

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( DOKTORA TEZİ )**

**DEKSAMETAZON VE MEPERİDİNİN HL-60 AKUT  
PROMYELOSİTİK LÖSEMİ HÜCRE SOYUNDA VİNORELBİN  
SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**SEVİLCAN TUNA**

**DANIŞMAN  
PROF.DR.AYHAN BİLİR**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM  
DALI/HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA  
PROGRAMI**

**İSTANBUL-2009**

## TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

31 / 07 / 2009

Prof.Dr.Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒  
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji AD  
Tez Sahibi : Sevilcan TUNA  
Tez Başlığı : Dekametazon ve Meperidinin HL-60 Akut Promyelositik Lösemi Hücre Soyunda Vinorelbin Sitotoksitesi Üzerine Etkisi  
Sınav Yeri : İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD  
Sınav Tarihi : 30 / 06 / 2009

### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof.Dr.Ayhan BİLİR-Danışman (Tez İzleme Komitesi Üyesi) İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
- 2.Prof.Dr.Selda BEKPINAR(Tez İzleme Komitesi Üyesi) İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
- 3.Prof.Dr.Seyhun SOLAKOĞLU(Tez İzleme Komitesi Üyesi) İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
- 4.Prof.Dr.Mehmet GÜRTEKİN İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
- 5.Prof.Dr.Serap ARBAK Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sevilcan TUNA



## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince attığım her adımda yanımda olan, engin bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof.Dr.Ayhan Blir'e

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Yurdagül Canberk'e,

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, elemanlarına ve asistan arkadaşlarıma,

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı elektron mikroskopi laboratuvarında görevli Bio.Fadime Aktar ve Bio.Ebru Karabulut'a,

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı'nda görevli Dr.Esin Aktaş Çetin'e

Sevgi ve ilgileri ile her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-2201

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                 |      |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| TEZ ONAYI .....                                                                 | İİ   |
| BEYAN.....                                                                      | İİİ  |
| İTHAF.....                                                                      | İV   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                   | V    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                               | VI   |
| TABLolar LİSTESİ .....                                                          | İX   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                          | X    |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....                                            | Xİİ  |
| ÖZET .....                                                                      | Xİİİ |
| ABSTRACT.....                                                                   | XİV  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                          | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                         | 3    |
| 2.1. Hücre ve Doku Kültürü Hakkında Genel Bilgiler.....                         | 3    |
| 2.1.1. Hücre Kültürlerinin Temel Tıp ve Kanser Araştırmalarında Kullanımı ..... | 3    |
| 2.1.2. Hücre Siklusu .....                                                      | 3    |
| 2.1.3. Hücre Siklusunun Kantitatif Analizi .....                                | 4    |
| 2.1.4. İmmünohistokimya.....                                                    | 5    |
| 2.1.5. Bromodeoxyuridine (BrdU).....                                            | 6    |
| 2.2. Lösemi ve Tipleri .....                                                    | 7    |
| 2.3. Akut Lösemiler.....                                                        | 7    |
| 2.3.1. Akut lösemilerin klinik özellikleri .....                                | 8    |
| 2.4. Akut Myeloblastik Lösemi (AML) .....                                       | 9    |
| 2.4.1. AML’de prognoz .....                                                     | 9    |
| 2.5. Apoptozis veya Programlı Hücre Ölümü .....                                 | 10   |
| 2.5.1. Hücre Ölümünde Morfolojik Değişiklikler .....                            | 11   |
| 2.6. Projede Kullanılan İlaçlar .....                                           | 12   |
| 2.6.1. Vinorelbine.....                                                         | 12   |
| 2.6.1.1. Etki Mekanizması .....                                                 | 12   |
| 2.6.1.2. Klinik Etkinlik .....                                                  | 13   |
| 2.6.2. Deksametazon .....                                                       | 13   |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.2.1. Glukokortikoidlerin Farmakokinetik Özellikleri .....                            | 13 |
| 2.6.2.2. Glukokortikoidlerin Fizyolojik ve Farmakolojik Etkileri .....                   | 13 |
| 2.6.3. Meperidin .....                                                                   | 14 |
| 2.6.3.1. Ağrı ile İlgili Açıklamalar ve Analjezik Etkinin Temelleri .....                | 15 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                                 | 16 |
| 3.1. Kullanılan Maddeler .....                                                           | 16 |
| 3.1.1. Kimyasal Maddeler .....                                                           | 16 |
| 3.1.2. İlaçlar .....                                                                     | 16 |
| 3.1.3. Kitler .....                                                                      | 16 |
| 3.1.4. Diğer Maddeler .....                                                              | 17 |
| 3.2. Kullanılan Gereçler .....                                                           | 17 |
| 3.3. Kullanılan Çözeltiler .....                                                         | 17 |
| 3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler .....                                      | 17 |
| 3.3.2. İmmünohistokimya Kullanılan Çözeltiler .....                                      | 17 |
| 3.4. Kullanılan Yöntemler .....                                                          | 18 |
| 3.4.1. Hücre Kültürü .....                                                               | 18 |
| 3.4.1.1. Doz Belirleme Deneyi .....                                                      | 18 |
| 3.4.1.2. Proliferasyon deneyi ve canlılık tayini .....                                   | 19 |
| 3.4.2. İmmünohistokimya .....                                                            | 20 |
| 3.4.2.1. BrdU İmmünohistokimyası .....                                                   | 20 |
| 3.4.2.2. Kaspaz 3 İmmünohistokimyası .....                                               | 20 |
| 3.4.2.3. Bcl-2 İmmünohistokimyası .....                                                  | 20 |
| 3.4.3. Flow sitometri .....                                                              | 21 |
| 3.4.4. Hücrelerin transmisyon elektron mikroskopik değerlendirme için hazırlanması ..... | 21 |
| 3.4.5. Kullanılan İstatistiksel Analiz Yöntemleri .....                                  | 22 |
| 4. BULGULAR .....                                                                        | 23 |
| 4.1. Proliferasyon verileri .....                                                        | 23 |
| 4.2. Viabilite Sonuçları .....                                                           | 25 |
| 4.3. BrdU-İşaretlenme İndeksi (BrdU-LI) .....                                            | 26 |
| 4.4. Kaspaz 3 ile İşaretlenme Oranları .....                                             | 29 |
| 4.5. Bcl-2 ile İşaretlenme Oranları .....                                                | 31 |
| 4.6. Flow Sitometrik Analiz Sonuçları .....                                              | 33 |

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| 4.7. Transmisyon Elektron Mikroskop Bulguları ..... | 37 |
| 5. TARTIŞMA .....                                   | 40 |
| KAYNAKLAR .....                                     | 47 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                      | 54 |

**TABLÖLAR LİSTESİ**

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| Tablo 4-1: Viabilite değerleri ..... | 26 |
|--------------------------------------|----|

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-1: Zamana bağlı hücre çoğalma verileri (*= $p>0,05$ ) .....                                                                               | 23 |
| Şekil 4-2: Hücrelerin 72. saat invert mikroskop görüntüleri A: Kontrol grubu B: Vinorelbin grubu (Bar: 25 $\mu$ ).....                            | 23 |
| Şekil 4-3: Hücrelerin 72. saat invert mikroskop görüntüleri A: Deksametazon grubu B: Meperidin grubu (Bar: 25 $\mu$ ) .....                       | 24 |
| Şekil 4-4: Hücrelerin 72. saat invert mikroskop görüntüleri A: Vinorelbin+deksametazon grubu, B: Vinorelbin+meperidin grubu (Bar: 25 $\mu$ )..... | 24 |
| Şekil 4-5: Deksametazon+meperidin grubuna ait hücrelerin 72. saat invert mikroskop görüntüleri (Bar: 25 $\mu$ ) .....                             | 25 |
| Şekil 4-6: Viabilite sonuçları.....                                                                                                               | 25 |
| Şekil 4-7: BrdU-İşaretlenme indeksi (*= $p>0,05$ ) .....                                                                                          | 26 |
| Şekil 4-8: 24. saatte BrdU ile işaretlenmiş hücreler A: Kontrol grubu B: Vinorelbin grubu (Bar: 25 $\mu$ ) .....                                  | 27 |
| Şekil 4-9: 24. saatte BrdU ile işaretlenmiş hücreler A: Deksametazon grubu B: Meperidin Grubu (Bar: 25 $\mu$ ).....                               | 27 |
| Şekil 4-10: 24. saat BrdU ile işaretlenmiş hücreler A: Vinorelbin+deksametazon grubu B: Vinorelbin+meperidin grubu (Bar: 25 $\mu$ ).....          | 28 |
| Şekil 4-11: 24. saat deksametazon+meperidin grubu BrdU ile işaretlenmiş hücreler (Bar: 25 $\mu$ ).....                                            | 28 |
| Şekil 4-12: Kaspaz-3 ile işaretlenme oranları .....                                                                                               | 29 |
| Şekil 4-13: 24. saat anti-kaspaz-3 ile işaretlenmiş hücreler A: Kontrol grubu B: Vinorelbin grubu (Bar: 25 $\mu$ ).....                           | 29 |
| Şekil 4-14: 24. saat anti-kaspaz-3 ile işaretlenmiş hücreler A: Deksametazon grubu B: Meperidin grubu (Bar: 25 $\mu$ ) .....                      | 30 |
| Şekil 4-15: 24. saat anti-kaspaz-3 ile işaretlenmiş hücreler A: Vinorelbin+deksametazon grubu B: Vinorelbin+meperidin grubu (Bar: 25 $\mu$ )..... | 30 |
| Şekil 4-16: 24. saat anti-kaspaz-3 ile işaretlenmiş hücreler deksametazon+meperidin grubu (Bar: 25 $\mu$ ) .....                                  | 31 |
| Şekil 4-17: Bcl-2 ile işaretlenme oranları .....                                                                                                  | 31 |
| Şekil 4-18: 24. saat anti-bcl-2 ile işaretlenmiş hücreler A: Kontrol grubu B: Vinorelbin grubu (Bar: 25 $\mu$ ) .....                             | 32 |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-19: 24. saat anti-bcl-2 ile işaretlenmiş hücreler A:Deksametazon grubu B:Meperidin grubu (Bar: 25µ) .....                      | 32 |
| Şekil 4-20: 24. saat anti-bcl-2 ile işaretlenmiş hücreler A:Vinorelbin+deksametazon grubu B:Vinorelbin+meperidin grubu (Bar: 25µ)..... | 33 |
| Şekil 4-21: 24. saat anti-bcl-2 ile işaretlenmiş hücreler deksametazon+meperidin grubu (Bar: 25µ).....                                 | 33 |
| Şekil 4-22: Kontrol grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72. saat.....                                                           | 34 |
| Şekil 4-23: Apoptozis oranları .....                                                                                                   | 34 |
| Şekil 4-24: Vinorelbin grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72.saat .....                                                        | 35 |
| Şekil 4-25: Deksametazon grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72.saat.....                                                       | 35 |
| Şekil 4-26: Meperidin grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72.saat.....                                                          | 35 |
| Şekil 4-27: Vinorelbin+Deksametazon grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat B: 72.saat .....                                            | 36 |
| Şekil 4-28: Vinorelbin+Meperidin grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72.saat                                                    | 36 |
| Şekil 4-29: Deksametazon+Meperidin grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B:72.saat .....                                             | 37 |
| Şekil 4-30: 24 saat kontrol grubu elektron mikroskop görüntüleri .....                                                                 | 37 |
| Şekil 4-31: 24 saat elektron mikroskopi görüntüleri A:Vinorelbin grubu B:Deksametazon grubu .....                                      | 38 |
| Şekil 4-32: 24 saat elektron mikroskopi görüntüleri A:Meperidin grubu B:Vinorelbin+deksametazon grubu.....                             | 38 |
| Şekil 4-33: 24 saat elektron mikroskopi görüntüleri A:Vinorelbin+meperidin grubu B:Deksametazon+meperidin grubu .....                  | 39 |

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

|          |                                                                                     |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| AML      | : Akut myelositik lösemi                                                            |
| ALL      | : Akut lenfositik lösemi                                                            |
| KLL      | : Kronik lenfositik lösemi                                                          |
| KML      | : Kronik myelositik lösemi                                                          |
| ANLL     | : Akut non-lenfositik lösemi                                                        |
| NSCLC    | : Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri                                             |
| DMEM-F12 | : Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle Medyumu, besleyici<br>karışım F12 Ham medyumu |
| BrdU     | : Bromodeoksiuridin                                                                 |
| BrdU-LI  | : Bromodeoksiuridin-labeling indeks                                                 |
| PBS      | : Fosfat tamponu içeren %0,9 NaCl                                                   |
| FCS      | : Fotal sığır serumu                                                                |
| ELISA    | : ELIZA (Enzyme-linked immunosorbent assay)                                         |



## ÖZET

Tuna S. Deksametazon ve meperidinin HL-60 akut promyelositik lösemi hücre soyunda vinorelbin sitotoksitesisi üzerine etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. İstanbul. 2009.

Akut lösemiler olgun hücrelerin azalması ve lökosit prekürsörlerinin (lösemik blastlar) birikimi ile karakterizedir. Vinorelbin tubuline bağlanan yarı sentetik vinka alkaloiddir ve çeşitli tümör tiplerine karşı antineoplastik aktiviteye sahiptir. Deksametazon kemoterapi ile bağlantılı mide bulantısı ve kusmanın önlenmesinde kullanılan glukokortikoid sınıfından bir ilaçtır. Glukokortikoidlerin hücre kültüründe, lenfoid hücrelerde pro-apoptotik ve anti-proliferatif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Meperidin, ağrı kesici olarak kullanılan sentetik opioiddir ve etkisini mu opioid reseptörlere bağlanarak gösterir. HL-60 hücre soyunun mu opioid reseptörleri içerdiği gösterilmiştir.

Çalışmamızda; HL-60 akut promyelositik lösemi hücre soyunda, vinorelbin sitotoksitesisi üzerine deksametazon ve meperidinin etkilerinin hücre kültürü, immünohistokimya, flow sitometri ve elektron mikroskopi yöntemleriyle gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda vinorelbinin HL-60 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve sentez fazındaki hücre oranında azalmaya neden olduğu belirlendi. Elektron mikroskopik ve flow sitometrik inceleme ile vinorelbinin apoptotik hücre oranında artışa neden olduğu gösterildi. Vinorelbinin bcl-2 aktivasyonunu inhibe ederek ve kaspaz-3 aktivasyonu ile hücreyi apoptozise götürdüğü saptandı. Deksametazon ve meperidin hücre proliferasyonunu durdurdu ve apoptozise neden oldu. Deksametazon vinorelbin ile kombine edildiğinde ilave bir etki sağlamadı. Flow sitometrik analize göre ise meperidinin vinorelbinin apoptotik etkisini 72. saatte arttırdığını saptandı.

Sonuç olarak, vinorelbin akut promyelositik lösemi hücrelerinde apoptozise yönlendirir ve akut promyelositik lösemili hastaların tedavisinde kullanılması yarar sağlayabilir. Ayrıca meperidinin tedavide vinorelbin ile birlikte kullanımı yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler : Deksametazon, Meperidin, Vinorelbin, HL-60, Lösemi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-2201

## ABSTRACT

Tuna S. The effect of dexamethasone and meperidin on vinorelbine cytotoxicity in HL-60 acute promyelocytic leukemia cell line. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Histology and Embryology. İstanbul. 2009.

Acute leukemia is characterized with decreasing mature cells and aggregation of leucocyte precursors. Vinorelbine is a semisynthetic vinca alkaloid that binds to tubulin and has antineoplastic activity towards various tumour types. Dexamethasone is a drug of glucocorticoid class that is used to prevent nausea and vomiting that is caused by chemotherapy. Glucocorticoids have pro-apoptotic and anti-proliferative effects on lymphoid cells in cell culture was shown. Meperidine is a synthetic opioid used for pain killer and shows its effect thereby binding to mu opioid receptors. HL-60 cell line has mu opioid receptors was shown.

The aim of this study is to show the effects of dexamethasone and meperidine on vinorelbine cytotoxicity at HL-60 acute promyelocytic leukemia cell line with cell culture, immunohistochemistry, flow cytometry and electron microscopy.

In our study, we observed that vinorelbine inhibited HL-60 cell proliferation and decreased the rate of synthesis phase cells. Furthermore, by electron microscopy and flow cytometry analyzes we found that vinorelbine increased the rate of apoptotic cells. We detected that vinorelbine causes cell death by inhibiting bcl-2 and activating caspase-3. Moreover dexamethasone and meperidine inhibited cell proliferation and promoted apoptosis. When dexamethasone combined with vinorelbine no additional effect was observed. However, according to flow cytometry analyzes, meperidine increased the apoptotic effect of vinorelbine at 72th hour.

In conclusion, vinorelbine promotes apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells and may be beneficial in the treatment of acute promyelocytic leukemia patients. Moreover using meperidine with vinorelbine in the treatment may be beneficial.

**Key Words:** Dexamethasone, Meperidin, Vinorelbine, HL-60, Leukemia

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-2201

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemi, kemik iliğindeki normal hücreler yerine neoplastik hücrelerin geçişi ile karakterize edilen hematopoetik kök hücrelerin kötü huylu oluşumlarıdır. Akut lösemiler olgun hücrelerin azalması ve lökosit prekürsörlerinin (lösemik blastlar) birikimi ile karakterizedir. Akut lösemide lösemik blastların birikimi, transforme olan hücrelerin hızlı çoğalmasıyla birlikte işlevsel olan son hücreler yönünde olgunlaşamamasına bağlıdır. Tedavide amaç lösemik klon topluluğunun geride kalan az sayıdaki normal kök hücresinin düzelmesine imkan verecek şekilde azaltılmasıdır. Akut myelositik lösemi (AML) çok ağır bir hastalıktır. Yoğun kemoterapi ile hastaların çoğunda remisyon sağlanabilmesine rağmen, bunların büyük kısmında hastalık tekrarlar ve yalnız %10-15 inde uzun süreli hastalıksız yaşam beklenebilir (64).

Vinorelbin tubuline bağlanan yarı sentetik vinka alkaloiddir. Mitotik mikrotubul polimerizasyonunu inhibe eder. Hücre siklusunu G2/M geçişinde durdurur (13, 23, 28). Vinorelbin, lenfoma, meme ve akciğer kanseri gibi çeşitli tümör tiplerine karşı önemli antineoplastik aktiviteye sahiptir (47, 65).

Deksametazon klinikte damar geçirgenliğini azaltması nedeniyle ödemlerin tedavisinde kullanılan ve aynı zamanda antienflamatuar ve immünosupresif etkileri olan glukokortikoid sınıfından bir ilaçtır (45). Kemoterapi ile bağlantılı mide bulantısı ve kusmanın önlenmesinde kullanılmaktadır (1, 74). Glukokortikoidler hücre kültüründe, lenfoid hücrelerde pro-apoptotik ve anti-proliferatif etkiye sahiptir (36, 66, 67).

Meperidin ağrı kesici olarak kullanılan sentetik opioiddir (45). Opioid türlerinin apoptozisi arttırdığına dair veriler bulunmaktadır (39, 83). Opioidler opioid reseptörlerine bağlanarak etkinliklerini gösterirler. HL-60 hücre soyunun opioid reseptörlerden mu opioid reseptör içerdiği gösterilmiştir (53). Endojenik opioid peptidler HL-60 hücrelerinde Bcl-2 üzerinden apoptozisi indüklerken yine HL-60 hücre soyunda codein ve codeinonun kaspaz 3 üzerinden apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (39, 51).

Mikrotubul polimerizasyon inhibitörü olan vinorelbin sitotoksitesi üzerine, hücre kültüründe pro-apoptotik ve anti-proliferatif etkileri olan deksametazon ve mu opioid reseptörler üzerinden etki ederek apoptozisi indükleyen meperidin ilaçlarının akut promyelositik lösemi üzerine etkilerini belirten çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, akut promyelositik lösemi hücre soyu (HL-60) üzerine bu ilaçların ayrı ve kombine kullanımda yarattıkları etkileri hücre kültürü, immünohistokimya, flow sitometrik analiz ve transmisyon elektron mikroskopi ile incelemeyi amaçladık. Bu çalışma ile bu maddelerin ve kombinasyonlarının HL-60 hücre soyu üzerine etkinliği aydınlatılarak klinikte akut promyelositik lösemili hastaların tedavisine katkı sağlanacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hücre ve Doku Kültürü Hakkında Genel Bilgiler

#### 2.1.1. Hücre Kültürlerinin Temel Tıp ve Kanser Araştırmalarında Kullanımı

Hücre kültürleri hücrelerin tek hücreyi dahi kapsayabilecek şekilde, doku olarak düzenlenmeden in vitro çoğalmasdır. Organizmadan doğrudan doğruya alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen kültürler primar kültürler adı verilir. Primer kültürler, bulundukları yerde çoğalıp başka bir yere bölünerek aktarıldıktan (hücre pasajı) sonra hücre soyu (cell line) adını alırlar.

Primer hücre kültürlerinden veya hücre soylarından özel seçim veya klonlama yöntemi ile belirleyici bazı özellikleri olan hücreler elde edilir. Bu hücrelerin, kültürde yaşamları süresince belirleyici özellikleri devam eder; hücrelerin pasaj yapılmış olması, onların belirleyici özelliklerini etkilemez.

Hücre suşları ve hücre soyları diploid veya heteroploid olabilirler, hücrelerin heteroploid oluşları onların habis hücreler oldukları veya in vitro çoğalmalarının sınırsız olduğu anlamına gelmez. Hücre kültürlerinde sınırsız çoğalan hücre soy veya suşları, devamlı hücre soyları (established cell line) şeklinde tanımlanarak, yaşam süreleri sınırlı diploid veya heteroploid hücre soylarından ayrılırlar. Üç gün ara ile en az 70 defa pasajı yapılabilen hücre soyları “devamlı hücre soyu” olarak kabul edilmektedir.

Günümüzde, hücre kültürleri esas olarak iki yolla üretilmektedir: Tek tabaka hücre kültürleri ve süspansiyon halinde hücre kültürleri. Tek tabaka hücre kültürleri, cam veya plastik bir zemin üzerine tutunarak yaşayan, işlevlerini sürdüren ve üreyen hücrelerdir. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde, hücreler hayatsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde bulundukları ortamda sürdürebilir. Doku kültürü yöntemleri kullanılarak, hücre yapısı, fizyolojisi, patojen hücre ilişkileri, iyonlaştırıcı ışınların hücre düzeyinde incelenmesi ve çeşitli radyobiyojik problemlere bağlı olarak tümör büyümesinin açıklığa kavuşturulmasına çalışılır. Hücre kültürlerinde, in vivo şartlarda mümkün olmayan, kısa zaman aralığında gerçekleştirilmesi istenilen fiziksel ve kimyasal etkiler incelenebilir (24).

#### 2.1.2. Hücre Siklusu

Hücre siklusunun incelenmesi, hücre kültüründe yapılan araştırmalarda önemli yer tutar. Memeli hücreleri mitoz bölünme ile çoğalırlar. Bir hücre ikiye bölünerek, ana

hücre ile aynı sayıda ve özellikte kromozomları içeren iki yavru hücre oluşur. Yavru hücreler yeni nesillerdir ve sürekli bölünen hücrelerde her mitoz bölünmeden sonra yeni bir nesil oluştuğu için bir hücre yaşlanması söz konusu değildir. Mitoz bölünme ile oluşan yavru hücrelerin her biri belli bir zaman aralığı sonunda ikinci bir mitoz bölünme geçirirler ve bu olaylar peş peşe sürer gider. Birbirini izleyen iki mitoz bölünme esnasında geçen süreye “hücre siklusu – hücre döngüsü” adı verilir.

Sürekli bölünen bir hücre popülasyonu, ışık mikroskobu ile incelenirse, hücre siklusu içinde yalnızca mitoz fazındaki hücrelerin morfolojik açıdan diğerlerinden farklı oldukları görülür. Böyle bir incelemeyi, doku kültüründe yetiştirilen ve petri kutusunun dibine yapışmış hücrelerde yaparsak, ana hücrenin bölünmeye başlarken, bir yandan kromozomlarının görünür hale geçtiğini, diğer yandan da petrinin dibine yapışma derecesinin azaldığını ve yuvarlak şekil aldığını görürüz.

Daha sonra yuvarlaklaşan ana hücre ikiye bölünür ve bölünmeden hemen sonra yavru hücrelerin her biri tekrar cam yüzeye yayılarak yapışırlar. Bütün bu olaylar yani mitoz bölünme yaklaşık 1 saatlik bir süre içinde tamamlanır. Bunun dışındaki tüm hücreler interfaz hücreleridir ve ışık mikroskobunda bakıldığında aynı morfolojik özelliktedirler.

Hücre bölünmeleri, birbirini peş peşe izleyen olaylar oldukları ve her hücre neslinde tekrarlandıkları için, bir siklusun tamamlanması için geçen süreye generasyon süresi, mitotik siklus veya hücre siklusu adı verilir ve “Tc” sembolü ile ifade edilir.

1953 yılında Howard ve Pelc tarafından geliştirilen ve otoradyografi adı verilen yöntem ile, interfazdaki hücrelerin fizyolojik açıdan farklı davrandıklarının ortaya konması, hücre biyolojisinde yeni bir çığırın açılmasına neden olmuştur (61, 71).

### **2.1.3. Hücre Siklusunun Kantitatif Analizi**

Aynı cins hücrelerden oluşan bir hücre popülasyonundaki bütün hücrelerin, hücre siklusu süreleri tam olarak aynı değildir. Birçok değişik ve karmaşık faktörlere bağlı olarak, bu hücrelerin hücre siklusu süreleri arasında büyük varyasyonlara rastlanır. Bir hücre popülasyonundaki hücrelerin hücre siklusları ile ilgili kantitatif verilerin elde edilmesi amacı ile, basit olarak iki ölçüm yapılabilir.

Bunlardan birincisi, popülasyondaki mitoz bölünme yapan hücrelerin sayısının saptanması ve bu sayının tüm hücrelere oranının hesaplanmasıdır. Bu değere “mitotik indeks” (Mi) adı verilir. Eğer bir popülasyondaki hücrelerin tümünün bölündüğünü,

hepsinin aynı hücre siklusu süresine sahip olduğunu ve bütün hücrelerin hücre siklusunun çeşitli fazlarına homojen olarak dağıldığını düşünürsek, mitotik indeks değerinden, aşağıdaki eşitliği çıkarabiliriz:

$$\text{Mitotik İndeks (Mi)} = T_M/T_C$$

Burada  $T_M$  mitoz fazının süresini,  $T_C$  ise, hücre siklusunun toplam süresini belirlemektedir.

Bu konudaki ikinci basit ölçüm ise, işaretlenmiş yani S fazındaki hücreleri sayarak bunların tüm hücrelere oranının saptanmasıdır. Bu değere “Labeling İndeks” (LI) ya da “işaretlenme indeksi” denir.

$$\text{Labeling İndeks (LI)} = T_B/T_C$$

Burada  $T_B$ , S fazının süresini,  $T_C$  ise toplam hücre siklusu süresini göstermektedir.

Uygulamada bu iki yöntemle küçük miktarda ve tek bir örnekte mitotik indeks ve labeling indeks saptanarak hücre siklusuna kantitatif bir yaklaşımda bulunmak mümkündür. Bu olay özellikle insan dokuları ile yapılan çalışmalarda çok önemlidir (61, 71).

#### **2.1.4. İmmünohistokimya**

Makromoleküller arasındaki yüksek afiniteli etkileşimler, immünohistokimyanın temelini oluşturur.

Spesifik proteinlerin ve nükleik asitler ve polisakkaritler gibi bazı başka makromoleküllerin yerlerinin araştırılmasında en faydalı yöntemin işaretlenmiş antikorların kullanıldığı metot olduğu kanıtlanmıştır. Bu test, antijenler ya da immünojenler gibi yabancı ajanlara karşı vücudun gösterdiği reaksiyon temeline dayanır. Vücut, antijene spesifik olarak ve kuvvetle bağlanan antikor adlı proteinleri üreterek cevap verir ve sonuçta yabancı madde nötralize edilir. Antikorlar; antijenle karşılaştıktan sonra plazma ve doku sıvılarında ortaya çıkan globulin grubu proteinlerdir (immünglobulinler). Antikor üretimi, organizmayı yabancı mikroorganizmaların istilasına karşı korur ve vücudun kendisine ait olmayan bazı proteinleri ya da diğer yabancı maddeleri tanımasını ve ortadan kaldırmasını sağlar. İmmünohistokimya, immüno globulinlerin maddelerle eşleşme temeline dayanır ve antikorun biyolojik aktivitesini kaybetmeden mikroskopta görünmesini sağlar.

İşaretlenmiş immünglobulinler spesifik olarak antijenlerine bağlandıkları için, bu bileşikler spesifik antijenlerin doku örneklerindeki yerlerinin belirlenmesini sağlar. Belirli antijenler içeren doku kesiti, bu antijenlere karşı işaretlenmiş antikorlar içeren bir çözeltide inkübe edildiği zaman, antikorlar spesifik olarak antijenlere bağlanır, böylece antijen-antikor komplekslerinin yerleri, ışık ya da elektron mikroskopta saptanabilir.

Antikorların işaretlenmesinde çoğunlukla 3 yöntem kullanılmaktadır.

- Fluoresan bir bileşikle eşleşme: Fluoresan mikroskop kullanılarak spesifik antijenlerin yerinin belirlenmesine olanak sağlar.
- Bir enzimle eşleşme: Geleneksel enzim sitokimyası ile işaretlenmiş antikoron belirlenmesini sağlar. En sık kullanılan enzim peroksidazdır ve ışık ya da elektron mikroskopla belirlenebilir.
- Işık ve elektron mikroskoplarında belirlenebilen elektron yayan renkli bir bileşikle eşleşme: Altın partikülleri günümüzde en çok kullanılan işaretleyicidir.

Antijenin konumunun belirlenmesi için direkt ya da indirekt yöntemler bulunmaktadır.

a) Direkt Yöntem: Antijen (x proteini) içerdiği düşünülen bir dokunun kesitleri X'e karşı işaretlenmiş antikorla inkübe edilir, antikor spesifik X'le birleşir. Antikoron fazlası yıkanır ve yukarıda özetlenen yöntemlere göre doku işleme tabi tutulur.

b) İndirekt Yöntem: X proteinine (antijen) karşı antikorlar hayvanda (sözgelimi tavşanda) üretilir. Keçi ya da koyun gibi bir başka hayvanda antikor cevabını başlatma yeteneğine sahip tavşan immünglobulinleri, anti-antikor oluşturur. X proteini içeren bir doku kesiti işaretlenmemiş anti-X antikorları ile inkübe edilir. Yıkamadan sonra işaretlenmiş tavşan anti-antikorları eklenir ve X proteininin yeri işaretlemeye uygun mikroskopik teknikle görülebilir. Bu yöntem, direkt yöntemle göre daha duyarlı ve daha avantajlıdır (43).

### **2.1.5. Bromodeoxyuridine (BrdU)**

BrdU; DNA sentezini tayin etmek için timidin protokolüne eşdeğer bir alternatiftir. BrdU timidin analogudur ve DNA içine girer. Anti-BrdU monoklonal antikor ile boyanarak sayım yapılabilir veya ELISA ile ölçülebilir (5). Proliferasyon yapan hücreler belirlenirken hızlı uygulanabilir olma ve radyoaktif olmama gibi avantajlar sağlar (62).



## 2.2. Lösemi ve Tipleri

Lösemiler, kemik iliğinin neoplastik hücrelerle diffüz replasmanı ile karakterize hematopoetik kök hücrelerinin malign neoplazileridir. Çoğu olguda lösemik hücreler kana dökülür ve kanda yüksek sayılara ulaşırlar. Bu hücreler aynı zamanda karaciğer, dalak, lenf düğümleri ve vücuttaki diğer dokuları da infiltre ederler. Lösemilerde periferik kanda anormal hücrelerin aşırı çoğalması çarpıcı bir bulgu olmasına rağmen lösemilerin temelde kemik iliğinin bozuklukları olduğu hatırlanmalıdır.

Geleneksel olarak, lösemiler tutulan hücre tipi ve hücrelerin olgunluk derecesine göre sınıflandırılır. Buna göre akut lösemilerde blast adı verilen olgunlaşmamış hücreler çoğalır ve tedavi edilmediğinde hızla ölüme götürür. Diğer taraftan kronik lösemiler en azından başlangıçta iyi diferansiye olgun lökositlerle karakterizedir ve oldukça yavaş bir gidiş gösterir. Akut ve kronik lösemilerin iki ana tipi vardır; lenfositik ve myelositik. Böylece basit bir sınıflamada dört ana lösemi tipi bulunacaktır:

1. Akut Lenfositik Lösemi (ALL): En sık çocukluk çağında görülen lösemi tipidir. 65 yaşın üzerindeki erişkinleri de etkilemektedir.
2. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL): Genellikle 55 yaş ve üzeri erişkinleri etkiler. Zaman zaman genç erişkinlerde de hastalık görülür. Çocukluk çağında neredeyse hiç görülmez.
3. Akut Myelositik Lösemi (AML): Hem çocuklar hem de erişkinlerde görülür. Bu lösemi tipi bazen akut non-lenfositik lösemi (ANLL) olarak da adlandırılır. Yedi farklı alt grubu (M1-M7) vardır.
4. Kronik Myelositik Lösemi (KML): Çoğunlukla erişkinlerde görülmesine rağmen, nadir olarak çocukları da etkiler (64).

## 2.3. Akut Lösemiler

Tüm lösemilerde olduğu gibi akut olanlarda kökenlerini hematopoetik kök hücrelerin değişiminden alırlar. Akut lösemiler olgun hücrelerin azalması ve lökosit prekürsörlerinin (lösemik blastlar) birikimi ile karakterizedir. Morfolojik ve hücre kinetiği çalışmaları akut lösemilerde lösemik kök hücrelerde bir ayrımlaşma duraklaması olduğunu göstermiştir. Bu hücrelerde yenilenme süresi kısalmış değil uzamıştır. Bu nedenle akut lösemide lösemik blastların birikimi; transforme olan hücrelerin hızlı çoğalmasıyla birlikte işlevsel olan son hücreler yönünde

olgunlaşamamasına bağlıdır. Bazı olgularda olgunlaşma olmaması neoplastik hücrelerin hızlı proliferasyonundan daha önemlidir. Lösemik blastlar ilikte çoğaldıkça bilinmeyen mekanizmalarla normal hematopoetik kök hücreleri baskırlar. Malign hücrelerin normal hücreleri kalabalıklaşarak ortadan kaldırmaları gibi basit bir görüş olası sayılmamaktadır. Akut lösemide normal hematopoetik kök hücrelerin baskılanmasının iki önemli klinik sonucu vardır:

1.Esas belirtiler normal kırmızı hücreler, lökositler ve trombositlerin azalmasından doğar.

2.Tedavide amaç lösemik klon topluluğunun geride kalan az sayıdaki normal kök hücrelerinin düzelmesine imkan verecek şekilde azaltılmasıdır.

Lösemik transformasyon çok yönlü hematopoetik kök hücrenin gelişim evresindeki herhangi bir basamağı etkileyebilir. Lenfoid dizinin tutulumu ALL, myeloid öncül hücrelerin neoplastik değişimi (transformasyon) ise değişik tipte AML'ye yol açar (64).

### **2.3.1. Akut lösemilerin klinik özellikleri**

Akut lösemiler aşağıdaki özellikleri gösterirler:

Akut fırtınalı başlangıç: Hastaların çoğunluğu belirtilerin başlangıcından itibaren 3 ay içinde başvururlar.

Normal kemik iliği fonksiyonunun baskılanması ile ilişkili semptomlar: Başlıca anemiye bağlı halsizlik, olgun lökositlerin yetersizliğine bağlı enfeksiyonu yansıtan ateş, trombositopeniye ikincil kanama (peteşi, ekimoz, burun ve dişeti kanamaları)

Kemik ağrısı ve duyarlılığı: Subperiostun infiltrasyonu ile birlikte iliğin genişlemesine bağlı.

Yaygın lenfadenopati; splenomegali ve hematomegali: Lösemik hücrelerin yayılmasını yansıtır. Bu olay tüm lösemilerde görülür, ancak ALL'de daha sıktır.

Santral sinir sistemi belirtileri: Baş ağrısı, kusma ve sinir felçleri meninkslerde yayılmayı gösterir. Bu belirtiler çocuklarda erişkinlerden ve ALL'de AML'den daha sık görülür (64).

## 2.4. Akut Myeloblastik Lösemi (AML)

Akut myeloblastik lösemi (AML), 15-39 yaş arası erişkinleri etkiler. Çok heterojen bir bozukluktur.

Olguların çoğunda myeloblastlar Wright-Giemsa boyalı yaymalarda lenfoblastlardan ayrılabilirler. İnce nükleer kromatin, 3-5 nukleolus ve küçük azurofilik, myeloperoksidaz-pozitif sitoplazmik granüller içerirler. Bazı olgularda, özellikle promyelositik tipte, tipik kırmızı boyanan çubuk biçiminde (Auer çubukları) yapılar görülür. Lizozomal nonspesifik esteraz grubu enzimlerle boyanma monositik farklılaşmayı belirler.

AML'ler (akut nonlenfositik lösemide denir) farklı kökenlerden oluşur (myeloblastlar tabloya hakim olsa bile). Diğerlerinde ortak monosit-granülosit prekürsörleri tutulmuştur, bu da myelomonositik lösemiye neden olur. Hücrelerin olgunluk ve farklılaşma çizgisine bağlı olarak AML'ler, yaygın olarak kullanılan Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) sınıflamasında 7 gruba ayrılmıştır (64).

### FAB Sınıflandırmasına Göre AML:

**M1:** Farklılaşma göstermeyen akut myelositik lösemi

**M2:** Farklılaşma gösteren akut myelositik lösemi

**M3:** Akut promyelositik lösemi

**M4:** Akut myelomonositik lösemi

**M5:** Akut monositik lösemi

**M6:** Akut eritrolösemi

**M7:** Akut megakaryositik lösemi

### 2.4.1. AML'de prognoz

AML çok ağır bir hastalıktır. Yoğun kemoterapi ile hastaların çoğunda remisyon sağlanabilmesine rağmen, bunların büyük kısmında hastalık tekrarlar ve yalnız %10-15'inde uzun süreli hastalıksız yaşam beklenebilir. Gittikçe artan sayıda hasta kemik iliği transplantasyonu ile tedavi edilmektedir. Bu yöntem bazı hasta gruplarında (özellikle ilk remisyondaki genç hastalarda) oldukça etkili olmaktadır (64).

## 2.5. Apoptozis veya Programlı Hücre Ölümü

Normal fizyolojik şartlarda, hasarlı veya yaşlı hücreler, apoptozis (Yn. apo, uzak; ptosis, düşmek) olarak adlandırılan, genetik olarak düzenlenen bir hücre ölüm programıyla kendi kendilerini öldürür (46).

Wyllie ve Kerr glukokortikoidlere maruz kalan timüs hücreleri üzerinde yapılan deneysel bir çalışma ile apoptozisi göstermiştir (38).

Apoptozis nekrozdan farklıdır. Nekroz, akut hasarda (örneğin, bir iskemik inme) görülen, fizyolojik olmayan bir durumdur. Nekrotik hücreler parçalanır; sitoplazma ve çekirdek içeriği çevreye salınır; bu inflamasyon tepkimesini tetikler. Apoptozise giden hücreler büzüşür, hücreler arası bağlantılarını kaybeder, yoğunlaşır, kromatin parçalanır ve hücre küçük apoptotik cisimler oluşturmak üzere yıkılır. Apoptotik cisimler makrofajlar tarafından fagosite edilir, bu nedenle inflamasyon görülmez.

Apoptotik hücre ölümü, merkezi sinir sisteminin gelişimi sırasında izlenir, çünkü erişkinde varlığını devam ettiren nöronlardan daha fazlası bu dönemde oluşturulmaktadır. Perifer kanındaki olgun granülositlerin apoptozise gitmeden önce 1-2 günlük bir yaşam süresi vardır. Timusda, T hücrelerinin klonal seçimi ve hücresel immün yanıtlar apoptozis ile ilişkilidir.

Apoptozisin genetik ve moleküler mekanizmaları 1980'lerin sonunda bir nematod solucanı olan *Caenorhabditis elegans*'da, tam olarak 131 hücrenin öldürülüp 959 tanesinin kalmasıyla ortaya çıkarıldı. Burada, apoptozisde birbirini izleyen dört basamak vardır.

1. Hücre dışı ve hücre içi faktörlerin uyardığı hücre ölümü için hücrenin programlanması.
2. Kaspazlar (sistein aspartik asit-özgün proteaz) olarak adlandırılan hücre içi proteazların aktivasyonu ile hücre ölümü ya da idamı.
3. Makrofajlar tarafından apoptotik cisimlerin fagositozu.
4. Apoptotik cisimlerin lizozomal yıkılması.

Fas (APO-1 veya CD95 olarak da bilinir), tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesine üye olan bir hücre zar proteinidir. Bir ligand, Fas ligandı, Fas reseptörüne bağlanarak programlı hücre ölümünü ve prokaspazların aktif kaspazlara dönüşümü için

artarda aktivasyonunu içeren bir hücre sinyal dizisini başlatır. Kaspazlar iki DNA tamir enzimini (poli-ADP-riboz polimeraz [PARP] ve DNA protein kinaz) yıkar ve kromatinde engellenemeyen kırılmalar görülür.

Ek olarak, Bax proteini, mitokondriyondan sitoplazmaya, sitokrom c kaçağını uyarır ve bu olay, diğer apoptotik proteazları aktive eder. Bax'ın hücre hasarlayıcı etkisi, bcl-2 proteininin Bax'a bağlanmasıyla önlenir.

Apoptozis, greft reddinde, bir seri otoimmün hastalıkta, nörodejenerasyonda, kalp hastalığında ve kanserde (lenfoproliferatif hastalık) görülür.

Apoptozisin düzenlenmesinde ve devamında görev alan gen ürünleri, hastalığın seyrinde tanıda ve tedavide, olası hedeflerdir (46).

### **2.5.1. Hücre Ölümünde Morfolojik Değişiklikler**

Apoptozisde, tek bir hücrede görülen hücresel büzüşmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması ile hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır (14). Apoptotik uyarım alan hücrenin hacmi yarıya düşer, çevre ile olan bağlantıları kesilir ve mikrovillusları kaybolur. Plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur (zeiozis yapısı). Transglutaminaz enziminin etkisiyle zarda tomurcuklanma ve parçalara ayrılma görülür. Hücre zarında içten dışa fosfatidilserin translokasyonu olur. Plazma ve çekirdek kondansasyonunu takiben sitozolik  $Ca^{++}$  düzeyinde önemli bir artış olur ve sonrasında kromatin kondansasyonu olur yani nukleozomlar arası bağlantı bölgeleri ayrılır. 180-200 baz çifti uzunluğunda parçalar agaroz elektroforezinde merdiven görüntüsü oluşturur (8). İternukleozomal DNA parçalanmasına kalsiyum artışına duyarlı endonükleazların sebep olduğu düşünülmektedir. Hücrenin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili apoptotik cisimcikler oluşur. Normalde hücre zarında iki katlı lipid tabakada fosfolipit asimetrisi vardır. İç tabakada bulunan fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin ve dış tabakada fosfatidilkolin (PC) asimetrik dağılmıştır. Bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptozis sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu PS'nin dış yüzey tabakaya yerleşmesiyle sonuçlanır. Bu, apoptotik cisimciğin fagositozu için uyarıdır (41). Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar veya komşu hücreler tarafından fagosit edilir. Apoptozis 30-60 dakikada tamamlanır (14).

Nekrozda, apoptozisden farklı olarak hücrede büzüşme yerine şişme olur. Hipertermi, oksidatif fosforilasyon-Krebs döngüsü ya da glikolizisin inhibisyonu, otolizis, hipoksi veya çeşitli toksinler patolojik hücre ölümü yani nekroza sebep olur (75). Hücre tarafından genlerle programlanmayan ve çeşitli dış etkenlerle gerçekleşen nekrotik hücre ölümünde enerji kaybı sebebiyle hücre zarının geçirgenliği bozulur ve fazla miktarda sodyum ile su hücre içerisine girdiği için hücre şişer. Ayrıca mitokondrilerde değişme gözlenir, diğer organeller plazma içinde dağılır. Şişme sonucunda hücre zarı patlar ve bütünlüğünü kaybeder, proteolitik enzimler içeren plazma hücreler arası boşluğa sızar, doku çevresinde inflamasyon oluşturur (37, 56).

## **2.6. Projede Kullanılan İlaçlar**

### **2.6.1. Vinorelbine**

Navelbine; 50 mg Vinorelbine eşdeğer Vinorelbine Ditartarat içerir. Vinorelbine (Navelbine), vinka-alkaloid grubundan bir sitostatik, antineoplastik üründür.

#### **2.6.1.1. Etki Mekanizması**

Vinka alkaloidler merkezi sinir sistemi tümörlerinin tedavisinde rol oynayan antineoplastik ajanların bir sınıfını oluşturur. Vinorelbine, toksisite profili ve mikrotubul için seçiciliği ile sınıfın diğer üyelerinden farklıdır (33).

Vinorelbine yeni bir yarı-sentetik vinka alkaloididir. Antitümör aktiviteye sahiptir. Vinka alkaloidler sitotoksik etkilerini mikrotubulleri depolimerize ederek kullanırlar. Hareketin mekanizması; mitotik iğ dinamiğinin bozulması ile ilgili mikrotubul polimerizasyonunun inhibisyonudur (33, 79).

Vinorelbine, tubulin depolimerizasyonu ile etki gösterir ve mitotik iğ oluşumunu inhibe ederek hücreyi metafazda durdurur. Böylece, vinorelbine hücre siklusunu G2/M noktasında durdurarak hücre siklusuna bağlı antimitotik ajan olarak rol oynar. Vinorelbine yapısındaki farklılıkları, aksonal mikrotubullerin üzerinde mikrotubule bağlı proteinlere seçici olarak bağlanmasından kaynaklanabilir. Vinorelbine ile nörotoksisite diğer vinka alkaloidlerden daha az problem oluşturur (33).

### **2.6.1.2. Klinik Etkinlik**

Vinorelbin; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (2, 20, 31), göğüs kanseri (2, 19, 32, 42, 81), ovaryum kanseri (12) ve Hodgkin's lenfoma (10, 21) tedavisinde kullanılmaktadır.

### **2.6.2. Deksametazon**

Glukokortikoid sınıfındandır. Kimyaca 9 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ -metilprednizolon'dur. Ağız yoluyla tablet şeklinde kullanılır. Plazmadaki yarılanma ömrü 3 saat kadardır. Plazma proteinlerine en az bağlanan bir glukokortikoiddir. Deksametazon sodyum fosfat ise suda nispeten fazla çözünen bir deksametazon esteridir. Sudaki steril solüsyonu i.v. veya i.m. enjeksiyon suretiyle uygulanır. Ayrıca pomad, göz damlası veya göz pomadı şeklinde lokal uygulanan %0,05-0,1 ilaç içeren preparatları vardır.

#### **2.6.2.1. Glukokortikoidlerin Farmakokinetik Özellikleri**

Yeni sentetik steroidler ağızdan alındıklarında mide-barsak kanalından genellikle tam olarak absorbe edilirler. Maksimum kan düzeylerine, alındıktan 2-8 saat sonra ulaşırlar. Plazmada eliminasyon yarılanma ömürleri genellikle 90-180 dakika arasındadır.

Doğal kortikosteroidler gibi ve onlara benzer bir şekilde, karaciğerde metabolizma edilirler. Karaciğer hastalıkları bu organda önemli ölçüde zedelenme yapmışsa glukokortikoidlerin eliminasyon yarılanma ömrü belirgin şekilde uzar. Metabolitler ve değişmeden kalan genellikle ufak miktardaki ilaç, böbreklerden itrah edilir.

#### **2.6.2.2. Glukokortikoidlerin Fizyolojik ve Farmakolojik Etkileri**

Glukokortikoidlerin glukoz, protein ve yağ metabolizması üzerine etkilerinin yanı sıra antiinflamatuvar, immünosüpresif etkisi ve kardiyovasküler, merkezi sinir sistemi, böbrekler, kaslar ve endokrin bezler üzerine çok geniş etkileri olan ilaçlardır.

Glukokortikoidler suprafizyolojik konsantrasyonlarda akut iltihap olayını ve özellikle kronik iltihap olayını inhibe ederler. İltihap olayı hangi etkene bağlı olursa olsun inhibe edilir. İltihabın ortak makroskopik özelliklerini oluşturan belirtiler (tumor, rubor, kalor, dolor, functio laesa yani sırasıyla şişme (ödem), kızarma, sıcaklık, ağrı ve fonksiyon kısıtlanması) bu ilaçlar tarafından ortadan kaldırılır. İltihabın erken histolojik belirtileri olan olayları (kapiler dilatasyonu, damar çeperine fibrinin çökmesi,

serodiapedez ve lokal ödem, lökositlerin iltihap alanına migrasyonu ve fagositik etkinlik artması gibi) ve geç histolojik belirtilerini oluşturan olayları (fibrozis, kapillerlerin proliferasyonu, kolajen birikmesi ve nihayet nedbeleşme gibi) inhibe ederler. Ancak hastalığın altında yatan ve iltihap reaksiyonunu tetikleyen patolojik olayı etkilemezler. Antijen-antikor birleşmesi veya antijen tarafından duyarlı lenfositlerin aktive edilmesi sonucu başlatılan alerjik iltihap olayı da glukokortikoidler tarafından inhibe edilir.

İmmünosupresif etkilerine baktığımızda ise, glukokortikoidler suprafizyolojik dozlarda, immün sistemin efektör hücreleri arasında çok sayıda sitokinler tarafından sağlanan iletişimi, otokrin, parakrin ve endokrin nitelikte etkinlikler gösteren bu faktörlerin üretimini ve/veya onların etkilerini inhibe etmek suretiyle bozarlar. Glukokortikoidlerin immünosupresif etkileri, monositlerin, makrofajların ve endotel hücrelerinin immün sataşma sonucu aktive edilmelerinin ve sitokin salgılamalarının inhibisyonu esasına dayandığından antiinflamatuvar etkilerine mekanizmaları bakımından benzer.

Glukokortikoidler beyin ödemi ortadan kaldırırlar. Bu patolojik durumun, beyin kapillerlerinin endotel hücreleri arasındaki sıkı temas yerlerinin açılması sonucu doku içine plazma suyunun kaçmasına bağlı olduğu sanılmaktadır. Glukokortikoidler, kabul edildiğine göre, endotel hücrelerinin aralarının açılmasını önlerler (44).

### 2.6.3. Meperidin

1939 yılında Almanya’da atropin benzeri bir ilaç geliştirmek için çalışan araştırmacılar tarafından bulunan ve analjezik etkisi tesadüfen fark edilen bir fenilpiperidin türevidir. Morfin-benzeri etkinlik gösteren sentetik ilaçlardan klinik uygulamaya ilk giren ilaçtır.

Kitlesine göre analjezik etki gücü morfininkinden daha zayıftır. Cilt altından verilen 75-100 mg meperidin, aynı yoldan verilen 10 mg morfinin yaptığına eşit derecede analjezi yapar (eki-analjezik= eşit-analjezik etki). Eki-analjezik dozda verildiğinde etkisi morfininkinden daha çabuk başlar ve daha kısa sürer. Sedasyon ve öfori yapar. Ancak ağız yolundan verildiğinde analjezik etkinliği parenteral verilmesine göre daha azdır; bu yoldan parenteral dozunun 3-4 katı verilmesi gerekir. Morfinden bir farkı eki-analjezik oral ve parental dozları arasındaki oranın düşük olması ve ağız yolundan rutin olarak kullanılabilmesidir.



Etki süresinin kısa olması vücutta çabuk metabolize edilmesinin sonucudur; hidroliz ve N-demetilasyon suretiyle karaciğerde parçalanır. N-demetilasyon sonucu normeperidin'e dönüşür. Bu metabolit merkezi sinir sistemini meperidine göre daha fazla stimüle eder ve analjezik etkinliği düşüktür; konvülsiyon yapma potansiyeli vardır. Meperidinin eliminasyon yarılanma ömrü 3-4 saat, normeperidininki ise 14-21 saattir. Etki süresinin kısalığı nedeniyle devamlı kullanılması halinde meperidine tolerans gelişmesi, morfine karşı olduğundan daha yavaştır (44).

#### **2.6.3.1. Ağrı ile İlgili Açıklamalar ve Analjezik Etkinin Temelleri**

Ağrı genellikle doku zedelenmesine bağlı yani nosiseptif nitelikte bir duygudur. Akut ağrı daima nosiseptif niteliktedir, neden olan lezyon ile ağrı arasında zaman, yer ve şiddet bakımından yakın bir ilişki vardır. Kronik ağrı her zaman olmasa da çoğu olguda nosiseptif niteliktedir (kanser ağrısı ve romatizmal ağrıda olduğu gibi); bazı olgularda ise kronik ağrı deaferentasyon ağrısı şeklindedir. Deaferentasyon ağrısı periferik ve santral sinir sisteminde ağrı yolları üzerindeki bozukluğa (tümör tarafından tahrip edilme gibi) bağlıdır ve bazen ağrılı bölgede sempatik innervasyonun bozukluğunu gösteren ciltte renk değişikliği, sıcaklık azalması ve kıl kaybı gibi değişiklikler olur (postherpetik nöraljide olduğu gibi); fakat talamik sendrom (santral ağrı) ve periferik nöropatilerde sempatik komponent belirgin değildir.

Şiddetli akut ağrılarda ve kronik kanser ağrısında güçlü narkotik analjezikler kullanılır (44).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

NaOH (Merck 106482), NaCl (Merck 106406), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck 106586), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck 106346), Absolü etanol (Merck 100983), Metanol (Merck 106008), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck 108597), Phenol Red (Merck 107241), Poly-l-Lysine Solution (Sigma P8920), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck 105108), KCl (Merck 104934), Formaldehit (Riedel-de Hën 15513), Osmium tetroksit O<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (Merck 124505), Uranil asetat C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>U.2H<sub>2</sub>O (Merck 108473), Gluteraldehid (Sigma G7776), 1,2 propilen oksit (Merck 112492), Epoxy Embedding medium (EPON-812) (Fluka 45345), Dodenylsuccinic anhidrit (DDSA) (Fluka 45346), Dicarboxylic anhydride (MNA) (Fluka45347), 2,4,6-tris (dimethylaminomethyl)phenol (DMP) (Merck 112388), Sodyum sitrat (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O) (Merck 106446), NaHCO<sub>3</sub> (Merck 3011729), Tipan Mavisi (Sigma T8154).

##### 3.1.2. İlaçlar

Navelbine (Pierre Fabre Medicament)

Deksametazon (Onadron İ.E.Ulagay İlaç Sanayii)

Meperidin (Aldolan, Liba Laboratuvarları)

Penisilin (Sigma P-7794)

Streptomisin (Sigma S-9137)

##### 3.1.3. Kitler

BrdU Staining Kit (Zymed 93-3943)

Caspase 3 (Lab Vision RB-1197-P)

Bcl-2 (Santa Cruz sc-7382)

Histostain Kit (Zymed 85-9043)

Diluent (Lab Vision TA-125-VDX)

AEC Single Solution (Zymed 00-1111)

Clearmount (Zymed 00-8110)

Mayer Hematoksilen (Lab Vision TA-125-MH)

### **3.1.4. Diğer Maddeler**

Fötal Sığır Serum (Sigma SF-7524),

DMEM-F12 (ATCC 30-2004)

### **3.2. Kullanılan Gereçler**

İnkübatör (Sanyo)

Laminar Akım Kabini (Hereaus)

Su banyosu (Nüve)

Etüv (Hereaus)

Otoklav (Victor Recker)

İnvert Mikroskop (Leitz)

Manyetik Karıştırıcı (RÜHROMAG)

Santrifüj (Nüve)

Pipet Aid (Drummond)

Derin Dondurucu (Arçelik)

Buzdolabı (Bosch)

FACS Aria Flow Cytometer&Cell Sorter

### **3.3. Kullanılan Çözeltiler**

#### **3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler**

NaHCO<sub>3</sub>

8,8 gr NaHCO<sub>3</sub> ve 0,01 gr. Phenol red tartılarak 200 ml bidistile su içerisine kondu ve karıştırıldı. Otoklavda 121°C, 3 Atm. basınçta 15 dk. steril edildi.

#### **3.3.2. İmmünohistokimya Kullanılan Çözeltiler**

PBS

11,5 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2,96 gr.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 5,84 gr.  $\text{NaCl}$  1 lt distile suya konu ve karıştırıldı. pH 7,6 ya ayarlandı.

#### $\text{H}_2\text{O}_2$

1,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 98,5 ml metanole konu.

Solüsyon taze hazırlandı.

#### Poly-l-Lysine

10 ml Poly-l-Lysine, 90 ml distile suya konu. Karışım, şaleye dizilen lamaların üzerine konarak 5 dk bekletildi. Lamalar oda ısısında kurutuldu.

### **3.4. Kullanılan Yöntemler**

#### **3.4.1. Hücre Kültürü**

Deneylerimiz İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Araştırmada Avrupa Hücre Kültür Koleksiyonu hücre bankasından sağlanan insan HL-60 Akut Promyelositik Lösemi (ECACC no:85011431) hücreleri kullanıldı.

HL-60 hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 FCS, 0,2 mM glutamin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomisin, 100 IU/ml penisilin içeren DMEM-F12 medyumu (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu, besleyici karışım F12 Ham Medyumu) dur.

Hücreler bu besi ortamını içeren 25  $\text{cm}^2$  ve 75  $\text{cm}^2$ 'lik flasklarda, iç ortamı %5  $\text{CO}_2$ , %95 nem içeren ve 37°C olan inkübatör içinde tutularak ve haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

##### **3.4.1.1. Doz Belirleme Deneyi**

Hücrelerin toplanması aşamasında flasklardaki üst medyum ile birlikte hücreler flasklardan 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Hücreler 5 dk. 1500 rpm'de santrifüj edildi ve üst medyum atıldı. Hücrelerin üzerine medyum konarak süspansiyon haline getirildi ve hemositometrede sayıldı.

Deneyde 24 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Kültür kaplarının her kuyucuğuna %100 canlı 100.000 HL-60 hücresi 2 ml DMEM-F12 medyumu içinde ekildi.

Vinorelbin, deksametazon ve meperidin ilaçlarının herbiri için 0,1; 1; 10; 100µM konsantrasyonlarda olacak şekilde steril bidistile suda hazırlanmış taze çözeltileri 100'er µl'lik eşit hacimlerde hücrelere verildi.

Her bir ilacın her bir dozu için 4'er kuyucuğa ekim yapıldı. Tüm gruplar 24, 48 ve 72. saatler için ekildi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> hava karışımında nemli ortamda inkübe edildi.

24, 48 ve 72.saatler sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler pastör pipeti ile süspansiyon haline getirilip sayma kamerasıyla (hemositometre) sayıldı. Toplam hücre sayıları kaydedildi.

ID50 (İnhibition dose %50) değeri, Vinorelbin ve deksametazon için 10 µM, meperidin için 100 µM olarak saptandı. Gerçekleştirilen tüm deneylerde ilaçların doz belirleme deneyi ile belirlenen bu etkin dozları uygulandı.

#### **3.4.1.2. Proliferasyon deneyi ve canlılık tayini**

24 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 100.000 hücre 2 ml medyum içerisine ekildi.

Gruplar şöyleydi:

Kontrol

Vinorelbin

Deksametazon

Meperidin

Vinorelbin + Deksametazon

Vinorelbin + Meperidin

Deksametazon + Meperidin

Her bir grup için 4'er kuyucuğa ekim yapıldı. Bu gruplar 24, 48 ve 72. saatler için ayrı ayrı ekildi. Her bir sürenin bitiminde hücreler süspanse edilerek sayma kamerasında sayıldı ve hücre sayıları kaydedildi.

%0,1'lik tripan mavisi (trypan blue) boyasıyla, hücre solüsyonu 1/1 oranında hazırlandı ve lam lamel arasına konarak mikroskopta sayıldı. Böylece canlı hücre oranları saptandı.

### 3.4.2. İmmünohistokimya

Hücreler santrifüj edilip PBS ile yıkandıktan sonra lam üzerine 1 damla damlatıldı ve %70 etanolde tespit edildi. BrdU immünohistokimyası yapılacak olan gruba hücreler tespit edilmeden önce 5-bromo-2-deoksiüridin ile 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> hava karışımında nemli ortamda inkübe edildi.

#### 3.4.2.1. BrdU İmmünohistokimyası

Lamlara tespit edilen hücreler PBS'te 10 dk bekletildi. Metanolde hazırlanmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 dk karanlıkta bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. 2 dk 3 kez distile su ile yıkandı. Denatüre edici solüsyonda 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Üç kez 2 dk PBS ile yıkandı. Bloke edici solüsyonda 10 dk bekletildikten sonra biyotinli fare anti-BrdU ile 2 saat oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi. 3 kez 2 dk PBS ile yıkandıktan sonra streptavidin-peroksidaz ile 30 dk muamele edildi. 3 kez 2 dk PBS ile yıkandı ve DAB kromojende 15 dk tutuldu. Distile su ile iyice yıkandıktan sonra hematoksilende 2 dk bekletildi. Çeşme suyu ile yıkandıktan sonra rengin maviye dönüşmesi için 30 saniye PBS te tutuldu. Distile su ile yıkayıp alkol serilerinden geçirilerek toluene alındı. Histomount kapatıcı ile kapatıldı. Işık mikroskopunda sayılarak BrdU-işaretlenme indeksi (BrdU-LI) değerleri saptandı.

#### 3.4.2.2. Kaspaz 3 İmmünohistokimyası

Lamlara tespit edilen hücreler PBS te 10 dk bekletildi. Metanolde hazırlanmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 dk karanlıkta bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. 2 dk 3 kez distile su ile yıkandı. Serum bloke edici solüsyonda 10 dk bekletildikten sonra poliklonal rabbit anti-kaspaz 3 ile 2 saat oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi. 3 kez 2 dk PBS ile yıkandıktan sonra biyotinli sekonder antibody ile 30 dk muamele edildi. 3 kez 2 dk PBS ile yıkandı ve enzim konjugatında 30 dk tutuldu. 3 kez 2 dk PBS ile yıkandı ve AEC kromojende 15 dk bekletildi. Distile su ile iyice yıkandıktan sonra Mayer Hematoksilende 2 dk bekletildi. Çeşme suyu ile yıkandıktan sonra rengin maviye dönüşmesi için 30 saniye amonyaklı suda tutuldu. Distile su ile yıkayıp Clearmount kapatıcı ile kapatıldı. Işık mikroskopunda sayılarak işaretlenme oranı saptandı.

#### 3.4.2.3. Bcl-2 İmmünohistokimyası

Lamlara tespit edilen hücreler PBS te 10 dk bekletildi. Metanolde hazırlanmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 dk karanlıkta bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. 2 dk 3

kez distile su ile yıkandı. Serum bloke edici solüsyonda 10 dk bekletildikten sonra monoklonal mouse anti-bcl-2 ile 2 saat oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi. 3 kez 2 dk PBS ile yıkandıktan sonra biyotinli sekonder antibody ile 30 dk muamele edildi. 3 kez 2 dk PBS ile yıkandı ve enzim konjugatında 30 dk tutuldu. 3 kez 2 dk PBS ile yıkandı ve AEC kromojende 15 dk bekletildi. Distile su ile iyice yıkandıktan sonra Mayer Hematoksilende 2 dk bekletildi. Çeşme suyu ile yıkandıktan sonra rengin maviye dönüşmesi için 30 saniye amonyaklı suda tutuldu. Distile su ile yıkanıp Clearmount kapatıcı ile kapatıldı. Işık mikroskobunda sayılarak işaretlenme oranı saptandı.

### **3.4.3. Flow sitometri**

Flow sitometrik inceleme için 24 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 100000 hücre 2ml medyum içerisine ekildi. 24 ve 72. saatler için aşağıda belirtilen gruplar oluşturularak ekim yapıldı.

Kontrol

Vinorelbin

Deksametazon

Meperidin

Vinorelbin + Deksametazon

Vinorelbin + Meperidin

Deksametazon + Meperidin

İlaçlar verildikten 24 ve 72 saat sonar hücreler toplanarak 2000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak 100µl binding buffer ilave edildi. Boş tüplere FITC işaretli 5µl Annexin V ve 5µl Propidium iodide kondu. Hücreler bu hazırlanan tüplere aktarıldı ve vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dk karanlıkta inkübe edildi. 2 ml binding buffer ile yıkanarak 2000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak 500 µl binding buffer kondu ve FACSCalibur cihazında analiz edildi.

### **3.4.4. Hücrelerin transmisyon elektron mikroskopik değerlendirme için hazırlanması**

Kontrol ve deney gruplarının tümünde hücreler 24. saatte toplandı. Santrifüj tüplerine alınan hücrelerin üzerindeki medyum çekilip atıldı ve PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine %1.5 gluteraldehit konarak 30 dk 4°C de bekletilerek tespit edildi.

Fosfat tamponu ile 2 kez yıkandıktan sonra santrifüj edilip üst sıvısı çekildi ve  $\text{OsO}_4$  te 60 dk  $4^\circ\text{C}$  de bekletildi. Tekrar fosfat tamponda 10 dk yıkandıktan sonra %1 uranil asetatla 15 dk tutuldu. Fosfat tamponunun ardından %30 etanolde 10 dk bekletildi. Hücrelerin bir arada durmalarını sağlamak amacıyla üzerlerine önceden süzölmüş taze yumurta akı kondu ve santrifüj edildi. Tüm yumurta akı çekildikten sonra %50 etanolde 10 dk, %70 etanolde 10 dk, 2 kez %100 etanolde 10 dk, 2 kez saf propilenoksitte 10 dk, 1/1 oranında hazırlanmış propilenoksit/epon karışımında 1 saat, 1/3 oranında hazırlanmış propilenoksit/epon karışımında 1 saat, saf eponda da 1 saat bekletildikten sonra doku gömme kapsüllerine gömüldü.  $37^\circ\text{C}$  etüvde 18 saat bekletildi. Etüvden çıkarılan bloklar trimlenerek bakır gridler üzerine ince kesitler alındı. Kurşun sitrat ve uranil asetatla kontrastlaması yapılarak Jeol 1011 taransmisyon elektron mikroskopunda incelendi.

#### **3.4.5. Kullanılan İstatistiksel Analiz Yöntemleri**

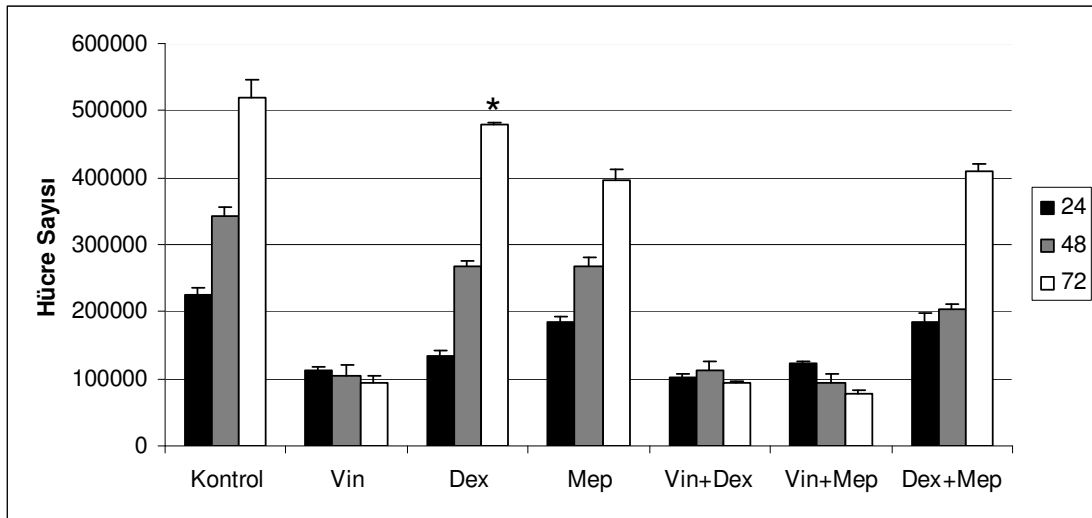
Elde edilen değerler kendi aralarında ve paralel kontrol gruplarıyla Student-T testi kullanılarak istatistiksel anlamlılık değerleri saptandı. Değerlendirmeler anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  kabul edilerek yapıldı.



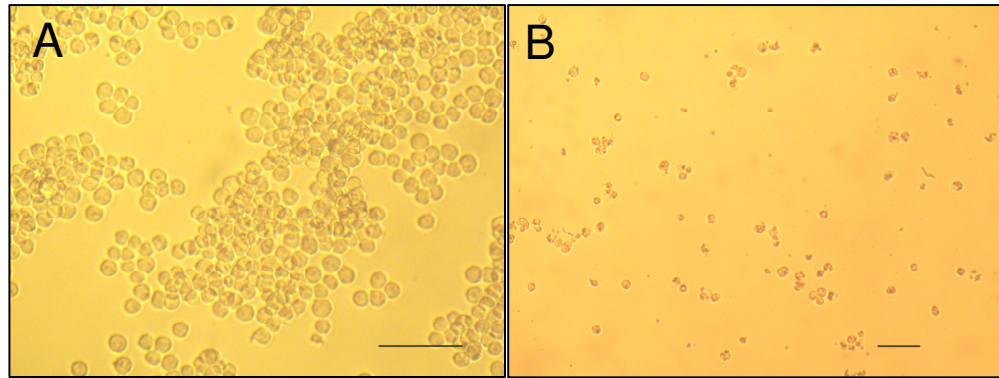
## 4. BULGULAR

### 4.1. Proliferasyon verileri

Kontrol grubunda 24, 48 ve 72. saatler boyunca hücre sayısı beklenildiği üzere sağlıklı ve katlanarak çoğalma gösterdi (Şekil 4-1) (Şekil 4-2A).



Şekil 4-1: Zamana bağlı hücre çoğalma verileri (\*= $p < 0,05$ )

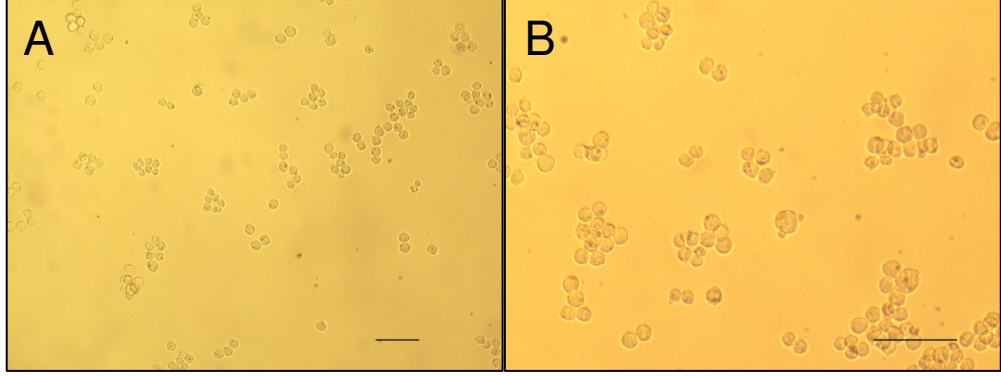


Şekil 4-2: Hücrelerin 72. saat invert mikroskop görüntüleri A: Kontrol grubu  
B: Vinorelbin grubu (Bar: 25µ)

Vinorelbin 10 µM dozunda 24, 48 ve 72. saatlerde hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde inhibe etti ( $p < 0,01$ ) (Şekil 4-2B).

Deksametazon 10 µM dozunda 24 ve 48. saatlerde hücre sayısında anlamlı bir şekilde azalmaya yol açtı ( $p < 0,01$ ). 72. saatte de kontrol grubuna kıyasla hücre sayısını azalttı fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4-3A).

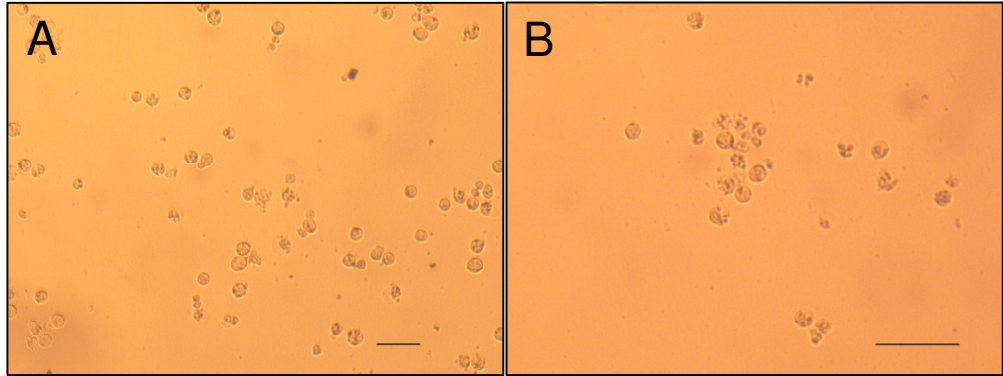
Meperidin 100  $\mu$ M dozunda 24, 48 ve 72. saatlerde anlamlı proliferasyon inhibisyonu yarattı (sırasıyla  $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,05$ )(Şekil 4-3B).



**Şekil 4-3: Hücrelerin 72. saat invert mikroskop görüntüleri A:Deksametazon grubu B:Meperidin grubu (Bar: 25 $\mu$ )**

Vinorelbin ve deksametazon birlikte uygulandığında 24, 48 ve 72. saatte hücre proliferasyon inhibisyonu gerçekleşti ( $p<0,01$ ) (Şekil 4-4A). Ancak bu kombinasyon vinorelbin grubuyla karşılaştırıldığında vinorelbin etkisinde bir inhibisyon gerçekleştiği deksametazonun ilave bir sitotoksositeye neden olmadığı bulundu ( $p>0,05$ ).

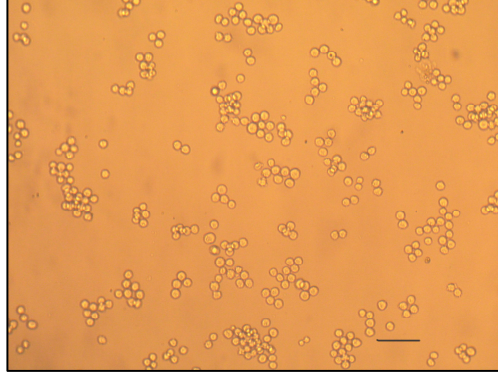
Vinorelbin meperidin ile kombine uygulandığında tüm saatlerde anlamlı inhibisyon gerçekleştiği bulundu ( $p<0,01$ )(Şekil 4-4B). Meperidin vinorelbin etkisini 72. saatte az da olsa arttırdığı görülmektedir fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4-4: Hücrelerin 72. saat invert mikroskop görüntüleri A:Vinorelbin+deksametazon grubu, B:Vinorelbin+meperidin grubu (Bar: 25 $\mu$ )**

Deksametazon ve meperidin kombinasyon grubunda 24. saatte hücre sayısındaki azalma kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ). Meperidin tek başına uygulanması ile deksametazon ile beraber uygulanması arasındaki fark 48. saatte

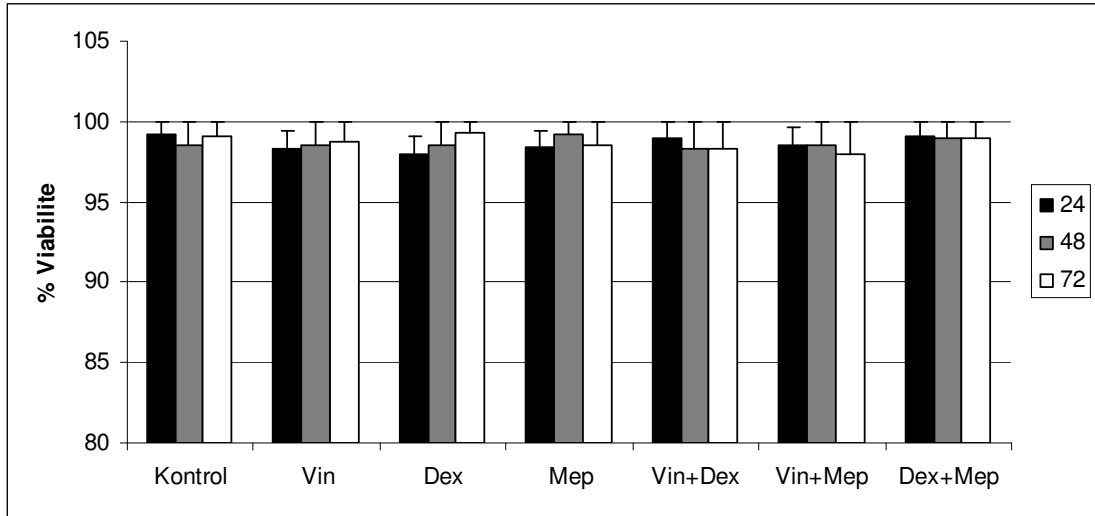
anlamli bulunurken ( $p<0,01$ ), 24 ve 72. saatlerde anlamsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ )(Şekil 4-5).



**Şekil 4-5: Deksametazon+meperidin grubuna ait hücrelerin 72. saat invert mikroskop görüntüleri (Bar: 25µ)**

#### 4.2. Viabilite Sonuçları

Tripan mavisi uygulanarak belirlenen canlılık kontrol grubunda 24. saatte %99,2; 48. saatte %98,5 ve 72. saatte %99,1 oranındaydı (Şekil 4-6).



**Şekil 4-6: Viabilite sonuçları**

Vinorelbin, deksametazon ve meperidin uygulanan gruplarda canlılık oranı kontrole yakın değerlerde bulundu ( $p>0,05$ ) (Tablo 4-1).

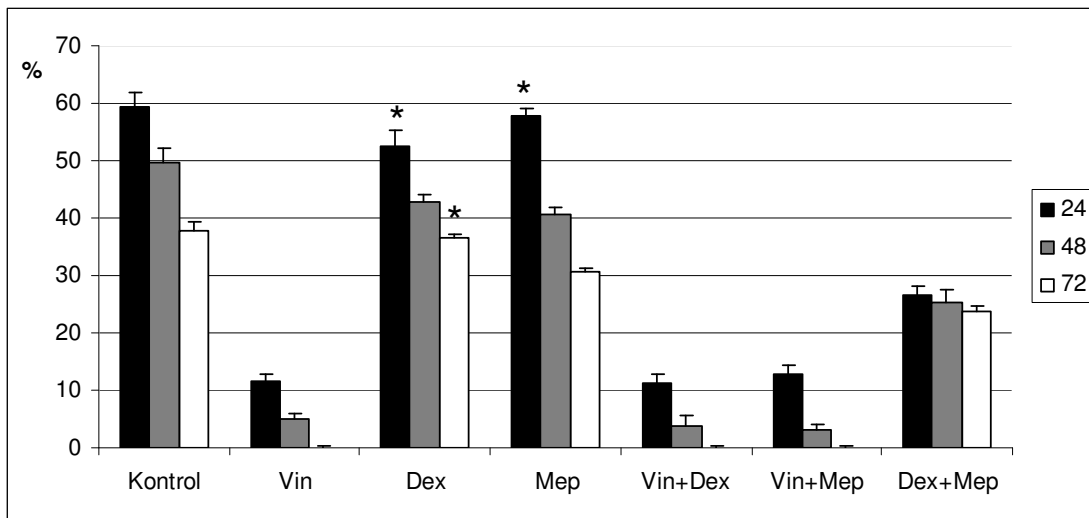
**Tablo 4-1: Viabilite değerleri**

|                         | 24 saat | 48 saat | 72 saat |
|-------------------------|---------|---------|---------|
| Kontrol                 | 99,25   | 98,5    | 99,1    |
| Vinorelbin              | 98,25   | 98,5    | 98,75   |
| Deksametazon            | 97,91   | 98,5    | 99,3    |
| Meperidin               | 98,45   | 99,25   | 98,5    |
| Vinorelbin+Deksametazon | 99      | 98,25   | 98,25   |
| Vinorelbin+Meperidin    | 98,5    | 98,5    | 98      |
| Deksametazon+Meperidin  | 99,1    | 98,9    | 98,9    |

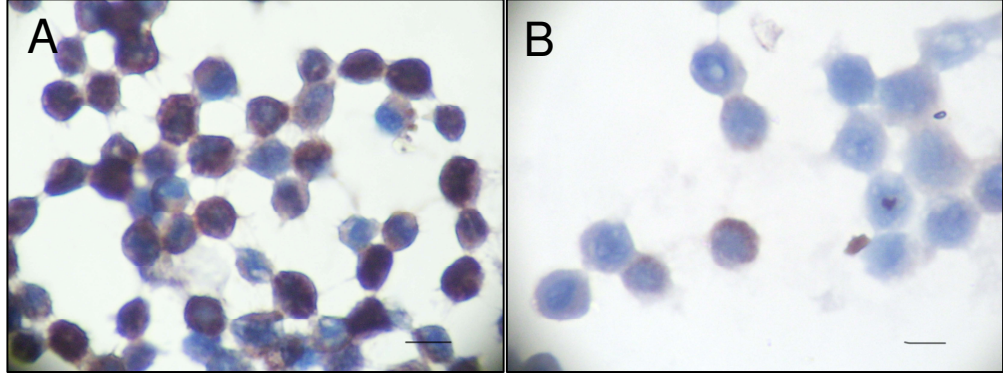
Vinorelbin+deksametazon grubu, vinorelbin+meperidin grubu ve deksametazon+meperidin grubunda kontrole oranla sitotoksosite açısından değişim gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

#### 4.3. BrdU-İşaretlenme İndeksi (BrdU-LI)

Kontrol grubunda işaretlenme indeksi 24. saatte %59,32; 48.saatte %49,53 ve 72. saatte %37,95 olarak belirlendi (Şekil 4-7, 4-8A).



**Şekil 4-7: BrdU-İşaretlenme indeksi (\*= $p>0,05$ )**

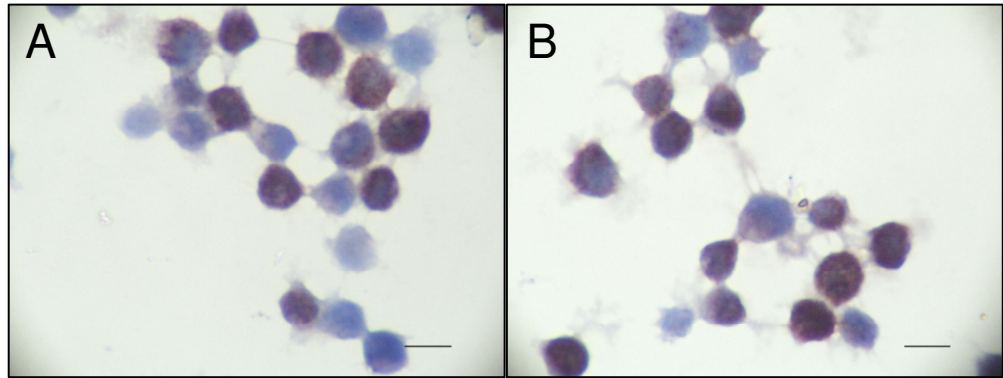


**Şekil 4-8: 24.saatte BrdU ile işaretlenmiş hücreler A:Kontrol grubu B:Vinorelbin grubu(Bar: 25µ)**

Vinorelbin grubunda ise 24. saatte işaretlenme oranı %11,68 olarak belirlendi ve kontrol grubuna göre bu oran istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,01$ )(Şekil 4-8B). 48. saatte işaretlenme oranının %4,88'e, 72. saatte ise %0,15'e kadar düştüğü tespit edildi. Bu değerler de kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

Deksametazon grubunda işaretlenme oranları 24. saatte %52,43; 48. saatte %42,67 ve 72. saatte %36,46 olarak belirlendi (Şekil 4-9A). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24 ve 72. saatteki azalma anlamlı bulunmazken ( $p>0,05$ ), 48. saatte anlamlılık içeriyordu ( $p<0,05$ ).

Meperidin uygulanan grupta BrdU ile işaretlenme değerleri 24. saatte %57,72 olup kontrole göre anlamlı değildi ( $p>0,05$ )(Şekil 4-9B). 48. saatte %42,67'e; 72. saatte %30,51'e düşen işaretlenme oranı kontrole göre anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).



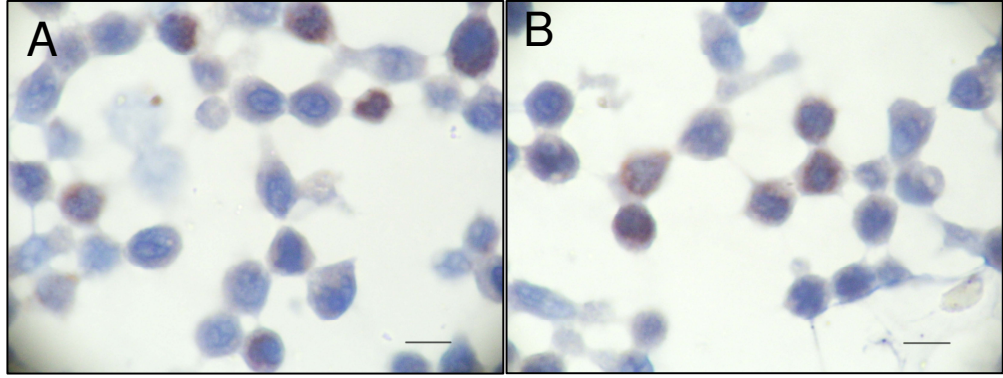
**Şekil 4-9: 24.saatte BrdU ile işaretlenmiş hücreler A:Deksametazon grubu B:Meperidin Grubu (Bar: 25µ)**

Vinorelbin ve deksametazon birlikte uygulandığında ise BrdU ile işaretlenme oranı 24. saatte %11,27; 48. saatte %3,89 ve 72. saatte %0,15 olarak belirlendi. Kontrol



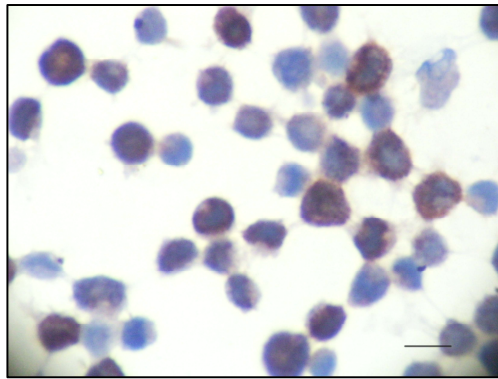
grubuyla kıyaslandığında bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,01$ )(Şekil 4-10A). Tek başına deksametazon ile kıyaslandığında da sonuç anlamlıydı ( $p<0,01$ ). Dolayısıyla sentez fazında bulunan hücre sayısındaki bu azalmanın vinorelbin etkisinde gerçekleştiği söylenebilir.

Vinorelbin ve meperidin kombinasyon grubunda oranlar 24. saatte %12,76; 48. saatte %3,1 ve 72. saatte %0,15 olarak bulundu. Tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla anlamlılık mevcuttu ( $p<0,01$ )(Şekil 4-10B). Tek başına meperidin ile kıyaslandığında vinorelbinin S fazı inhibisyonunu meperidin etkilemediği saptandı ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4-10: 24.saat BrdU ile işaretlenmiş hücreler A:Vinorelbin+deksametazon grubu B:Vinorelbin+meperidin grubu (Bar: 25µ)**

Deksametazon ve meperidin birlikte uygulandığında 24. saatte %26,45; 48. saatte 25,46 ve 72. saatte %23,64 oranında sentez fazındaki hücre oranını azalttığı tespit edildi. Bu değerler kontrole göre her saatte anlamlı bulundu ( $p<0,01$ )(Şekil 4-11).

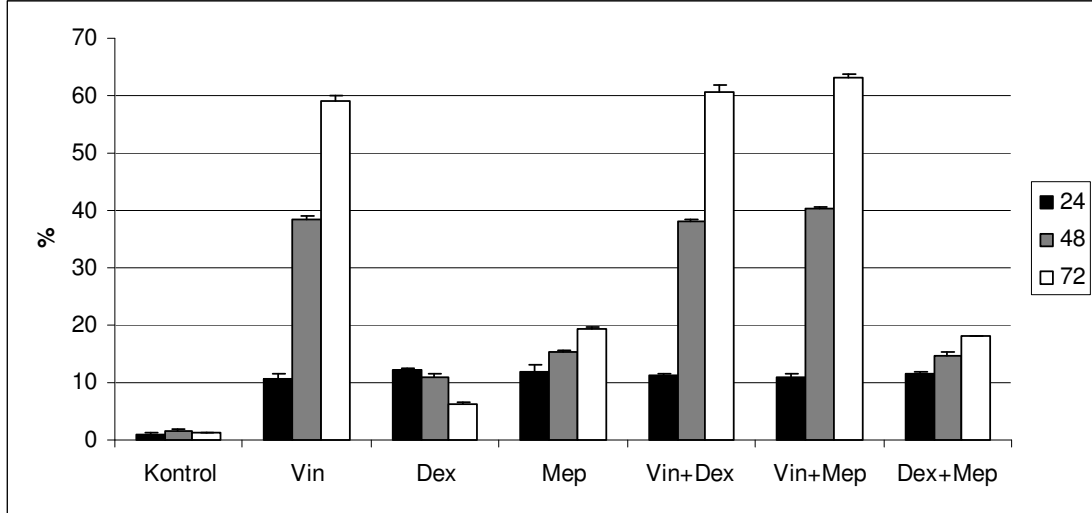


**Şekil 4-11: 24.saat deksametazon+meperidin grubu BrdU ile işaretlenmiş hücreler (Bar: 25µ)**

Her iki ilacın tek başına uygulanması ile kıyaslandığında birlikte uygulanmasının yarattığı inhibisyon anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

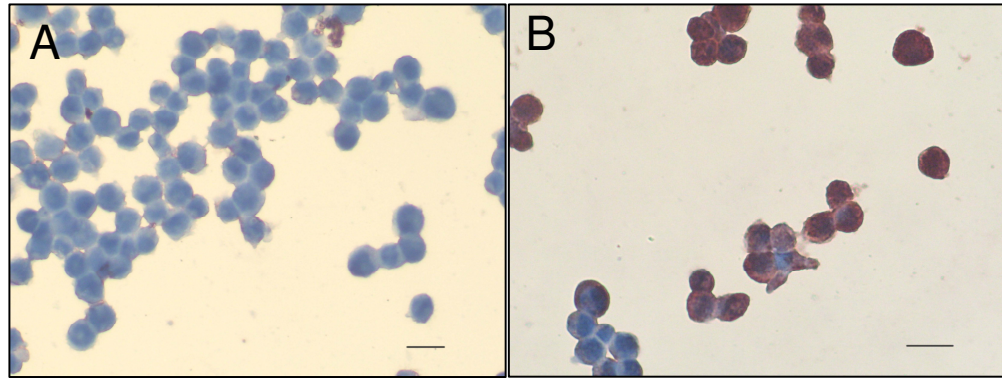
#### 4.4. Kaspaz 3 ile İşaretlenme Oranları

Kontrol grubunda kaspaz-3 ile işaretlenme oranı 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla %0,95; %1,44 ve %1,1 olarak belirlendi (Şekil 4-12 ve 4-13A).



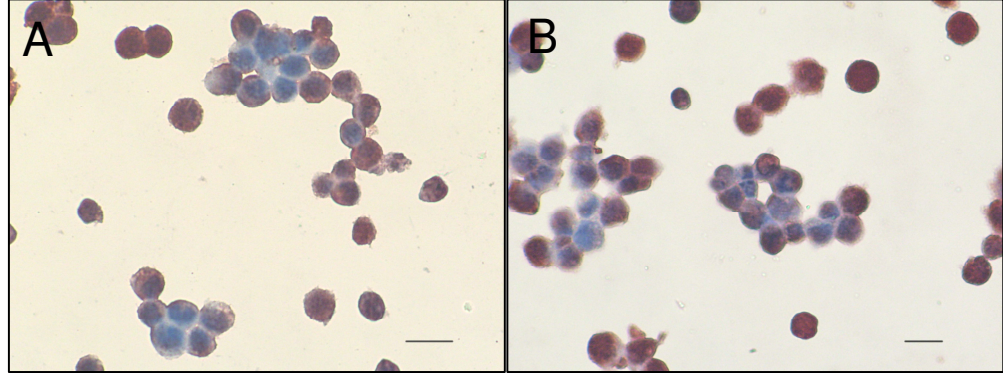
Şekil 4-12: Kaspaz-3 ile işaretlenme oranları

Vinorelbin uygulandığında ise 24. saatte %10,77; 48. saatte %38,51 ve 72. saatte %59,02 oranında zamana bağlı bir artış olduğu tespit edildi ( $p<0,01$ ) (Şekil 4-13B).



Şekil 4-13: 24.saat anti-kaspaz-3 ile işaretlenmiş hücreler A:Kontrol grubu B:Vinorelbin grubu (Bar: 25µ)

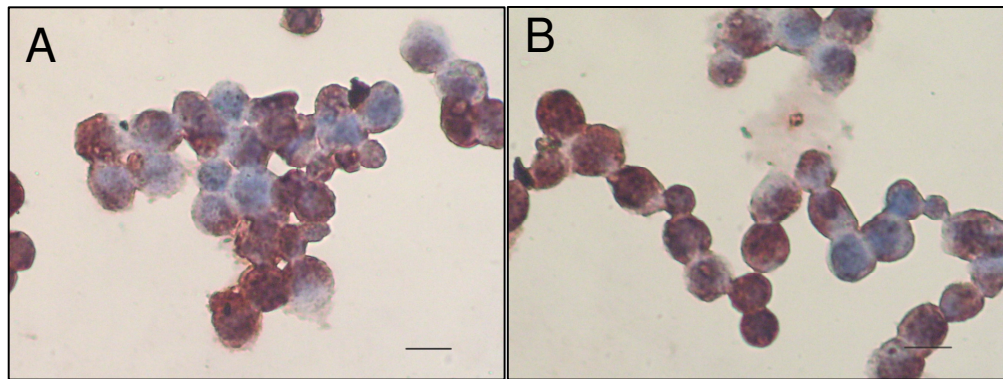
Deksametazon grubunda 24. saatte %12,1; 48. saatte %11,08 ve 72. saatte %6,3 oranında işaretlenme mevcuttu (Şekil 4-14A) ve kontrol grubu verileri ile kıyaslandığında bu artış anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ). Meperidin uygulanan hücrelerde kaspaz-3 ile işaretlenme oranı 24.saatte %11,98; 48. saatte %15,27 ve 72.saatte %19,3 olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi ( $p<0,01$ )(Şekil 4-14B).



**Şekil 4-14: 24. saat anti-kaspaz-3 ile işaretlenmiş hücreler A:Deksametazon grubu B:Meperidin grubu (Bar: 25µ)**

Vinorelbin deksametazon ile kombine edildiğinde kaspaz-3 ile işaretlenme oranı 24. saatte %11,24; 48. saatte %38,05; 72. saatte %60,6 olarak belirlendi ( $p<0,01$ )(Şekil 4-15A). Kontrol grubuyla kıyaslandığında her saatte istatistiksel olarak anlamlılık mevcuttu ( $p<0,01$ ). Tek başına deksametazon ile kıyaslandığında 24. saatte anlamlılık içermezken ( $p>0,05$ ), 48 ve 72. saatte anlamlılık içeriyordu ( $p<0,01$ ). Bundan dolayı 48 ve 72. saatlerdeki artışın vinorelbin etkisinde gerçekleştiği belirlendi.

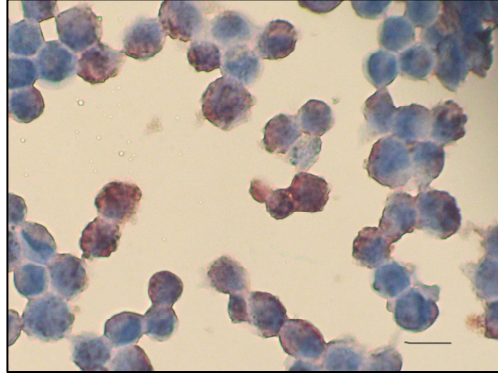
Vinorelbin+meperidin uygulanan grupta kaspaz-3 ile işaretlenme değerleri 24. saatte %11; 48. saatte %40,2 ve 72. saatte %63 olarak belirlendi (Şekil 4-15B). Kontrol grubuyla kıyaslandığında bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,01$ ). Tek başına meperidin ile kıyaslandığında 24. saatte anlamlı bulunmazken ( $p>0,05$ ), 48 ve 72. saatlerde vinorelbinin tetiklediği kaspaz-3 aktivasyonunu etkilememiştir ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4-15: 24. saat anti-kaspaz-3 ile işaretlenmiş hücreler A:Vinorelbin+deksametazon grubu B:Vinorelbin+meperidin grubu (Bar: 25µ)**

Deksametazon ve meperidin kombinasyon grubunda oranlar 24. saatte %11,5; 48. saatte %14,6 ve 72. saatte %18,03 olarak bulundu (Şekil 4-16). Tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla anlamlılık mevcuttu ( $p<0,01$ ).



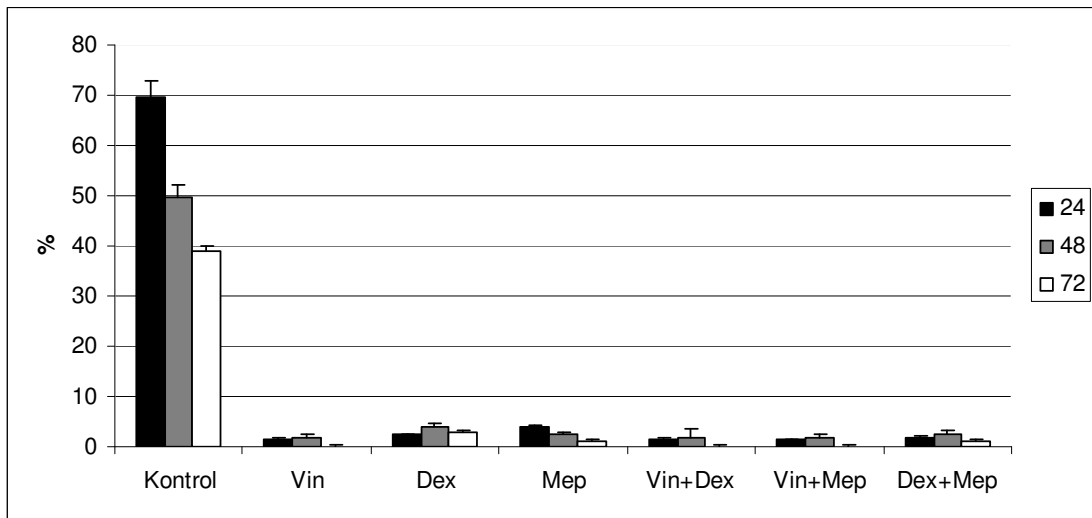


**Şekil 4-16: 24. saat anti-kaspaz-3 ile işaretlenmiş hücreler deksametazon+meperidin grubu (Bar: 25µ)**

Her iki ilacın tek başına uygulanması ile kıyaslandığında birlikte uygulanmalarının yarattığı kaspaz-3 aktivasyonu sadece 72. saatte anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

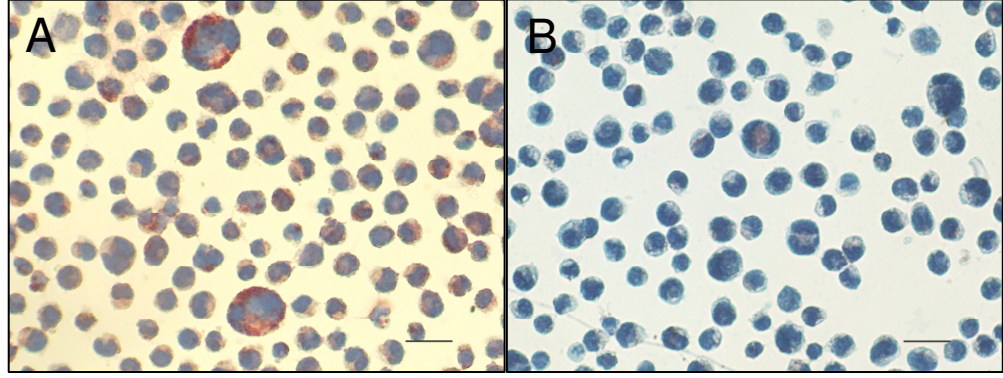
#### 4.5. Bcl-2 ile İşaretlenme Oranları

Kontrol grubunda işaretlenme oranları 24. saatte %69,4; 48. saatte %49,5 ve 72. saatte %38,77 olarak belirlendi (Şekil 4-17, 4-18A).



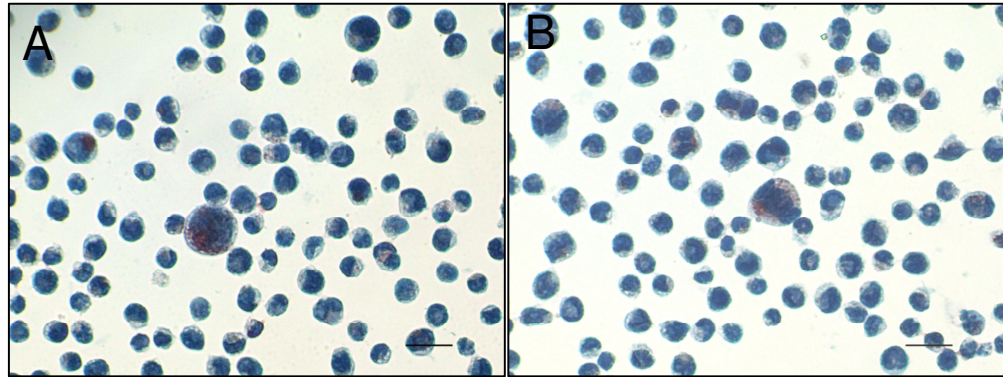
**Şekil 4-17: Bcl-2 ile işaretlenme oranları**

Vinorelbin uygulandığında işaretlenme oranları 24. saatte %1,36; 48. saatte %1,8 ve 72. saatte %0,15 olarak bulundu (Şekil 4-18B). Kontrol grubu ile kıyaslandığında vinorelbinin bcl-2 oranını anlamlı derecede azalttığı belirlendi ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4-18: 24.saat anti-bcl-2 ile işaretlenmiş hücreler A:Kontrol grubu B:Vinorelbin grubu (Bar: 25µ)**

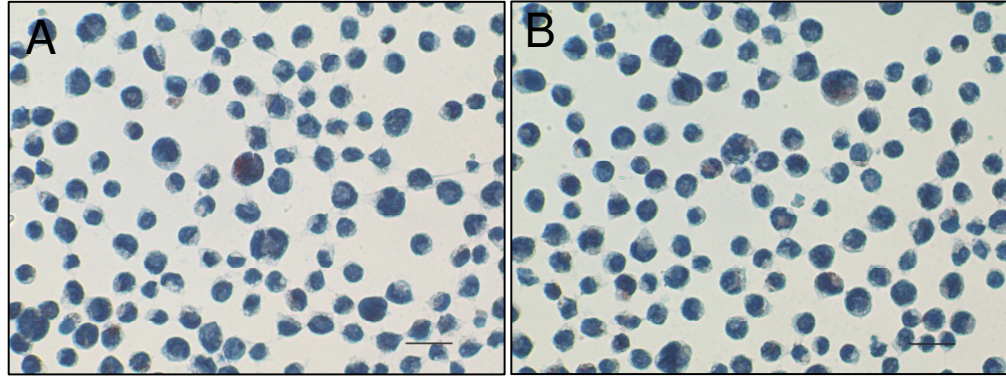
Deksametazon uygulandığında bcl-2 oranının 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla %2,32; %4,16 ve %2,92 olduğu belirlendi(Şekil 4-19A). Kontrol grubuna oranla anlamlı düşüş saptandı ( $p<0,01$ ). Meperidin grubunda bcl-2 işaretlenme oranları 24. saatte %3,75; 48. saatte %2,41 ve 72. saatte %1,24 olarak bulundu (Şekil 4-19B). Kontrole göre her saatte anlamlı azalma mevcuttu ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4-19: 24. saat anti-bcl-2 ile işaretlenmiş hücreler A:Deksametazon grubu B:Meperidin grubu (Bar: 25µ)**

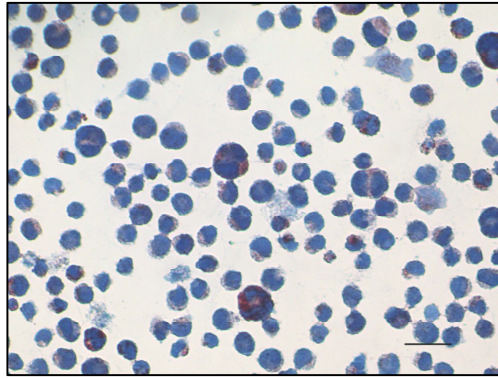
Vinorelbin ve deksametazon kombinasyon grubunda oranlar 24. saatte %1,46; 48. saatte %1,93 ve 72. saatte %0,15 olarak belirlendi(Şekil 4-20A). Tüm saatlerde değerler kontrole göre anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ). Tek başına deksametazon ile kıyaslandığında 24, 48 ve 72. saatte vinorelbinin bcl-2 inhibisyonunu etkilemediği bulundu ( $p<0,01$ ).

Vinorelbin ve meperidin birlikte uygulandığında 24. saatte %1,27; 48. saatte %1,86 ve 72. saatte %0,15 olarak belirlendi(Şekil 4-20B). Kontrol grubu ile kıyaslandığında bcl-2 inhibisyonu anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ). Meperidin'in vinorelbinin etkisini 24, 48 ve 72. saatte etkilemediği bulundu ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4-20: 24. saat anti-bcl-2 ile işaretlenmiş hücreler A:Vinorelbin+deksametazon grubu B:Vinorelbin+meperidin grubu (Bar: 25µ)**

Deksametazon ve meperidin kombinasyon grubunda oranlar 24. saatte %1,77; 48. saatte %2,48 ve 72. saatte %1,14 olarak belirlendi(Şekil 4-21). Tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla anlamlılık mevcuttu ( $p<0,01$ ).

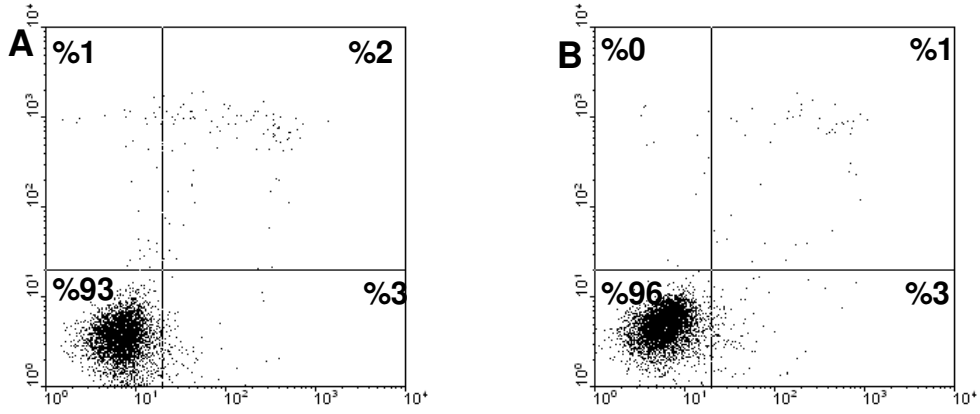


**Şekil 4-21: 24. saat anti-bcl-2 ile işaretlenmiş hücreler deksametazon+meperidin grubu (Bar: 25µ)**

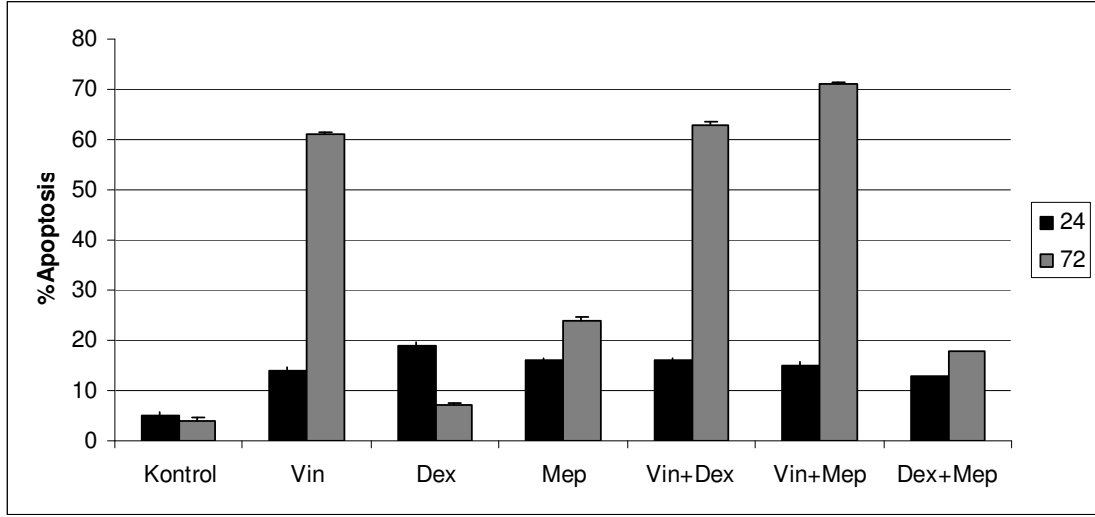
Her iki ilacın tek başına uygulanması ile kıyaslandığında birlikte uygulanmasının yarattığı inhibisyon sadece 24. saatte anlamlıydı ( $p<0,01$ ).

#### **4.6. Flow Sitometrik Analiz Sonuçları**

Flow sitometri ile belirlenen apoptozis oranı kontrol grubunda 24. saatte %5, 72. saatte ise %4 (Şekil 4-22) olarak belirlendi (Şekil 4-23).

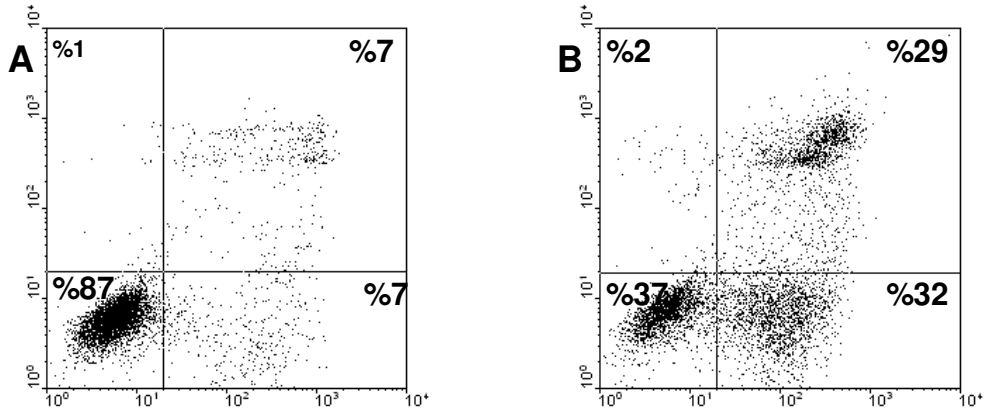


Şekil 4-22: Kontrol grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72. saat



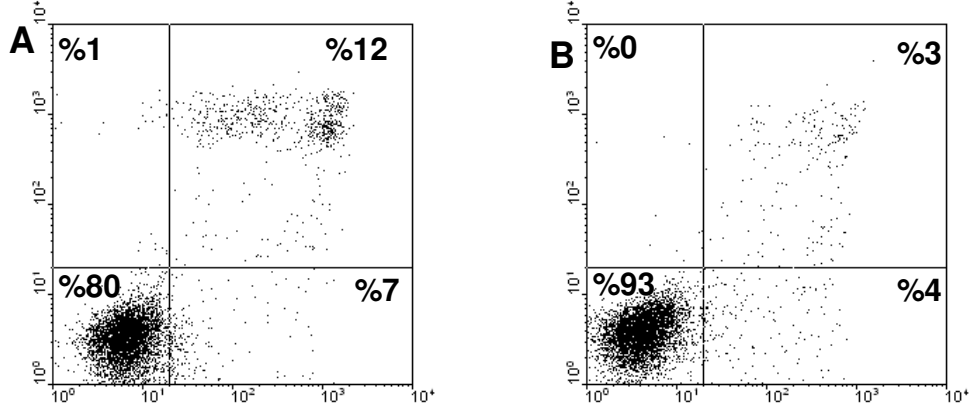
Şekil 4-23: Apoptozis oranları

Vinorelbin grubunda oran 24. saatte %14 iken 72. saatte %61 (Şekil 4-24) e yükseldi ve kontrole göre anlamlıydı ( $p < 0,01$ ).



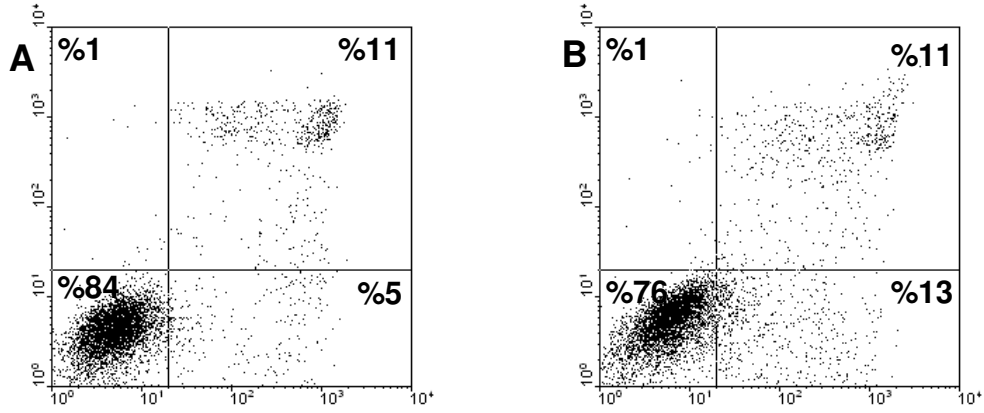
**Şekil 4-24: Vinorelbin grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72.saat**

Deksametazon uygulandığında 24. saatte %19 olan apoptozis oranı 72. saatte %7 (Şekil 4-25) ye düştü ( $p<0,01$ ).



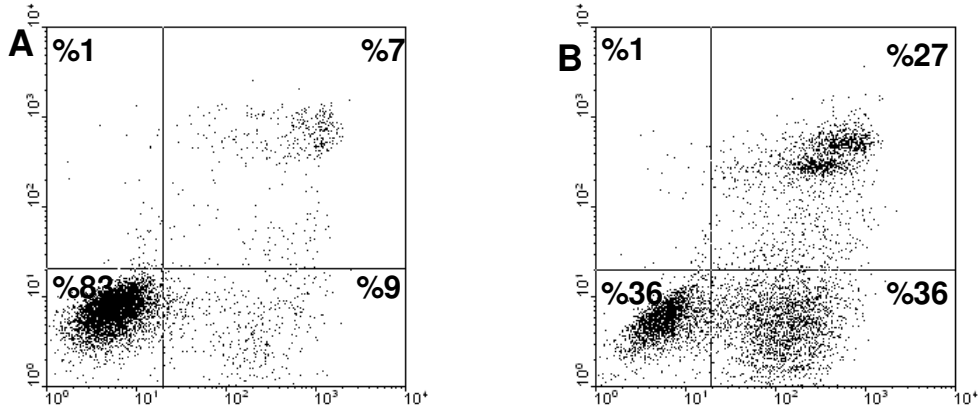
**Şekil 4-25: Deksametazon grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72.saat**

Meperidin 24. saatte %16 oranında apoptozise yol açarken 72. saatte bu oranı %24 (Şekil 4-26) oranına yükseltti ( $p<0,01$ ).



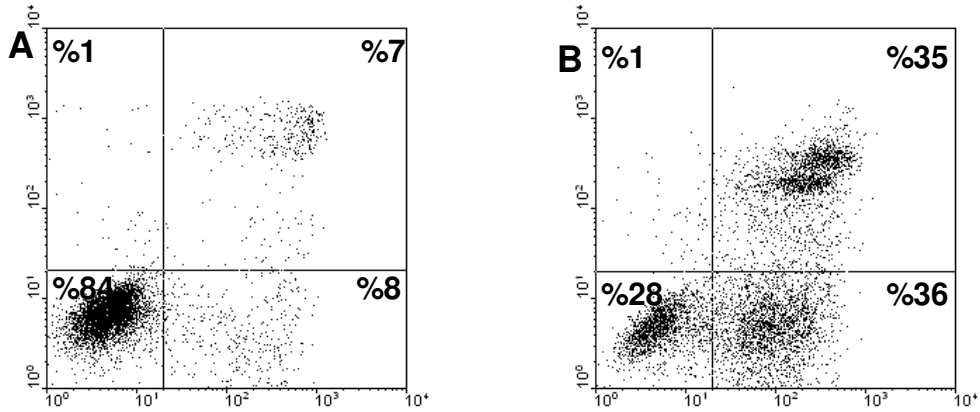
**Şekil 4-26: Meperidin grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72.saat**

Vinorelbin+deksametazon grubunda 24. saatte %16 olan apoptozis oranı 72. saatte %63 (Şekil 4-27) e yükseldi ( $p<0,01$ ). Deksametazonun vinorelbinin etkisini 24 ve 72. saatte etkilemediği bulundu ( $p<0,01$ ).



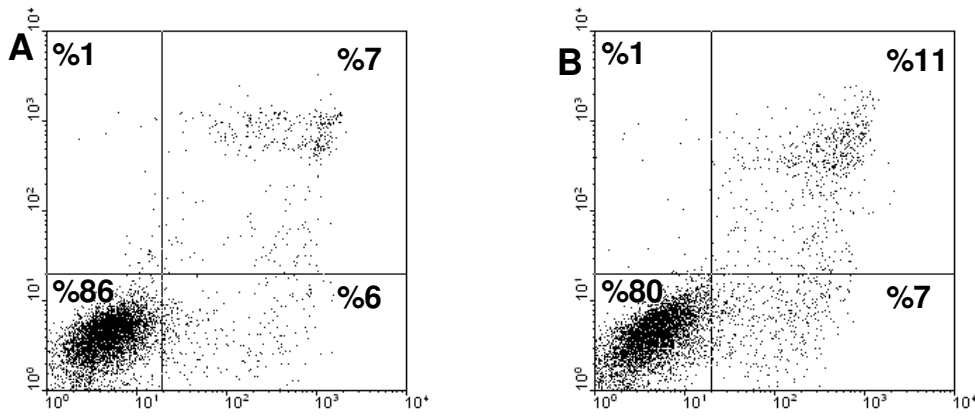
**Şekil 4-27: Vinorelbin+Deksametazon grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat B: 72.saat**

Vinorelbin meperidin ile kombine uygulandığında ise 24. saatte %15, 72. saatte %71 (Şekil 4-28) oranında apoptozisi arttırdığı belirlendi ( $p<0,01$ ). Meperidinin vinorelbinin etkisini 72. saatte arttırdığı belirlendi ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4-28: Vinorelbin+Meperidin grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B: 72.saat**

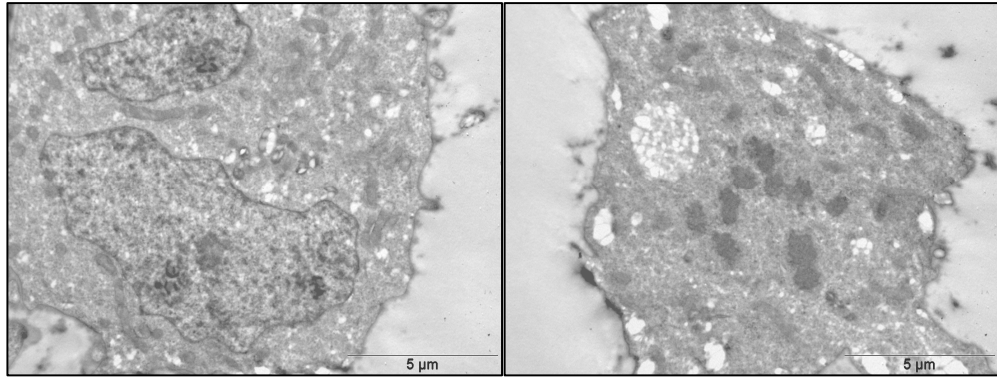
Deksametazon+meperidin kombinasyonundaki apoptozis oranı ise 24. saatte %13, 72. saatte %18 (Şekil 4-29) olarak saptandı ( $p<0,01$ ). İlaçların tek başına uygulanmaları ile kıyaslandığında birlikte uygulanması sonucu oluşan apoptozis oranındaki artış anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4-29: Deksametazon+Meperidin grubu flow sitometri sonucu A: 24.saat, B:72.saat**

#### 4.7. Transmisyon Elektron Mikroskop Bulguları

Kontrol grubu hücrelerinde genel morfoloji doğaldı (Şekil 4-30). Hücrelerin nukleusu düzgün sınırlı heterokromatik ve iyi gelişmiş nukleolusa sahipti. Sitoplazmaları serbest ribozomdan zengindi ve düzgün kristalara sahip mitokondriler ile çubuk şekilli sisternalara sahip granüllü endoplazma retikulumu içeriyordu. Hücreler sitoplazmik organeller açısından zengindi. Kontrol grubunda mitoz daha sık olarak izlenmekteydi. Hücre ölümü ve apoptozis nadir olarak izlenmekteydi.

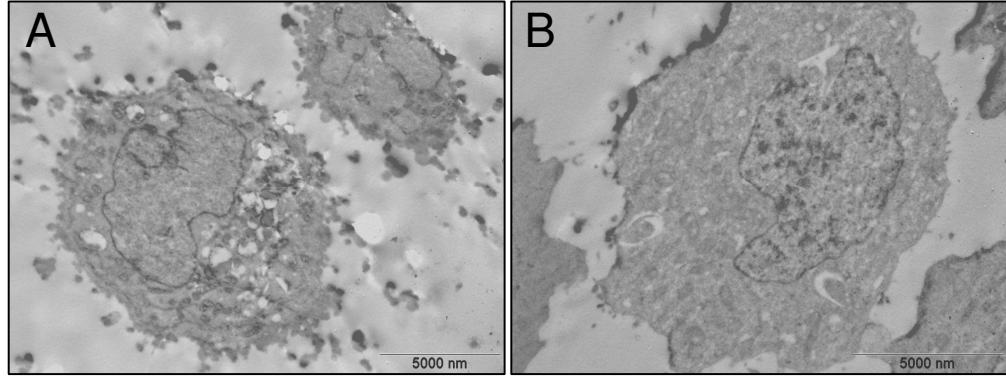


**Şekil 4-30: 24 saat kontrol grubu elektron mikroskop görüntüleri**

Vinorelbin uygulanan gruptaki hücrelerin morfolojisi bozuktı (Şekil 4-31A). Kontrol grubuna kıyasla nekroz ve apoptozisin daha sık olduğu gözlemlendi. Hücrelerin sitoplazmik içerikleri daha fakirdi ve hücrelerin sitoplazmik uzantıları kontrol grubuna göre azalmıştı. Endoplazmik retikulumdan farklılaşan intrasitoplazmik sisternaların görülmesi mikrotubul depolimerizasyonuna işaret etmektedir.

Deksametazon uygulanan gruptaki hücrelerde genel olarak kontrol grubuna benzer bir yapı görüldü (Şekil 4-31B).

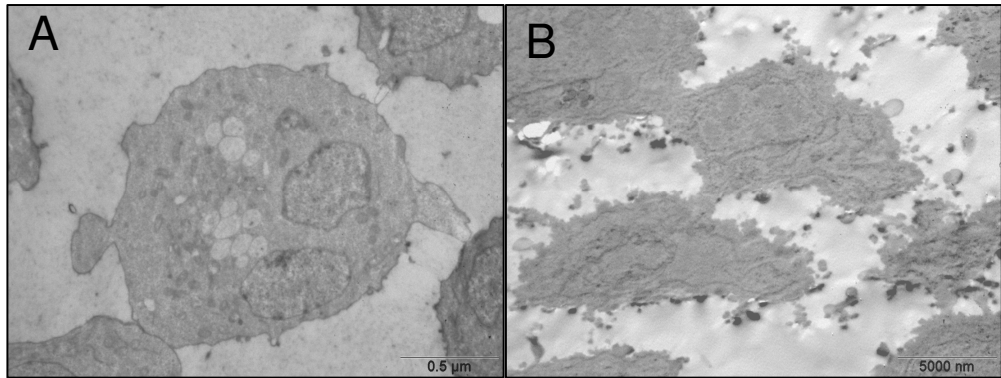




**Şekil 4-31: 24 saat elektron mikroskopi görüntüleri A:Vinorelbin grubu B:Deksametazon grubu**

Meperidin uygulanan gruptaki hücrelerde ise mitokondrilerde küçülme, vakuolizasyon ve hücre yüzey villuslarının azaldığı görülmektedir (Şekil 4-32A).

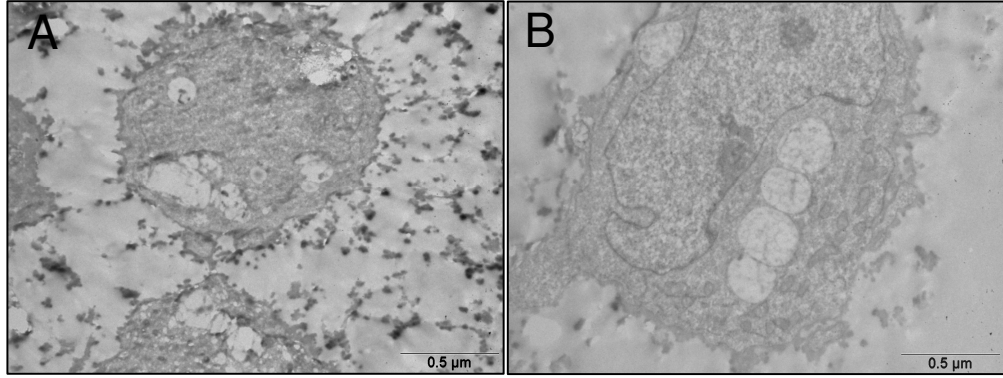
Vinorelbin+Deksametazon uygulanan hücreler kontrol grubundan farklı fakat vinorelbin grubuna benzer olarak bozuktur (Şekil 4-32B). Apoptozise giden hücrelere ilaveten ekstrasellüler alanda çok miktarda apoptotik cisimcikler görülmektedir. Ayrıca tek başına vinorelbin uygulanan gruptakine benzer şekilde hücrelerde intrasitoplazmik sisternaların arttığı açıkça görülmektedir.



**Şekil 4-32: 24 saat elektron mikroskopi görüntüleri A:Meperidin grubu B:Vinorelbin+deksametazon grubu**

Vinorelbin+meperidin kombinasyon grubunda hücrelerde yine vinorelbinin etkisi ile oluşan intrasitoplazmik sisternalar çok miktardadır (Şekil 4-33A). Apoptozise giden hücrelere ilaveten nekrotik hücreler de görülmektedir. Tek başına meperidin uygulanan gruptakine benzer şekilde hücre içinde vakuolizasyonun artmış olduğunu görmekteyiz. Deksametazon+meperidin uygulandığında hücrelerde vakuolizasyonun arttığı ve hücre uzantılarının azaldığı bulgularına rastlandı (Şekil 4-33B).





**Şekil 4-33: 24 saat elektron mikroskopi görüntüleri A:Vinorelbin+meperidin grubu  
B:Deksametazon+meperidin grubu**

Sonuç olarak tüm deney grubu hücreleri kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda mitoz, daha fazla sayıda apoptotik hücre ve daha az hücre uzantısı içermektedir. Vinorelbinin deksametazon ve meperidin ile kombine edildiğinde hücreler apoptotik hücrelerin varlığı açısından vinorelbin grubuna benzemekle birlikte vinorelbin grubundan farklı olarak meperidin ile olan kombinasyonu belirgin oranda vakuolizasyon içermektedir.

## 5. TARTIŞMA

Vinorelbin, yarı sentetik vinka alkaloididir ve antitümöral aktiviteye sahiptir. Vinorelbinin lösemi üzerine etkileri halen tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan bir çalışmada vinorelbinin, lösemi hücre soyları üzerinde doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (49). Myeloma hücre soyları ile yapılan bir çalışmada da vinorelbinin hücre büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur (58). Bizim çalışmamızda vinorelbinin HL-60 insan promyelositik lösemi hücreleri üzerine antiproliferatif etkiye sahip olduğu saptandı. Sonuçlarımıza bakıldığında vinorelbin, 24, 48 ve 72. saatlerde hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde durdurdu ( $p<0,01$ ).

Vinka alkaloidler mitotik iğ iplikleri ile etkileşip mikrotubul depolimerizasyonunu etkileyerek mitozu metafazda durdurur (54). Tubuline yüksek bağlanma yatkınlığında olup antitümör aktivite sergilerler (84). Deneyimizde 72 saat vinorelbin uygulamasının BrdU-LI düzeyini belirgin ölçüde azalttığı saptandı. Bu bulgu vinorelbinin mitotik mikrotubul polimerizasyonunu engelleyerek hücre siklusunu G2/M geçişinde durdurduğu bilgisiyle paralellik içermektedir (13).

Yapılan son çalışmalarda vinorelbinin sadece akciğer adenokarsinoma hücrelerinde değil (4, 30), aynı zamanda lenfoma ve lösemi hücrelerinde de apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (4, 77). Apoptozis açısından yaptığımız değerlendirmelerde vinorelbin uygulanan gruptaki hücrelerin 24, 48 ve 72. saatlerde kaspaz-3 ile pozitif işaretlendiği ve bu işaretlenme oranının kontrole göre yüksek değerlerde ve anlamlı olduğu bulundu. Yapılan bcl-2 immünohistokimya boyaması ile kontrol grubunda pozitif hücre sayısı 24. saatte %69,4; 48. saatte %49,5 ve 72. saatte %38,77 olarak belirlendi. Vinorelbinin bcl-2 aktivasyonunda kontrole göre anlamlı azalmaya yol açtığı tespit edildi. Flow sitometrik analiz sonuçlarına göre de vinorelbinin 24. saatte %14 oranında apoptozise neden olduğu, 72. saatte bu oranın %61'e yükseldiği bulundu. Açıkça görülmektedir ki vinorelbin bcl-2 aktivasyonunu engelleyerek kaspaz-3 aktivasyonu ile hücreyi apoptozise götürmektedir.

Bcl-2 nin aşırı ekspresyonu apoptozisi inhibe eder (63). Artmış olan bcl-2 oranı löseminin zayıf prognozu ile ilişkili olup iki etki gösterir. Birincisi canlı kalımı düzenleyerek dolaşımdaki blast populasyonunu genişletebilir. İkincisi, steroid hormon ve sitostatik ilaçların sebep olduğu apoptozisi engelleyerek kemoterapiye cevabı tersine

çevirebilir. Bcl-2nin aşırı ekspresyonu erişkin AMLde zayıf prognoz ve yüksek oranda WBC ile ilişkilidir (15).

Lösemili hastalardan elde edilen hücreler ile yapılan bir çalışmada vinorelbinin kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (77). Yapılan bir başka çalışmada ise, akut lenfoblastik lösemi (ALL), kronik lenfositik lösemi (KLL) ve akut myeloid lösemi (AML) olan hastalardan taze olarak elde edilen primer lösemi hücrelerinde vinorelbinin apoptozise yol açtığı flow sitometrik analiz ile gösterilmiştir (80). Myeloma hücre soyları ile yapılan bir çalışmada da flow sitometrik analiz ile vinorelbinin apoptozise neden olduğu bulunmuştur (58).

Kemoterapi ve radyoterapi çeşitli yan etkilere sahiptir. Glukokortikoidler yardımcı tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır çünkü pro-apoptotik etkilere sahiptir ve bulantı-kusma durumunu ve normal doku üzerine akut toksisiteyi azaltıcı etkilere sahiptir. Glukokortikoidlerin hücre kültüründe lenfoid hücreler üzerine pro-apoptotik ve anti-proliferatif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (36, 66, 67). Glukokortikoidlerin lenfositler, myeloma hücreleri ve lenfoma hücreleri gibi bazı hücre tiplerinde sitotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (26). Ayrıca AML li hastalardan elde edilen lösemi hücreleri ile yapılan bir çalışmada deksametazonun kontrole göre hücre sayısını azalttığı bulunmuştur (60). Deneyimizde de deksametazon 10µM dozunda 24 ve 48. saatlerde hücre sayısını anlamlı şekilde azalttı ( $p<0,01$ ). 72. saatte meydana gelen hücre sayısındaki azalma kontrole göre anlamlı bulunmadı ( $p>0,01$ ). Deksametazon vinorelbin ile kombine edildiğinde 72 saat boyunca proliferasyon inhibisyonu gerçekleşti ( $p<0,01$ ) ancak deksametazonun vinorelbinin proliferasyonu inhibe edici etkisine ilave bir etki sağlamadığı bulundu ( $p>0,05$ ).

BrdU ile işaretlenme oranı deksametazon grubunda 24 ve 72. saatlerde kontrole yakın değerlerde bulundu ( $p>0,05$ ). 48. saatte kontrole göre sentez fazındaki hücre oranında görülen azalma ise anlamlıydı ( $p<0,05$ ). Deksametazonun vinorelbinin sentez fazında yol açtığı inhibe edici etkisine ilave bir etki göstermediğini bulduk. Yapılan bir çalışmada akut lösemili 26 hastanın kanından izole edilen lökosit popülasyonunda çeşitli parametreler ölçülmüştür. Deksametazon ile indüklenen hücre ölümü ile S fazındaki hücre sayısının ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (40).

Çalışmamızda deksametazon kontrole göre anlamlı oranda kaspaz-3 aktivasyonu sağladı ( $p<0,01$ ). Yapılan bir çalışmada deksametazonun multiple myeloma (MM)

hücrelerinde apoptozisi indüklenme mekanizması araştırılmıştır. Bunun için 4 glukokortikoid reseptörünün mutantları eksprese edilmiş ve bu mutant genleri içeren hücrelerin deksametazon uygulanınca kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozise gittiği flow sitometrik analiz ile gösterilmiştir (69).

Kaspazlar (cysteine proteases with aspartate specificity), apoptozisin önemli araçlarıdır. Kaspazların aktivasyonu transkripsiyonel aktivasyon, apoptozis inhibe eden proteinlerin (IAP) regülasyonu, otoaktivasyon veya diğer kaspazlar tarafından yarıklanma gibi birçok mekanizma sonucu gerçekleşir (11, 22, 57, 76). Şu ana kadar kaspaz ailesinin 14 üyesi tanımlanmıştır. Bunlar üç grupta sınıflandırılabilir (57): başlatıcı kaspazlar (-8, -9, -10 ve -12), efektör kaspazlar (-3, -6 ve -7) ve inflamasyon kaspazlar (-1, -11). Kaspaz-3 ve kaspaz-6 efektör kaspazlardır. Nükleazların laminler ve PARP gibi hücrel substratlara ayrılmasını sağladığı bilinmektedir (50, 59). Yapılan bir çalışmada glukokortikoidlerin pre-B lösemi 697 hücrelerinde kaspaz-6'nın aktivasyonuna neden olduğu kaspaz-3ü aktive etmediği gösterildi (55). Bir başka çalışmada ise deksametazonun osteoblastlarda hem kaspaz-3 hem de kaspaz-6 aktivasyonuna yol açtığı belirlendi (18).

Deksametazon ve vinorelbin kombine uygulandığında ise deksametazon vinorelbinin sağladığı kaspaz-3 aktivasyonunu 24. saatte arttırdı fakat 48 ve 72. saatte sadece vinorelbinin etkisinde artış gerçekleşti.

Lösemi hücre soyları ile yapılan bir çalışmada hücrelerin deksametazona hassasiyeti ile bcl-2 seviyeleri arasında ters korelasyon olduğu bulunmuştur (70). Çalışmamızda deksametazon bcl-2 aktivasyonunu 24, 48 ve 72. saatte inhibe etti ( $p<0,01$ ). Vinorelbin ile kombinasyonunda da anlamlı inhibisyon gerçekleşti ( $p<0,01$ ) fakat bu etki vinorelbinin sağladığı bir etki olarak yorumlandı.

Flow sitometri ile belirlenen apoptozis oranı deksametazon uygulandığında 24. saatte %19 iken 72. saatte %7 olarak bulundu. Deksametazon vinorelbin ile kombine edildiğinde ise apoptozis oranı 24. saatte %16 dan 72 saatte %63 e yükseldi. Bu sonuç tek başına vinorelbin uygulanan grubun sonuçlarına benzerdi.

Glukokortikoidler etkilerini nüklear reseptör süperailisinde yer alan ve ligand ile indüklenen transkripsiyon faktörü glukokortikoid reseptörü (GR) vasıtasıyla gösterirler (7). Glukokortikoidler GR ile apoptozise aracılık ederler. GR sitoplazmik heteromerik komplekstir ve steroid/DNA bağlayıcı alt ünite ve ısı şok proteini hsp90 dimeri içerir

(9). GR, hormon bağımlı transkripsiyonel modulator proteinlerin steroid/tiroid reseptör ailesinin üyesidir (16, 25, 82). Glukokortikoid ile indüklenen apoptozisde sinyal yolunun ilk aşaması steroidin GRye bağlanmasıdır. Steroid reseptör kompleksi daha sonra transformasyon ve aktivasyon sürecine girer ve nukleusa transloke olur. Glukokortikoide cevap veren element olarak bilinen spesifik DNA sekuensine bağlanır (6, 16, 25, 82). Spesifik reseptör-DNA etkileşimi glukokortikoide cevap veren genlerin indüksiyonu veya baskılanmasına neden olur. Yapılan bir çalışmada GR aracılığı ile indüklenen apoptozisin rolünü daha iyi anlamak için insan akciğer ve servikal kanser hücrelerinde kanser terapisi aracılı ölüm üzerine deksametazonun etkisi çalışılmış. Şaşırtıcı olarak ve lenfoid hücreler ile elde edilen sonuçlara zıt olarak deksametazonun kullanılan kanser hücrelerinde güçlü antiapoptotik etkiye sahip olduğu ve kanser terapisi ile indüklenen tümör küçülmesini ve apoptozisi önlediği bulunmuştur. Bunun nedeni kaspaz aktivitesinin durması ile sonuçlanan mitokondriyal apoptozis yolağı ve ölüm reseptörünün anahtar moleküllerinin inhibisyonunu sağlamasıdır (36).

Çalışmamızı destekleyen lenfoid hücrelerde yapılan çalışmalarda deksametazon ile apoptozisin arttığı ve CD95, kaspaz-3 ve kaspaz-4 gibi proapoptotik genlerin ekspresyonu artarken, antiapoptotik moleküller bcl-2 ve bcl-x<sub>L</sub> ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (17, 29, 68, 78). Primer çocukluk çağı ALL örnekleri ve CCRF-CEM hücre soyunda da deksametazon uygulandığında bcl-2 ve bcl-x<sub>L</sub> in ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (48). Yapılan bir başka çalışmada da bcl-2 nin glukokortikoid uygulanan insan pre-B lenfositlerinin apoptozisini bloke ettiği ve bunun c-myc ekspresyonunun baskılanması ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (3).

Ayrıca deksametazonun nötrofillerde mitokondrial membran bütünlüğünü koruduğu, kaspaz-9 aktivasyonunu geciktirdiği ve spontan apoptozis oranını azalttığı gösterilmiştir (52).

Opioid ilaçlar neoplastik büyüme ve ilerlemenin çeşitli aşamalarındaki kanser hastalarında ağrı kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır (27).

Deneyimizde kullandığımız opioid sınıfı ilaçlardan biri olan meperidin 72 saat boyunca anlamlı proliferasyon inhibisyonu yarattı ( $p < 0,01$ ). Yapılan bir çalışmada endojenik  $\mu$ -opioid reseptör agonisti olan endomorfın 1 (EM1) ve endomorfın 2 (EM2)nin antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir (27). Vinorelbinin sağladığı

proliferasyon inhibisyonu etkisini 72. saatte az oranda arttırdığı görülmektedir fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0,05$ ).

Meperidin uygulanan grupta sentez fazındaki hücre sayısında 48 ve 72. saatte kontrole göre anlamlı azalma meydana geldi ( $p<0,01$ ). Vinorelbin tek başına BrdU-LI oranını anlamlı bir şekilde düşürdü. Ancak meperidinin vinorelbinin sağladığı bu düşüşe ilave bir etki yaratmadığı tespit edildi ( $p<0,01$ ).

Meperidin uygulanan grupta kaspaz-3 ile işaretli hücre sayısı 72 saat boyunca anlamlı şekilde arttı ( $p<0,01$ ). Yapılan bir çalışmada morfinin oksidatif metaboliti olan morfinonun HL-60 ve HSC-2 (oral yassı hücre kanseri) hücre soylarında kaspaz-8 ve kaspaz-9u aktive etmediği fakat doza bağlı olarak kaspaz-3ü aktive ettiği gösterilmiştir. Burdan yola çıkarak morfinonun HL-60 hücrelerinde apoptotik olmayan hücre ölümünü indüklediği öne sürülmüştür (73). Çalışmamızda vinorelbin ve meperidin kombinasyonunda da anti-kaspaz-3 işaretli hücre sayısının kontrole göre anlamlı oranda arttığı bulundu ( $p<0,01$ ). Her iki ilacın tek başına ve birlikte kullanımları anti-kaspaz-3 işaretli hücre sayısını arttırdı. Fakat bu artış vinorelbin grubuna benzerdi. Kombine kullanım vinorelbinin etkisini azaltıcı ya da arttırıcı etki göstermedi.

HL-60 hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada kodeinin oksidatif metaboliti olan kodeinonun internükleozomal DNA fragmentasyonunu indüklediği bulunmuştur. Ayrıca kodeinonun kaspaz-8 ve kaspaz-9'u aktive etmediği, doza bağlı olarak kaspaz-3ü aktive ettiği gösterilmiştir (72).

Meperidin bcl-2 işaretlenme oranlarında 24. saatte %3,75; 48. saatte %2,41 ve 72. saatte %1,24 olarak anlamlı azalmaya yol açtı ( $p<0,01$ ). Endojenik  $\mu$ -opioid reseptör agonisti olan endomorfınlerin HL-60 hücrelerinde bcl-2 seviyesini düşürdüğü, Bax, Fas ve FasL ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. Sonuç olarak endomorfınlerin HL-60 hücrelerinde Bcl-2-Bax ve Fas-FasL aktivasyonu yoluyla apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (51). Çalışmamızda meperidin vinorelbinin tek başına sağladığı bcl-2 inhibisyonu etkisini 24, 48 ve 72 saatlerde etkilemediği tespit edildi.

Flow sitometrik analiz ile kodeinonun HL-60 hücrelerinde apoptotik hücrelerde artışa yol açtığı gösterilmiştir (39). Benzer olarak çalışmamızdaki flow sitometrik analiz sonuçlarına göre meperidin 24. saatte %16 oranında apoptozise yol açarken, 72. saatte bu oranın %24 olduğu ve kontrole göre apoptotik hücre sayısındaki artışın anlamlı olduğu bulundu ( $p<0,01$ ). Vinorelbin tek uygulandığında 24. saatte %14 olan apoptozis

oranı meperidin ile birlikte uygulandığında %15 olarak belirlendi. 72. saate ise vinorelbin tek başına uygulandığında %62 olan apoptozis oranı meperidin ile kombine edildiğinde %71 e yükseldiği bulundu. Sonuç olarak meperidinin 72. saatte vinorelbinin apoptotik etkisini arttırdığını tespit ettik.

Yapılan bir çalışmada HL-60 ve A549 (akciğer kanseri) hücre soylarına morfin uygulandığında erken apoptotik belirteçlerin üretildiği, MCF-7 (meme kanseri) hücrelerinde ise nekrotik hücrelerin artışının indüklendiği bulunmuştur (35). Yapılan bir başka çalışmada ise morfinin HL-60, A549 ve MCF-7 hücre soylarında sitotoksik aktivite gösterdiği ve apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca morfinin HL-60 hücre soyunda mitokondriyal Mn-içeren süperoksit dismutaz (MnSOD) aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (34).

Deksametazon ve meperidin birlikte uygulandığında 24. saatte hücre sayısında azalma kontrole göre anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ). Meperidin ve deksametazon sinerjistik etki göstererek hücre proliferasyonunu 48. saatte azalttı. BrdU ile işaretlenen hücre sayısı da kontrole göre anlamlı olarak her saatte azaldı. Her iki ilacın tek başına uygulanması ile kıyaslandığında birlikte uygulanmasının yarattığı inhibisyon anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ). Deksametazon ve meperidin birlikte kontrole göre anlamlı kaspaz-3 aktivasyonu sağladı. Tek başına uygulanmalarına kıyasla sadece 72. saatte sinerjistik etki bulundu. Deksametazon ve meperidin birlikte kontrole kıyasla anlamlı bcl-2 inhibisyonu sağladı. Birlikte uygulanmaları sadece 24. saatte anlamlı ilave etki sağladı.

Flow sitometri ile belirlenen apoptozis oranı 24. saatte %13, 72. saatte %18 olarak saptandı. İlaçların tek başına uygulanmaları sonucu oluşan apoptozis oranındaki artış anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

Vinorelbin mikrotubul depolimerizasyonu sağlayarak hücreyi metafaz evresinde durdurur ve böylece kontrolsüz hücre çoğalmasını önler. Gösterdiği bu antitümoral etki nedeniyle klinikte çeşitli tümör tiplerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Çalışmamızda vinorelbin HL-60 akut promyelositik lösemi hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etti ve sentez fazındaki hücre sayısında azalmaya neden oldu. Ayrıca bcl-2 seviyesinde azalmaya neden olarak ve kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozise neden olduğu belirlendi. Deksametazon antiinflamatuvar ve immünoşüpresif etkileri nedeniyle kemoterapi sırasında ve sonrasında kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda bcl-2 seviyesini düşürdüğü ve kaspaz-3 aktivasyonu ile

kontrole göre anlamlı oranda apoptozise neden olduğu tespit edildi. Meperidin narkotik analjezik etkisinin yanısıra apoptozis ile ilişkili aşamaları etkilemesi nedeniyle antitümör potansiyele sahiptir. Çalışmamızda, meperidinin HL-60 hücrelerinde de apoptozise neden olduğunu gösterildi. Deksametazon vinorelbinin etkisini arttırıcı veya azaltıcı rol oynamadı. Ancak meperidinin vinorelbinin apoptotik etkisine 72. saatte ilave etki sağladığı tespit edildi.

Sonuç olarak, vinorelbin akut promyelositik lösemi hücrelerinde apoptozise gidişi arttırabileceğini ve akut promyelositik lösemili hastalarda tedavide faydalı olabileceğini göstermiş olmasının yanında kortikosteroid reseptörleri üzerinden etki eden maddelerle kombinasyonu yerine mu opioid reseptörleri üzerinden etki eden maddelerle kombinasyonunun tedavide daha yararlı olacağı gösterilmiştir.



## KAYNAKLAR

1. Aapro MS. Present role of corticosteroids as antiemetics. *Recent Results Cancer Res* 1991; **121**: 91-100.
2. Aapro MS. Combination docetaxel/vinorelbine for metastatic breast cancer and non-small-cell lung cancer. *Oncology* 1997; **11(8)**: 46-49.
3. Alnemri ES, Fernandes TF, Halder S, Croce CM, Litwack G. Involvement of BCL-2 in glucocorticoid-induced apoptosis of human pre-B-leukemias. *Cancer Research* 1992; **52**: 491-495.
4. Ashizawa T, Asada M, Kobayashi H, Okabe M, Gomi K, Hirata T. Combination effect of navelbine (vinorelbine ditartrate) with cisplatin against murine P388 leukemia and human lung carcinoma xenografts in mice. *Anti-Cancer Drugs* 1993; **4(5)**: 577-83.
5. Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL. In vitro response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicol Lett* 2000; **114**: 143-53.
6. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; **56**: 335-344.
7. Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 1995; **83**: 851-857.
8. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Official Publication of The American College of Chest Physicians (CHEST)* 2000; **117**: 1771-7.
9. Bodine PV, Litwack G. The glucocorticoid receptor and its endogenous regulators. *Receptor* 1990; **1**: 83-119.
10. Borchmann P, Schnell R, Diehl V, Engert A. New drugs in the treatment of Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1998; **9(5)**: 103-108.
11. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; **15**: 269-290.
12. Burger RA, DiSaia PJ, Roberts JA, O'rourke M, Gershenson DM, Homesley HD, Lichtman SM, Barnes W, Moore DH, Monk BJ. Phase II trial of vinorelbine in recurrent and progressive epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999; **72(2)**: 148-153.
13. Burris H.A. 3rd, Fields S. Summary of data from in vitro and phase I vinorelbine (Navelbine) studies. *Semin Oncol* 1994; **21**: 14-19.

14. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; **13**: 102-7.
15. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, Archimbaud E, Magaud JP, Guyotat D. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 1993; **81**: 3091-3096.
16. Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 1990; **11**: 201-220.
17. Chauhan D, Auclair D, Robinson EK, Hideshima T, Li G, Podar K, Gupta D, Richardson P, Schlossman RL, Krett N, Chen LB, Munshi NC, Anderson KC. Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene* 2002; **21**: 1346-1358.
18. Chua CC, Chua BHL, Chen Z, Landy C, Hamdy RC. Dexamethasone induces caspase activation in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1642**: 79-85.
19. Conti F, Vici P. Vinorelbine in the treatment of breast cancer: current status and perspectives for the future. *Clin Therapeut* 1998; **149 (921)**: 61-74.
20. Depierre A, Lemarie E, Dabouis G, Garnier G, Jacoulet P, Dalphin JC. Efficacy of Navelbine (NVB) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Sem Oncol* 1989; **16(4)**: 26-29.
21. Devizzi L, Santoro A, Bonfante V, Viviani S, Bonadonna G. Vinorelbine: a new promising drug in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 1996; **22(5-6)**: 409-414.
22. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufman SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Ann Rev Biochem* 1999; **68**: 383-424.
23. Edelstein M.P., Wolfe L.A., 3rd, Duch D.S.: Potentiation of radiation therapy by vinorelbine (Navelbine) in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol.* 1996; **23**: 41-47.
24. Erben T. Biyoloji Ders Notları, 3. Baskı, 1986, BETA Basım Yayım Dağıtım AŞ.
25. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; **240**: 889-895.
26. Frankfurt O, Rosen ST. Mechanism of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. *Curr Opin Oncol* 2004; **16**: 553-563.

27. Fuggetta MP, Di Francesco P, Falchetti R, Cottarelli A, Rossi L, Tricarico M, Lanzilli G. Effect of morphine on cell-mediated immune responses of human lymphocytes against allogeneic malignant cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; **24(2)**: 255-63.
28. Fukuoka K, Arioka H, Iwamoto Y, Fukumoto H, Kurokawa H, Ishida T, Tomonari A, Suzuki T, Usuda J, Kanzawa F, Saijo N, Nishio K. Mechanism of the radiosensitization induced by vinorelbine in human non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 2001; **34**: 451-460.
29. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'Shea JJ, Chrousos GP, Bornstein SR. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J* 2002; **16**: 61-71.
30. Gomi K, Ohno H, Nomura K, Okabe M, Kobayashi K, Niitani H. Kinetic analysis of combination effect of navelbine (KW-2307) with cisplatin against human lung adenocarcinoma PC-12 cells in culture. *Jpn J Cancer Res* 1992; **83(5)**: 532-9.
31. Goss GD, Logan DM, Newman TE, Evans WK. Use of vinorelbine in non-small-cell lung cancer. Provincial Lung Disease Site Group. *Cancer Prev Control* 1997; **1(1)**: 28-38.
32. Goss PE, Fine S, Gelmon K, et al. Phase I studies of fluorouracil, doxorubicin and vinorelbine without (FAN) and with (SUPERFAN) folinic acid in patients with advanced breast cancer. *Cancer Chem Pharm* 1997; **41(1)**: 53-60.
33. Hanley ML, Elion GB, Colvin OM, Modrich PL, Keir S, Adams DJ, Bigner DD, Friedman HS. Therapeutic efficacy of vinorelbine against pediatric and adult Central nervous system tumors, *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; **42**: 479-82.
34. Hatsukari I, Hitosugi N, Matsumoto I, Nagasaka H, Sakagami H. Induction of early apoptosis marker by morphine in human lung and breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 2003; **23(3B)**: 2413-7.
35. Hatsukari I, Hitosugi N, Ohno R, Hashimoto K, Nakamura S, Satoh K, Nagasaka H, Matsumoto I, Sakagami H. Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro. *Anticancer Res* 2007; **27(2)**: 857-64.

36. Herr I, Ucur E, Herzer K, Okouoyo S, Ridder R, Krammer PH, von Knebel Doeberitz M, Debatin KM. Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Res* 2003; **63**: 3112-3120.
37. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; **279**(4): 300-7.
38. Hızal N. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1997; **6**: 196-7.
39. Hitosugi N, Hatsukari I, Ohno R, Hashimoto K, Mihara S, Mizukami S, Nakamura S, Sakagami H, Nagasaka H, Matsumoto I, Kawase M. Comparative analysis of apoptosis-inducing activity of codeine and codeinone. *Anesthesiology* 2003; **98**(3): 643-50.
40. Homo F, Duval D, Harousseau JL, Marie JP, Zittoun R. Heterogeneity of the in vitro responses to glucocorticoids in acute leukemia. *Cancer Research* 1980; **40**: 2601-2608.
41. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999; **4**: 332-9.
42. Jones S, Winer E, Vogel C, et al. Randomized comparison of vinorelbine and melphalan in anthracycline-refractory advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 1995; **13**(10): 2567-2574.
43. Junqueira L.C., Carneiro J, Kelley RO. Çevirmenler: Prof.Dr. Yener Aytekin, Uz.Dr.Seyhun Solakoğlu, Uz.Dr.Bülent Ahışhalı: *Temel Histoloji* 8.Baskı İstanbul: Barış Kitabevi 1998.
44. Kayaalp SO. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* 2. Cilt 9. Baskı Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd.Şti; 2000.
45. Katzung BG, editor. *Basic&Clinical Pharmacology*. 5<sup>th</sup> ed. USA, Appleton& Lange; 1992.
46. Kierszenbaum AL. Çeviri Editörü: Ramazan Demir *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Ankara: Palme Yayıncılık 2006.
47. Kubota K. Vinorelbine in the treatment of non-small-cell lung cancer and breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000; **27**(8):1301-6.
48. Laane E, Panaretakis T, Pokrovskaja K, Buentke E, Corcoran M, Söderhall S, Heyman M, Mazur J, Zhivotovsky B, Porwit A, Grandier D. Dexamethasone-

- induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia involves differential regulation of Bcl-2 family members. *Haematologica* 2007; **92**: 1460-1469.
49. Landini I, Bartolozzi B, Banchelli I, Degli Innocenti A, Nocentini O, Bernabei PA. In vitro activity of human leukemia cells. *J Chemother* 2001; **13(3)**: 309-315.
  50. Li X, Darzynkiewicz Z. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Exp Cell Res* 1998; **25**: 125-132.
  51. Lin X, Chen Q, Xue LY, Ma XJ, Wang R. Endomorphins, endogenous opioid peptides, induce apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Can J Pharmacol* 2004; **82(11)**: 1018-1025.
  52. Madsen-Bouterse SA, Rosa GJM, Burton JL. Glucocorticoid modulation of bcl-2 family members A1 and Bak during delayed spontaneous apoptosis of bovine blood neutrophils. *Endocrinology* 2006; **147**: 3826-3834.
  53. Makman MH, Dobrenis K, Surratt CK. Properties of mu 3 opiate alkaloid receptors in macrophages, astrocytes, and HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Adv Exp Med Biol* 1998; **437**: 137-48.
  54. Meininger V, Binet S, Chaîneau E, Fellous A. In situ response to vinca alkaloids by microtubules in in cultured post-implanted mouse embryos. *Biol Cell* 1990; **68(1)**: 21-9.
  55. Miyashita T, Nagao K, Krajewski S, Salvensen GS, Reed JC, Inoue T, Yamada M. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 1034-1041.
  56. Nanji AA, Hiller-Strmhöfel S. Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease. *Alcohol Health Res World* 1997; **21(4)**: 325-30.
  57. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 1028-1042.
  58. Ochiai N, Shimazaki C, Inaba T, Fuchida S, Okano A, Hatsuse M, Hirai H, Ashihara E, Fujita N, Nakagawa M. Effect of vinorelbine on growth of human myeloma cell lines in vitro. *Leuk Res* 2002; **26**: 731-738.
  59. Orth K, Chinnaiyan AM, Garth M, Froelich CJ, Dixit VM. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16443-16446.

60. Ovali E, Ozdemir F, Aydin F, Kavgaci H, Tekelioğlu Y, Büyükelcik A, Yilmaz M. The effects of dexamethasone on leukemic cells derived from patients with AML. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; **22(1)**: 85-9.
61. Özalpan A. Temel Radyobioloji 2001, Haliç Üniversitesi Yayınları.
62. Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Smith JS, McDermott MW. Techniques to assess proliferative potential of brain tumors. *J Neurooncol* 2005; **74**: 19-30.
63. Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Amer* 1995; **9**: 451-473.
64. Robbins. *Patoloji*. Çevirmen: Prof.Dr.Uğur Çevikbaş, 7.Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2003.
65. Rule S, Tighé M, Davies S, Johnson S. Vinorelbine in the treatment of lymphoma. *Hematol Oncol* 1998; **16**: 101-105.
66. Rutz HP. Effects of corticosteroid use on treatment of solid tumours. *Lancet* 2002; **360**: 1969-1970.
67. Rutz HP, Herr I. Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions. *Cancer Biol* 2004; **3**: 715-718.
68. Schmidt M, Luegering N, Luegering A, Pauels HG, Schulze-Osthoff K, Domschke W, Kucharzik T. Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J Immunol* 2001; **166**: 1344-1351.
69. Sharma S, Lichtenstein A. Dexamethasone-induced apoptotic mechanism in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors. *Neoplasia* 2008; **112**: 1338-1345.
70. Smets LA, Van Den Berg J, Acton D, Top B, Van Rooij H, Verwijs-Janssen M. Bcl-2 expression and mitochondrial activity in leukemic cells with different sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood* 1994; **84**: 1613-1619.
71. Studzinski GP. Cell growth and apoptosis 1994.
72. Takeuchi R, Hoshijima H, Onuki N, Nagasaka H, Chowdhury SA, Kawase M, Sakagami H. Effect of anticancer agents on codeinone-induced apoptosis in human cancer cell lines. *Anticancer Res* 2005; **25(6B)**: 4037-41.
73. Takeuchi R, Hoshijima H, Nagasaka H, Chowdhury SA, Kikuchi H, Kanda Y, Kunii S, Kawase M, Sakagami H. Induction of non-apoptotic cell death by morphinone in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Anticancer Res* 2006; **26(5A)**: 3343-8.

74. The Italian Group of Anticancer Research: Dexamethasone alone or in combination with ondansetron for the prevention of delayed nausea and vomiting induced by chemotherapy. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1554-1559.
75. Thompson EB. Apoptosis. *Annual Review of Physiology* 1998; **60**: 525-32.
76. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; **281**: 1312-1316.
77. Toh HC, Sun L, Koh CH, Aw SE. Vinorelbine induces apoptosis and caspase-3 (CPP32) expression in leukemia and lymphoma cells: a comparison with vincristine. *Leuk Lymphoma* 1998; **31**: 195-208.
78. Tonko M, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Helmberg A, Kofler R. Gene expression profiles of proliferating versus G1-G0 arrested human leukemia cells suggest a mechanism for glucocorticoid-induced apoptosis. *FASEB J* 2001; **15**: 693-699.
79. Turkolmez K, Beduk Y, Baltacı S, Gogus C, Gogus O. Gemcitabine plus vinorelbine chemotherapy in patients with advanced bladder carcinoma who are medically unsuitable for or who have failed cisplatin-based chemotherapy, *Eur Urol* 2003; **44**: 682-6.
80. Uckun FM, Morar S, Qazi S. Vinorelbine-based salvage chemotherapy for therapy-refractory aggressive leukaemias. *British Journal of Haematology* 2006; **135**: 500-508.
81. Weber BL, Vogel C, Jones S, Harvey H, Hutchins L, Bigley J, Hohnaker J. Intravenous vinorelbine as first-line and second-line therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 1995; **13(11)**: 2722-2730.
82. Yamamoto KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet* 1985; **19**: 209-252.
83. Zagon IS, McLaughlin PJ. Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells. *Neuropeptides* 2003; **37**: 79-88.
84. Zhou XJ, Rahmani R. Preclinical and clinical pharmacology of Vinca alkaloids. *Drug* 1992; **44(4)**: 1-16.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                 |                           |                  |             |
|-----------------|---------------------------|------------------|-------------|
| <b>Adı</b>      | SEVİLCAN                  | <b>Soyadı</b>    | TUNA        |
| <b>Doğ.Yeri</b> | KEŞAN                     | <b>Doğ.Tar.</b>  | 14.02.1982  |
| <b>Uyruğu</b>   | TC                        | <b>TC Kim No</b> | 39556175146 |
| <b>Email</b>    | sevilcan @istanbul.edu.tr | <b>Tel</b>       | 05326086145 |

### Eğitim Düzeyi

|                 | Mezun Olduğu Kurumun Adı                            | Mez. Yılı |
|-----------------|-----------------------------------------------------|-----------|
| <b>Doktora</b>  | İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji |           |
| <b>Yük.Lis.</b> | İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji | 2005      |
| <b>Lisans</b>   | İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji                         | 2003      |
| <b>Lise</b>     | Keşan Yusuf Çapraz (Süper) Lisesi                   | 1999      |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|    | Görevi              | Kurum                                               | Süre (Yıl - Yıl) |
|----|---------------------|-----------------------------------------------------|------------------|
| 1. | Araştırma Görevlisi | İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji | 2005-            |
| 2. |                     |                                                     | -                |
| 3. |                     |                                                     | -                |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* | ÜDS Puanı | (Diğer) Puanı |
|-----------------|-------------------|----------|--------|-----------|---------------|
| İngilizce       | İyi               | İyi      | İyi    | 65        |               |
|                 |                   |          |        |           |               |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

|                      | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel  |
|----------------------|---------|--------------|--------|
| <b>LES Puanı</b>     | 54.662  | 54.426       | 54.190 |
| <b>(Diğer) Puanı</b> |         |              |        |

### Bilgisayar Bilgisi

| Program   | Kullanma becerisi |
|-----------|-------------------|
| MS OFFİCE | Çok İyi           |



## Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### Makaleler

#### a-Uluslararası Makaleler

- 1- **Tuna S.**, Altinoz M.A., Karasu A., Canbolat A., Bilir A.: Selective COX-2 inhibitor (Rofecoxib) inhibits vinorelbine cytotoxicity in C6 glioma cells in vitro. The Open Pathology Journal 3: 22-29, 2009.
- 2- Kurt Y., Ulkuseven B., **Tuna S.**, Erguven M., Solakoglu S.: Iron(III) and nickel(II) template complexes derived from benzophenone thiosemicarbazones. Journal of Coordination Chemistry 62: (13)2172-2181, 2009.
- 3- Bilir A., Aybar B., Tanrikulu S.H., Issever H., **Tuna S.**: Biocompatibility of different barrier membranes in cultures of human CRL 11372 osteoblast-like cells: an immunohistochemical study. Clin. Oral Impl. Res. 18: 46–52, 2007.
- 4- Altinoz MA., Bilir A., Del Maestro RF., **Tuna S.**, Ozcan E., Gedikoglu G.: Noscipine and diltiazem augment taxol and radiation-induced S-phase arrest and clonogenic death of C6 glioma in vitro. Surg Neurol. 65(5):478-84, 2006.

#### b-Ulusal Makaleler

- 1- Ozmen T., Oktem G., **Tuna S.**, Biltekin B., Denir S., Bilir A. Different doses of radiation on agar colony forming development in C6 glioma cells: assessment by Thymidine labelling index, and BrdU labelling index. Türkiye Klinikleri J Med Sci 27: 321-327, 2007.
- 2- Oktem G., Ayla S., **Tuna S.**, Baka M., Bilir A.: Doksorubisinin Multisellüler Sferoid Hücre Kültürlerinde MCF-7 Hücreleri üzerine etkisi: Elektronmikroskopik Çalışma. Türkiye Klinikleri J Med Sci 25:337-342,2005.

### Posterler

- 1- XIII International Congress of Histochemistry and Cytochemistry Poland. L.Tapul, **S. Tuna**, B.Bozkurt, S. Erdem, A. Bilir. The effect of retinoic acid and selenium on human neuroblastoma cells in two and three dimensional cell culture models. 23-27 August 2008.
- 2- IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) **S.Tuna**, F.Öncü, A.Bilir. HL-60 lösemi hücre soyunda, DMSO'nun vinorelbin sitotoksitesitesi üzerine etkileri. Adana 20-23 Mayıs 2008.

- 3- XVIII. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı) L. Tapul, **S.Tuna**, B. Bozkurt, S. Erdem, A. Bilir. İnsan SH-SY5Y Nöroblastoma Hücreleri Üzerine Retinoik Asit ve Selenyumun Etkileri. 26-29 Ağustos 2007.
- 4- II. Congress of Molecular Medicine From Cell To Beside, Istanbul 24-26 March 2007- 027, P274. **S.Tuna**, A. Bilir, A. Altınöz. The effects of gemcitabine, vinorelbine, viox (Rofecoxib) and DMSO on Cell Proliferation in C6 Glial Tumour Cell Line.
- 5- American Association for Cancer Research Los Angeles, CA Mine Ergüven, **Sevilcan Tuna**, Basar Oku, Nuriye Akev, Ayhan Bilir. Imatinib mesylate provides combinational benefit with Clomipiramine against monolayer and spheroid cultures of rat C6 glioma. April 14, 18 2007.
- 6- 8th Congress of the European Academy of Paediatric Dentistry, Amsterdam 8-11 June 2006- poster presentation. PD 8-1. Sepet E., Pınar A., İlhan B., Ulukapı I., Bilir A., **Tuna S.** Cytotoxic Effects of Calcium Hydroxide and Mineral Trioxide Aggregate on 3T3 Fibroblast Cell-Line in Vitro.
- 7- Ulusal Moleküler Tıp Kongresi İstanbul 2005-P457. M Ergüven, A Bilir, F Aktar, **S.Tuna**, N Akev. Artan Dozda Suramin Uygulamasının Sıçan C6 Glioma Hücrelerindeki Etkilerinin Araştırılması.
- 8- 19th International Medical Sciences Student Congress (IMSSC) İstanbul 2004-P78. Özmen T, **Tuna S**, Öncü F, Bilir A. Thymidine Labelling Index levels of C6 glioma cells treated with different doses of radiation.
- 9- 18th International Medical Sciences Student Congress (IMSSC) İstanbul 2003-P59. Özmen T, **Tuna S**, Şahutoğlu T, Öncü F, Bilir A. The effects of different doses of radiation on C6 glioma and primary endometrium carcinoma cells on agar colony forming assay.

#### **Uluslararası Bildiriler**

- 1- The FEBS Journal 31st FEBS Congress M. Ergüven, A. Bilir, **S. Tuna**, N. Akev Growth inhibition of c6 glioma cells in monolayer and spheroid cultures by the combination of carvedilol and imatinib 45, 24-29 June 2006.
- 2- Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı) Mine ERGÜVEN, Ayhan BİLİR, Tuncay ALTUĞ, **Sevilcan TUNA**, Fadime AKTAR, Nuriye AKEV Suramin'in C6 Glioma Hücreleri Üzerinde Apoptotik ve Antiapoptotik Etkileri: Telomeraz 109, 12-15 Mart 2006.

### **Ulusal Bildiriler**

1. XVIII. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı) **S.Tuna**, M.A.Altınöz, F.D.Onar, A.Bilir. Dimetil sülfoksit (DMSO) ve Rofecoxibin, Gemcitabin ve Vinorelbin Sitotoksitesisi Üzerine Etkilerinin Elektron Mikroskopik İncelenmesi. 26-29 Ağustos 2007.

### **Katıldığı Kongreler**

- 1- IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 20-23 Mayıs 2008
- 2- XVIII. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 26-29 Ağustos 2007
- 3- II. Congress of Molecular Medicine 24-26 March 2007
- 4- Ulusal Moleküler Tıp Kongresi 16-19 Nisan 2005
- 5- I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi 7-9 Mayıs 2004

### **Görevli olduğu kurslar**

- 1- İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi ve Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği adına 11-12 Şubat 2004 tarihleri arasında gerçekleştirilen ‘Uygulamalı Hücre Kültürü’ kursunda görevli

### **Katıldığı Kurslar**

- ☐ 25-29 Haziran 2007 Uluslararası Katılımlı 10. Ulusal Stereoloji Kursu
- ☐ 24-26 March 2007 II. Congress of Molecular Medicine, ‘Application of Realtime PCR Course’
- ☐ 7-8 Aralık 2006 Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, ‘Apoptosis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri’ kursu katılımı
- ☐ 18 Ekim 2006 Leica Microsystems, ‘Introduction to Confocal Microscopy and its Application’ kurs katılımı
- ☐ 9-10 Haziran 2006 İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi ‘Araştırma Yöntembilimi ve Biyoistatistiksel Değerlendirme: Temel İlkeler’ kursu katılımı

- 25 Şubat 2005 İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Uygulamalı Deney Hayvanları Kursu Katılımı

**Katıldığı Sempozyumlar**

1. Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 9 Nisan 2008

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):****Kitap okumak**