ile NO, nöron hücrelerinde apoptotik

etki göstermektedir. Bu etkiler paklitaksel ile kısmen engellenebilmektedir (Nicotara ve ark., 1995).

NO mitokondriyal enzim sistemi ile reaksiyona girerek hücre solunumu reversibl şekilde inhibe etmektedir, ancak "tiyol içeren" mitokondriyal enzimlerden bazılarının irriversibl inaktivasyonuna neden olmaktadır. Fizyolojik konsantrasyonlarda NO, oksijen ile yarışarak sitokrom c oksidaz enzimlerinde kompetitif inhibisyona neden olmaktadır. Öte yandan hücreler, uzun süreli NO'e maruz kaldıklarında S-nitrozilasyon reaksiyonu ile kompleks I, II ve III irriversibl şekilde inhibe olmaktadır (Lamas ve ark., 1998; Kim ve ark., 2002; Kolb, 2000).

NO'in düşük konsantrasyonunun elektron transportunu inhibe ederek hücre solunumu ve ATP sentezini bozduğu ve buna bağlı olarak mitokondriden sitoplazmaya doğru salınımı ile intrasellüler kalsiyum düzeyleri arttırdığı gözlenmiştir. Mitokondrideki bu değişikliklere ilave olarak NO'in, mitokondriyal "permabilite transizyon por (PTP)" geçirgenliğini direkt olarak arttırdığı bildirilmiştir. NO ayrıca mitokondriyal transmembran potansiyalinin ($\Delta\Psi_m$) dağılımını direkt olarak etkilemektedir. Sonuç olarak, NO'in mitokondri üzerindeki etkilerine bağlı olarak hem serbest sitoplazmik kalsiyum düzeylerinin artması, hem de mitokondriden apoptotik faktörler salınması olayları gözlenmiştir. Sonradan bu faktörler izole edilmiş ve nükleer apoptozis oluşturabildiğini görülmüştür (Kolb, 2000). NO'in antiapoptotik etkilerinin genellikle cGMP bağımlı ve/veya bağımsız mekanizmalar aracılığıyla kaspazların inhibisyonuna bağlantılı olduğu gösterilmiştir ve bu, S-nitrozilasyon reaksiyonu ile gerçekleşmektedir (Lamas ve ark., 1998; Kim ve ark., 2002). Melanoma hücrelerinde iNOS sentaz inhibitörleri, endojen NO sentezini inhibe ederek ve hücre siklusunu etkilemeden hücrede apoptotik ölüme neden olmakta ve bu etkiler SNP ile bloke edilmektedir (Salvucci ve ark., 2001). NO'in antiapoptotik etkilerinin intrasellüler "glutasyon sistemi gibi" antioksidan sistemlerin up-regülasyonuna bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir (Kiechle ve Zhang, 2000). NO, hem sitostatik hem de sitotoksik olup (Martin ve ark., 1999) hücre proliferasyonu engellediği için endojen antitümöral bir madde olarak kabul edilmektedir (Lamas ve ark., 1998).

3.3. Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler Hakkında Genel Bilgiler

3.3.1. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Testler ve MTT Ölçümü

MTT ölçümü, *in vitro* kuşullarda hücre metabolizmasını, canlılığı ve sitotoksisiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Holst-Hansen ve Brünner, 1998). Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondriyelerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonucunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Kristaller DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir. Böylece direkt olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmektedir. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Mosmann, 1983; Denizot ve Lang, 1986; Carmichael ve ark., 1987). Süksinat-dehidrojenaz mitokondri matriksinde yer alan Krebs siklusundaki enzimlerden birisidir ve diğer enzimlerinden farklı olarak mitokondriyal iç membranın içe bakan yüzeyinde bulunmaktadır. Bu enzim, FAD (Flavin adenin dinükleotid) demir-kükürt (Fe:S) proteini içermektedir. Malonat ve okzaloasetat, süksinat-dehidrojenazi kompetitif olarak inhibe etmektedir (Murrey ve ark, 1993; Voet ve Voet, 1995; Alberts ve ark, 1994). Bu yöntem, çalışma basamaklarının az olması açısından hızlı, kolay ve çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren bir testtir (Reile ve ark., 1990; Kueng ve ark., 1989; Senaratne ve ark. 2000).

3.3.2. Kantitatif Nitrit Tayini

Biyolojik sistemlerde nitrik oksit (NO), ancak saniyelerle ifade edilebilecek çok kısa bir yarılanma ömrü olan (Kim ve ark. 2001; Al-alami, 1998) bir serbest radikaldir (Hajri, 1998; Soonjo, 2001). NO stabil olmadığı için, stabil olan son metaboliti Nitrit (NO₂⁻) Griess reaktifi ile ölçülebilmektedir (Al-alami, 1998). Besiyerde toplanan nitrit Griess reaktifi ile reaksiyona girerek kırmızımsı-mor renkli bir azo bileşiği oluşturmaktadır. Oluşan rengin absorbansı UV/görünür dalga boyundaki spektrofotometrelerle ölçülmektedir. Besiyerde toplanan nitrit'in

miktarı ile absorbansın değeri arasında doğru orantı bulunmaktadır. Griess reaktifi iki çözeltilerin eşit oranla karışması ile elde edilir. Birinci çözelti distile suda 0.1% oranla çözülmüş naftiletilediamin iken, ikinci çözelti ise 5%'lik fosforik asit solüsyonu içinde 1% oranla çözülmüş sülfanilamid veya sülfanilik asittir (Green ve ark., 1982).

3.3.3. Hücrelerdeki DNA ve RNA Miktarları ve Akridin Oranj ile Boyama

Akridin oranj ve etidyum bromür gibi maddeler nükleik asitlere bağlanarak DNA'yı yeşil RNA'yı turuncu floresans verecek biçimde boyamaktadır (Kasten, 1981). UV ışığında, nükleik asitlere bağlı bu floresan maddeler serbest kalmış olanlara göre daha çok fazla floresans göstermektedir. DNA ve RNA miktarlarına bağlı olarak floresans şiddeti değişmektedir (Celis, 1998). Böylece hem floresans şiddetine göre hem de rengine göre DNA'nın ve RNA'nın miktarı ve dağılımı incelenebilmektedir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Gereçler

4.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Akridin oranj (Sigma)

Amfoterisin-B (Sigma)

Dimetilsülfoksit -DMSO (Sigma, Merck)

Dulbecco's Modification Eagles Besiyeri (Biological Industries)

Etanol (Merck)

Fetal Calf Serum (Biological Industries)

Fosfat Tuz Tamponu (PBS-A)

Fosforik asid H_3PO_4 (Merck)

Hank's Balans Tuz Solüsyonu (Sigma)

Hidroklorik asid HCl (Merck)

Kalsiyum klorür- $CaCl_2$ (Merck)

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) (Sigma)

Naftilendiamin dihidroklorid (Merck)

Paklitaksel (Bristol-Myers-Squibb)

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (Sigma)

Sodyum hidroksid NaOH (Merck)

Sodyum nitrit (Merck)

Sodyum nitroprussid (NIPRUS[®], Bilim)

Sülfonilamid (Merck)

Tripsin-EDTA Solüsyonu (Biological Industries)

4.1.2. Malzemeler

Otoklavlanabilir cam şişe (Iso-lab)

1, 2, 5 10 ve 25 ml'lik cam pipet (Iso-lab)

10, 100 ve 1000µl mikropipet ucu

15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpü (TPP)

22x22 Lamel

25 ve 75 cm²'lik kültür şişeleri (TPP)

5, 10 ve 25 ml'lik tek kullanımlık pipet (Serological Pipette)

96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP)

Çok kanallı mikropipet (Eppendorf)

Lam

Neubauer lamı (Iso-lab)

Stepet pipet (Eppendorf)

Steril petri (Corning)

4.1.3. Cihazlar

Steril Kabin (Holten)

ELISA cihazı (Bio-Tek)

İmmüno-floresan mikroskop ve fotoğraf ataçmanı (Olympus)

İnverted mikroskop (Olympus)

Karbondioksit inkübatörü (Heraeus)

Kuru hava sterilizatörü (Heraeus)

Otoklav (Hirayama)

Soğutmalı santrifüj (Heraeus)

4.2. Yöntemler

4.2.1. Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması

Uygun kuşularda çoğalmaya bırakılan hücreler yeterli sayıya eriştikleri zaman tripsin ile muamele edilerek toplandı. 1 ml'de 250000 hücre olacak şekilde Neubauer lamı kullanarak süspansiyon hazırlandı. 250.000 hücre/ml şeklinde süspansiyon edilmiş hücreler 96 kuyucuklu plakaya her kuyucuğa 0.1 ml olacak şekilde ekildi. Böylece her kuyucukta 25.000 hücre ekilmiş oldu. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sona erdiğinde hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine test maddelerinin istenilen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip test maddeleri için aşağıda belirtilen sürelerde (24, 48, 72 ve 96 saat) inkübe edildi.

Sodyum nitroprusid (SNP)'in 20 ve 100 mM'lık, paklitaksel'in 0.8, 4, 20 ve 100 μ M'lık dilüsyonları hazırlandı. SNP için injeksiyonluk distile su,

paklitaksel için DMSO çözücü olarak kullanıldı. Hazırlanmış olan bu dilüsyonlardan 1'er µl alınarak 1'er ml'lik hacimdeki besiyerlerine ilave edildi. Paklitaksel ve SNP kombinasyon konsantrasyonlarını hazırlamak için 1 µl'lik paklitaksel dilüsyonları ile karıştırılan 1 ml'lik besiyerlerine 1 µl 20 mM'lık veya 100 mM'lık SNP çözeltisinden ilave edildi.

Bu şekilde oluşan final konsantrasyonlar, paklitaksel için 0.8 ,4, 20 ve 100 nM, SNP için 20 ve 100 µM, kombinasyonlar için 20 µM SNP + 0.8 , 4, 20 ve 100 nM Paklitaksel ve 100 µM SNP + 0.8 , 4, 20 ve 100 nM paklitaksel. Besiyeri içindeki DMSO konsantrasyonu %0.1 civarındadır. Bu konsantrasyonda DMSO tarafından oluşturulan etkiler ihmal edilebilir ya da hücreler tarafından tolere edilebilir olarak kabul edilmektedir (Berlt ve ark 1999).

Bu konsantrasyonlarda besiyerinde hazırlanan test maddelerinin konsantrasyonları, kontrol grubu (boş) ve %0.1 DMSO içeren çözücü kontrol grubu da teste eklendi. Test maddeleri içeren besiyerleri 96 kuyucuklu plakaların 24 ve 48 saat sayımları için 0.2 ml, 72 ve 96 saat sayımları için 0.3 ml koyularak belirtilen sürelerde inkübe edildi. Bu süreler sonunda hücrelerde gerekli test yöntemleri uygulandı.

Akridin oranj deneyi için, 50 cm²'lik petriye yerleştirilmiş 7 adet 22 x 22 mm steril lamellerin üzerine 250.000 hücre/ml'lik hücre süspansiyonu her petri'ye 5 ml olmak üzere ilave edilerek ekim yapıldı ve inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra lameller alınarak 9 cm²'lik bölmeler içeren plakalara aktarıldı ve üzerine test maddesi çözeltisinden 2 ml içeren taze besiyerleri ilave edildi. Hücreler diğer testlerde maksimum etki görülen süre (72 saat) bekletildikten sonra boyama işlemi uygulandı.

4.2.2. MTT Ölçümü

MTT 5 mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Çalışma solüsyonu stok solüsyonundan 1:9 oranla besiyeri ile seyreltilerek elde edildi. Hazırlanmış olan (0.5 mg/ml MTT) çalışma solüsyonu 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 0.1 ml olarak ilave edildi ve 4 saat inkübasyonda bekletildikten sonra plaklardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazı ile 540 nm dalga boyunda okutuldu (Mosmann, 1983; Denizot ve Lang

1986; Alley ve ark.,1988; Reile ve ark., 1990; Holst-Hansen ve Br nner 1998; Tedone ve ark. 1996; Horakova ve ark., 2001; Korkmaz, 2002; Abdallah, 2003).

4.2.3. Kantitatif Nitrit Tayini

NO'in yarılanma ömrü çok kısa olduğundan besiyerdeki oluşan metaboliti NO₂⁻  l mlemlenmektedir (Mullins, 1998). 96 kuyucuklu plakada her kuyucuktan 100  l süpernatant alıp üzerine eşit miktarda Griess reaktifi (0.05% naftilendiamin dihidroklorid, 0.5% sülfonilamid, 2.5% H₃PO₄) ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra ELISA cihazı ile 540 nm dalga boyunda okutuldu (Green, 1982; Abdallah, 2003; Mullins ve ark, 1998; Al-alamı ve ark, 1998). Elde edilen değerler, besiyerinde saptanan nitrit miktarı ve boş plaka absorbansından arındırılmıştır. Standart olarak 50 M sodium nitrit kullanılmıştır.

4.2.4. Akridin Oranj ile Floresan DNA ve RNA Boyaması

Test maddeleri ile  c gün muamele edilmiş lamellerin üzerindeki hücreler plakalardan alındı ve 3 kez 2 dakika PBS ile yıkandıktan sonra 5 dakika % 70 etanolde bekletildi, 5 dakika içerisinde birkaç defa distile su ile yıkandı. Sonra 2 dakika PBS'de bekletildi, oda ısısında ve karanlıkta 15 dakika akridin oranj çalışma  zeltisi ile fikse ederek boyandı. Boyayı uzaklaştırmak için 4 kez PBS ile yıkandı. lameller hücrelerin bulunduğu kısımlar arada kalacak şekilde üzerine birer damla PBS damlatılmış lamaların üzerlerine kapatıldı. Lamellerin etraflarına şeffaf tırnak cilası sürülerek sabitleştirildikten sonra floresan mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi (Celis 1998, Kasten 1981; Korkmaz, 2002). Boya ışıkta bozulduğu için preparatlar karanlıkta bekletildi.

4.2.5. İstatistiksel Değerlendirmeler

Elde edilen sonuçlar, SPSS istatistik programında günler ve gruplar parametrelerine karşı tek yön ANOVA ve post-hoc olarak Tukey kullanılarak değerlendirildi.

5. AMAÇ

Kanser hastalığı neden olduğu mortalite ve psikolojik bozukluklardan dolayı hep göndemde olmuştur. Maalesef en çok araştırılan konulardan biri olmasına rağmen henüz radikal tedavisi bulunmamaktadır.

Ölüm oranı açısından akciğer kanseri ilk sırayı almaktadır (Kayaalp, 2002). Akciğer kanserleri bir çeşidi olan küçük hücre dışı akciğer kanserine karşı paklitaksel etkili bulunmuş (Korkmaz, 2002). Paklitaksel ayrıca sisplatine dirençli over karsinomaya karşı (Runowicz ve ark., 1995) yüksek etkiye sahip bir antineoplastik ajan olduğunu anlaşılmıştır (Makino ve ark., 2001).

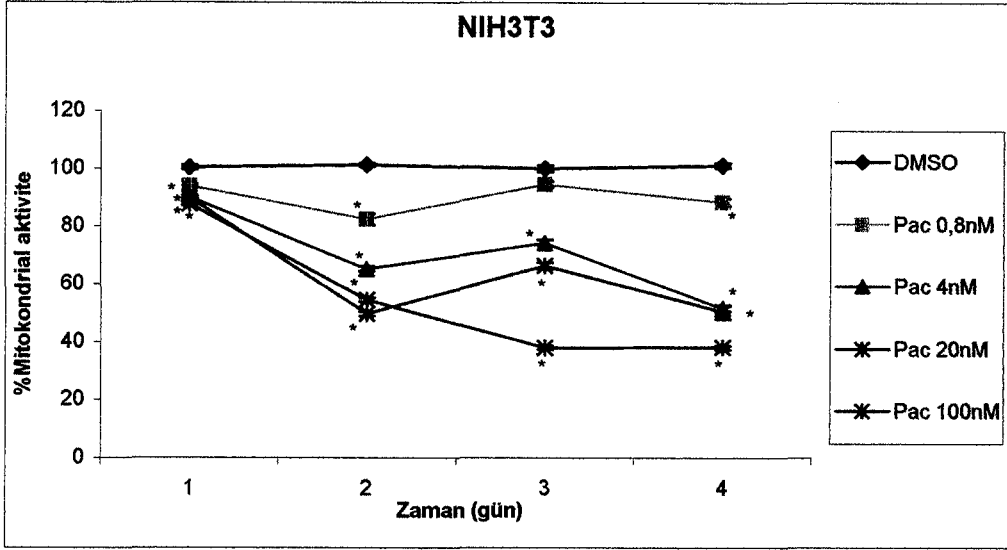
Nitrik oksid donorleri tarafından kanser hücrelerin kemoterapiye karşı gösterdiği rezistansı düşürüldüğünü gösterilmiştir (Matthews, 2001).bu sonucu gösteren çalışma NO donorleri kemoterapi ajanlarının potansiyelini arttırarak avantaj sağladığını ve bu nedenle NO donorlerini düşük dozları kemoterapi ajanları ile kombine ederek kullanılması önermiştir.

Bundan dolayı bu çalışmada, paklitaksel ile NO donorü olan SNP kombine ederek, akciğer ve over kanser hücreleri üzerinde nasıl bir etki gösterdiğini araştırmayı amaçladık.

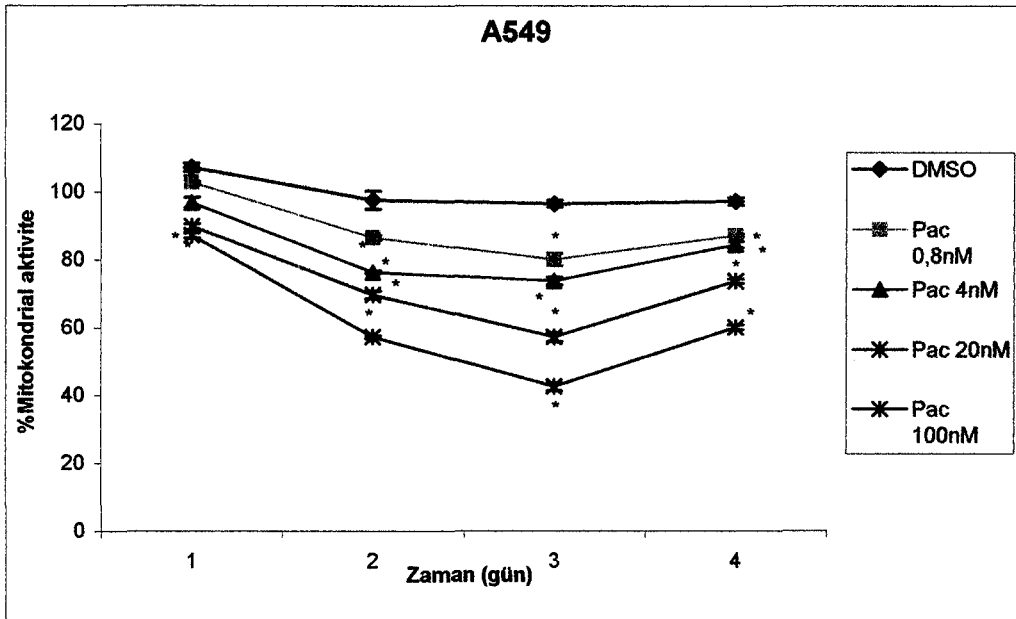
6. BULGULAR

6.1. Paklitaksel Sonuçları

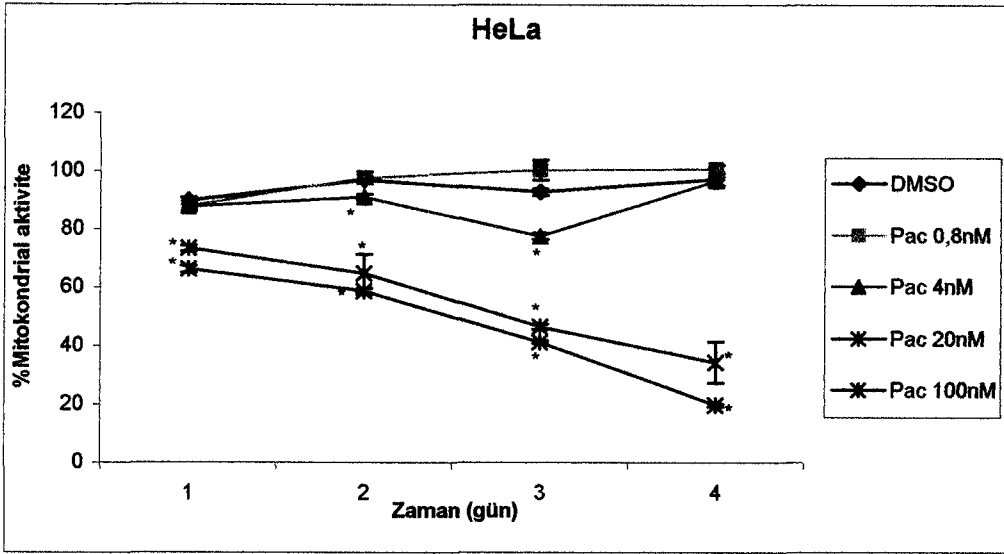
6.1.1. Paklitakselin MTT ölçümü Sonuçları



ŞEKİL 1. Paklitakselin NIH3T3 hücreleri üzerine MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

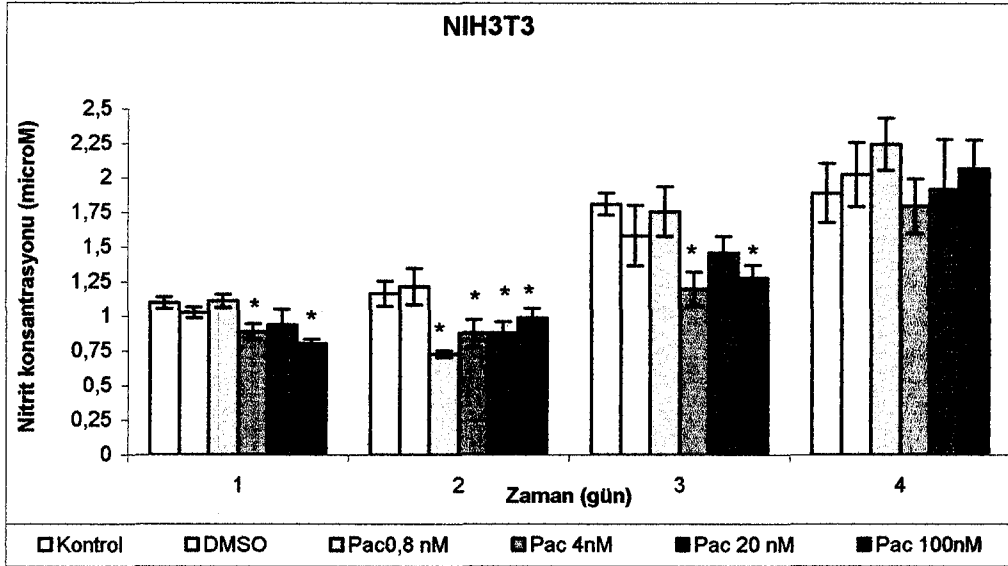


ŞEKİL 2. Paklitakselin A549 hücreleri üzerine MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

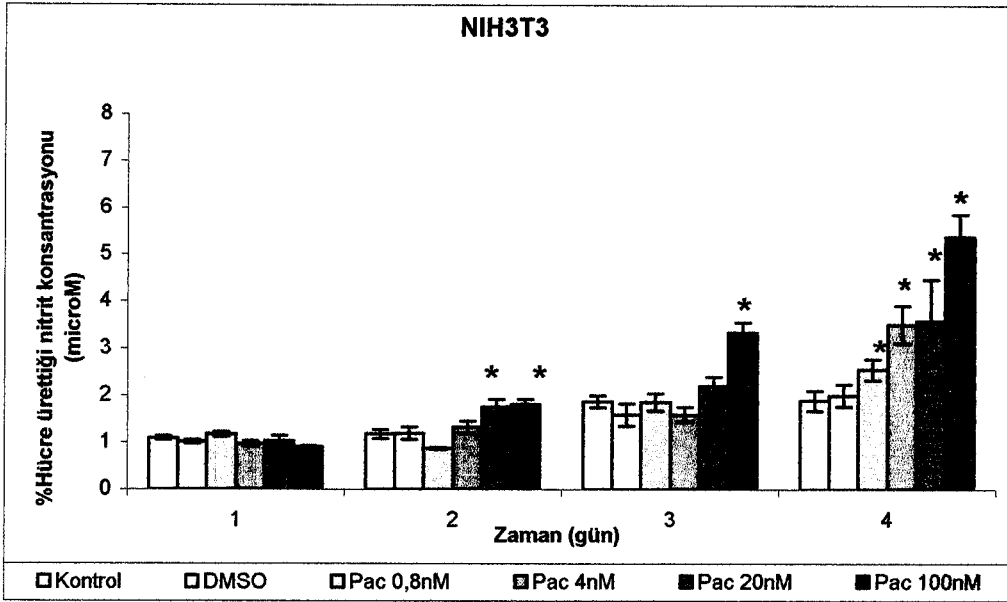


ŞEKİL 3. Paklitakselin HeLa hücreleri üzerine MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

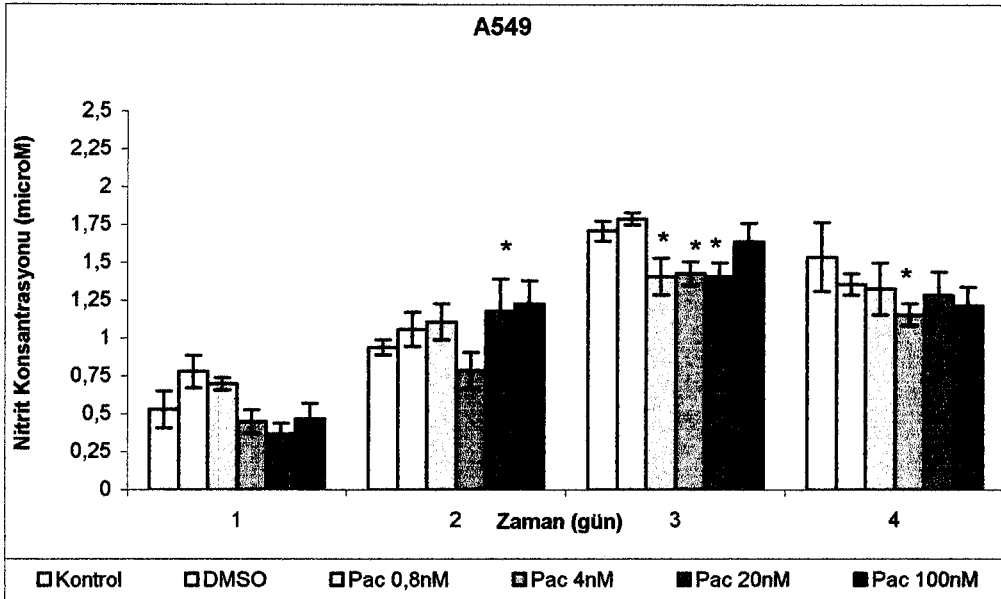
6.1.2. Paklitakselin nitrit ölçümü sonuçları



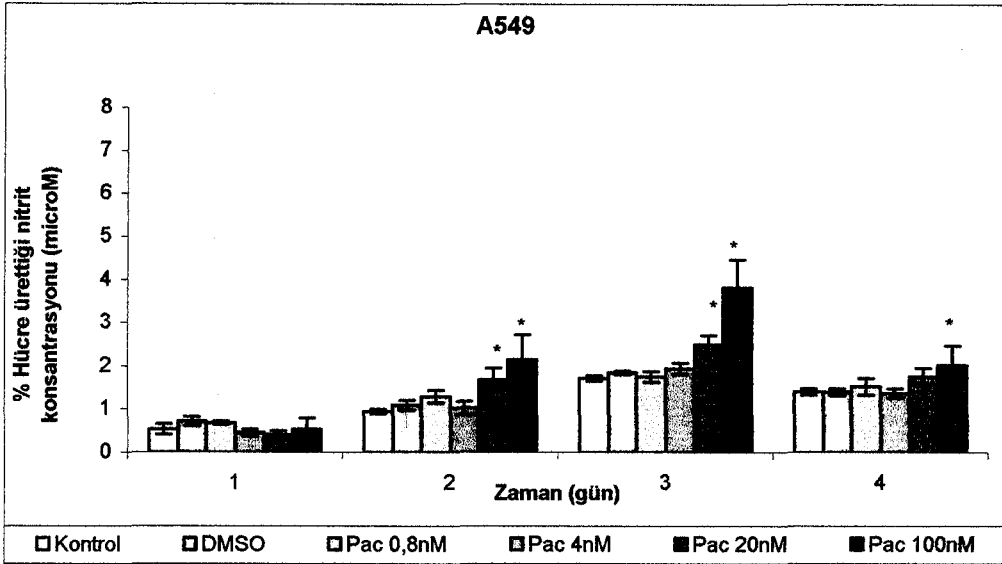
ŞEKİL 4. Paklitakselin NIH3T3 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)



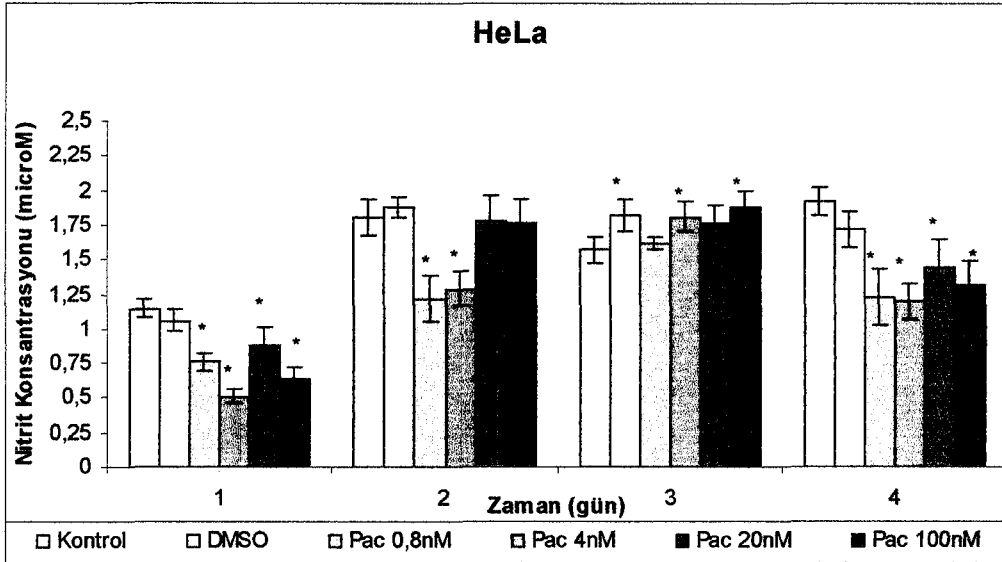
ŞEKİL 5. Paklitakselin NIH3T3 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü hücre proliferasyonu ile oranlayarak değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)



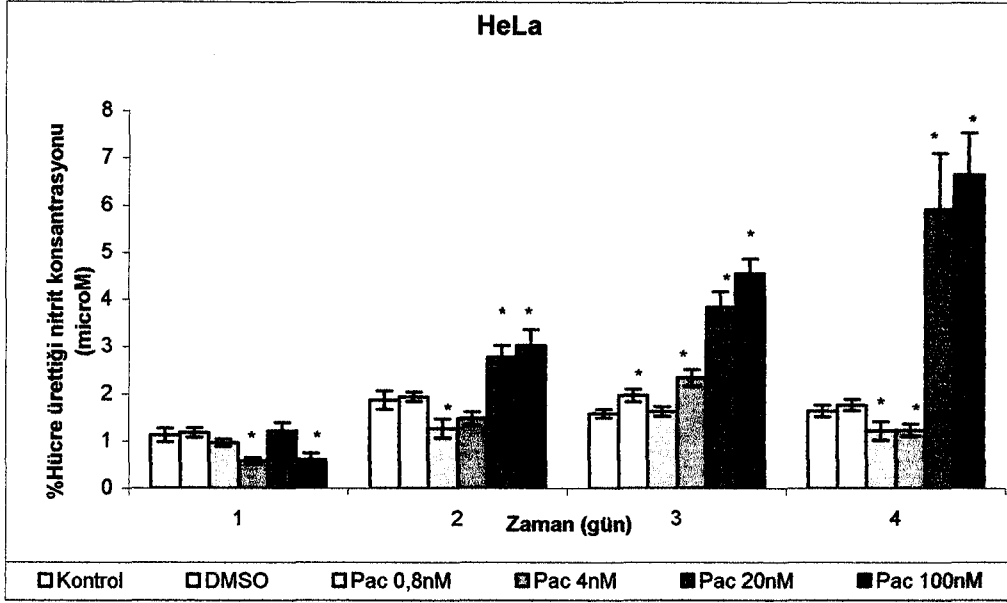
ŞEKİL 6. Paklitakselin A549 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)



ŞEKİL 7. Paklitakselin A549 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü hücre proliferasyonu ile oranlayarak değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

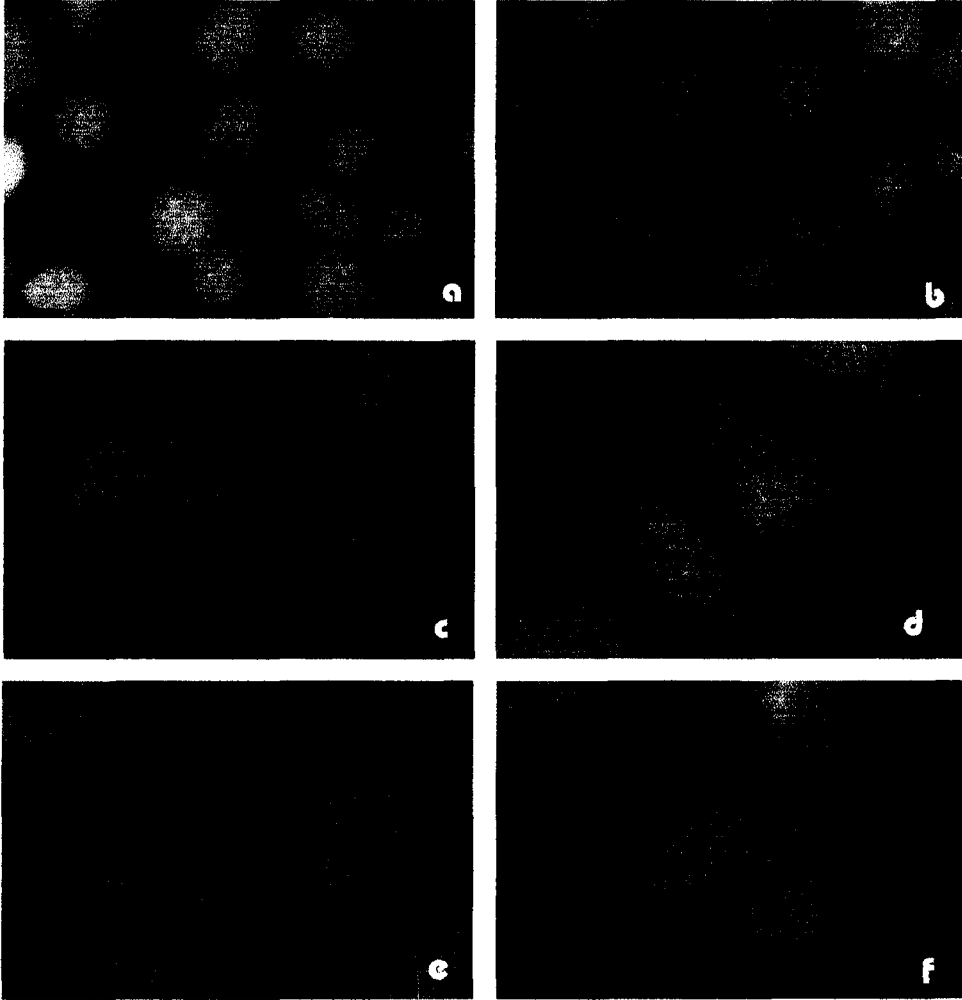


ŞEKİL 8. Paklitakselin HeLa hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

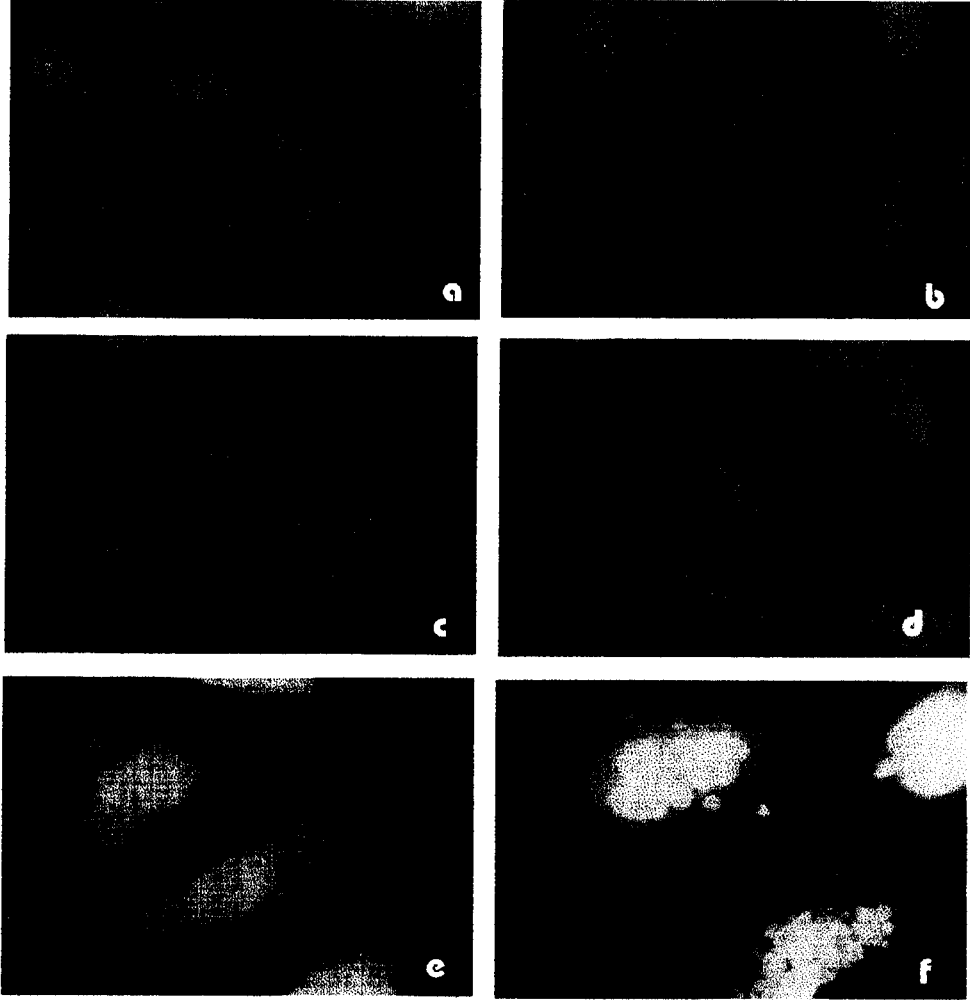


ŞEKİL 9. Paklitakselin HeLa hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü hücre proliferasyonu ile oranlayarak değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

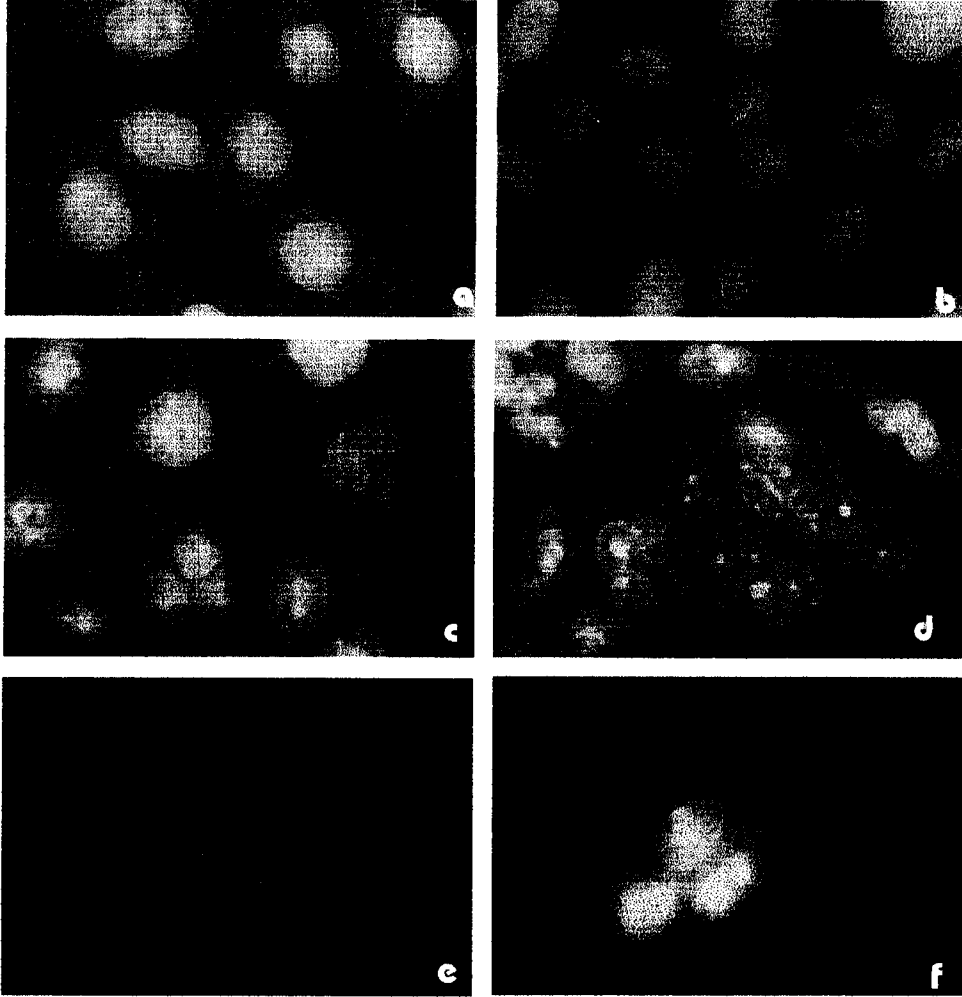
6.1.3. Paklitakselin akrinin oranj boyama sonuçları



Şekil 10. Paklitaksel uygulanan NIH3T3 hücrelerin akrinin oranj ile boyaması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı-RNA, Sarı-yeşil DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0,8 nM, d- 4 nM, e-20 nM, f-100 nM Paklitaksel. (1cm = 62,5 µm, büyütme 1600X)



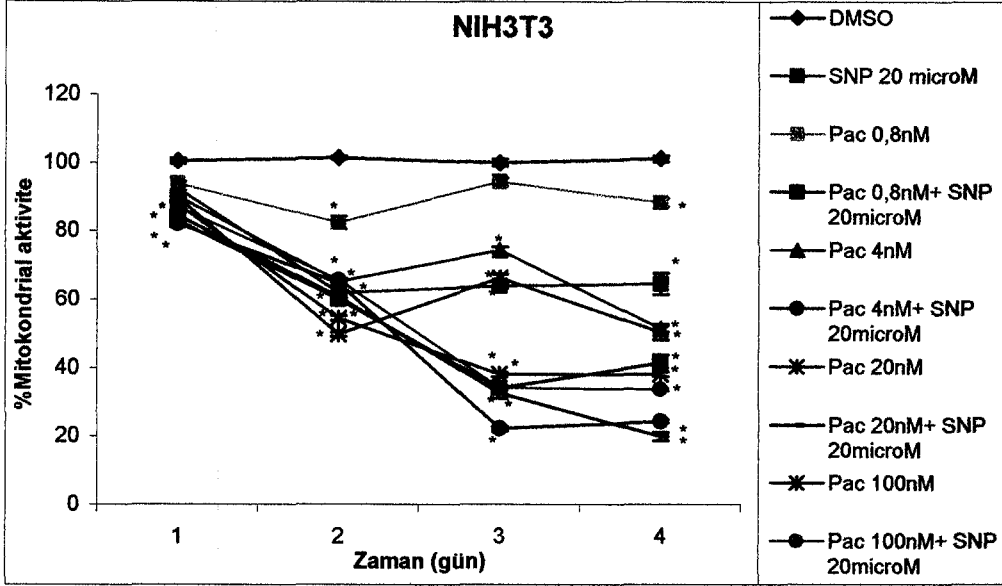
Şekil 11. Paklitaksel uygulanan A549 hücrelerin akridin oranj ile boyaması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı-RNA, Sarı-yeşil DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0,8 nM, d- 4 nM, e-20 nM, f-100 nM Paklitaksel. (1cm = 62,5 µm, büyütme 1600X)



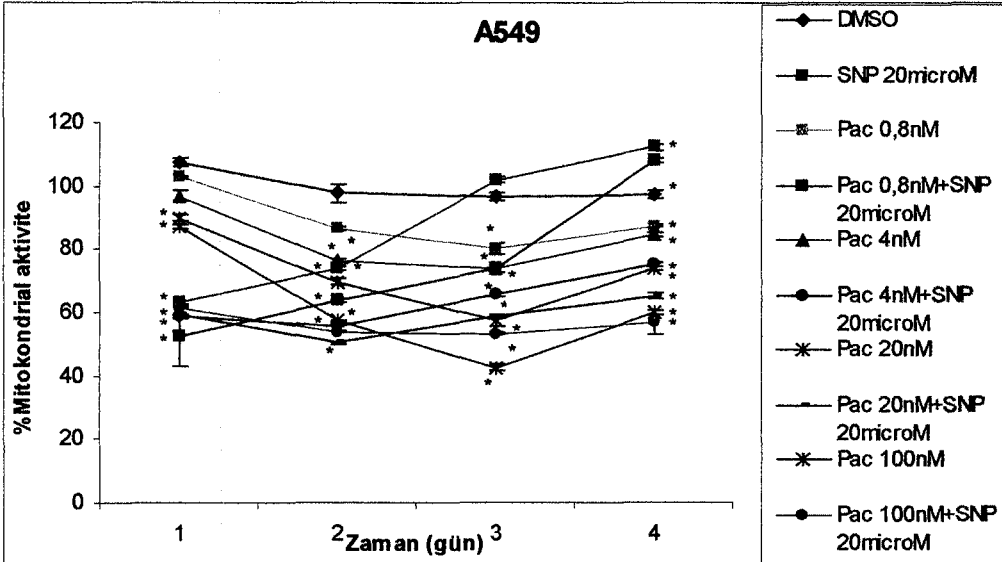
Şekil 12. Paklitaksel uygulanan HeLa hücrelerin akridin oranj ile boyaması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı-RNA, Sarı-yeşil DNA. a- Kontrol, b-DMSO, c- 0,8 nM, d- 4 nM, e-20 nM, f)100 nM Paklitaksel. (1cm = 62,5 µm, büyütme 1600X)

6.2. Paklitaksel ve SNP 20 µM kombinasyonu sonuçları

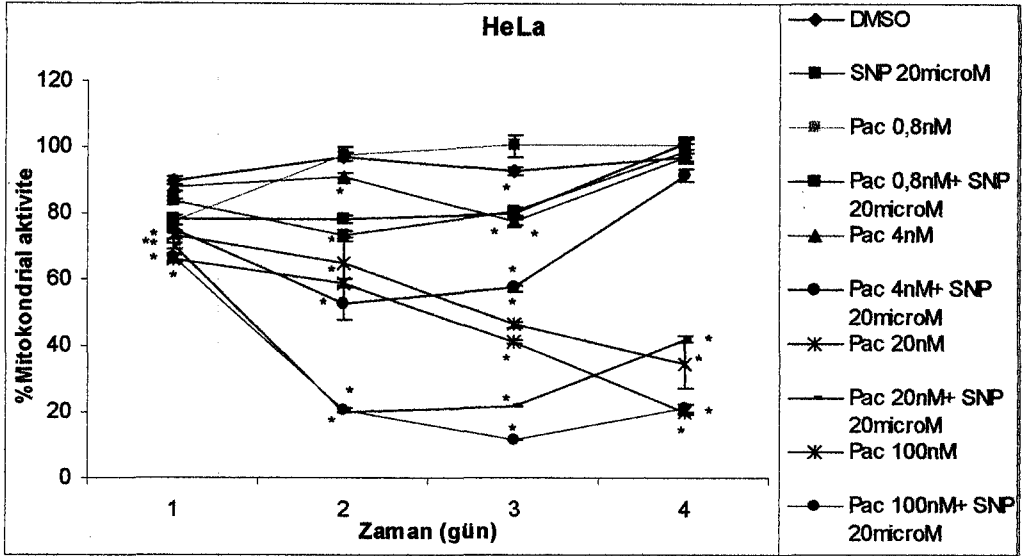
6.2.1. Paklitaksel ve SNP 20 µM kombinasyonunun MTT ölçümü sonuçları



ŞEKİL 13. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu NIH3T3 hücreleri üzerine MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

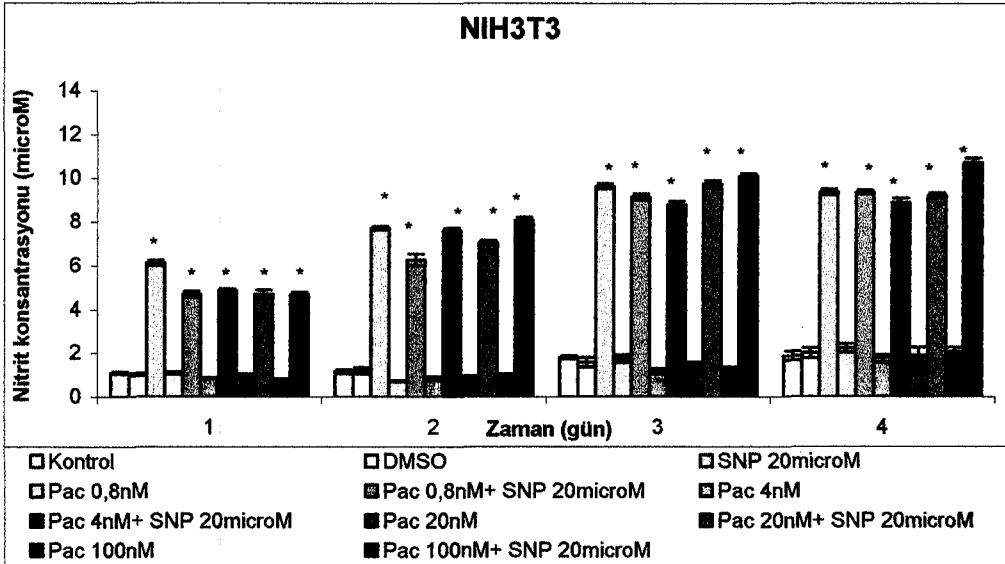


ŞEKİL 14. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu A549 hücreleri üzerine MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

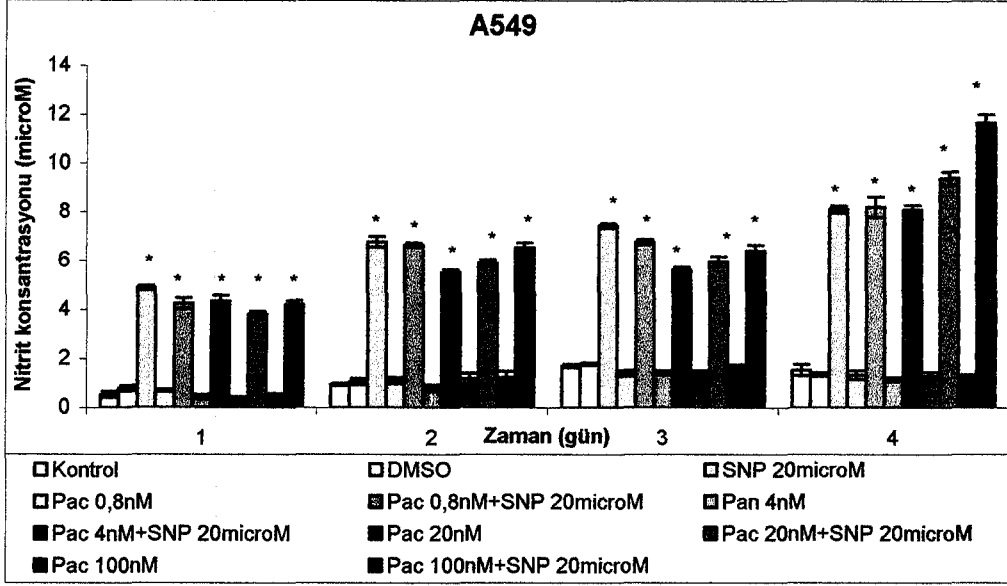


ŞEKİL 15. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu HeLa hücreleri üzerine MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

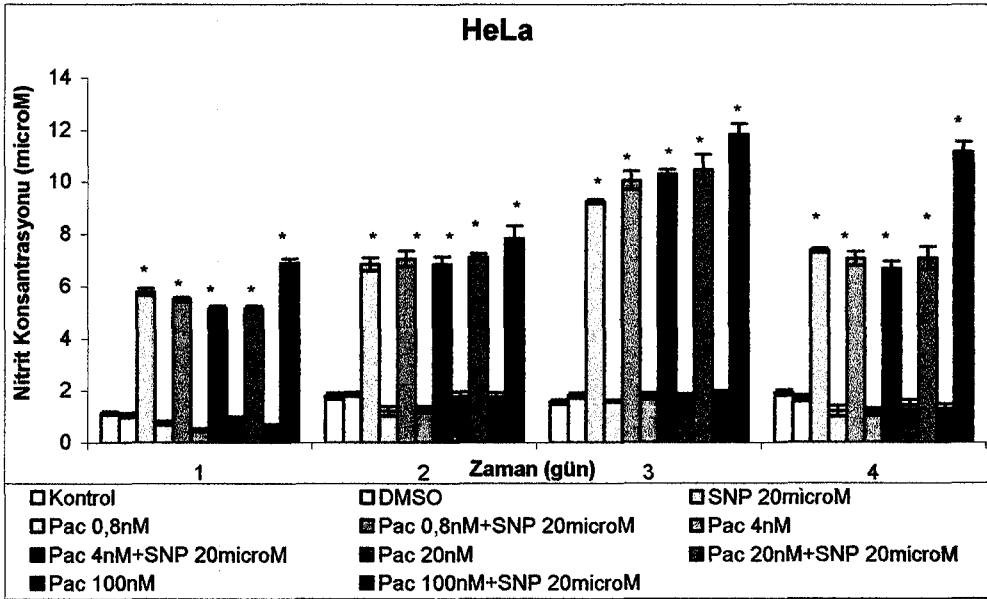
6.2.2. Paklitaksel ve SNP 20 µM kombinasyonunun nitrit ölçümü sonuçları



ŞEKİL 16. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu NIH3T3 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

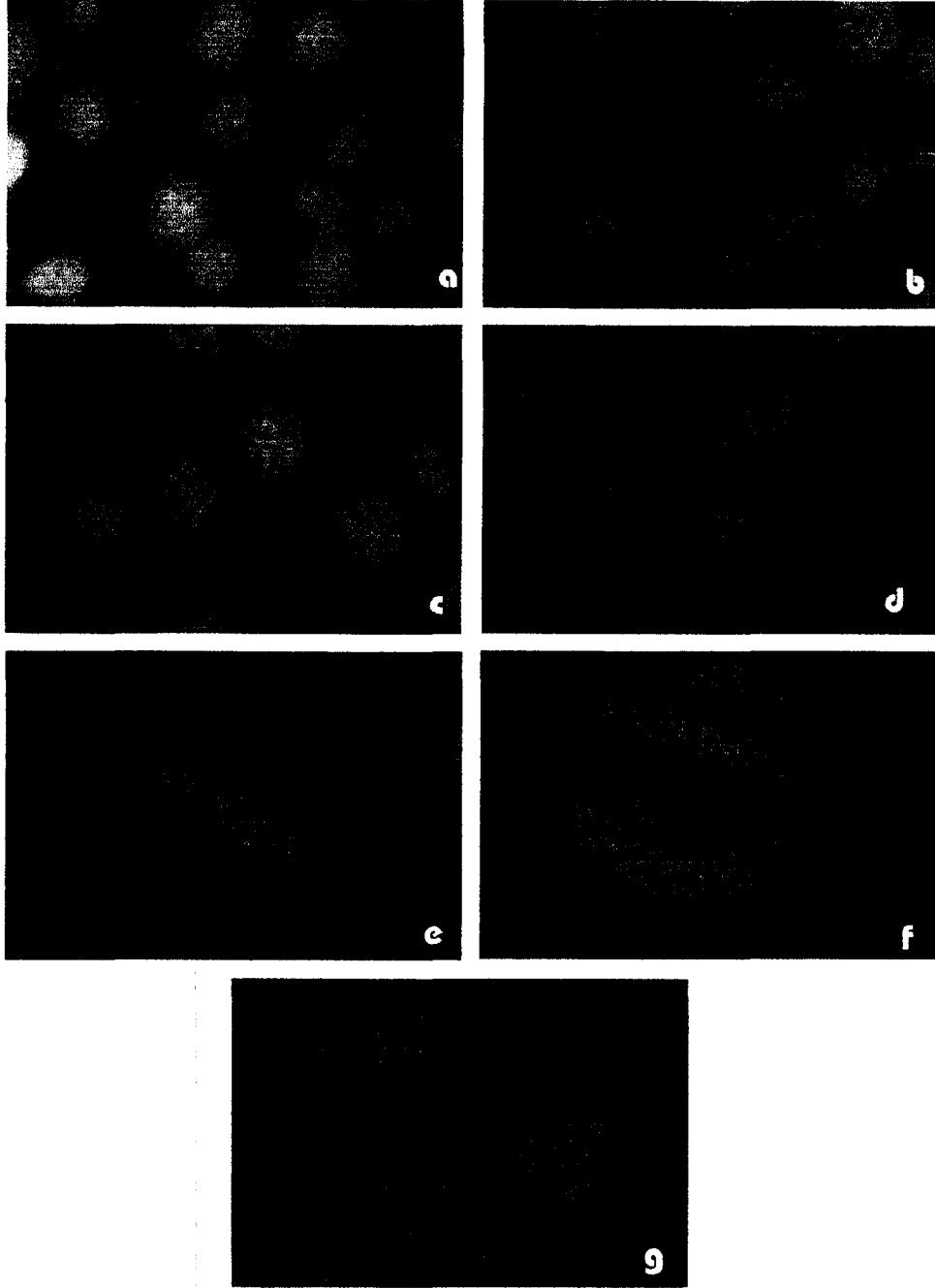


ŞEKİL 17. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu A549 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

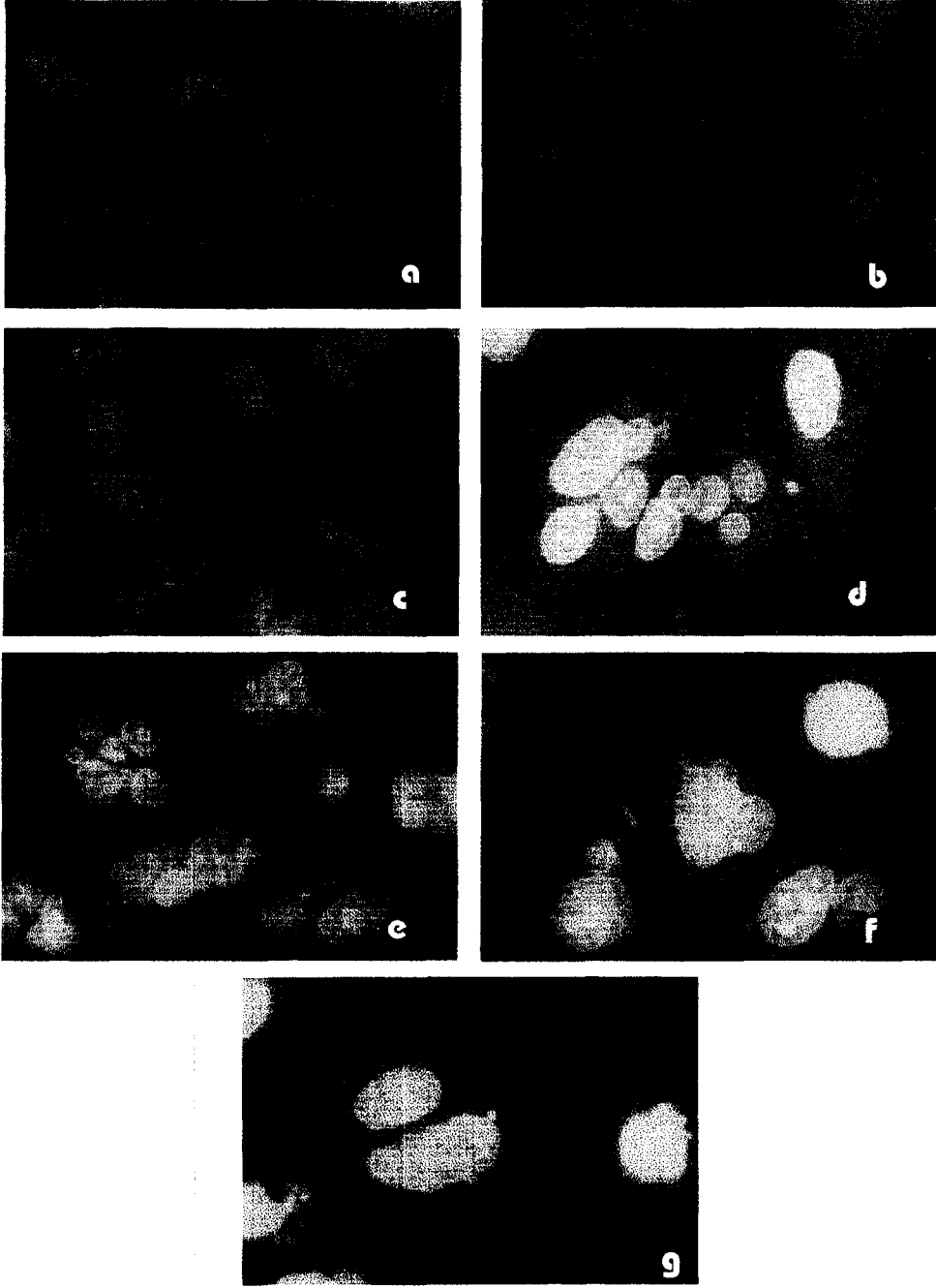


ŞEKİL 18. Paklitaksel ve SNP 20µM kombinasyonu HeLa hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

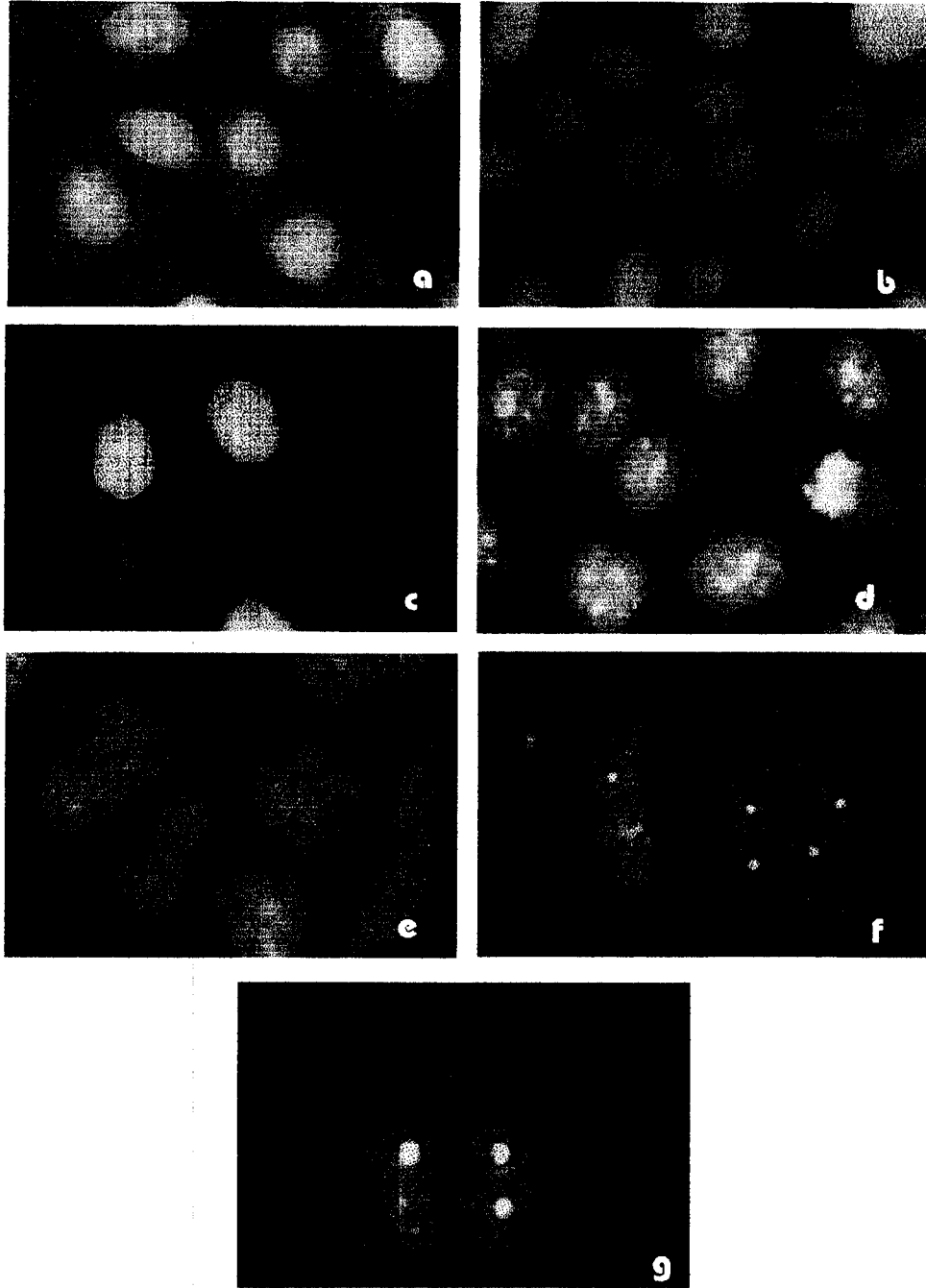
6.2.3. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonunun akridin oranj boyama sonuçları



Şekil 19. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonu uygulanan NIH3T3 hücrelerin akridin oranj ile boyaması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı-RNA, Sarı-yeşil DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- SNP20 μ M, d- 0,8 nM Pac + SNP20 μ M, e- 4 nM Pac + SNP20 μ M, f-20 nM Pac + SNP20 μ M, g- 100 nM Pac + SNP20 μ M. (1cm = 62,5 μ m, büyütme 1600X)



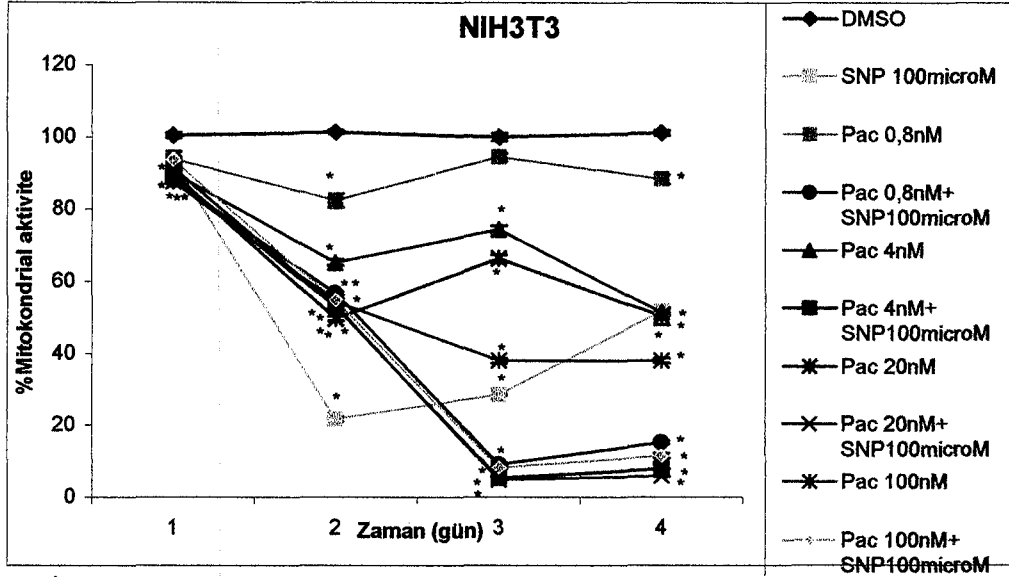
Şekil 20. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonu uygulanan A549 hücrelerin akridin oranj ile boyaması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı-RNA, Sarıyeşil DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- SNP20 μ M, d- 0,8 nM Pac + SNP20 μ M, e- 4 nM Pac + SNP20 μ M, f-20 nM Pac + SNP20 μ M, g- 100 nM Pac + SNP20 μ M. (1cm = 62,5 μ m, büyütme 1600X)



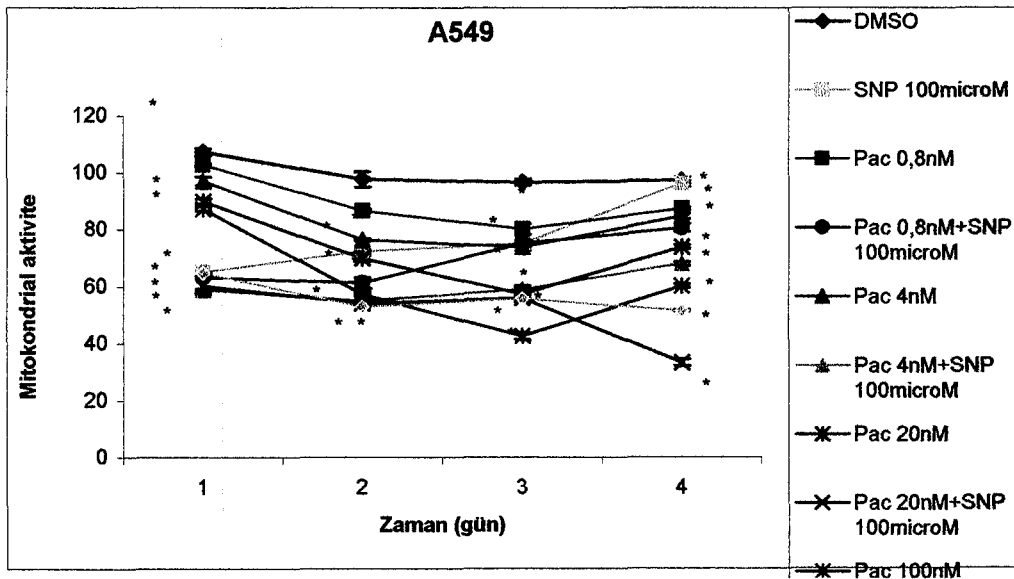
Şekil 21. Paklitaksel ve SNP 20 μ M kombinasyonu uygulanan HeLa hücrelerin akridin oranj ile boyaması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı-RNA, Sarıyeşil DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- SNP20 μ M, d- 0,8 nM Pac + SNP20 μ M, e- 4 nM Pac + SNP20 μ M, f-20 nM Pac + SNP20 μ M, g- 100 nM Pac + SNP20 μ M. (1cm = 62,5 μ m, büyütme 1600X)

6.3. Paklitaksel ve SNP 100 µM kombinasyonu sonuçları

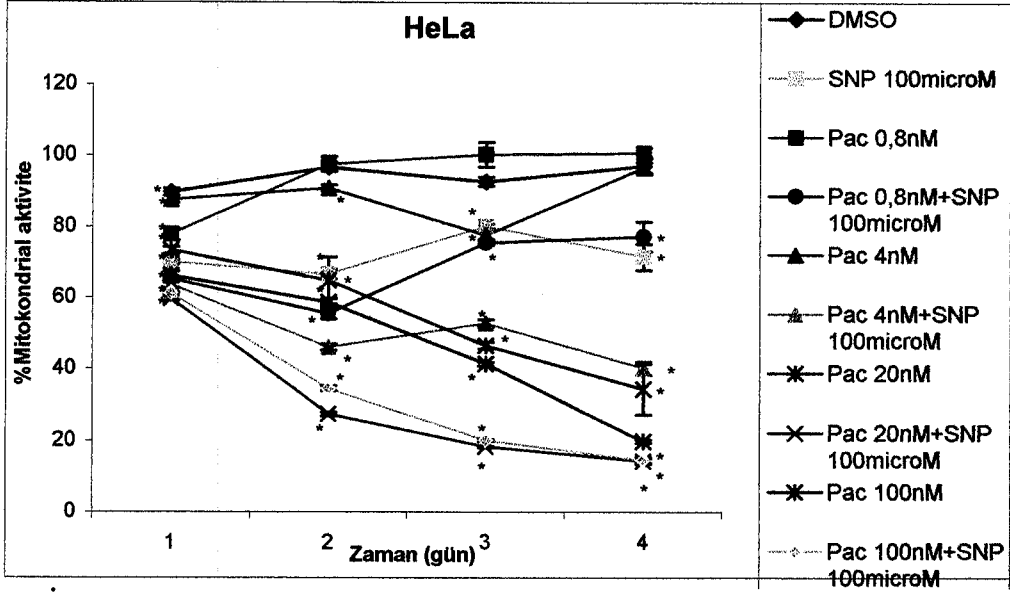
6.3.1. Paklitaksel ve SNP 100 µM kombinasyonunun MTT ölçümü sonuçları



ŞEKİL 22. Paklitaksel ve SNP 100µM kombinasyonu NIH3T3 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

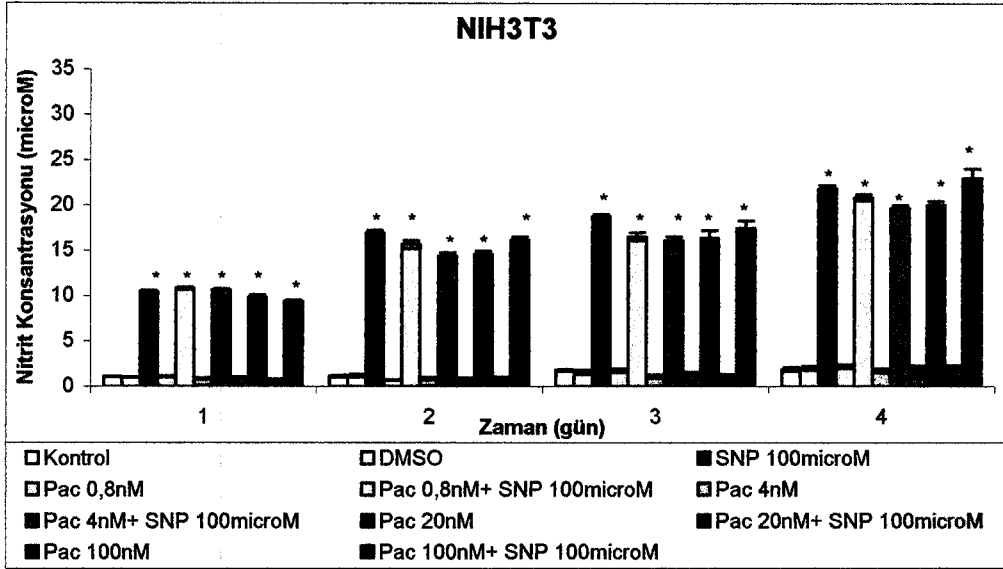


ŞEKİL 23. Paklitaksel ve SNP 100µM kombinasyonu A549 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

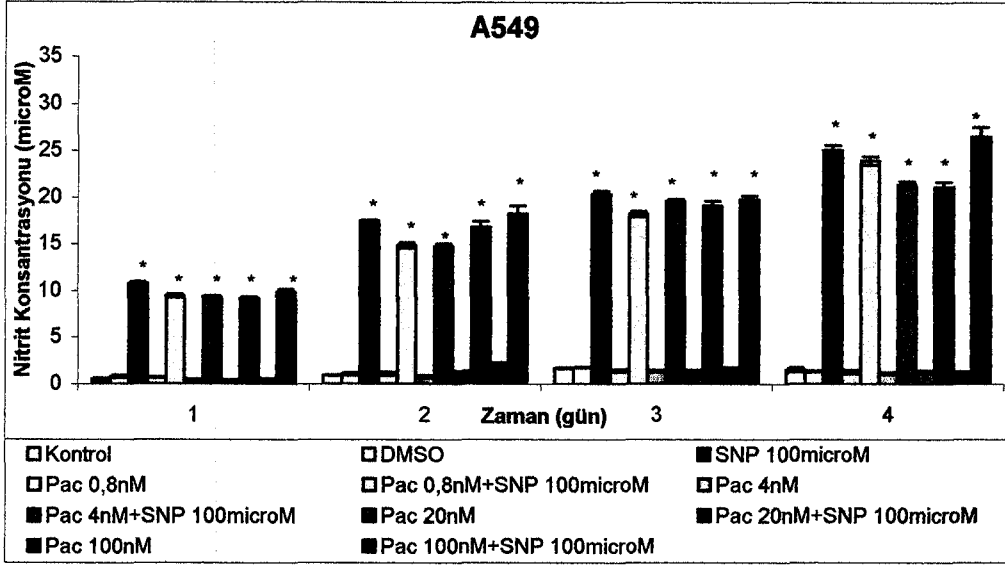


ŞEKİL 24. Paklitaksel ve SNP 100µM kombinasyonu HeLa hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

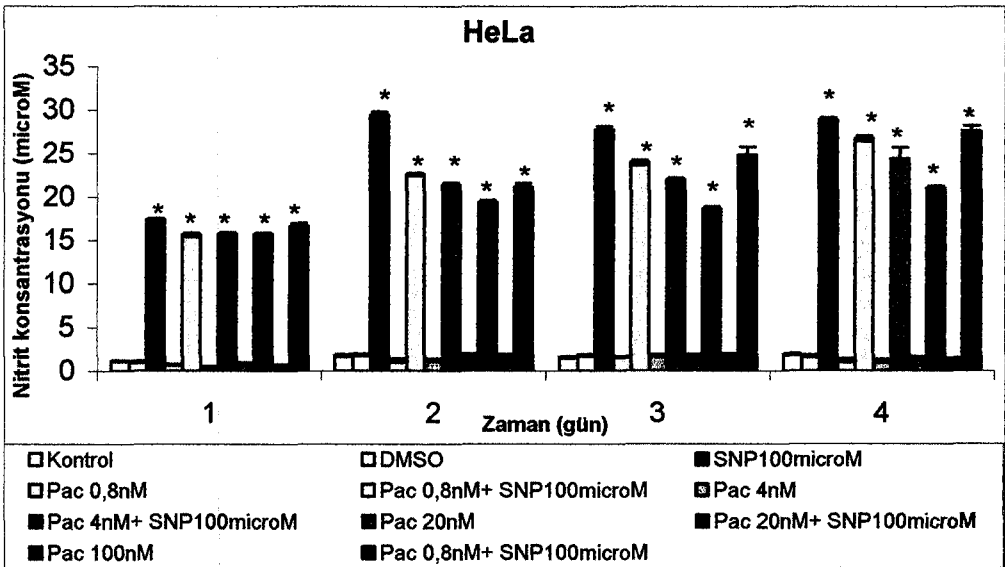
6.3.2. Paklitaksel ve SNP 100 µM kombinasyonunun nitrit ölçümü sonuçları



ŞEKİL 25. Paklitaksel ve SNP 100µM kombinasyonu NIH3T3 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

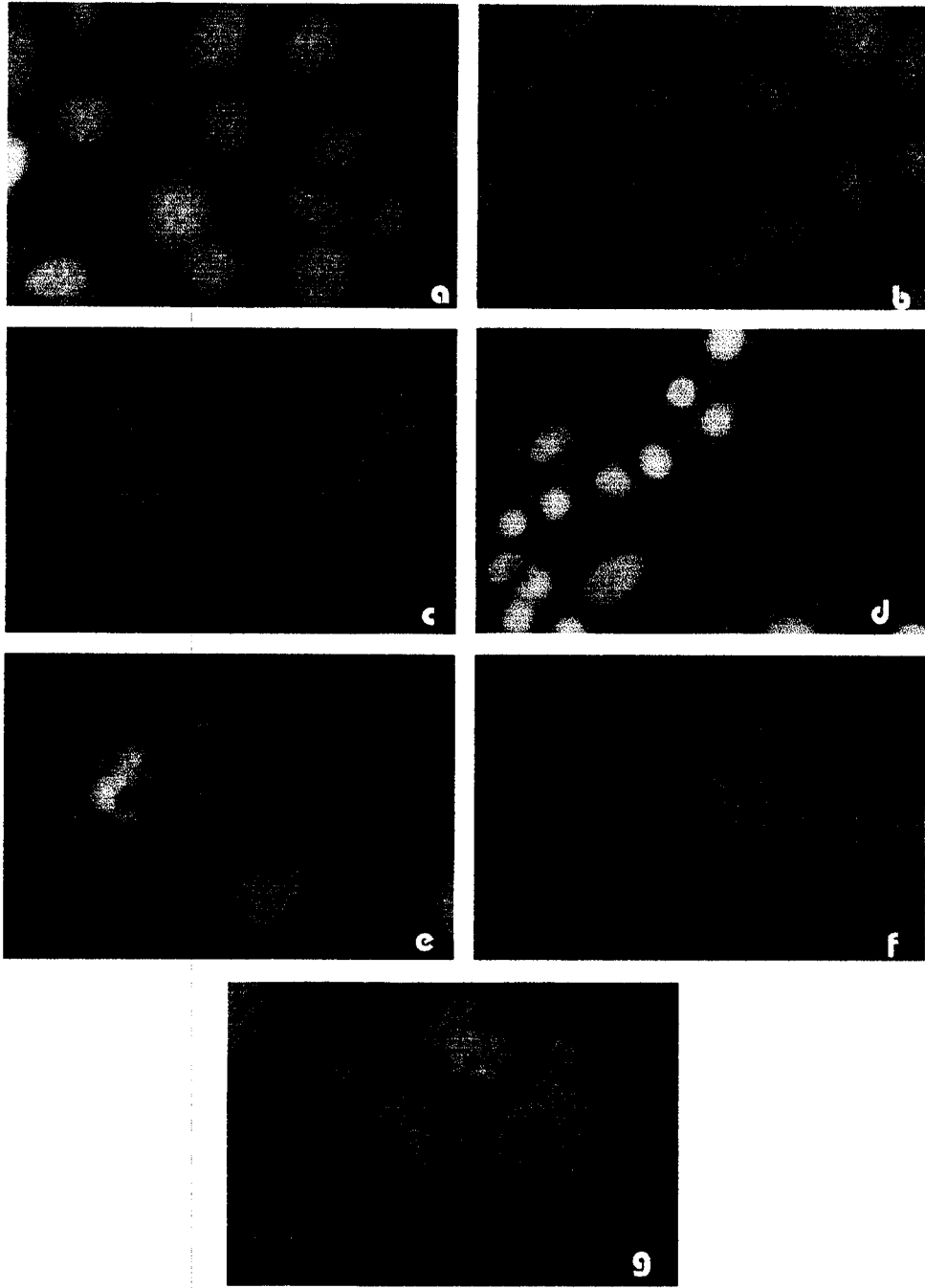


ŞEKİL 26. Paklitaksel ve SNP 100µM kombinasyonu A549 hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

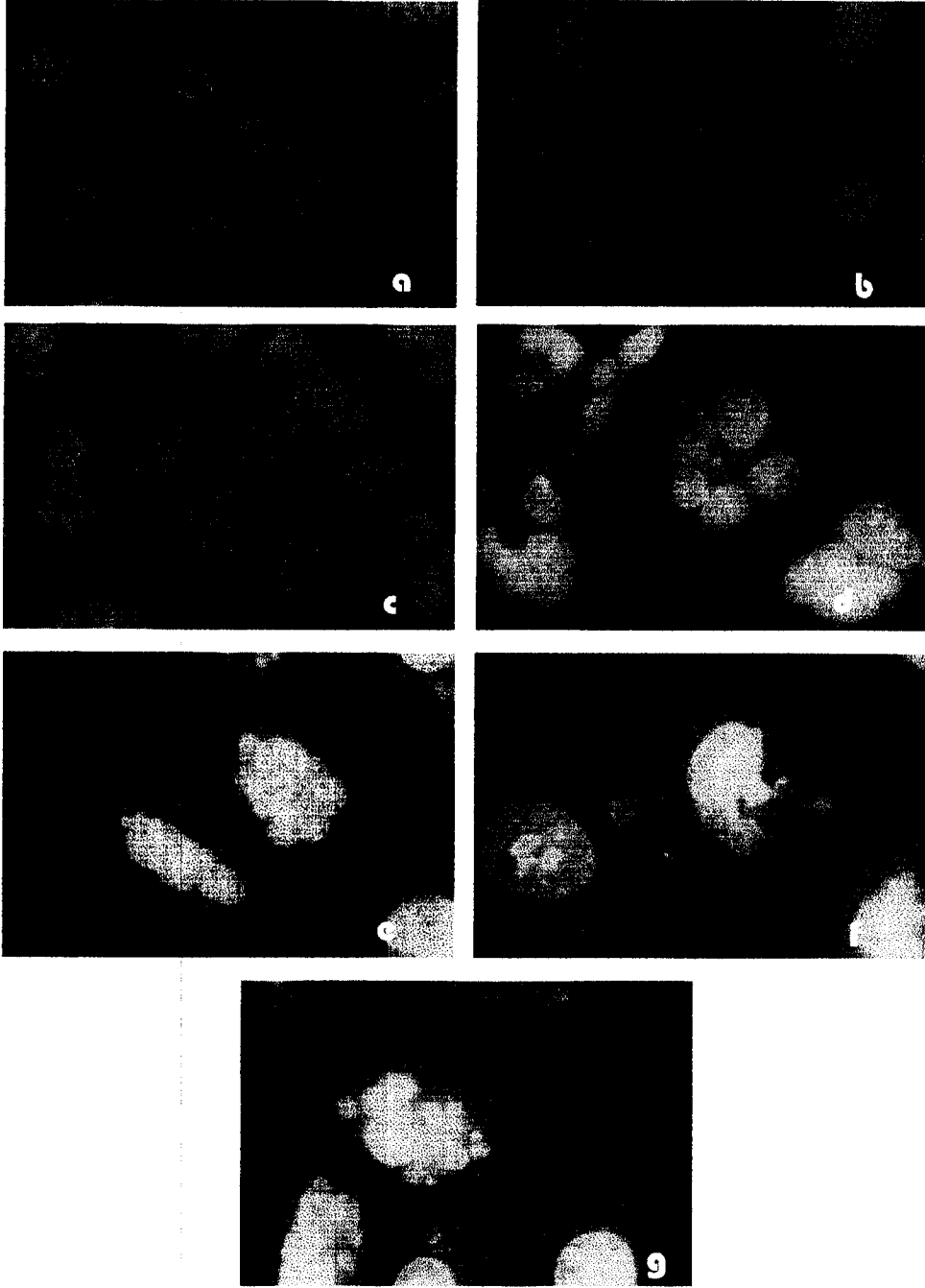


ŞEKİL 27. Paklitaksel ve SNP 100µM kombinasyonu HeLa hücreleri üzerine Nitrit konsantrasyonu ölçümü ile değerlendirilmeleri. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)

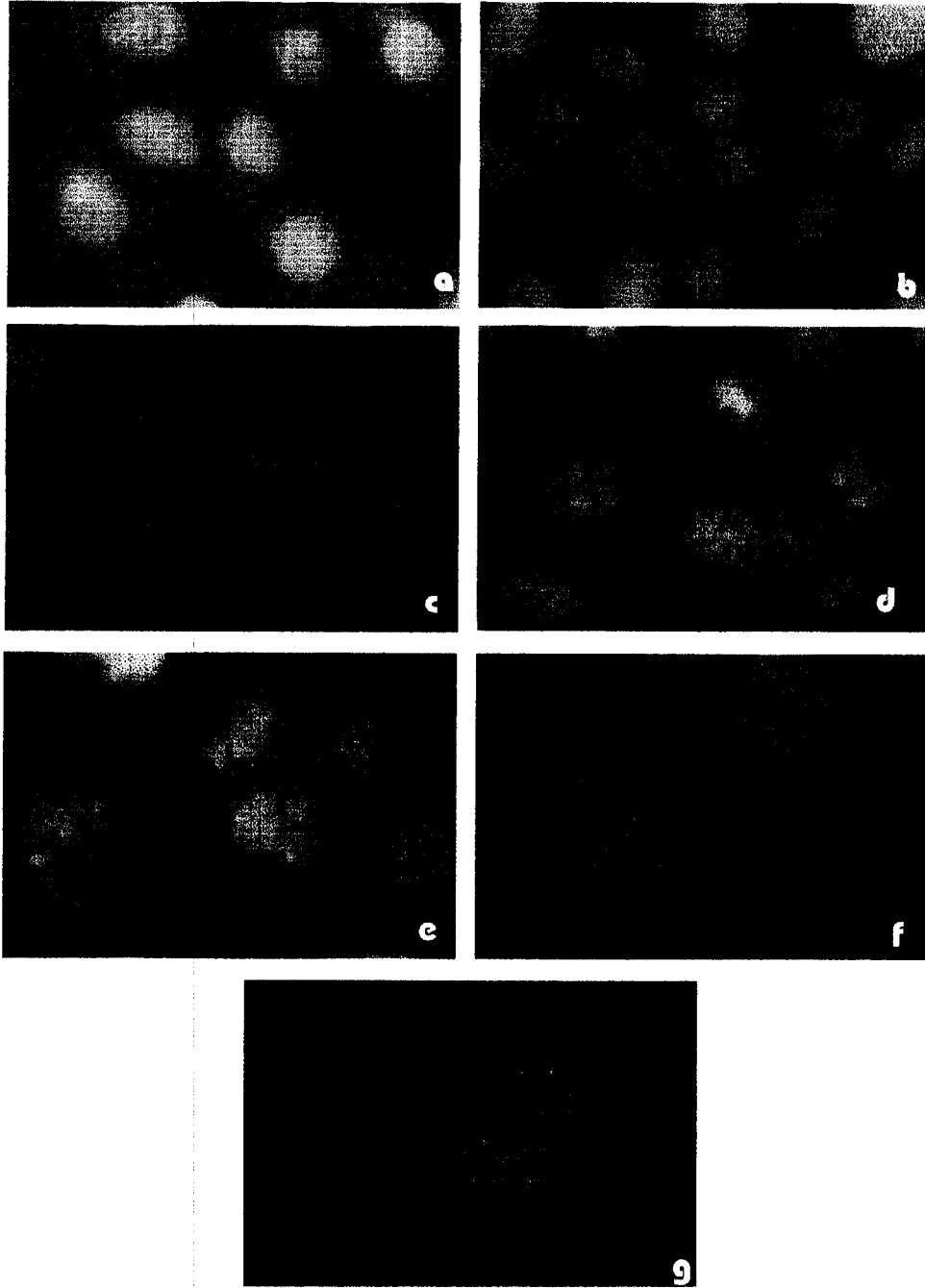
6.3.3. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonunun akridin oranj boyama sonuçları



Şekil 28. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu uygulanan NIH3T3 hücrelerin akridin oranj ile boyaması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı-RNA, Sarı-yeşil DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- SNP100 μ M, d- 0,8 nM Pac + SNP100 μ M, e- 4 nM Pac + SNP100 μ M, f-20 nM Pac + SNP100 μ M, g- 100 nM Pac + SNP100 μ M. (1cm = 62,5 μ m, büyütme 1600X)



Şekil 29. Paklitaksel ve SNP 100µM kombinasyonu uygulanan A549 hücrelerin akridin oranj ile boyaması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı-RNA, Sarı-yeşil DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- SNP100µM, d- 0,8 nM Pac + SNP100µM, e- 4 nM Pac + SNP100µM, f-20 nM Pac + SNP100µM, g- 100 nM Pac + SNP100µM. (1cm = 62,5 µm, büyütme 1600X)



Şekil 30. Paklitaksel ve SNP 100 μ M kombinasyonu uygulanan HeLa hücrelerin akridin oranj ile boyaması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı-RNA, Sarı-yeşil DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- SNP100 μ M, d- 0,8 nM Pac + SNP100 μ M, e- 4 nM Pac + SNP100 μ M, f-20 nM Pac + SNP100 μ M, g- 100 nM Pac + SNP100 μ M. (1cm = 62,5 μ m, büyütme 1600X)

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

7.1. SONUÇLAR

7.1.1. Paklitaksel Sonuçları

7.1.1.1. Paklitakselin MTT Ölçüm Sonuçları

Paklitaksel hücrelerden elde edilen MTT sonuçlarına göre NIH3T3 hücrelerinde 100nM'lik konsantrasyon haricinde üçüncü günde ikinci güne nazaren etki düşüşü görünmektedir, dördüncü günde ise etki tekrar artmaktadır. 100nM paklitaksel uygulanması ile etki üçüncü güne kadar artarak maksimuma ulaşmaktadır, dördüncü günde ise artık üçüncü günün grafiğine benzeyen grafik alınmaktadır (Şekil 1). A549 hücrelerinde maksimum yanıt üçüncü günde gözükmektedir ve dördüncü gün etki azalışı gözükmektedir (Şekil 2). HeLa hücrelerinde 0,8-4nM konsantrasyonlarda 4nM'ın üçüncü günde gösterdiği etki haricinde etkisizdir, 20-100nM konsantrasyonlarda ise ilk günden itibaren başlayıp dördüncü güne kadar etki devam etmektedir. Bu hücrelerde metabolizma ve proliferasyon paklitakselin konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağımlı olarak azaldığı gözlenmektedir (Şekil 3).

7.1.1.2. Paklitakselin Nitrit Ölçüm Sonuçları

Paklitaksel uygulanmış NIH3T3 hücrelerinde birinci ve ikinci günde konsantrasyondan bağımsız şekilde nitrit konsantrasyonunda düşüş gözlenmektedir, üçüncü ve dördüncü günlerde ise değişiklikler istatistiksel açıdan anlamsızdır (Şekil 4). Nitrit konsantrasyonu, canlı kalmış hücre yüzdesine oranlandığında konsantrasyona bağımlı nitrit artışı gözükmektedir (Şekil 5). 0,8-20nM paklitaksel uygulanan A549 hücrelerinde üçüncü günde nitrit konsantrasyonunda azalma görünmektedir, ancak diğer doz nitrit konsantrasyonunda anlamlı değişikliğe neden olmamaktadır (Şekil 6). Nitrit konsantrasyonu, canlı kalmış hücre yüzdesine oranlandığında 20-100 nM paklitaksel uygulanan hücrelerde nitrit konsantrasyonunda bir artış gözlenmektedir (Şakil, 7). Paklitaksel'in 0,8-100 nM konsantrasyonları uygulanan HeLa

hücrelerinde nitrit konsantrasyonu üzerindeki etki konsantrasyondan bağımsız olarak gözlenmektedir (Şekil 8). Nitrit konsantrasyonu, canlı kalmış hücre yüzdesine oranlandığında birinci günde nitrit konsantrasyonunda düşme görülmektedir, 20-100nM paklitaksel konsantrasyonu uygulanan hücrelerde ikinci günden itibaren konsantrasyona bağımlı biçimde salıverilen nitrit konsantrasyonunda artış gözlenmektedir (Şekil 9).

7.1.1.3. Paklitakselin Akridin Oranj Boyama Sonuçları

1) NIH3T3 hücreleri (Şekil 10)

Kontrol: Hücreler sağlıklı, çekirdekler tek, hücre kenarları belirgin.

DMSO: Hücreler arası uzantılar kısalmış.

Pac 0,8nM: Az sayıda vakül, mikronükleus ve apoptotik cisimcikler içeren hücreler görülmüştür.

Pac 4nM: Hücre sayısı azalmış ve büyümüş, apoptotik cisimcikler mevcuttur.

Pac 20nM: Hücreler tümü apoptotik cisimcikler çok sayıda içermektedir. Hücreler büyümüş ve kenarları kalkmıştır.

Pac 100nM: Hücre kenarları düzensiz, vaküller büyük ve çok sayıda.

2) A549 hücreleri (Şekil 11)

Kontrol: Hücreler sağlıklı, çekirdekler tek.

DMSO: Hücreler sağlıklı, çekirdekler tek.

Pac 0,8nM: Hücrelerin çekirdekleri bölünmek üzere iken görüntüsü mevcut, bazı çekirdekler parçalı.

Pac 4nM: Sitoplazma sınırları belirgin değil, apoptotik cisimcikler çok sayıdadır.

Pac 20nM: RNA sentezi çok azalmış, apoptotik cisimcikler çok sayıda, hücrelerin bazıları uzamıştır.

Pac 100nM: Hücreler azalmış, büyümüş ve vakül içermektedir. RNA sentezi görünmemektedir.

3) HeLa hücreleri (Şekil 12)

Kontrol: Hücreler kalabalık, çekirdekler parçalanmamıştır.

DMSO: Hücreler arası uzantılar kısalmıştır.

Pac 0,8nM: Çekirdekler bazıları ikili veya üçlü, RNA sentezi mevcuttur.

Pac 4nM: Hücreler çok sayıda apoptotik cisimcikler içermektedir, Sitoplazma kenarları belirgin değildir.

Pac 20nM: Sitoplazma niteliği kaybetmiş, çekirdekler parçalanarak apoptotik cisimcikler oluşturmuştur.

Pac 100nM: Hücreler çok azalmış, çekirdekler ikili veya üçlü, hücre hacminde bir az büyüme vardır.

7.1.2. Paklitaksel ve SNP 20 µM Kombinasyonu Sonuçları

7.1.2.1. Paklitaksel ve SNP 20µM Kombinasyonunun MTT Ölçüm Sonuçları

Paklitaksel ile SNP 20µM kombinasyonu uygulanan NIH3T3 hücrelerinde maksimum cevap üçüncü ve dördüncü günlerde Pac 4nM + SNP 20µM kombinasyonu ile gözükmektedir. SNP 20µM tek başında uygulandığında etkisi ikinci günden başlayarak dördüncü güne artarak devam etmektedir. Sonuç olarak bu kombinasyon ile NIH3T3 hücreleri üzerinde hem sinerjistik etki oluşmakta hem de etki uzaması sağlamaktadır (Şekil 13). A549 hücrelerinde Pac 100nM + SNP 20µM kombinasyonu dışındaki konsantrasyonlar maksimum cevapları ikinci günde ortaya çıkarmaktadır, Pac 100nM + SNP 20 µM kombinasyonu ile ise dört gün boyunca hemen hemen aynı cevap görülmektedir. Burada kombinasyon, etki şiddetini arttırmazken etki süresini uzatmaktadır (Şekil 14). Kombinasyonun HeLa hücreleri üzerinde sağladığı etki paklitakselinkinden daha fazladır, ancak dördüncü günde kombinasyonun etkisi azalarak paklitaksel etkisine benzemektedir. Burada kombinasyon etki süresinde uzama sağlamazken etkinin şiddetini arttırmaktadır (Şekil 15).

7.1.2.2. Paklitaksel ve SNP 20µM Kombinasyonunun Nitrit Ölçüm Sonuçları

Paklitaksel ile SNP 20µM kombinasyonu uygulanan NIH3T3 (Şekil 16), A549 (Şekil 17) ve HeLa (Şekil 18) hücrelerinde nitrit konsantrasyonunda zamana bağlı artışlar gözükmektedir. A549 hücrelerinde kombinasyonun orta dozları, SNP 20 µM neden olduğu nitrit artışına nazaren daha düşük artışa neden olmaktadır (Şekil, 17). Buna benzer biçimde, NIH3T3 hücrelerinde birinci günde tüm

kombine konsantrasyonlarda gözükmele beraber, diğer günlerde düşüş orta dozlarda gözükmele (Şekil 16). HeLa hücrelerinde ise sadece birinci ve dördüncü günde 4-20 nM paklitaksel dozları ile kombine edilmiş 20µM SNP konsantrasyonu ile elde edilene benzeyen bir cevap gözlenmektedir, ikinci günde önemli değişiklik olmazken üçüncü günde SNP'li kontrol grubuna nazaren artış gözlenmektedir (Şekil 18).

7.1.2.3. Paklitaksel ve SNP 20µM Kombinasyonunun Akridin Oranj Boyama Sonuçları

1) NIH3T3 hücreleri (Şekil, 19)

Kontrol: Hücreler sağlıklı, çekirdekler tek, hücre kenarları belirgin.

DMSO: Hücreler arası uzantılar kısalmış.

SNP 20µM: Hücrelerin durumu iyi.

Pac 0,8nM+SNP20: Hücreler çoğu iç şeklidir.

Pac 4nM+SNP 20µM: Hücreler büyük ve iç şeklinde, hücreler fazla sayıda vakuol içermektedir.

Pac 20nM+SNP 20µM: Sitoplazma kötü durumda, hücre kenarları belirgin değil, apoptotik cisimcikler çok sayıdadır.

Pac 100nM+SNP 20µM: Çekirdek fragmentasyonu ve vakuoller artmıştır.

2) A549 hücreleri (Şekil, 20)

Kontrol: Hücreler sağlıklı, çekirdekler tek.

DMSO: Hücreler sağlıklı, çekirdekler tek.

SNP 20µM: Çekirdekler sağlam. Hücreler kontrol grubuna benzemektedir.

Pac 0,8nM+SNP 20µM: Çekirdeler parlak ve çoğu parçalanarak apoptotik cisimcikler oluşturmuştur.

Pac 4nM+SNP 20µM: Hücre içindeki apoptotik cisimcikler parlak ve sayısı artmıştır.

Pac 20nM+SNP 20µM: Hücre hacminde biraz artış vardır, apoptotik cisimcikler mevcut ve çok parlaktır.

Pac 100nM+SNP 20µM: RNA sentezi azalmış, apoptotik cisimciklerin görüntüsü mevcut ve çok parlaktır.

3) HeLa hücreleri (Şekil, 21)

Kontrol: Hücreler kalabalık, çekirdekler parçalanmamıştır.

DMSO: Hücreler arası uzantılar kısalmıştır.

SNP 20 μ M: Sitoplazma iyice bozulmuş ve dağılmıştır, çekirdekler tek ve çok parlaktır.

Pac 0,8nM+SNP 20 μ M: Çekirdekler ikili veya üçlü, prometafaz ve metafaz görüntüsü mevcuttur.

Pac 4nM+SNP 20 μ M: Hücre kenarları belirgin değil, apoptotik cisimcikler tüm hücrelerde ve çok sayıda bulunmaktadır.

Pac 20nM+SNP 20 μ M: Hücrelerin sayısı çok azalmış ve büyük vakuoller içermektedir, hücre hacmi büyümüş ve apoptotik cisimcikler içermektedir.

Pac 100nM+SNP 20 μ M: Sitoplazma sınırları belirgin değil, hücre hacmi büyümüş ve apoptotik cisimcikler içermektedir.

7.1.3. Paklitaksel ve SNP 100 μ M Kombinasyonu Sonuçları

7.1.3.1. Paklitaksel ve SNP 100 μ M Kombinasyonunun MTT Ölçüm Sonuçları

SNP ile kombine edilmiş 0,8-100 nM paklitaksel konsantrasyon aralığı ile üçüncü günde maksimum cevap alınmaktadır. Dördüncü günde cevap ise, üçüncü güne benzemektedir (Şekil 22). Kombinasyonun A549 hücrelerinde üçüncü günde gösterdiği etki paklitakselin 20nM'lık konsantrasyonunun gösterdiği cevaba benzemektedir. Paklitaksel'in 100nM'lık konsantrasyonu ise üçüncü günde kombinasyondan etkilidir, dördüncü günde ise kombine etki paklitakselden fazladır. Burada kombinasyon etki şiddetinde artış sağlamazken, etki süresini uzatmaktadır (Şekil 23). HeLa hücrelerinde ise kombinasyon, tek başına paklitakselden daha etkili gözükmemektedir (Şekil 24).

7.1.3.2. Paklitaksel ve SNP 100µM Kombinasyonunun Nitrit Ölçüm Sonuçları

Kombinasyon veya tek başına SNP 100µM uygulanan NIH3T3 hücrelerinin salıverdiği nitrit konsantrasyonunda zamana bağımlı biçimde artma gözükmemektedir. Kombinasyon orta dozları ikinci günden itibaren SNP 100µM kontrol grubuna nazaren daha düşük nitrit konsantrasyonu oluşturmaktadır (Şekil 25). A549 hücreleri ise NIH3T3 hücrelerin cevabına benzeyen cevaplar vermektedir (Şekil, 26). Kombinasyonun ilk üç dozu uygulanan HeLa hücrelerinden salıverilen nitrit konsantrasyonu, SNP 100µM kontrol grubuna göre konsantrasyona bağımlı düşüş göstermektedir. Kombinasyonun dördüncü konsantrasyonunda ise azalmadaki fark zamanla kapanarak dördüncü günde SNP 100 µM kontrol grubuna benzemektedir (Şekil 27).

7.1.3.3. Paklitaksel ve SNP 100µM Kombinasyonunun Akridin Oranj Boyama Sonuçları

1) NIH3T3 hücreleri (Şekil 28)

Kontrol: Hücreler sağlıklı, çekirdekler tek, hücre kenarları belirgin.

DMSO: Hücreler arası uzantılar kısalmış.

SNP 100 µM: Hücrelerde belirgin azalma vardır.

Pac 0,8nM +SNP 100 µM: Sitoplazma dağılmış, çekirdekler parlak ve tek.

Pac 4nM +SNP 100 µM: Sitoplazma dağılmış, apoptotik cisimcikler oluşmuştur.

Pac 20nM +SNP 100 µM: Mikronükleus ve apoptotik cisimcikler oluşmuştur.

Pac 100nM +SNP 100 µM: Hücre kenarları belirgin değil vaküller büyük ve fazla sayıda, apoptotik cisimcikler oluşmuştur.

2) A549 hücreleri (Şekil 29)

Kontrol: Hücreler sağlıklı, çekirdekler tek.

DMSO: Hücreler sağlıklı, çekirdekler tek.

SNP 100 µM: Hücre sınırları belirgin değil.

Pac 0,8nM +SNP 100 µM: Hücre sınırları belirgin değil, apoptotik cisimcikler oluşmuştur.

Pac 4nM +SNP 100 µM: Apoptotik cisimcikler çok sayıda ve parlaktır.

Pac 20nM +SNP 100 µM: Parçalanmış çekirdek sayısı azalmış, bazı hücrelerde vakül oluşmuştur.

Pac 100nM +SNP 100 µM: Hücreler tümünde apoptotik cisimcikler oluşmuştur, apoptotik cisimcikler parlaktır.

3) HeLa hücreleri (Şekil, 30)

Kontrol: Hücreler kalabalık, çekirdekler parçalanmamıştır.

DMSO: Hücreler arası uzantılar kısalmıştır.

SNP 100 µM: Hücre kenarları belirgin değil, nükleus normal görünmektedir.

Pac 0,8nM +SNP 100 µM: pro-metafaz ve metafazda kalan hücreler görünür, bazı hücrelerde apoptotik cisimcikler oluşmuştur.

Pac 4nM +SNP 100 µM: apoptotik cisimcikler oluşmuştur, hücre sınırları belirgin değildir.

Pac 20nM +SNP 100 µM: sitoplazma dağılmıştır, apoptotik cisimcikler çok sayıda oluşmuştur.

Pac 100nM +SNP 100 µM: apoptotik cisimcikler oluşmuştur ve bazılar dağılmıştır, hücreler büyümüş ve vaküller oluşmuştur, Sitoplazma niteliği kaybetmiştir.

7.2. TARTIŞMA

Paklitaksel ile sodyum nitroprussid'in yaygın bazı kanser hücreleri (HeLa ve A549) üzerindeki kombine etkilerini normal (sağlıklı) hücreler olan NIH3T3 ile karşılaştırmalı olarak araştırmayı amaçlayan bu tez kapsamında elde edilen bulgular, sözkonusu kombinasyonun klinik uygulamalar için yararlı olabileceğine ilişkin bazı ipuçları vermektedir. Paklitaksel son yıllarda antineoplastik tedavi amacıyla özellikle rahim, over ve metastatik meme kanseri olgularında yaygın biçimde kullanılan bir ilaçtır (Runowicz ve ark., 1993). Sodyum nitroprussid ise NO donörü özelliği taşıyan antihipertansif etkili bir bileşiktir ve esas olarak hipertansif kriz tedavisinde kullanılmaktadır (Ülker, 2000).

Literatürde hem NO kanser ilişkisini araştıran (Kolb, 2000; Lamas ve ark., 1998; Martin ve ark., 1999) hem de paklitaksel'in normal ve neoplastik hücrelerdeki NO yapımı üzerine etkilerini irdeleyen (Al-alamı ve ark., 1998; Mullins ve ark., 1997; Su ve ark., 2002) çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Paklitaksel'in neoplastik hücrelerdeki NO yapımı üzerine etkisini araştıran tek çalışma ise Al-alamı ve ark. (1998) tarafından gerçekleştirilmiş ve bu maddenin kültürlenmiş insan lösemi hücrelerinde (MHH225 CD34⁺ ve U937 CD34⁺) NO yapımını arttırdığı saptanmıştır. Laboratuvarımızda yapılan bir diğer çalışmada da paklitaksel'in insan C6 *glioblastoma multiforma* hücrelerinde NO düzeylerini değiştirdiği gösterilmiştir (Abdallah ve ark., 2003). Dolayısıyla, paklitaksel'in tümör hücrelerindeki NO yapımı üzerine etkilerinin az sayıda araştırmaya konu olduğunu belirtmek yanlış olmayacaktır. Bu tez çalışmasında, paklitaksel'in HeLa over tümörü ve A549 akciğer kanseri hücrelerinde NO yapımını arttırdığı sonucu ilk kez tarafımızdan gözlenmiştir. Bilinen bir NO donörü olan SNP test ettiğimiz bütün kültür hücrelerinin medyumlarındaki nitrit konsantrasyonlarını arttırmıştır. Tahminlerimizle uyumlu olan bu gözlem, kültür ortamlarındaki NO salınımını doğrulamaktadır.

Teorik beklentilerimiz doğrultusunda, paklitaksel'in hem kanser hücreleri olan HeLa ve A549 hem de normal hücreler olan NIH3T3 üzerinde apoptotik, sitostatik ve sitotoksik etkilerini gözlemledik. Paklitaksel'in mikotübül fonksiyonlarını bozucu özellikleri nedeniyle ortaya çıkan bu etkiler literatür verileri ile tam bir uyum göstermektedir.(Runowicz ve ark., 1993; Das ve ark., 2001; Korkmaz, 2002). Paklitaksel'in A549 hücrelerindeki apoptotik, sitostatik ve sitotoksik etkileri ise daha önceki çalışmalar ile rapor edilmiştir ve bunların sonuçları da tezin deneysel verileri ile uyumludur (Das ve ark., 2001; Korkmaz, 2002)

Nitrikoksit donörlerinin, bu arada SNP'in çeşitli normal ve neoplastik hücrelerde apoptotik (Takuma, 2002; Hajri ve ark., 1998), sitostatik (Kim, 1997), sitotoksik (Takuma, 2002; Tamir ve Tannenbaum, 1996) ve antimetastatik (Fidler, 1990; Xie ve ark., 1998; Xie ve ark., 1996) etkilerini gösteren çok sayıda

araştırma daha önce çeşitli araştırma grupları tarafından gerçekleştirilmiştir. Ancak, ne HeLa ne de A549 hücrelerinde SNP'in bu tür etkileri daha önce başka bir araştırmacı tarafından incelenmemiştir. İlk kez bu tez deneyleri çerçevesinde elde edilen bulgular ile her iki hücre tipinde de, zamansal farklılıklar göstermesine karşın, SNP'in apoptik ve antiproliferatif etkileri saptanmıştır.

Paklitaksel ile SNP kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkileri bu tezin en ilginç bulguları olarak karşımıza çıkmaktadır. Paklitaksel ile NO veya NO donörlerinin apoptozis ve hücre proliferasyonu bağlamında etkileşimini araştıran ve daha önceden gerçekleştirilmiş tek bir araştırma mevcuttur. Buna göre, NO'in nöronlardaki apoptotik etkisi paklitaksel ile kimen önlenmektedir (Nicotara ve ark., 1995). Ancak, tümör hücrelerinde bu tür bir etkileşim daha önce hiç araştırılmamıştır. İlk kez bu tez kapsamında kanser hücreleri üzerinde araştırılan paklitaksel ve SNP kombinasyonu bize bir ölçüde çarpıcı bulgular sağlamıştır. Buna göre SNP, ya etki süresinin uzaması ya da etki şiddetinin artması tarzında paklitakselin antineoplastik etkisini potansiyalize etmektedir. Bu gözlem, paklitaksel'in klinik kullanımı açısından yarar sağlayabilecek niteliktedir, çünkü bu etkileşim sayesinde paklitaksel'in antineoplastik dozu düşürülebilecek ve böylece "yan etkiler" bir ölçüde de olsa azaltılabilecektir. Olası diğer bir yarar ise, tümör hücrelerinin klinikte uygulanan paklitaksel yüksek dozuna karşı geliştirebileceği "rezistans olgusunun" bu tür bir kombinasyon sayesinde önlenmesidir, çünkü kombinasyon ile belki de paklitaksel antineoplastik tedavi dozu düşürülebilecektir. Burada, paklitaksel ve SNP kombinasyonu ile ilgili olası tek sakınca, SNP'in oluşturacağı hipotansif etkidir, çünkü deneylerimizde kullandığımız SNP konsantrasyonları *in vitro* deneylerde vazodilatasyon konsantrasyonlardan daha yüksektir (Karimi ve ark., 2002; Fujimoto ve ark., 2003).

Sonuç olarak, bulgularımız en azından sodyum nitroprussidin antineoplastik tedaviye yardımcı bir ajan olarak katılabileceğini ve bazı klinik yararlarının olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu konuda daha kesin bir yargıya varabilmek için daha detaylı araştırmalara gereksinim vardır.

8. KAYNAKLAR

ABAL, M., SOUTO, A.A., ARNAT-GUERRI, F., ACUÑA, A.U., ANDREU, J.M. and BARASCOIN, I.: Centrosome and spindle pole microtubules are main targets of a fluorescent taxoid inducing cell death. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 49 : 1-15, 2001.

ABDALLAH, Q.M.A., KORKMAZ, S., ÖZTÜRK. Y.: C6 glioma hücre kültürlerinde paklitakselin proliferasyon ve nitrik oksit sentezi üzerine etkileri. XV. Ulusalkanser kongresi; Kemer Antalya. 23-27 Nisan 2003.

ALALAMI, O., MARTIN, J.H.J.: ZR-75-1 human breast cancer cells: expression of inducible nitric oxide synthase and effect of tamoxifen and phorbol ester on nitric oxide production. *Cancer Letters* 123: 99-105, 1998.

AL-ALAMI, O., SAMMONS, J., MARTIN, J.H. and HASSAN, H.T.: Divergent effect of taxol on proliferation, apoptosis and nitric oxide production in MHH225 CD34 positive and U937 CD34 negative human leukaemia cells. *Leukaemia Research* 22 : 939 –945, 1998.

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.: *Essential Cell Biology*. Garland Publishing Inc., New York, 1998.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 2002.

ALLEY, M.C., SCUDIERO, D.A., MONKS, A., HURSEY, M.L., CZERWINSKI, M.J., FINE, D.L., ABBOTTU B.J., MAYO, J.G., SHOEMAKER, R.H. and BOYD, M. R.: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48: 589-601, 1988.

ANDERSSON, P., GOLDFARB, M.P. and WEINBERG, R.A.: A defined subgenomic fragment of in vitro synthesized Moloney sarcoma virus DNA can induce cell transformation upon transfection. *Cell* 16: 63-75, 1979.

ANONİM: AMERICAN TYPE OF CELL CULTURE (ATCC): <http://atcc.org>, 2002.

AUGUSTIN, H.G.: Antiangiogenic tumor therapy: will it work?. *Trends in Pharmacological Sciences* 19: 216- 222, 1998.

BALDÌ, A., BOCCIA, V., CLAUDÌO, P.P., DE LUCA, A. and GIORDANO, A.: Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 4629-4632, 1996.

BALINT, E., VOUSDEN, K.: Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *British Journal of Cancer* 85: 1813-1823, 2001.

BAŞARAN, A. (Ed): *Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı*. S: 181-270, Güneş ve Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002

BOSHART, M., GISSMANN, L., IKENBERG, H., KLEINHEINZ, A., SCHEURLEN, W. and ZUR HAUSEN, H.: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO Journal* 3: 1151-1157, 1984.

BOYD, C.S., CANDERAS, E.: Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biological Chemistry* 383: 411-423, 2002.

BOZKURT, A.: Antineoplastik ilaçlar. S: 625-640, *Farmakoloji Ders Kitabı*. Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ, Melli, M. (Edt.), Gazi Kitabevi, Ankara, 2000.

BRATTON, S.B. and COHEN, G.M.: Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego?. *Trends in Pharmacological Sciences* 22: 306-315, 2001.

BROXTERMAN, H.J., LANKELMA, J., HOEKMAN, K.: Resistance to cytotoxic and anti-angiogenic anticancer agents: similarities and differences. *Drug Resistance Updates* 2003, (Baskıda).

BRUDER, J.T. and KOVESDI, I.: Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signaling pathway and induces interleukin-8 expression. *Journal Virology* 71:398-404, 1997.

CARMICHAEL, J., DEGRAFF, W., GAZDAR, MINNA, J.D., MITCHELL, J.B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47: 936-942, 1987.

CELIS, J.E.: *Cell Biology. A Laboratory Handbook*. Vol I, S: 264-267, 453, Vol III, S: 17, San Diego, Academic Press, 1998.

CHANG, K. and PASTAN, I.: Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and over cancers. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 136-140, 1996.

CHARLES, A.G., HAN, T.Y., LIU, Y.Y., HANSEN, N., GIULIANO, A.E. and CABOT, M.C.: Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47: 444-450, 2001.

CHEN, T.R.: Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 48: 19-24, 1988.

DAS, G.C., HOLIDAY, D., GALLARDO, R. and HAAS, C.: Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of

different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Letters* 165: 147-153, 2001.

DAY, B.W.: Mutants yield a pharmacophore model for the tubulin-paclitaxel binding site. *Trends in Pharmacological Sciences* 21: 321-323, 2000.

DELARUE, F.L., TAYLOR, B.S. and SEBTI, S.M.: Ras and RhoA suppress whereas RhoB enhances cytokine-induced transcription of nitric oxide synthase-2 in human normal liver AKN-1 cells and lung cancer A-549 cells. *Oncogene* 20: 6531-7, 2001.

DENIZOT, F. and LANG, R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89: 271-277, 1986.

DUFFY, M.J.: Cancer Metastasis: Biological and Clinical Aspects. *Irish Journal of Medical Science* 167: 4-8, 1998.

ESTEVEZ, A.G., JORDAN, J.: Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Annals New York Academy of Science* 962: 207-211, 2002.

EVDOKIOU, A. and COWLED, P.A.: Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *International Journal of Cancer* 75: 568-77, 1998.

FIDLER, I.J.: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: Twenty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Research* 50: 6130-6138, 1990.

FRANKS, L.M.: What is cancer? *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Editor: Franks, L.M., Teich, N.M., sayfa:1-19, Oxford University Press, Oxford, 1998.

FUJIMOTO, S., MORI, M. and TSUSHIMA, H.: Mechanisms underlying the hydrogen peroxide-induced, endothelium-independent relaxation of the norepinephrine-contraction in guinea-pig aorta *European Journal of Pharmacology* 459: 65–73, 2003.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L., WISHNOK, J. S. and TANNENBAUM, S.R: Analysis of nitrate, nitrite, [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126: 131-138, 1982.

GREENLEE, R.T., HILL-HARMON M.B., MURRAY, T., THUN, M.: Cancer statistic. *CA Cancer Journal for Clinicians* 51; 15-36, 2001.

GRIFFIOEN, A.W. and MOLEMA, G.: Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, Cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews* 52: 237-268, 2000.

GUARINO, M.J., SCHNEIDER, C.J., GRUBBS, S.S., BIGGS, D.D., HIMELSTEIN, A.L., HOGABOOM, K., TILAK, S.: Adose-escalation study of weekly topotecan, cisplatin, and gemcitabine front-line therapy in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *The Oncologist* 7: 509-515, 2002.

HAJRI, A., METZGER, E., VALLAT, F., COFFY, S., FLATTER, E., EVRARD, S., MARASCAUX, J. and ABRAHAMIAN, M.: Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: in vivo and in vitro studies. *British Journal of Cancer* 78: 841-849, 1998.

HALDER, S., CHINTAPAPPLI, J. and CROCE, C.: Taxol induced bcl-2 phosphorylation and death of prostat cancer cells. *Cancer Research* 56: 1253-1255, 1996.

HOLST-HANSEN, C. and BRÜNNER, N.: MTT cell proliferation assay. *Cell Biology. A Laboratory Handbook*. Edt: Celis, J.E., pp: 16-18, Academic press, San Diego, 1998.

HORAKOVA, K., SOVCIKOVA, A., SEEMANNOVA, Z., SYROVA, D., BUSANYOVA, K., DROBNA, Z. and FERENCIK, M.: Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 30: 650-664, 2001.

HUANG, Y., RAY, S., REED, J.C., IBRADO, A.M., TANG, C., NAWABI, A. and BHALLA, K.: Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 42: 73-81, 1997.

JAIN, R.K., FUKUMURA, D.: Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculations in tumour. *Cancer and Metastasis Reviews* 17: 77-89, 1998.

JAINCHILL, J.L., AARONSON, S.A. and TODARO, G.J.: Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *Journal of Virology* 4: 549-553, 1969.

JANG, S.I., STEINERT, P.M. and MARKOVA, N.G.: Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene.: *Journal of Biological Chemistry* 271: 24105-24114, 1996.

JORDAN, M.A., WENDELL, K., GARDINER, S., DERRY, W.B., COPP, H. and WILSON, L.: Mitotik block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research* 56: 816-825, 1996.

Anadolu Üniversitesi
Mikrobiyoloji

JUNQUEIRA, L.C., CAREIRO, J., KELLEY, R.O. (edt.): *Temel Histoloji*, (çeviri) 30-78, Barış kitap evi, İstanbul, 1993.

KARIMI, G., KHOSHBATEN, A., ABDOLLAHI, M., SHARIFZADEH, M., NAMIRANIAN K. and DEHPOUR, A.R.: Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacological Research* 46:31-37, 2002.

KARP, G.: *Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments*. John Wiley & Sons Inc., New York, 1999.

KASTEN, F.H.: *Staining Procedures*. Edt: Clark, G., Chapter 3 Methods for fluorescence microscopy, S: 57-58, Williams & Wilkins, 1981.

KAYAALP, S.O.: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Sayfa: 376-411, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 2002.

KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-257, 1972.

KIECHLE, F.L., ZHANG, X.: Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta* 326: 27-45, 2002.

KIM, H.-M.: Nitric oxide released from Swiss 3T3 fibroblasts acts as a cytostatic agent for cultured mast cells. *Pharmacology* 55: 285-291, 1997.

KIM, P.K.M., KWON, Y.G., CHUNG, H.T., KIM, Y.M.: Regulation of Caspases by nitric oxide. *Annals New York Academy of Science* 962: 42-52, 2002.

KIM, P.K.M., ZAMORA, R., PETROSKO, P., BILLIAR, T.R.: The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *International Immunopharmacology* 1: 1421-1441, 2001.

KINLOCH, R.A., TREHERNE, J.M., FURNESS, L.M., HAJIMOHAMADREZA, I.: The pharmacology of apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 35-42, 1999.

KOLB, J.P.: mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia. *Leukemia* 14: 1685-1694, 2000.

KORKMAZ, S.: Paklitaksel, kersetin ve berberinin A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Doktora Tezi, Eskişehir, Ekim 2002.

KOUMENİS, C. and GIACCIA, A.: Transformed cells require continuous activity of RNA polymerase II to resist oncogene-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 17: 7306-7316, 1997.

KUENG, W., SILBER, E., EPPENBERGER, U.: Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry* 182: 16-19, 1989.

KUMAR, V., COTRAN, R.S., ROBBINS, S.L.(ed.): *Basic Pathology. TEMEL PATOLOJİ* 132-174 (çeviri). Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. İstanbul, 2000.

KWON, S. and GEORGE, S.C.: Synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide* 3: 348-357, 1999.

LALA, P.K., CHAKRABORTY, C.: Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *The Lancet Oncology* 2: 149-156, 2001.

LAMAS, L., PEREZ-SALA, D., MONCADA, S.: Nitric oxide: from discovery to the clinic. *Trends in Pharmacological Sciences* 19:436-438, 1998.

LANE, D., LAIN, S.: Therapeutic exploitation of the p53 pathway. *Trends in Molecular Medicine* 8: 38-42, 2002.

LEE, J.H., JANG, S.I., YANG, J.M., MARKOVA, N.G. and STEINERT, P.M.: The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene. Stratified squamous epithelial-specific expression in cultured cells is mediated by binding of Sp1 and ets transcription factors to a proximal promoter element. *Journal of Biological Chemistry* 271: 4561-4568, 1996.

LEWIS, J.A., HUQ, A., NAJARRO, P.: Inhibition of mitochondrial function by interferon. *Journal of Biological Chemistry* 271: 13184-13190, 1996.

LIEBMANN, J., COOK, L.A., FISHER, J. AND ALL.: Changes in radiation survival curve parameters in human tumour and rodent cells exposed to paclitaxel (TAXOL[®]) *International Journal of Radiation Oncology and Biological Physics*. 29: 559-64, 1994.

LOFFLER, S., LOTTSPEICH, F., LANZA, F., AZORSA, D.O., TER MEULEN, V. and SCHNEIDER-SCHAULIES, J.: CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *Journal of Virology*; 71: 42-49, 1997.

MACVILLE, M., SCHROCK, E., PADILLA-NASH, H., KECK, C., GHADIMI, B.M., ZIMONJIC, D., POPESCU, N. and RIED, T.: Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Research* 59: 141-150, 1999.

MAKINO, K., YU, D. and HUNG, M.C.: Transcriptional upregulation and activation of p53Cdc via p34(cdc2) in Taxol-induced apoptosis. *Oncogene* 20: 2537-2543, 2001.

MARTIN, J.H.J., ALALAMI, O., VAN DEN BERG, H.W.:Reduced expression of endothelial andinducible nitric oxide synthase in a human breast cancer cell line which has acquired estrogen independence. *Cancer Letters* 144: 65-74, 1999.

MATTHEWS, N.E., ADAMS, M.A., MAXWELL, L.R., GRAHAM, G.H.: Nitric oxide-mediated regulation of cemosensitivity in cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute* 93: 1879-1985, 2001.

MILLER, V.A., KENNETH, K.Ng, KRUG, L.M., PEREZ, W., PIZZO, B., HEELAN, R.T. and KRIS, M.G.: Phase I trial of docetaxel and vinorelbine in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 88: 1045-1050, 2000.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A.: Nitric oxide:physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43: 109-134, 1991.

MOSMANN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 : 55-63, 1983.

MULLINS D.W., BURGER,C.J. and ELGERT, K.D.: Tumor growth modulates macrophage nitric oxide production following paclitaxel administration. *International Journal of Immunopharmacology* 20: 537-551, 1998.

MULLINS, D.W., ALLEVA, D.G., BURGER, C.J. and ELGERT, K.D.: Taxol, a microtubule- stabilizing antineoplastic agent, differentially regulates normal and tumor-bearing host macrophage nitric oxide production. *Immunopharmacology* 37: 63-73, 1997.

MURRAY, R.K.: Kanser, Onkojenler ve Büyüme Faktörleri. MURRAY R.K., MAYES, P.A., GRANNER D.K., RODWELL, V.W. (edt.), *Harper'in Biokimyası* 818-836 (çeviri). Barış kitap evi. İstanbul, 1993.

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane

NICHOLSON, K.M., BIBBY, M.C. and PHILLIPS, R.M.: Influence of drug exposure parameters on the activity of paclitaxel in multicellular spheroids. *European Journal of Cancer* 33:1291-1298, 1997.

NICOTERA, P., BONFOCO, E., BRÜNE, B.: Mechanism for nitric oxide-induced cell death: involvement of apoptosis. *Advances in Neuroimmunology* 5:411-420, 1995.

NICOTERA, P., BRUNE, B., BAGETTA, G.: nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis? *Trends in Pharmacological Sciences* 18: 189-190, 1997.

OKUNO, S., SHIMIZU, S., ITO, T., NOMURA, M., HAMADA, E., TSUJIMOTO, Y., MATSUDA, H.: Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *Journal of Biological Chemistry* 273: 34272-34277, 1998.

OLAH, E., CSOKAY, B., PRAJDA, N., KOTE-JARAI, Z., YEH, Y.A. and WEBER, G.: Molecular mechanisms in the antiproliferative action of taxol and tiazofurin. *Anticancer Research*. 16: 2469-2477, 1996.

PAE, H.O., YOO, J.C., CHOI, B.M., KANG, C.L., KIM, J.D. and CHUNG, H.T.: Apoptotic cell death induced by taxol is inhibited by nitric oxide in human leukemia HL-60 cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 21: 667-682, 1999.

PATEL, P., VARGHESE, E., DING, G., FAN, S., KAPASI, A., REDDY, K., FRANKI, N., NAHAR, N., SINGHAL, P.: Transforming growth factor beta induces cells apoptosis through NO- and p53-dependent and -independent pathways. *Journal of Investigate medicine* 48: 403-410, 2000.

PATER, M.M. and PATER, A.: Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145: 313-318, 1985.

PECHKOVSKY, D.V., ZISSEL, G., GOLDMANN, T., EINHAUS, M., TAUBE, C., MAGNUSSEN, H., SCHLAAK, M. and MULLER-QUERNHEIM, J.: Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 282:L684-92, 2002.

PIEPER, A.A., VERMA, A., ZHANG, J., SNYDER, S.H.: Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 171-181, 1999.

POSTE, G., FIDLER, I.J.: The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283: 139-146, 1979.

PREISLER, V.K., WÜCK, D. and STOPPER, H.: Combinaton of paclitaxel and radiation: genotoxicity *in vitro* in four mamalian cell lines. *Cancer Letters* 145: 29-33, 1999.

RAZANDI, M., PEDRAM, A. and LEVIN, E.R.: Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Molecular Endocrinology* 14: 1434-1447, 2000.

REILE, H., BIRNBOCK H., BERNHARDT, G., SPRUSS, T. and SCHONENBERGER, H.: Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture. *Analytical Biochemistry* 187: 262-267, 1990.

RISAU, W.: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997.

RUNOWICZ, C.D., WIERNIC, P.H., EINZIG, A.I., GOLDBERG, G.L. and HORWITZ, S.B.: Taxol in over cancer. *Cancer (Suppl)* 71: 1591-1596, 1993.

SALMON, S.E. and SARTORELLIA.C.: Kanser Kemoterapisi. KATZUNG, B.G., (edt.), *Temel ve Klinik Farmakoloji*. 1098-1143., (çeviri) Barış kitap evi. İstanbul 1995.

SALVUCCI, O., CARSANA, M., BERSANI, I., TRAGNI, G., ANICHINI, A.: Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells. *Cancer Research* 61: 318-326, 2001.

SAUNDERS, D.E., LAWRENCE, W.D., CHRISTENSEN, C., WAPPLER, N.L., RUAN, H. and DEPPE, G.: Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast-cancer cells. *International Journal of Cancer*. 70: 214-220, 1997.

SCHEFFNER, M., MUNGER, K., BYRNE, J.C. and HOWLEY, P.M.: The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 88: 5523-5527, 1991

SCHNEIDER-GADICKE, A. and SCHWARZ, E.: Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO Journal* 5: 2285-2292, 1986.

SCHWARZ, E., FREESE, U.K., GISSMANN, L., MAYER, W., ROGGENBUCK, B., STREMLAU, A. and ZUR HAUSEN, H.: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314: 111-114, 1985.

SENARATNE, S.G., PIRIANOV, G., MANSI, J.L., ARNETT, T.R., COLSTON, K.W.: Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer* 82: 1459-1468, 2000.

SHEPPARD, B.C., RUTTEN, M.J., MEICHSNER, C.L., BACON, K.D., LEONETTI, P.O., LAND, J., CRASS, R.C., TRUNKEY, D.D., DEVENEY, K.E.,

DEVENEY, C.W.: Effects of paclitaxel on the growth of normal, polyposis, and cancerous human colonic epithelial cells. *Cancer* 85: 1454-1464, 1999.

SHTIL, A.A., MANDELKAR, S., YU, R., WALTER, R.J., HAGEN, K., TAN, T.H., RONINSON, I.B. and KONG, .A.T.: Differential regulation of mitogen-activated protein kinasis by microtubule binding agents in human breast cancer cells. *Oncogene* 18: 377-384, 1999.

STEIN, G.S., BASERGA, R., GIORDANO, A. and DENHARDT, D.T.(ed.): *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*. Willy-Liss, Inc. A.B.D. New York, 1999.

STUDZINSKI, G.P.: Overview of apoptosis. STUDZINSKI, G.P.(ed.). *Apoptosis A practical Approach*. Oxford University Press. New York, 1999.

SU, Y., ZHARIKOV, S.I. and BLOCK, E.R.: Microtubule-active agents modify nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Physiology and Lung Cell Molecular Physiology* 282: 1183-1189, 2002.

TAKUMA, K., PHUAGPHONG, P., LEE, E., ENOMOTO, R., MORI, K., BABA, A., MATSUDA, T.: The nitric oxide donor NOC12 protects cultured astrocytes against apoptosis via a C-gmp-dependent mevhanism. *Japanease Journal of Pharmacology* 89: 64-71, 2002.

TAMIR, S., TANNENBAUM, S.R.: The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288: 31-36, 1996.

TEDONE, T., CORREALE, M., PARADISO, A. and RESHKIN, S. J.: Differential responsiveness of proliferation and cytokeratin release to stripped serum and oestrogen in the human breast cancer cell line, MCF-7. *European Journal of Cancer* 32A: 849-856, 1996.

THOMSEN, L.L., MILES, D.W.: Role of nitric oxide in tumour progressing: lesson from human tumours. *Cancer and Metastasis Reviews* 17: 107-118, 1998.

TISHLER, R.B., LAMPPU, D.M., PARK, S. and PRICE, B.D.: Micro-tubule active drugs taxol, Vinblastine, and nocodazole increases the level of transcriptionally active p53. *Cancer Research* 5: 6021-6025, 1995.

TOMITA, M., OKUYAMA, T., ISHIKAWA, T., HIDAHA, K. and NOHNO, T.: The role of nitric oxide in paraquat-induced cytotoxicity in the human A549 lung carcinoma cell line. *Free Radical Research* 34: 193-202, 2001.

TRIPATHY, D.: Neoplasia. MCPHEE, S.J., LINGAPPA, V.R., GANONG, W.F., LANGE, J.D.(edt.): *Pathophysiology of Disease*. Lange Medical Books/McGraw-Hill. A.B.D. New York, 2000.

ÜLKER, S.: Antihipertansif İlaçlar S: 393-406, *Farmakoloji Ders Kitabı*. Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ, Melli, M. (Edt.), Gazi Kitabevi, Ankara, 2000.

VOET, D., VOET, J.G.: *Biochemistry*. S: 553-554, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.

WANI, M.C., TAYLOR, H.L., WALL, M.E., COGGON, P. and MCPHAIL, A.T.: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of American Chemical Society* 93: 2325-2327, 1971.

WARD, C., DRANSFIELD, I., CHILVERS, E.R., HASLETT, C. and ROSSI, A.G.: Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 503-509, 1999.

WATERS, J.C., CHEN, R.H., MURRAY, A.W. and SALMON, E.D.: Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *Journal of Cell Biology* 141: 1181-1191, 1998.

XIE, K. and FIDLER, I.J.: Therapy of cancer metastasis by Activation of the inducible nitric oxide synthase. *Cancer and Metastasis Reviews* 17: 55-75, 1998.

XIE, K., DONG, Z. and FIDLER, I.J.: Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition of cancer metastasis. *Journal of Leukocyte Biology* 59: 797-803, 1996.

YEE, C., KRISHNAN-HEWLETT, I., BAKER, C.C., SCHLEGEL, R. and HOWLEY, P.M.: Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *American Journal of Pathology* 119: 361-366, 1985.

ZAKS-ZILBERMAN, M., ZAKS, Z. T. and VOGEL S.N.: Induction of proinflammatory and chemokine genes by lipopolysaccharide and paclitaxel (Taxol™) in murine and human breast cancer cell line. *Cytokine* 15: 156-165, 2001.

ZHAO, Z., TAN, Z., DILTZ, C.D., YOU, M. and FISCHER, E.H.: Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases *Journal of Biological Chemistry* 271: 22251-22255, 1996.

ZOBEL, A.M. and SCHELLENBERGER, S.E.: Paclitaxel in combination with coumarin as a potentially effective anticancer agent. *Pharmaceutical Biology* 38: 192-196, 2000.