

90529

**GEMSİTABİN VE İNTERFERON-ALFA' NIN İNSAN ERİTROLÖSEMİ
HÜCRE DİZİSİ K562 VE VARYANTI P-GP (+) K562-DOX ÜZERİNDE
ANTİTÜMORAL VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

MEHTAP KILIÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

1999

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEMSİTABİN VE İNTERFERON-ALFA' NIN İNSAN ERİTROLÖSEMİ
HÜCRE DİZİSİ K562 VE VARYANTI P-GP (+) K562-DOX ÜZERİNDE
ANTİTÜMORAL VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

MEHTAP KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez / / 1999 tarihinde aşağıdaki jüri tarafındannot takdir
edilerek Oybirliği/ Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

Yrd. Doç. Dr. Burhan SAVAŞ

ÖZ

GEMSİTABİN VE İNTERFERON-ALFA' NIN İNSAN ERİTROLÖSEMİ HÜCRE DİZİSİ K562 VE VARYANTI P-GLİKOPROTEİN (+) K562/DOX ÜZERİNDE ANTİTÜMÖRAL VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MEHTAP KILIÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

1999, 71 + x sayfa

Gemsitabin (dFdC) özellikle pankreatik adenokarsinoma gibi kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olmalarıyla tanınan solid tümörlere karşı önemli etkinlik gösterebilen, yeni bir nükleotid analogu antimetabolittir. Bu çalışmada gemsitabinin P-glikoprotein (-) K562 ve P-glikoprotein (+) ÇİD K562/DOX eritrolösemi hücreleri üzerinde etkinliği araştırılmış ve P-glikoprotein (-) K562 hücre dizisi üzerinde daha etkin olduğu bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELELER : Lösemik hücre, Gemsitabin, P-glikoprotein, Çoğul İlaç Direnci, Sitotoksik etki.

Jüri: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

Yrd. Doç. Dr. Burhan SAVAŞ

ABSTRACT

ANTITUMORAL AND APOPTOTIC EFFECTS OF GEMCITABINE (dFdC) AND INTERFERON- α in ERYTHROLEUKEMIA CELL LINE K562 AND P-GLYCOPROTEIN (+) MULTIDRUG RESISTANT VARIANT K562/DOX

Mehtap KILIÇ

M. S. in Biotechnology

Adviser: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Gemcitabine (dFdC) is a new nucleoside analog which exhibits substantial activity against solid tumors such as pancreatic adenocarcinoma that are well known for their poor response to chemotherapy and radiotherapy. In this study, antitumor apoptotic effects of gemcitabine in both erythroleukemia cell lines parental drug sensitive P-glycoprotein (-) K562 and its multidrug resistant variant K562/Dox were evaluated. It was found that gemcitabine is more effective in K562 than in K562/Dox.

KEY WORDS: Leukemia, Gemcitabine, P-glycoprotein, Multidrug resistant (MDR), cytotoxic effect

COMMITTEE: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

Assoc. Prof. Dr. Burhan SAVAŞ

ÖNSÖZ

Günümüzde kanser hastalığının tedavisinde yaygın tedavi metotları cerrahi, kemoterapi ve radyoterapidir. Çoklu ilaç direnci (ÇİD) malignansilerin kemoterapi ve radyoterapi metotlarıyla tedavisinde karşılaşılan en önemli engellerden birisidir. Kanser tedavisinde kullanılan bir çok ilacın ÇİD' e yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle son 20 yıldır ÇİD mekanizmalarının ve aşılmasını sağlayabilecek ilaçların araştırılması için çalışmalar önem kazanmıştır.

Bu çalışmada da özellikle kemoterapi ve radyoterapiye direnç gösteren pankreatik adenokarsinoma gibi solid tümörlerdeki etkinliği ile tanınan ancak hematolojik malignansiler için yeni bir onkolitik ilaç olan gemsitabinin, ÇİD'e sahip eritrolösemi hücrelerinde etkinliği araştırılarak bu konu aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN' a, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI' ya, çalışma konumun belirlenmesine ışık tutan ve her aşamasında büyük yardımını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Burhan SAVAŞ' a (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahiliye/ Onkoloji Servisi), bilim dünyasında yolumu çizmemi sağlayan, bu konudaki bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım hocam Doç. Dr. O. Nidai ÖZEŞ' e (Indiana University, Walther Oncology Center, Indiana/USA), yine bu tezin gerçekleşmesinde desteğini gördüğüm sevgili arkadaşım Dr. Selda SAMAKOĞLU' na (Pasteur Institute- Paris/ France) ve adını sayamadığım nice dost ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmaya maddi destek sağlayan Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu' na teşekkür ederim.

Tezimden kaynakça gösterilmek koşulu ile faydalanılabilir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1. 1. Gemsitabin' in (2' 2' diflorodeoksisitidin) Özellikleri	1
1. 1. 1. Kimyasal yapısı	1
1. 1. 2. Hücredeki metabolizması	2
1. 1. 3. Etki mekanizmaları	3
1. 2. Gemsitabinin Çeşitli İn vivo ve İn vitro Tümör Modellerinde Etkileri	5
1. 3. Çoğul İlaç Direnci (Multidrug Resistance).....	6
1. 3. 1. İlaç direnci mekanizmaları	6
1. 4. P-glikoprotein	8
1. 5. P-glikoproteinin Yapısı ve Fonksiyonu	10
1. 6. Normal ve Malignant Dokularda P-glikoprotein İfadesi	15
1. 7. P-gp Aracılıklı ÇİD Fenotipinin Geri Döndürülmesi	19
1. 8. Gemsitabin ve İlaç Direnci	20
1. 9. İnterferonlar ve Özellikleri	20
1. 10. Apoptozis Nedir, Nasıl Gözlenir?	22
2. MATERYAL VE METOD	24
2. 1. MATERYAL	24
2. 1. 1. Hücreler ve kültürasyonları	24
2. 1. 2. Çalışmada kullanılan Gemsitabin ve İnterferon-alfa	25
2. 2. METOD	26
2. 2. 1. Büyüme inhibisyonunun ölçülmesi	26
2. 2. 2. K562/DOX hücrelerinin P-gp ifadelerinin P-GP 4E3 FITC monoklonal antikoruna ile (SIGNET) gösterimi	28

2. 2. 3. Daunorubicin emilim (accumulation =uptake) testi	29
2. 2. 4. DNA İzolasyonu ve agaroz jel elektroforezi	31
3. BULGULAR	33
3. 1. K562/Dox Hücrelerinin P-gp İfadesinin Ölçülmesi	33
3. 2. K562/ Dox Hücrelerindeki P-gp Pompasının Fonksiyonunun Ölçülmesi ...	35
3. 3. Çoğalma İnhibisyonunun Ölçülmesi	44
3. 4. DNA Fragmantasyon Sonuçları	53
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ	58
6. ÖZET	59
7. SUMMARY	61
8. KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μg	Mikrogram
kD	Kilodalton
U	Unit
ml	Mililitre
mg	Miligram
ng	Nanogram
nm	Nanometre
mAmp	Miliamper
$^{\circ}\text{C}$	Derece Santigrat
μM	Mikro Molar
cm^2	Santimetre kare

Kısaltmalar

IFN	İnterferon
IgG2a	İmmünoglobülin G 2a
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
ATP	Adenozin trifosfat
FCS	Fötal Calf Serum
Asp	Asparajin
NK	Natural Killer
CML	Chronic Myeloid Leukemia
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
ATCC	American Tissue Culture Catalog
DNA	Deoksiribonükleikasit

mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
UV	Ultraviyole
EDTA	Etilen diamin tetra asetikasit
PBS	Phosphate Buffered Saline
NaCl	Sodyum Klörür
Na ₂ HP0 ₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
KH ₂ PO ₄	Dihidrojen potasyum fosfat
KCl	Potasyum klörür
CO ₂	Karbon dioksit
SDS	Sodyum deodoecyl Sulfat
OD	Optik Densite
SF	Sulandırma Faktörü
P-gp	P-glikoprotein
ÇİD	Çoğul İlaç Direnci
dFdC	Gemcitabin
dFdCDP	Gemcitabin di fosfat
dFdCTP	Gemcitabin tri fosfat

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. İlaç Direnci Mekanizmaları.....	7
Çizelge 1. 2. P-glikoprotein Substratı Olan İlaçlar.....	8
Çizelge 1. 3. P-glikoprotein Sınıfları.....	10
Çizelge 1. 4. Normal Dokularda P-gp İfadesi ve Fizyolojik Fonksiyonları.....	16
Çizelge 1. 5. MDR1 Geni İfade Eden İnsan Tümörleri	18
Çizelge 1. 6. P-gp (MDR) İnhibitörleri.....	19
Çizelge 2. 1. K562 ve P-gp (+) K562- DOX için Kullanılan Gempitabin Dozları.....	26
Çizelge 2. 2. K562 ve P-gp (+) K562/DOX için Kullanılan İnterferon-alfa Dozları.....	26
Çizelge 3.1.a) K562 +Daunorubicin (1.5 saatlik inkübasyon verileri)	35
Çizelge 3. 1. b) K562/Dox + Daunorubicin (1.5 saatlik inkübasyon verileri).....	36
Çizelge 3. 1. c) K562+ Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).....	36
Çizelge 3. 1. d) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).....	37
Çizelge 3. 1. e) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).....	38
Çizelge 3. 1. f) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).....	39
Çizelge 3. 1. g) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).....	40
Çizelge 3. 1. h) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).....	41
Çizelge 3. 1. i) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).....	42
Çizelge 3. 1. k) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon sonucu).....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Gempitabinin Yapısal Formülü	1
Şekil 1. 2. Gempitabinin Hücre İçi Metabolik Dönüşümü ve Etki Mekanizmaları.....	2
Şekil 1. 3. DNA Sentezinin İnhibisyonu: Maskelenmiş Zincir Terminasyonu.....	4
Şekil 1. 4. P-gp' nin a.a Yapısı.....	12
Şekil 1. 5. P-gp' nin Membrandaki Lokalizasyonu.....	12
Şekil 1. 6. P-glikoprotein (170 kd).....	13
Şekil 1. 7. P-glikoprotein Transport Proteinlerine Analog Mekanizması	14
Şekil 1. 8. Apoptozise uğrayan bir hücrede meydana gelen değişiklikler.....	23
Şekil 2. 1. Çalışmada Kullanılan K562 Hücrelerinin İnverted Mikroskopta Görünümü	24
Şekil 2. 2. Çalışmada Kullanılan K562/Dox hücrelerinin İnverted Mikroskopta Görünümü.....	25
Şekil 2. 3. Tripan Mavisi ile Boyanmış K562 Hücrelerinin İnverted Mikroskopta Görünümü.....	27
Şekil 2. 4. Tripan Mavisi ile Boyanmış K562/Dox Hücrelerinin İnverted Mikroskopta Görünümü.....	28
Şekil 3. 1. a. K562/DOX Hücrelerinin Flow Sitometride Hücre Dizisi Olarak Görüntüsü.....	33
Şekil 3. 1. b. K562/DOX Hücrelerinin Flow Sitometride 4E3 Monoklonal Antikoru ile Yapılan P-gp Pozitiflik Analizi Sonucu	34
Şekil 3. 1. c. K562/DOX Hücrelerinin Flow Sitometride IgG2a Monoklonal Antikoru ile Yapılan Negatif Kontrol Analiz Sonucu.....	34
Şekil 3. 2. a. K562+Daunorubicin (1.5 saatlik inkübasyon sonuçları).....	35
Şekil 3. 2. b. K562/Dox + Daunorubicin (1.5 saatlik inkübasyon sonuçları).....	36
Şekil 3. 2. c. K562 + Daunorubicin + CsA (1.5 saatlik inkübasyon sonuçları).....	36
Şekil 3. 2. d. K562/Dox + Daunorubicin + CsA (1.5 saatlik inkübasyon sonuçları).....	37
Şekil 3. 2. e. K562 + Daunorubicin (20 saatlik inkübasyon sonuçları).....	38
Şekil 3. 2. f. K562/Dox + Daunorubicin (20 saatlik inkübasyon sonuçları).....	39
Şekil 3. 2. g. K562/Dox +Daunorubicin+Verapamil (20 saatlik inkübasyon sonuçları).....	40
Şekil 3. 2. h. K562 + Daunorubicin +Verapamil (20 saatlik inkübasyon sonuçları).....	41

Şekil 3. 2. i. K562 + Daunorubicin + CsA (20 saatlik inkübasyon sonuçları).....	42
Şekil 3. 2. k. K562/Dox + Daunorubicin + CsA (20 saatlik inkübasyon sonuçları)....	43
Şekil 3. 3. a. 1 μ M, 5 μ M ve 8 μ M Gemsitabin Dozlarının K562 Hücre Dizisi Üzerindeki Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Grafiği.....	45
Şekil 3. 3. b. 1 μ M, 5 μ M ve 8 μ M Gemsitabin Dozlarının K562/DOX Hücre Dizisi Üzerindeki Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Grafiği.....	46
Şekil 3. 3. c. 1 μ M, 5 μ M ve 8 μ M Gemsitabin Dozlarının K562 ve K562/DOX Hücre Dizisi Üzerindeki Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Grafiği....	47
Şekil 3. 3. d. 10 μ M - 500 μ M Gemsitabin Dozlarının K562 hücre Dizisi Üzerindeki Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Grafiği.....	48
Şekil 3. 3. e. 10 μ M -500 μ M Gemsitabin Dozlarının K562/DOX Hücre Dizisi Üzerindeki Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Grafiği.....	49
Şekil 3. 3. f. 10 μ M -500 μ M Gemsitabin Dozlarının K562 ve K562/DOX Hücre Dizisi Üzerindeki Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Grafiği.....	50
Şekil 3. 3. g. 10-1000 ng/ml İnterferon-alfa 2a Dozlarının K562 Hücre Dizisi Üzerindeki Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Grafiği.....	51
Şekil 3. 3.h. 10-1000 ng/ml İnterferon-alfa 2a Dozlarının K562/DOX Hücre Dizisi Üzerindeki Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Grafiği.....	52
Şekil 3. 3. i. 10-1000 ng/ml İnterferon-alfa 2a Dozlarının K562 ve K562/DOX Hücre Dizisi Üzerindeki Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Grafiği..	53
Şekil 3. 4. a. K562 hücre dizisinde gemsitabinin apoptozisi İndüksiyonu.....	54
Şekil 3. 4. b. K562/Dox hücre dizisinde gemsitabinin apoptozisi İndüksiyonu.....	54

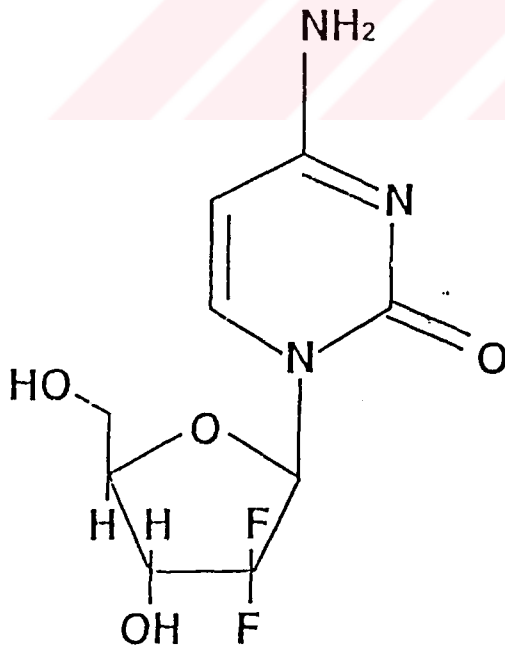
1. GİRİŞ

1. 1. Gemitabin' in (2' 2' diflorodeoksisitidin) Özellikleri

Gemitabin (2' 2' diflorodeoksisitidin) özellikle pankreatik adenokarsinoma gibi kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olmalarıyla tanınan solid tümörlere karşı önemli etkinlik gösterebilen yeni bir baz analogu (sitozin) primidin antimetabolittir. Özellikle bölünen hücrelerde sitotoksik aktivite gösterir ve **hücre siklusuna spesifiktir**. Hücre siklusu sırasında **S-fazı** ve **geç G1 fazı** aralığındaki hücrelerin programlarını bloke eder (Hertel 1990).

1. 1. 1. Kimyasal yapısı

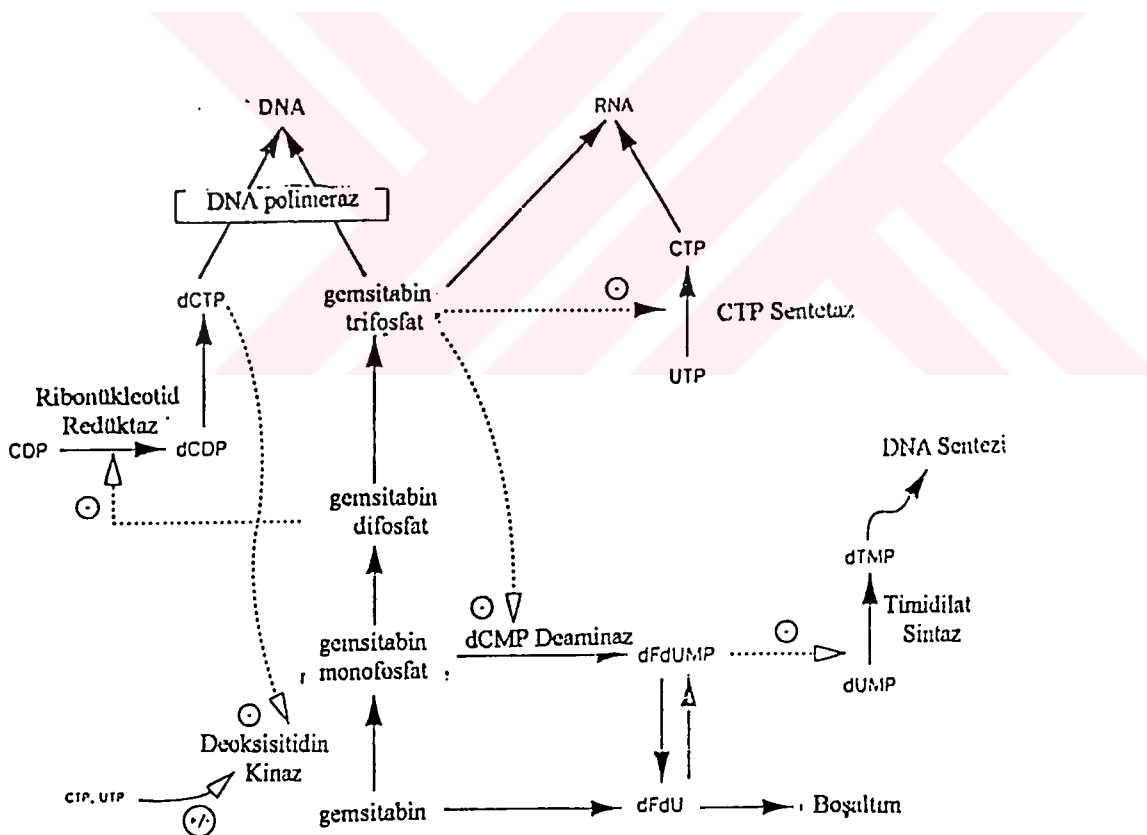
Kimyasal yapısı deoksiriboz şekerinin 2. pozisyonundaki iki hidrojen atomu yerine iki flor atomunun katılmasından oluşmuştur. “ Gemitabin ” adı kısmen 2' pozisyonundaki (“ geminal pozisyon ”) 2 flor atomundan türetilmiştir. Basit formülü ise $C_9H_{11}F_2N_2O_4$ olup molekül ağırlığı 299, 66' dir (Hertel 1990).



Şekil 1. 1. Gemitabinin Yapısal Formülü (Plunkett 1996).

1. 1. 2. Hücredeki metabolizması

Gemsitabin öncül bir ilaçtır ve aktif hale gelebilmek için hücre içi metabolik dönüşüme gereksinim duyar (Hertel 1990). Membran geçirgenliği oldukça yüksek olan gemsitabin hücreye transport edildikten sonra doğal nükleotidlerdekine benzer bir şekilde *deoksisitinkinaz* enzimi tarafından fosforilasyon yoluyla monofosfat (dFdCMP), difosfat (dFdCDP) ve trifosfat (dFdCTP) formlarına dönüştürülerek aktive olur. Oluşan di (dFdCDP) ve tri (dFdCTP) fosfatlar doğal nükleotid yapısını özellikle sitidin yapısını taklid ederler (Şekil 1. 2. Peters 1996, Xu ve Plunkett 1992, Mosconi 1997).



Şekil 1. 2. Gemsitabinin hücre içi metabolik dönüşümü ve etki mekanizmaları (Peters 1996).

1. 1. 3. Etki mekanizmaları

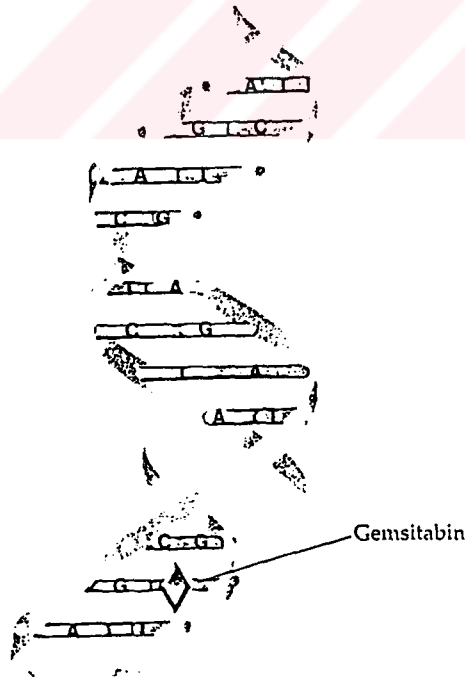
Gemsitabinle yapılan klinik öncesi çalışmalar, bu bileşiğin, hücre metabolizmasını değiştirerek hücre ölümüne yol açan bir çok etki mekanizmasına sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Başlıca etki mekanizması ise gemsitabin nükleotidin replikasyon sırasında DNA' ya katılması (**inkorporasyon**), büyümekte olan DNA zincirine doğal olmayan bir nükleotid ilavesi ile DNA sentezinin durması (**inhibisyonu**) dır (**maskelenmiş zincir terminasyonu**). Bu ana mekanizmaya ek olarak gemsitabin, DNA sentez substratlarını katalizleyen enzim inhibisyonu gibi replikasyonun durdurulması özelliğini güçlendiren ve **kendi kendini güçlendirme** adı verilen daha başka birçok etkiye de sahiptir. Gemsitabin sadece DNA sentezinde değil, RNA sentezinde de etkilidir. RNA üzerindeki spesifik etki mekanizmaları henüz açık değildir. Ancak RNA ya inkorpore olabildiği bilinmekte ve RNA üzerinde etkili olan diğer antimetabolitlere benzer şekilde etkili olduğu düşünülmektedir (Ruiz van Haperen 1993, Peters 1996).

Aktif hale dönüştürüldükten sonra, ilk olarak gemsitabin difosfat (dFdCDP) DNA sentezi için gerekli deoksinükleotid trifosfatların oluşumunu katalizleyen *ribonükleotidredüktaz* enzimini inhibe eder. Bu enzimin inhibisyonu hücre içi deoksinükleotidlerin özellikle deoksisitidin trifosfatın (dCTP) konsantrasyonunda bir azalmaya yol açar (Şekil 1.2.), (Gandhi ve Plunkett 1990, Peters 1996).

İkinci olarak ise, gemsitabin trifosfatlar (dFdCTP) replikasyon sırasında *DNA polimeraz* tarafından uzayan zincire katılmak için dCTP ile yarışır. Hücre içerisindeki yüksek gemsitabin konsantrasyonu ise dCTP' nin oluşumunu katalizleyen *CTP sentetaz*' ı doğrudan inhibe ederek CTP oluşumunu durdurur (Heinemann ve Plunkett 1992, Xu ve Plunkett 1992, Peters 1996), (Şekil 1.2.). Hücrel deoksinükleotidlerin özellikle de dCTP' nin miktarındaki düşüş burada replikasyona yansır ve uzayan zincire gemsitabin katılımında artış olarak sonuçlanır. Hücrel dCTP miktarındaki azalma her seferinde zincirde gemsitabin miktarının artışı ile sonuçlanır. dCTP miktarındaki azalma gemsitabinin aktif nükleotidlere dönüşümünü katalizleyen ve ancak yüksek dCTP konsantrasyonunda inhibe olabilen *deoksisitidinkinaz* enziminin

inhibisyonunu da önlemektedir. dCTP miktarındaki azalma aynı zamanda gemsitabinin eliminasyonunda başlıca enzim olan *dCMPdeaminaz* enziminin de inaktivasyonuna yol açar. Bu enzim gemsitabin trifosfat tarafından da doğrudan inhibe edilmektedir. Bu olay hücre içerisindeki gemsitabin konsantrasyonunu da artırmaktadır. Tüm bu reaksiyonlar sonuç olarak gemsitabin miktarı veya etki süresini uzatarak gemsitabin etkinliğini artırmaktadır.

Moleküler çalışmalar, replikasyon sırasında uzayan zincire gemsitabin nükleotidin katılımından sonra doğal tek bir nükleotid daha katılabildiğini, bundan sonra *DNA polimerazın* ilerleyemediğini ve replikasyonun durduğunu göstermiştir (DNA sentezinin inhibisyonu) (Ruiz van Haperen 1993). Gemsitabinin DNA yapısına girmesinden sonra bu yapıya bir nükleotid daha eklenir. Gemsitabin bu nükleotid tarafından maskelenir. Bu olay maskelenmiş zincir terminasyonu olarak adlandırılır. Maskelenmiş zincir terminasyonu gemsitabinin, DNA onarım mekanizmaları ve bu arada ekzonükleazlar tarafından DNA yapısından çıkarılmasına karşı korunmasını sağlar (Şekil 1. 3.), (Rothenberg 1989, Heinemann 1992, Xu ve Plunkett 1992).



Şekil 1.3. DNA sentezinin inhibisyonu: Maskelenmiş zincir terminasyonu (Plunkett 1996).

Gemsitabinin hücre metabolizması üzerindeki diğer etkileri, bu onkolitiğin DNA sentezi karşısındaki aktivitesini kendi kendine güçlendirmesini sağlar. Bu mekanizmalar gemsitabinin *ribonükleotidredüktaz*, *deoksisitidinkinaz*, *dCMP deaminaz*, *CTP sentetaz* enzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinden kaynaklanmaktadır (Xu ve Plunkett 1992).

Hücrelerin gemsitabini DNA dan uzaklaştıramamasıyla onarımın inhibisyonu ve replikasyonun durması ile bir süre sonra morfolojik ve biyokimyasal olarak apoptozis karakteristiği gözlenir (Huang ve Plunkett 1996).

Tüm bu prosesler gemsitabini hem in vivo, hem de in vitro olarak güçlü bir antimetabolit haline getirmiştir. Gemsitabinin ortaya koyduğu tüm bu etkilerle bölünen hücrelerde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

1. 2. Gemsitabinin Çeşitli İn vivo ve İn vitro Tümör Modellerindeki Etkileri

Gemsitabinin antitümör aktivitesi, çeşitli hücre sistemlerinde test edilmiştir. Gemsitabin CEM insan lösemi hücre kültüründe hücre çoğalmasını güçlü bir şekilde inhibe etmiştir (Hertel 1990). HL-60 miyeloid, RPMI-8392 B-lenfoid ve Molt-3 T-lenfoid hücre sistemi olan C26-10 (sıçan kolon karsinomu) ve A2780 (insan over karsinomu) sistemlerinde de DNA sentezini neredeyse tamamen inhibe etmiştir.

Gemsitabinin antitümör aktivitesi in vivo modellerde de görülmüştür. Sıçanlardaki iki lösemi modeliyle altı tümör modelinde antitümöral aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Hertel 1990). Ayrıca baş ve boyun kanseri (Braakhuis 1991), insan yumuşak doku sarkomu ve over kanseri (Boven 1993) ve diğer çeşitli insan tümörleri (Merimann 1994) ksenograftları (hayvanlara transplante edilen insan tümör sistemleri) karşısında anlamlı aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

1. 3. Çoklu İlaç Direnci (Multidrug Resistance)

Tümör hücreleri, yapısal ve fonksiyonel olarak birbirinden farklı, çok sayıda sitotoksik etkiye sahip antikanser ilaca karşı sıklıkla çapraz direnç meydana getirirler. Çoklu ilaç direnci (ÇİD; Multidrug Resistance; MDR) olarak adlandırılan bu fenomen insan kanserlerinin kemoterapötik tedavisinde başlıca engellerden birisidir (Goldstein 1996, Bouffard 1996).

ÇİD fenotipinden sorumlu olan biyokimyasal ve genetik değişiklikler 25 yıldan uzun süredir yoğun araştırmalara konu olmuştur. Bu araştırmalarda, *in vivo* ilaç direnci çalışmanın tabii zorluğundan dolayı (insan kanserlerinin heterojen eğimli olmaları veya kemoterapik tedavi sırasında aynı tümörden birden fazla klinik örnek elde etme zorluğu ve etik nedenler gibi) öncelikle farklı türlerden ve farklı doku orijinlerinden çok sayıda *in vitro* model (ÇİD fenotipine sahip çeşitli dokulardan hücre dizileri) geliştirilmiştir (Beck 1991, Sugimoto ve Tsuruo 1991, Germann 1996). Yapılan araştırmalar sonucu günümüzde ÇİD fenotipinden bir dizi genin sorumlu olduğu ve bu genlerin ilaç direnci fenotipini sağlayabilmek için tek başlarına ya da kombinasyon halinde hareket edebildikleri bulunmuştur. Bu genlerin, ÇİD fenotipini geri çevirmede sıklıkla karşılaşılan zorlukları açıklamaya yardımcı olabilecekleri de düşünülmektedir (Bouffard 1996).

1. 3. 1. İlaç direnci mekanizmaları

Deneysel olarak birçok tümör modelinde ÇİD fenotipi ile eşleşen çeşitli moleküler mekanizmalar bilinmektedir. Bunlar, P-glikoprotein ve insan ÇİD-ilişkili proteini-1 (Multidrug resistance-associated protein, MRP) benzeri mekanizmalar ile ilaçların hücre dışına pompalanması, DNA topoizomera II gibi ilaç hedeflerindeki değişiklikler ile kemoterapötik etkinliğinin azaltılması ve bazı bileşiklerin Glutasyon S transferaz gibi enzimler tarafından artırılmış sistemi detoksifikasyonu gibi farklı mekanizmalardır (Çizelge 1. 1 Lehnert 1996).

Çizelge 1. 1. İlaç Direnci Mekanizmaları (Lehnert 1996).

	Mekanizma	Karakteristik
P-gp MDR	MDRI P-gp geni ürünü	Yapısal ve fonksiyonel olarak farklı ilaçlara karşı direnç oluşturur. Hücre içinde ilaç birikimini azaltmaya yönelik pompa ödevi görür .
MRP1-MDR	MRP1 geni ürünü	P-gp MDR' a benzer fenotip, taksanlara daha az dirençli. Amfipatik katyonlara gereksinim duyar. Tipik P-gp inhibitörlerine düşük aktivite gösterir.
TopoII-MDR	Topo II- α aktivitesinin azalması	Topo II ilaçlarına karşı direnç geliştirir. (Yapısal olarak farklı, fonksiyonel olarak aynı ilaçlara).
GSH-MDR	GSH-transferaz aktivitelerinin azalması	Melfalan, siklofosfamid, klorambusil, BCNU, tiotepa, sisplatin, doksorubisin gibi ilaçlara direnç geliştirir. Radyoterapiye dirençte rol oynadığı da düşünülmektedir (Savas 1998).
Apop. MDR	Apoptozisi bloke eder. Apoptozis genlerinde fonksiyon bozukluğuna yol açar.	Sitotoksik ajanların neredeyse hepsine direnç geliştirir.
Klinik MDR	Multifaktöriyel olabilir. Ekstraselüler mekanizmalar mümkün.	Muhtemelen yapısal fonksiyonel olarak farklı olan sitotoksik ilaçlara karşı klinik direnç geliştirir.

Klinik alışmalar bu mekanizmalardan herhangi birinin insan tümörlerinde bulunabildiğini ve önemli birçok kanserin tedavisinde sınırlayıcı etken olabildiğini göstermiştir (Lehnert 1996).

1. 4. P-glikoprotein (P-gp)

P-glikoprotein, kanser hücreleri tarafından antikanser ilaçların sitotoksik etkisini savuşturmada kullanılan mekanizmalardan, en iyi karakterize edilenlerden bir tanesidir (Germann 1996). Memeli hücrelerinde ATP bağımlı ilaç atıcı bir pompa gibi hareket ederek, hücreiçi çevredeki yapısal olarak farklı ilaçların birikimini azaltarak çoklu ilaç direncine yol açtığı bilinmektedir. P-gp İD fenotipi ile karakterize edilen hücre dizilerinin direnç gösterdiği ilaç grupları arasında, *Vinca alkaloidleri*, *Antrasiklinler*, *Taksanlar*, *Epipodofilotoksinler vb.* yer almaktadır (izelge 1. 2.).

Çizelge 1. 2. P-glikoprotein Substratı Olan İlaçlar (Germann 1996).

Vinca alkaloidler	Antrasiklinler	Diğer
Vinblastin	Doksorubicin	Mitoksanton
Vinkristin	Daunorubisin	Aktinomisin-D
Vinorelbin	Epirubisin	Amsakrin
		Trimetrekسات
Taksanlar	Epipodofilotoksinler	Topotecan
Docetaksel	Etoposid	Mitramisin*
Paclitaksel	Tenoposid	Mitomisin C

* Bu ajanlara karşı daha düşük direnç var

İD fenotipi gösteren malignant hücre dizilerinin önemli bir bölümü 4.5 kb lik mRNA kodlayan bir gene (MDR1) sahiptirler. MDR1 geni ABC (ATP Binding Cassette) transporter süper ailesi diye bilinen bir gen ailesinin alt üyesidir.

Bakterilerde ve diğ er ökaryotik transport proteinlerinde de görülen korunmuş aminoasit sekanslarına sahiptir. MDR1 geni 7. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuştur. P-glikoprotein bu genin ürünü olarak ilk defa 1976 yılında Juliano ve Ling tarafından    D fenotipine sahip CHO (Chinese Hamster Ovary, kobay) hücrelerinin plazma membranından 170 kD luk yüksek molekül ağırlıklı integral bir plazma membran glikoproteinini olarak izole edilmiş ve ilaca karşın hücresel ge irgenliğı değiştirdiği sanılan bir şekerlenmiş protein olması nedeniyle P- glikoprotein ismi verilmiştir (Juliano ve Ling 1976).

P-gp geninin klonlanması ve MDR cDNA' sı ile elde edilen bilgiler bu proteinin insanlarda 2, rodentlerde 3  yesi bulunan bir gen ailesi tarafından kodlandığını ortaya koymuştur. Tüm P-gp' ler arasında % 70 den fazla aminoasit homolojisi bulunması, bunların ilaç transportu yapanlar (Sınıf I) ve yapmayanlar (Sınıf II) olarak 2 farklı alt sınıfa ayrılmasına olanak sağlamıştır ( izelge 1. 3.). Farklı  karyotik promot rlerin kontrolü altında gerçekleşen MDR cDNA sı kullanılan gen transfer deneylerinde de **sınıf I P-glikoproteinlerin** ifadesinin ilaca duyarlı hücelere çoklu ilaç direnci kazandırdığı açıkça gösterilmiştir (Germann 1996). **Sınıf II P-glikoproteinler** ile yapılan deneyler ise bunların, ilaca dirençlilik üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadıklarını, karaciğer ve safra kanalında dominant olarak ifade edildiklerini göstermiştir. Fosfotidil kolin taşıyabildikleri ve lipid transportunda işlevi olabilecekleri bu çalışmalar sonucu önerilmiştir (Germann 1996).

Çizelge 1. 3. P-glikoprotein sınıfları (Germann 1996)

Sınıf I

İnsan	MDR1	(Chen 1986, Germann 1996).
Fare	mdr3 (mdr1a), mdr1 (mdr1b)	(Hsu 1989, Devault 1990). (Beck ve Danks 1991, Sugimoto ve Tsuruo 1991).
Kobay	p-gp1, p-gp2	(Gros 1986, Endicott 1987).
Sıçan	P-gp1, P-gp2, (mdr1b)	(Silvermann 1991, Deuthars 1992).

Sınıf II

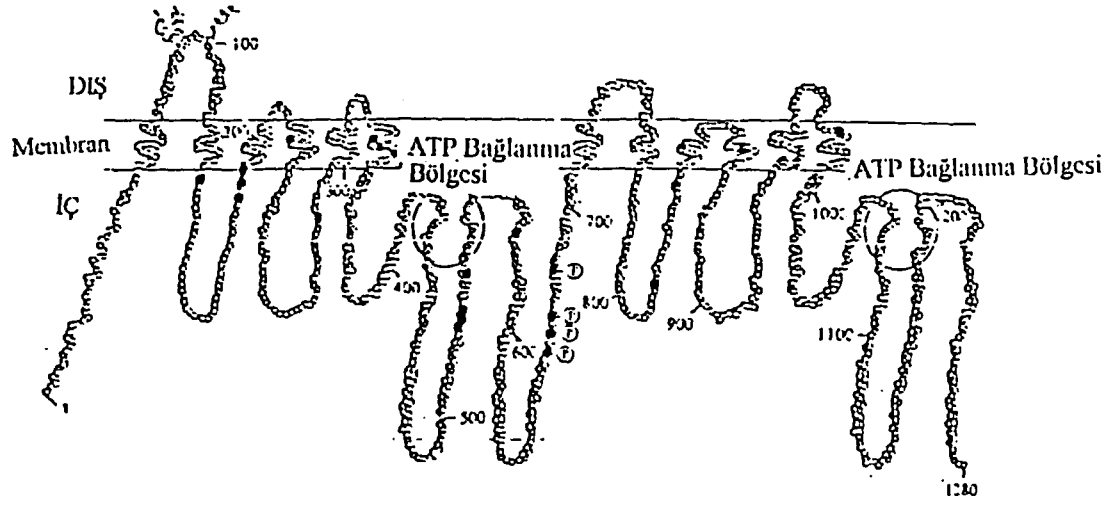
İnsan	MDR 2, 3	(Van der Blick 1987, Schinkel 1991)
Fare	mdr2	(Gros 1988, Buschmann 1992)
Kobay	p-gp3	(Endicott 1991)
Sıçan	mdr2, mdr3	(Brown 1993, Fruya 1994)

1. 5. P-glikoprotein Yapısı ve Fonksiyonu

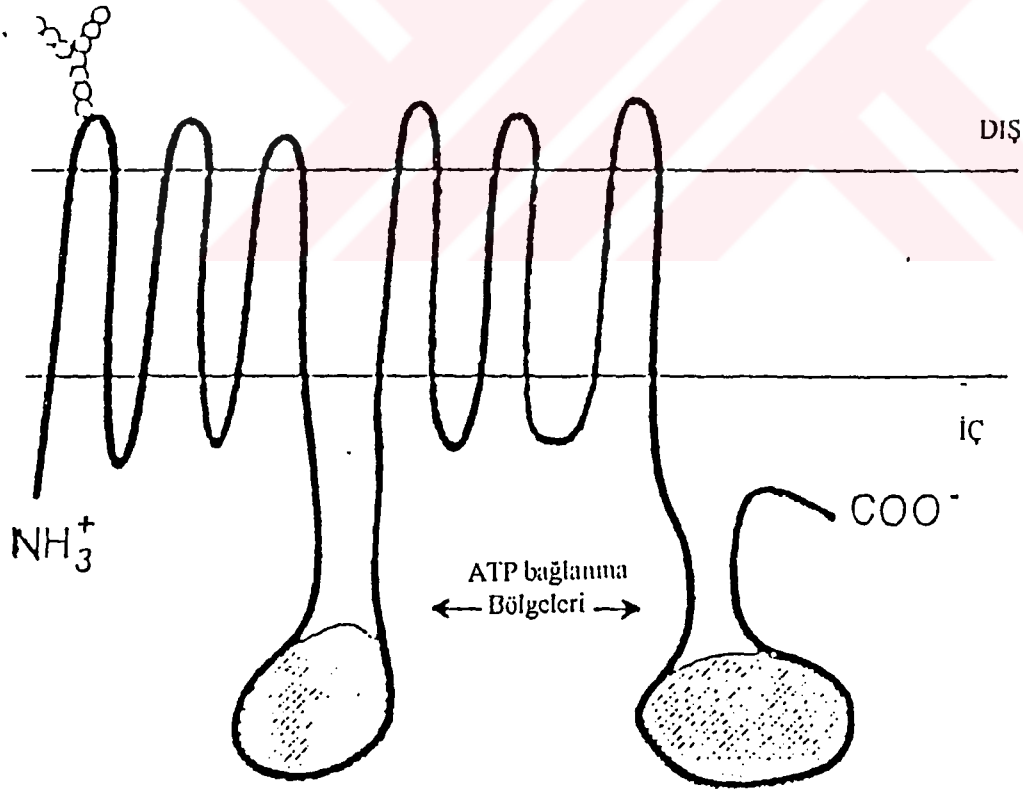
P-glikoprotein çoklu ilaç direnci gösteren çok sayıda memeli hücresinde fazla miktarlarda ifade edilmektedir. Yapısal olarak memeli P-gp leri MDR1 geni tarafından kodlanan 1280 aminoasit dizgesinden oluşan basit zincir proteinleridir. (Endicott ve Ling 1993, Juliano ve Ling 1976, Roninson 1992). Her kısımda 6 tane olmak üzere toplam 12 tane transmembran domainine sahip iki homolog yarımdan meydana gelmiştir. Her homolog kısımda transmembran domainlerini içeren 250 a.a. dan oluşan hidrofobik bir bölge ve bir de por benzeri yapı oluşturan ve nükleotid bağlayan 300 a.a lık hidrofilik bir bölge yer alır (Gottesmann 1993, Germann 1996). P-gp ATP bağlayan toplam iki tane sitoplazmik bölgeye sahiptir ve böylece ilaç bağlayıcı özelliğe de sahip olmaktadır (Bouffard 1996), (Şekil 1.4., 1.5., 1. 6.).

Proteinin -N- ve -C- terminalleri de nükleotid bağlayan kıvrımlar gibi hücre içinde yerleşmişlerdir ve hücre dışı kısımlar glikozillenmiştir. P-gp aslında glikozillenmemiş bir öncül olarak yaklaşık 120 ya da 140 kD ağırlığında sentezlenir. Olgun haline insan hücrelerinde 1-2 saatlik, farede 20-30 dakikalık yarılanma ömrü ile getirilir (Richert 1988, Greenberger 1988, Germann 1996). **Asp 91., Asp 94. ve Asp 99.**, insan P-gp' si üzerindeki glikozilasyon yerleri olarak belirlenmiştir (Schinkel 1993, Germann 1996). Birçok çalışmada glikozilasyonun P-gp' nin temel fonksiyonu olan ilaç atılımı için gerekli olmadığı bildirilmiştir. Ancak insan kolon karsinomu hücreleriyle yapılan çalışmalarda glikolizasyonun P-gp' nin hücre zarına yeteri kadar transloke olması için gerekli olduğu ortaya çıkarılmıştır.

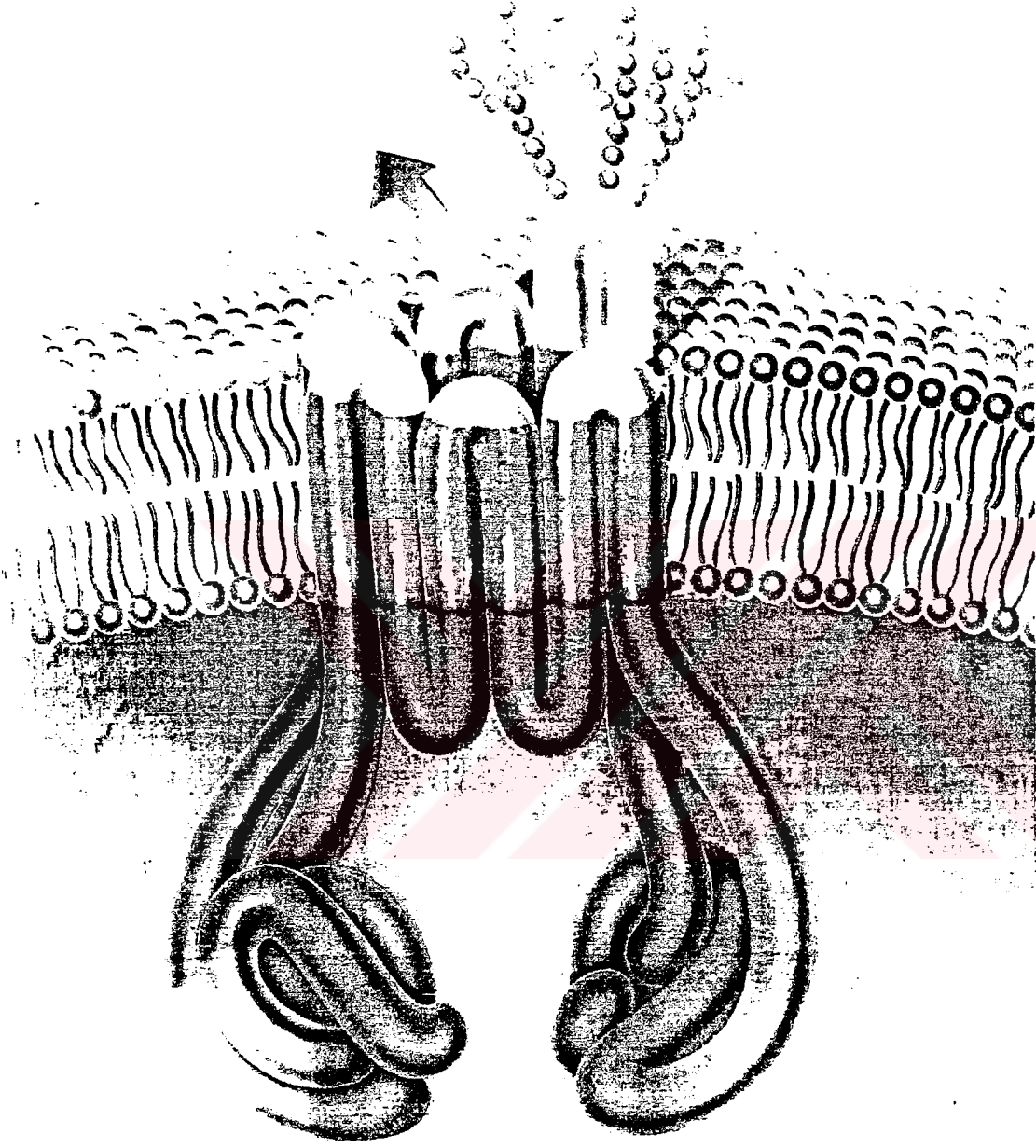
ÇİD mekanizmasına sahip insan ve rodent hücre dizilerinde yapılan çalışmalar P-gp' nin fosforlandığını da göstermiştir. İnsan P-gp' sinde **661., 671., 607., 675. ve 683. serin dizgeleri** fosforilasyon yerleri olarak bulunmuştur (Germann 1995, Chambers 1995, Germann 1996). P-gp' nin fosforilasyonunun rolü de birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır ve fosforilasyonun P-gp' nin ilaç transportunu ve çoklu ilaç direnci modülasyonunu regüle edebileceği öne sürülmüştür. Ancak bu konuda yapılan bazı çalışmalar ise fosforilasyonun bunlar üzerinde etkili olmadığını öne sürmektedir. Bu konu henüz yeterince aydınlatılamamıştır ve çeşitli hipotezler ileri sürülmektedir (Germann 1996).



Şekil 1.4. P-gp' nin a.a yapısı (1280 a.a), (Germann 1996).

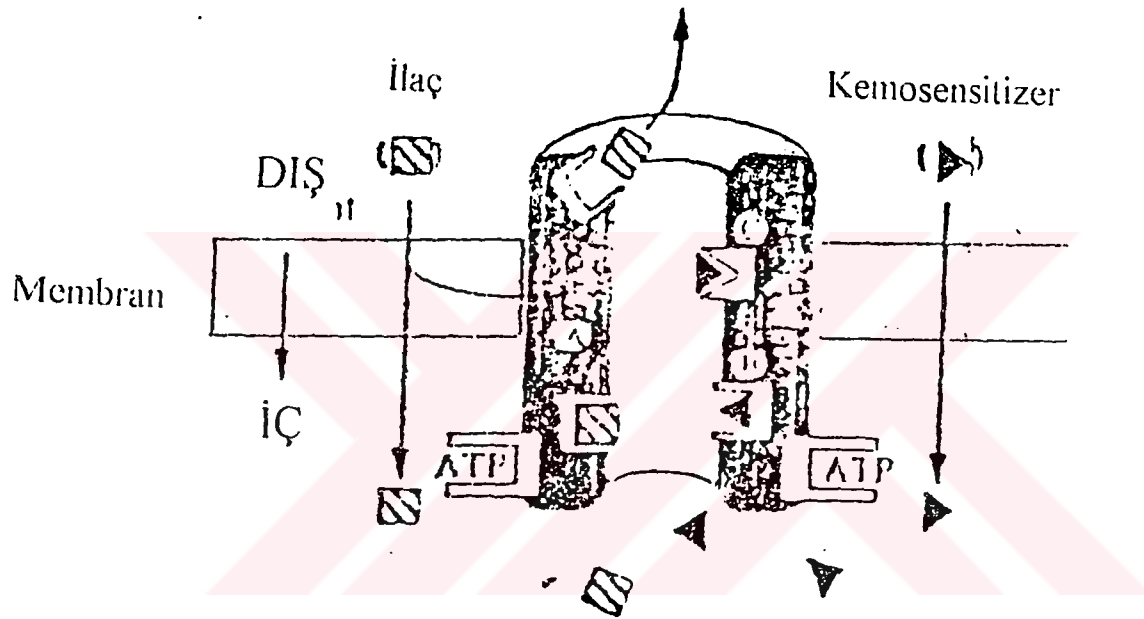


Şekil 1. 5. P-gp' nin membrandaki lokalizasyonu (De Vita 1997).



Şekil 1. 6. P-glikoprotein (170 kD), (Kartner ve Ling 1989).

ATP bağımlı bir pompa gibi çalışan P-gp hücre içerisinde yapısal olarak birbirinden farklı sitotoksik ajanların birikimini azaltmaya yönelik olarak hizmet eder (Bouffard 1996). P-gp modellerinin çoğu, P-gp'nin ilaçları hücre membranından aktif transport proteinlerine analog olarak taşıdığını bildirmektedir. Bu model substratların (sitotoksik ilaçların) proteinin spesifik domainlerine bağlandığı ve bu arada bu domainlerin enerji bağımlı olarak konformasyonel değişikliğe uğradığını, böylece substratın membranın ekstraselüler bölgesinde serbest bırakıldığını öne sürmektedir (Ford 1996), (Şekil 1.7.).



Şekil 1. 7. P-glikoprotein' in transport proteinlerine analog mekanizması (Ford 1996).

P-gp' nin plazma membranında substratlarla direk interaksyona girdiği (hidrofobik vakum temizleyici modeli) (Gottesman ve Pastan 1993, Ford 1996) ya da ilaçları difüze edildikleri yerden membranın iç tabakalarından en dış kısmına transport ettiğini (fillapse modeli) öneren çeşitli modeller de geliştirilmiştir (Higgins 1994, Ford 1996).

İlaç analogları ile yapılan fotoafinite çalışmaları ve site-directed mutagenез yöntemleri ile P-gp' nin haritalanması; P-gp' nin çok sayıda çakışık olmayan, ya da kısmen çakışık olan ve farklı sınıflardan çeşitli ilaçlara karşın farklı affiniteler gösteren ilaç bağlanma bölgelerine sahip olduğunu göstermiştir.

P-gp' nin ilaç tanınması ve bağlanmasından sorumlu domainlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu P-gp' nin ilaç molekülleri ile direk interaksiyona girdiğini göstermektedir (Cornwell 1994, Gros ve Shustik 1991, Morris 1994, Ford 1996).

Sonuç olarak P-gp enerji bağımlı bir çoklu ilaç transporteri olarak aktif taşıyıcı proteinlere benzer şekilde fonksiyon gösterir ve ifadesi bu tip ÇİD için genetik temeli oluşturmaktadır.

1. 6. Normal ve Malignant Dokularda P-glikoprotein İfadesi

Bugüne kadar yapılan lokalizasyon çalışmaları insan MDR1 gen ürünü P-gp' nin normal olarak karaciğer, safra kanalcıkları, böbrek proksimal tübülü, pankreatik kanallar, kalın ve ince bağırsak lümeni ve adrenal bezde ifade edildiğini göstermiştir. Ayrıca P-gp merkezi sinir sisteminde, testislerde ve plasentada endotel hücrelerinde bulunmuştur. P-gp' nin kan-beyin bariyeri, kan-testis bariyeri ve plasentayı kapsayan vasküler endotelyumun iç lümen yüzeyi boyunca ifade edilmesi merkezi sinir sistemini, fetüs ve üreme hücrelerini korumada önemli rol oynayabileceğini göstermektedir (Thiebaut 1987, Cordon-Cordo 1989, Goldstein 1996). Ayrıca, kalın ve ince bağırsağın, safra kanalının ve proksimal tübüllerin lümeninde uzanan hücrelerin apikal yüzeyinde bulunması P-gp' nin potansiyel toksik ksenobiotiklerin boşaltımında rolü olduğunu göstermektedir (Fischer 1996), (Çizelge 1.4).

Diğer dokulardaki fonksiyonları henüz açık olmamakla birlikte, ekzojen toksinlere karşın koruma, bazı metabolitlerin atılımı, steroid hormonların taşınması, polipeptidlerin (sitokin) atılımı gibi potansiyel fonksiyonlara sahip olduğu ileri sürülmektedir (Borst ve Schinkel 1996), (Çizelge 1.4).

İmmünohistokimyasal ve *in situ* hibridizasyon çalışmaları ile kolon kanseri, renal hücre kanseri, hepatoma, adenokortikal karsinoma, pankreas adacık hücre karsinomu gibi tedavi edilemeyen malignansilerin sıklıkla yüksek düzeylerde MDR1 geni ifade ettikleri gösterilmiştir. (Çizelge 1. 5.) , (Fojo 1987, Kanamaru 1989, Goldstein 1996).

Akut miyeloidlösemi (AML), kronik miyeloidlösemi (KML), Non Hodgkin Lenfoma, kronik miyeloidlösemi (blast krizi), nöroblastoma, gibi malignansilerde de yüksek ya da orta düzeyde MDR1 RNA' sı ifade edilir (Goldstein 1989, Rothenberg 1989, Bourhis 1989, Goldstein 1996). Tedavi edilemeyen birçok tümörde düşük ya da belirlenemeyecek düzeyde MDR1 RNA' sı bulunmuştur. Bu grupta meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (n-KHAK), küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), KML, özofagal, baş-boyun, melanoma, mezotelioma, over, prostat, sarkoma, troid kanserleri, Wilm's tümörü ve mide karsinomu yer almaktadır (Goldstein 1996).

Kemoterapiye başlangıçta duyarlı olan tümörler, tedaviden bir süre sonra ya da tedavi sırasında da direnç geliştirebilirler. Tek ilaç tedavisinden sonra bile yüksek düzeyde MDR1 RNA'sına sahip olan malignansiler vardır. Örneğin Non Hodgkin Lenfoma, ergin ve çocuk akut lenfoblastik lösemileri, ergin akut miyelositik lösemi, nöroblastoma, feokromositoma, meme, over kanseri, rabdomiyosarkom, pediatrik sarkom ve multiple myeloma gibi (Çizelge 1.5), (Bourhis 1989, Chan 1991, Goldstein 1996).

Bu bilgiler MDR1 ifadesinin belli başlı malignansilerde ilaç direnci gelişimindeki potansiyel rolünü ortaya koymaktadır.

Çizelge 1. 5. MDR1 geni ifade eden insan tümörleri (Goldstein 1996).

A. Yüksek düzeyde MDR1 ifade eden tümörler

Kolon	Feokromositoma	KML-blast kriz
Renal	Pankreatik karsinoma	Karsinoid
Hepatoma	non-KHAK	
Multiple myeloma	Adrenokortikal karsinoma	

B. Nadiren yüksek düzeyde MDR1 ifade eden tümörler

ALL (ergin)	Neuroblastoma
AML (ergin)	Astrositoma
KLL	Non-Hodgkin's lenfoma

C. Çok düşük düzeyde MDR1 ifade eden ya da hiç etmeyen tümörler

Meme	Mezotelioma	Baş ve Boyun
non-KHAK	Over	Melanoma
Kan	Prostat	Tiroid
KML-kronik faz	Sarkoma	Wilm's
Özofagus	KHAK	
Mide	Timoma	

D. Kemoterapiden sonra yüksek düzeyde MDR1 geni ifade eden tümörler

Meme	Ovarian	ANLL (ergin)
Neuroblastom	ALL (çocuk)	KLL
KML-Blast kriz	Feokromositoma	Multiple myeloma
ALL (ergin)	Non-Hodgkin's Lenfoma	

1. 7. P-gp Aracılıklı ÇİD Fenotipinin Geri Döndürülmesi

Çoklu ilaç direncini önlemek veya yenmek için klinik açıdan bir çok strateji geliştirilmiştir. Bunların çoğunluğu temel olarak p-glikoprotein ifadesinin azaltılması yada fonksiyonel aktivitesinin inhibe edilmesine odaklanmıştır (Sonneveld 1996, Ferry 1996, Ford 1996).

P-gp' nin aracılık ettiği çoklu ilaç direncinin farmakolojik olarak tersine çevrilmesi ilk olarak Tsuruo ve grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Tsuruo ve arkadaşları, verapamil veya trifloroperazin kullanarak çoklu ilaç direnci gösteren bir fare lösemi hücre dizisinde vincristinin hücre içi birikimini sağlayabilmişlerdir. Böylece bu ilacın antiproliferatif etkisini güçlendirmişlerdir. Bu orjinal gözlemden sonra birçok kemoterapötiklerin çoklu ilaç direncini geri çevirdiği gözlenmiştir (Tsuruo 1981, Ferry 1996, Ford 1996), (Çizelge 1.6).

Çizelge 1. 6. P-gp (MDR) inhibitörleri (Ferry 1996).

Verapamil	Nifedipine
Diltiazem	Quinidine
Quinine	Reserpine
Cefoperazone	Cloroquine
Trifloroperazine	Tamoxifen
Progesterone	Cyclosporine
Dipridamole	

ÇİD' i geri çevirebilen bu ajanların büyük çoğunluğu P-gp' nin ilaç pompalama fonksiyonunu, P-gp ile direk interaksiyona girerek inhibe ederler. Bazıları (verapamil, siklosporin A) ise diğer bir çok kemoterapötik ajanın P-gp' ye bağlanmasını, bu ajanlarla yarışa girerek bloke ederler.

Ancak bu ajanların toksisite profilini çoğu zaman aşması bu ilaçların ÇİD' i yenmek için rutin kullanımını engellemektedir. Bu yüzden de daha etkin ve daha az toksik olan yeni ajanlara ihtiyaç vardır.

1. 8. Gempitabin ve İlaç Direnci

İlaç direnci, onkolitik ilaç tedavisi altındaki hastalarda bu tedavinin başarısız kalmasına yol açan nedenlerin önde gelenlerinden biridir. Bu güne kadar yapılan klinik çalışmalarla in vitro çalışmalarda gempitabinin p-glikoprotein direnç mekanizmasını harekete geçirip geçirmediği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Eğer gempitabin bu mekanizmayı harekete geçirmiyorsa, diğer onkolitik ilaçlara karşın da çapraz direnç gelişmesine yol açmayacağından, kombinasyon tedavilerinde kullanılmaya uygun bir sitostatik demektir.

İn vivo fare modeli çalışmalarından elde edilen bilgiler (Waud 1996) gempitabinin P-glikoprotein (ÇİD) direnç mekanizmasını harekete geçirmediği izlenimini vermektedir. Ancak bu bulguların insanlarda da doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

1. 9. İnterferonlar ve Özellikleri

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

İnterferonlar Tip I ve Tip II olmak üzere iki temel grupta toplanırlar. Tip I interferonlar IFN- α (alfa) ve IFN- β (beta), Tip II interferon ise IFN- γ (gama) dır. IFN- α 20 dolayında bir gen ailesinden meydana gelir. Bunların 14 tanesi aynı fizyolojik özelliğe sahip ancak birkaç aminoasit değişikliği gösteren IFN- α proteinlerini kodlarlar, diğer IFN- α genleri “pseudogen” durumundadır. Bütün IFN- α genleri 9. kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olmuşlardır ve intron içermezler. IFN- β sadece bir gen tarafından kodlanır. Bu gen de 9. kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olmuştur ve intron içermez. IFN- α ve IFN- β 189 a.a uzunluğunda bir polipeptid olarak sentezlenirler ancak bunların hücre dışına salınımı sırasında 23 a.a lık sinyal peptidi koparılır ve fonksiyonel olan 166 a.a lık protein dolaşım sistemine verilir. IFN- γ bir gen tarafından kodlanır ve bu gen 12. kromozomun uzun kolu üzerinde lokalize olmuştur ve üç intron içerir (Weissmann ve Weber 1986).

İnterferonlar sağlıklı bir insan vücudunda pikomolar konsantrasyonda devamlı olarak bulunurlar. Ancak vücuda giren bakteri, virüs, antijen ya da vücutta gelişen tümörlere karşı bir cevap olarak miktarları artırılır. Böyle bir durumda lökositler IFN- α ' yı, fibroblastlar IFN- β ' yı, monosit ve T-lenfositlerde IFN- γ ' yı sentezleyerek kan dolaşımına verirler.

İnterferonlar etkinliklerini hücre yüzeyinde bulunan özgül reseptörlere bağlanarak gösterirler. Bu özellikleri bakımından bir hormon olarak kabul edilirler. IFN- α ve IFN- β aynı reseptöre bağlanarak aynı tip sinyalin yaratılmasına sebep olurlar. IFN- γ ise tamamen farklı bir reseptöre bağlanır ve farklı bir sinyalin yaratılmasına sebep olur (Branca ve Baglioni 1981, Weissman ve Weber 1986).

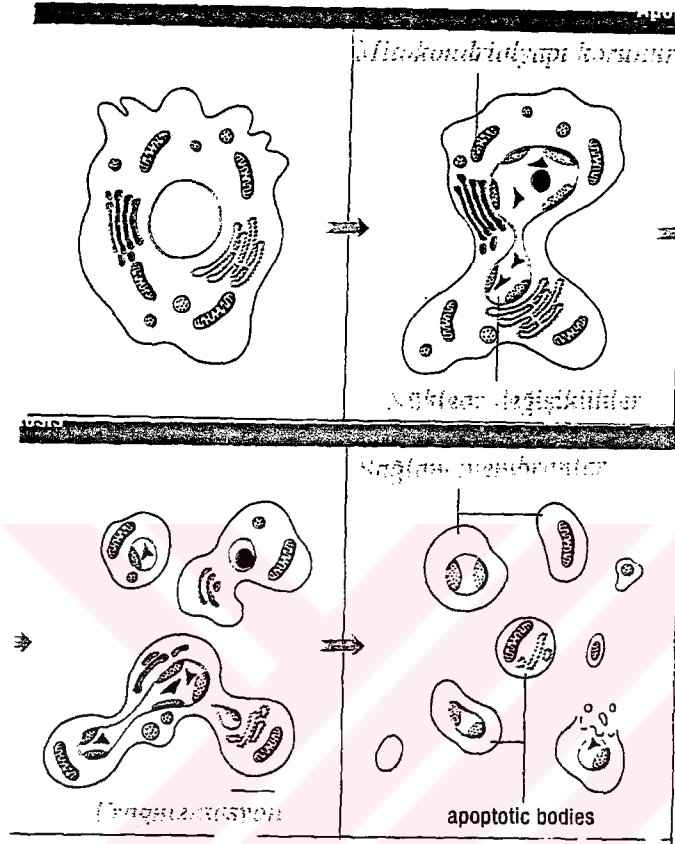
İnterferonların özgün hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması, hücrelerde viral replikasyonun inhibisyonu, hücre farklılaşmasının ve hücre proliferasyonunun indüksiyonu gibi çeşitli fizyolojik cevaplar oluştururlar.

1. 10. Apoptozis Nedir, Nasıl Gözlenir?

Apoptozis embriyogenezis, immün cevap, doku bağımlı hormon sentezi ve normal doku homeostazisi sırasında hücre sayısını kontrol eden hücre ölümünün normal fizyolojik prosesidir (Wyllie 1986 Walker 1988). Apoptotik hücre ölümü nekrotik hücre ölümünden farklıdır. Nekrotik hücre ölümü hücrenin hızla şişmesi ve lizisi ile sonuçlanan hücre ölümünün patolojik bir formudur. Buna karşılık, apoptotik hücre ölümü hücrenin oto sindirim kontrolü ile karakterize edilir. Hücreler, hücre içi proteazların aktivasyonu ile kendi apoptotik ölümlerini başlatırlar. Bu durum hücre iskeleti bozuklukları, hücre kayıpları ve membranda kabarcıklarla sonuçlanır. Apoptozis çekirdekteki karakteristik değişiklikleri de içine alır. Çekirdek yoğunlaşmaya başlar ve endonükleazlar aktive olarak DNA'yı parçalamaya başlarlar. Çoğu hücre tiplerinde DNA oligonükleozomlar halinde DNA fragmentlerine ayrılır (Wyllie 1980). Bu fragmentler en az 180 nükleotid büyüklüğündedir. Gelişen deliller immünsistem mekanizmaları ya da doku spesifik homeostatik kontroller boyunca apoptozisin indüksiyonunun gelişmemiş tümör hücrelerinin elimine edilmesi için önemli bir yol olduğunu desteklemektedir. Bu hipotez, apoptozisten koruyabilen onkogenlerin ifade edilmesi (örneğin bcl-2) ve mutant tümör baskılayıcı genlerden p53'ün bulunmasıyla desteklenmiştir (Wright 1994).

Ölmekte olan bir hücre kendi plazma membranının bütünlüğünü korur. Bununla birlikte apoptotik hücrelerin plazma membranındaki değişiklikler yakınındaki fagositik hücrelere onları içine almaları için bir sinyal oluştururlar ve böylece hücresel yıkım başlar. Hücreler hemen fagosite olmazlar önce "Apoptotic bodies" denilen küçük membran bağımlı fragmentlerine ayrılırlar. Apoptozisin önemli bir özelliği de herhangi bir teşvik edici cevap olmaksızın ölmekte olan hücrenin eliminasyona uğramasıdır. Çoğu dokularda hücre canlılığı, hücre dışı matriks ve komşu hücreler tarafından verilen canlılık sinyallerinin sürekli olarak sağlanmasına bağlı olarak görünmektedir. Birçok organdan alınan hücreler ekzojen yaşam faktörlerinin yokluğunda kültüre edildiğinde apoptozise maruz kalacaktır. Bu durumlarda ölüm, çoğu hücrelerde apoptozis aracılığı ile ifade edildiği gösterilen yeni proteinlerin sentezinin varlığında bile ortaya çıkar.

Bu sonuçların bir yorumu da çevreden sürekli olarak ya da uygun aralıklarla yaşamsal sinyaller alınmadığında çoğu hücrelerin toplu intihara programlanmış olmasıdır (Thiebaut 1995).



Şekil 1. 8. Apoptozise uğrayan bir hücrede meydana gelen değişiklikler

2. MATERYAL VE METOD

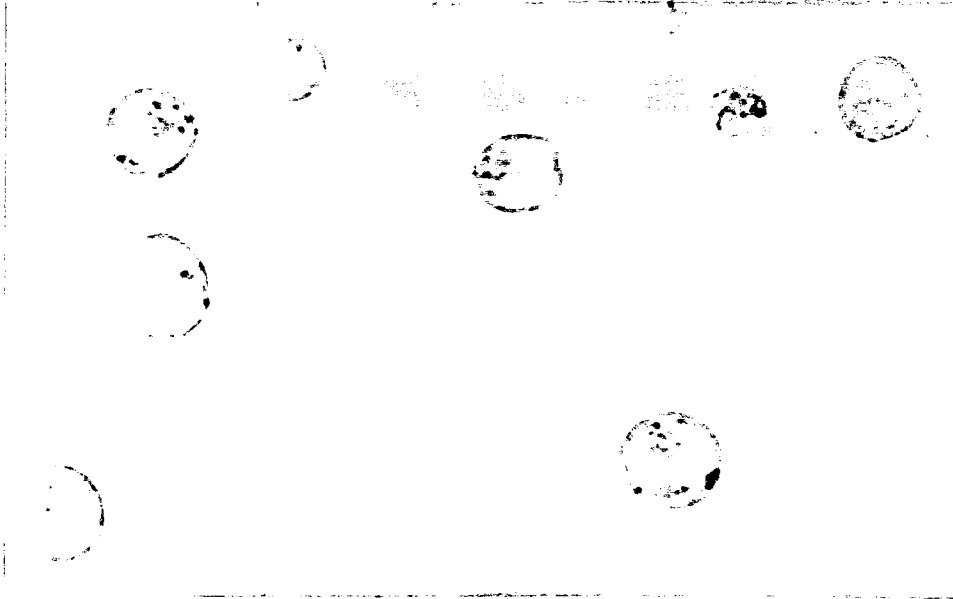
2.1. MATERYAL

2. 1. 1. Hücreler ve kültürasyonları

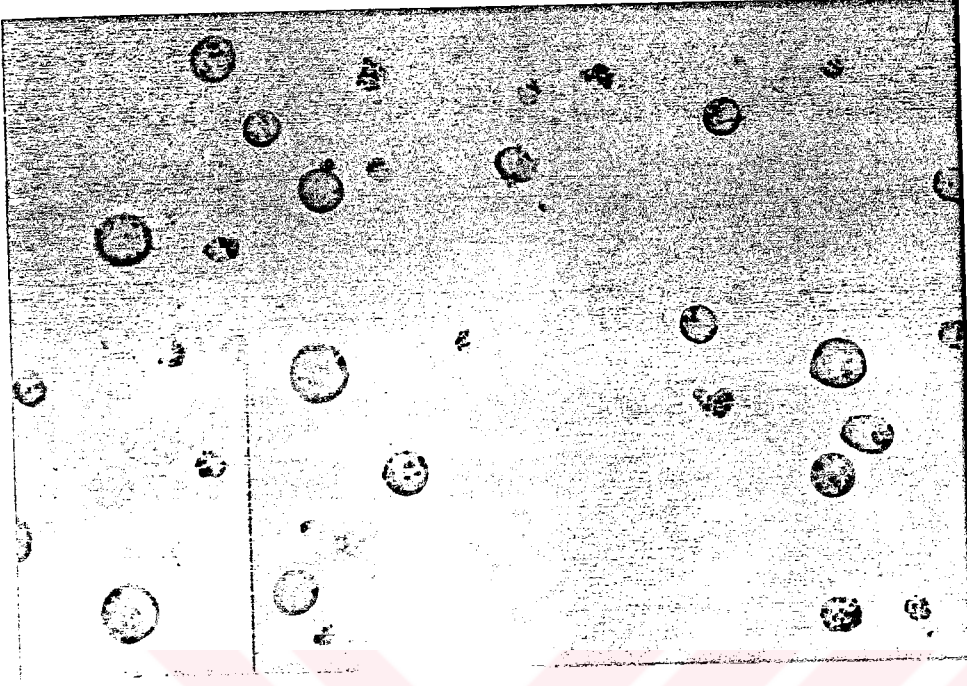
Çalışmada insan eritrolösemi hücre dizisi K562 (ATCC CLL 243) ve P-gp (+) varyantı K562/DOX kullanılmıştır. K562 hücre dizisi ilk defa Lozzio ve Lozzio tarafından kronik myeloid bir hastadan elde edilmiştir. Bu hücre dizisi Philadelphia kromozomu bakımından pozitif olup, eritroid özellikteki bir hücrenin klonal gelişimi ile ortaya çıkmaktadır (Lozzio ve Lozzio 1975).

K562/DOX , K562 hücrelerinin bir varyantı olup ilk defa Tsuruo tarafından K562 hücrelerine konsantrasyonu her defasında bir basamak artırılarak doxorubicin uygulanması sonucu geliştirilmiştir (Tsuruo 1986). Her iki hücre dizisi de Dr. J. P. Marie Hotel-Dieu Hospital, Paris, Fransa' dan sağlanmıştır.

Bütün hücreler % 10 fetal calf serumu (Sigma N-4762) ve % 1 antibiyotik-antimitotik karışımı (Sigma A-9909, 10000 U/ ml penisilin G, 10 ng/ml streptomisin, 0.0025 mg/ml amfoterisin B) içeren RPMI-1640 besi ortamında (Sigma R-6504), 37 ° C de, %5 CO₂' li ortamda 25 cm² ve 75 cm² lik flasklarda kültüre alınmışlardır.



Şekil 2. 1. Çalışma da kullanılan K562 hücrelerinin inverted mikroskopta görünümü



Şekil 2. 2. Çalışmada kullanılan K562/DOX hücrelerinin inverted mikroskopta görünümü.

2. 1. 2. Çalışmada Kullanılan Gemsitabin ve İnterferon-alfa

Gemsitabin (2, 2, difluorodeoksisitidin): Çalışma boyunca kullanılan gemsitabin (Lilly firması tarafından, Gemzar (Gemsitabin-HCL) ticari adı ile üretilen 20 mg/40 mg lık şişelerden toz halde alınıp steril şartlarda hazırlanmıştır.) Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dahiliye/Onkoloji Kliniği'nden Dr. Burhan Savaş tarafından sağlanmıştır.

İnterferon-alfa : Çalışma boyunca kullanılan. **İnterferon-alfa-2a** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dahiliye/Onkoloji Kliniğinden Dr. Burhan Savaş tarafından sağlanmıştır.

2. 2. METOD

2. 2. 1. Büyüme inhibisyonunun ölçülmesi

Bütün hücreler 75 cm² lik flasklardan logaritmik büyüme fazlarında 1x10⁵ hücre/ml yoğunluğunda 24 kuyucuklu plaklara taşınmıştır. RPMI-1640 besi ortamında bir gece ön inkübasyonda tutulduktan sonra logaritmik üreme fazında hücrelere artan konsantrasyonlarında gemsitabin veya gemsitabin kombine interferon alfa ile 72 saat boyunca, 37 ° C de, %5 CO₂ li ortamda muamele edilmişlerdir. Kontrol hücreleri hiçbir ilaç ve sitokin ile muamele edilmemiştir. Tüm bu işlemler doku kültürü odasında steril şartlar altında uygulanmıştır.

Çizelge 2. 1. K562 ve P-gp (+) K562- DOX için kullanılan gemsitabin dozları

Gemsitabin (µM)	
1	200
5	300
8	400
10	500
100	-

Çizelge 2. 2. K562 ve P-gp (+) K562- DOX için kullanılan interferon-alfa dozları

İnterferon alfa (ng/ml)	
10	250
25	500
50	1000
100	-

Ayrıca Çizelge 2. 1. de görülen gemsitabin dozları 200 ng/ml sabit IFN α-2a dozu ile kombine olarak da uygulanmıştır.

72 saatlik inkübasyon süresi sonunda tüm örneklerden 100 er µl alınarak Tripan mavisi testi uygulanmıştır. Canlı hücrelerin boyayı almayıp, ölü hücrelerin ise boyayı alması esasına dayanarak canlı ve ölü hücreler hemasitometre lamı kullanılarak sayılmıştır. Elde edilen canlı hücre sayısı ve hücrelerin başlangıç zamanında 1 ml' deki sayısı aşağıdaki formül kullanılarak çoğalma inhibisyonunun yüzdesi hesaplanmıştır.

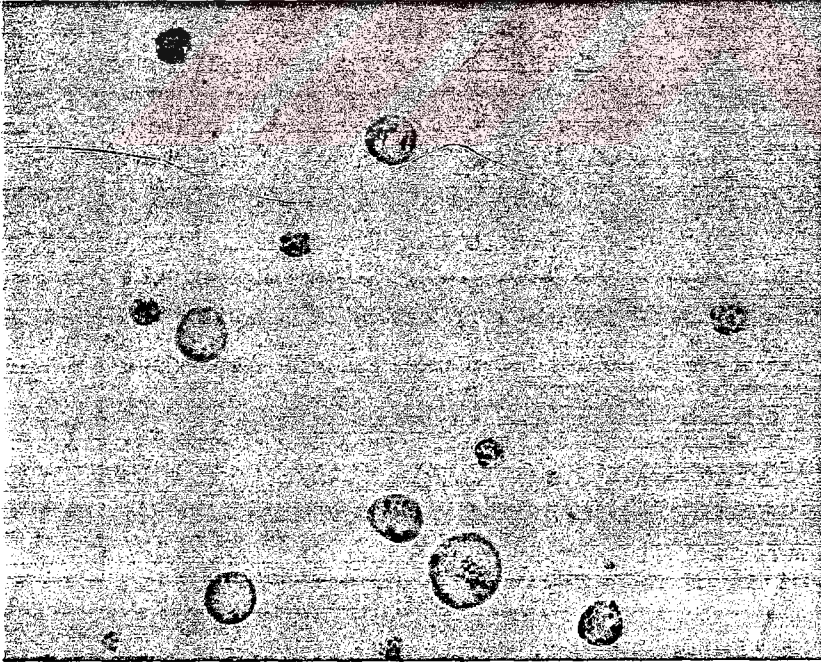
$$\% \text{ Ölüm} = \frac{K_n - L_n}{K_n - K_0} \times 100$$

L_n = Gemsitabin ve interferon uygulanmış hücrelerin n. gündeki sayısı

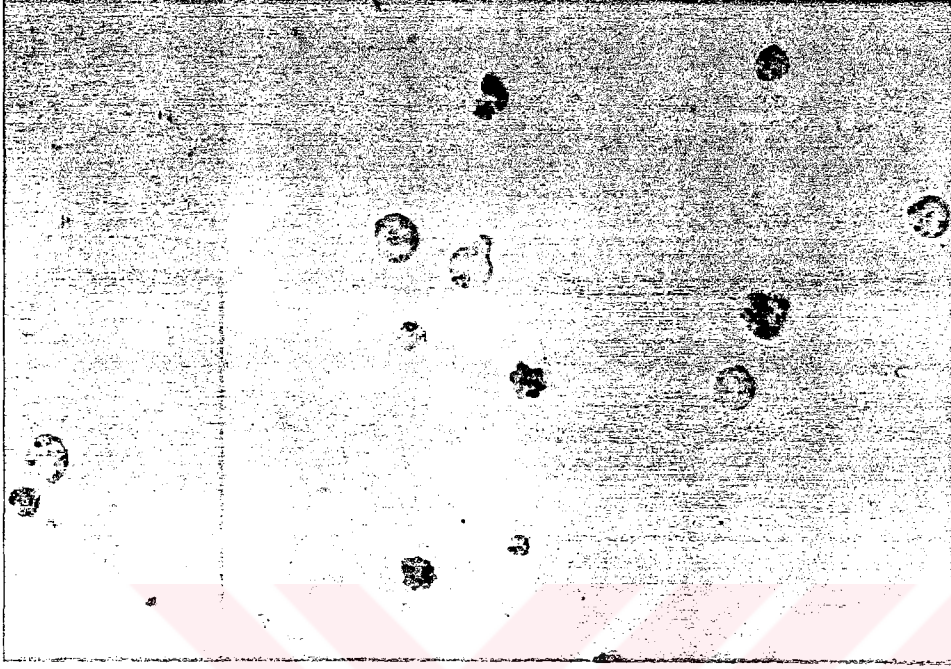
L_0 = Gemsitabin ve interferon uygulanmış hücrelerin 0. gündeki sayısı

K_n = Kontrol hücrelerin n. gündeki sayısı

K_0 = Kontrol hücrelerin 0. gündeki sayısı



Şekil 2. 3. Tripan mavisi ile boyanmış K562 hücrelerinin inverted mikroskopta görünümü



Şekil 2. 4. Tripan mavisi ile boyanmış K562/DOX hücrelerinin inverted mikroskopta görünümü

2. 2. 2. K562/DOX hücrelerinin P-gp ifadelerinin P-gp 4E3 FITC monoklonal antikoruna ile (SIGNET) gösterimi

K562/DOX hücre dizisinin P-gp ifadesinin yüzdesi ve şiddeti **4E3 monoklonal antikoruna** kullanılarak flow sitometri ile tayin edilmiştir. Bu deneyde 1 milyon hücre, 2.5 µg 4E3-FITC monoklonal fare anti-insan (mouse antihuman) antikoruna, 2.5 µg IgG2a kontrol antikoruna (negatif), PBS tamponuna (Phosphate Buffered Saline Ph 7, 1000 ml için: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, KH₂PO₄ 0.2 g) ve FCS (Foetal Calf Serum, Sigma N-4562) kullanılmıştır.

4E3, IgG2a tipinde bir antikordur ve P-glikoprotein hücre dışı bir epitopunu tanımaktadır. Orjinal olarak R. J. Arceci tarafından geliştirilmiştir (Arceci 1993). Ticari olarak Signet laboratuvarlarından (Dedham/Massachusetts) sağlanabilmektedir.

Her test tüpü 50 µl hacimde 500 bin hücre olacak şekilde hazırlanmıştır. 10 ml PBS + % 2 FCS içerisinde çözülerek elde edilen hücreler 5 dakika 400 x g (1000 rpm) de santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.

İzotipik kontrol (Negatif) için ve P-gp 4E3-FITC için iki tüp alınmıştır. P-gp tüpüne 20 µl (2.5 µg) Signet 4E3-FITC antikorundan konulmuştur. İzotipik (negatif) kontrol için ikinci bir tüpe 10 µl IgG2a-FITC (DAKO) eklenmiştir. Her iki tüp ayrı ayrı yavaşça karıştırılmıştır. Signet 4E3-FITC antikorunun olduğu tüp karanlıkta oda ısısında 30 dakika, IgG2a-FITC (DAKO) antikorunun olduğu tüp +4 °C de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 2 ml PBS + % 2 FCS içerisinde tekrar çözülerek 5 dakika 400g (1000 rpm) de santrifüj edilmiştir. Bu işlemde iki kez tekrar edilmiştir. Hücreler PBS + % 2 FCS ile 0.5 ml hacimde çözülmüştür. Flow sitometrik analiz yapılıncaya kadar +4 °C de karanlıkta bekletilmiştir. Flowsitometrik analiz için Coulter Epics Elite Fluorescein Activated Cell Sorter kullanılmıştır.

2. 2. 3 Daunorubicin emilim (accumulation= uptake) testi (Marie, 1993)

- 1) Üssel olarak büyüyen hücreler 400 g (1000 rpm) 5 dakika santrifuj edilir, sayılır ve PBS (HBSS) (PH 7,4) içinde $5 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$ hücre/ml konsantrasyonda ayarlanır.
- 2) 8 µg/ml konsantrasyonda Daunorubicin PBS (HBSS) içinde hazırlanır.
- 3) Eşit hacimde 2+ PBS (HBSS) karıştırılarak 4µg /ml konsantrasyonda Daunorubicin PBS (HBSS) içinde elde edilir.
- 4) 80 µM Verapamil PBS içinde hazırlanır.
- 5) 20 µM Verapamil hazırlanır.
- 6) 24 µM Cyclosporin A hazırlanır.
- 7) 2 µM Cyclosporin A hazırlanır.
- 8) Eşit hacimde 2+4
(4 µg /ml Daunorubicin + 40 µM Verapamil)
- 9) Eşit hacimde 2+5
(4 µg /ml Daunorubicin + 10µM Verapamil)

10) Eşit hacimde 2+6

(4 µg /ml Daunorubicin + 12µM CsA)

11) Eşit hacimde 2+7

(4 µg /ml Daunorubicin + 1 µMCsA)

Bu maddeler hazırlandıktan sonra işlemlere aşağıdaki gibi devam edilir.

1) Hücreler 37 C ° 15 dakika inkübe edilir.

2) Eşit hacimde hücre solüsyonu ve daunorubicin ± CsA/verapamil içeren tüpler hazırlanır. Sonuçta hazırlanan tüplerde

a) Hücre + 2 µg /ml Daunorubicin

(Tüp 1+ Tüp 3)

b) Hücre + 2 µg /ml Daunorubicin + + 20 µM Verapamil

(Tüp 1+ Tüp 8)

c) Hücre + 2 µg /ml Daunorubicin + 5 µM Verapamil

(Tüp 1+ Tüp 9)

d) Hücre + 2 µg /ml Daunorubicin + 6 µM CsA

(Tüp 1+ Tüp 10)

e) Hücre + 2 µg /ml Daunorubicin + 0.5 µM CsA

(Tüp 1+ Tüp 11)

3) 37 °C 1,5 saat inkübe edilir. Her 20 dakikada bir çalkalama işlemi yapılır.

4) Flow sitometride 488nm'de laser excitation; 575 nm'de bandpass filter kaydedildi.

Forward scattering ve light scattering lineer okunur. Floresans logaritmik okunur ve 5000 hücre sayılır.

Kalan hücrelerle Daunorubicine retention (alıkoyma) testine aşağıdaki gibi devam edilir.

5) 37 °C 16 saat inkube edilir ve yeniden FACS ile okunur (Van Acker 1993).

2. 2. 4. DNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi

K562 ve K562/DOX hücreleri 1×10^6 hücre/ml yoğunluğunda toplam 5 ml RPMI-1640 besiyerinde bir gece ön inkübasyonda tutulduktan sonra gempitabinin artan konsantrasyonlarında 72 saat boyunca, 37°C ' de, %5 karbondioksitli ortamda inkübasyona bırakılmışlardır. Gempitabin konsantrasyonları büyüme inhibisyonunda kullanılan konsantrasyonlarla aynıdır.

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

DNA Miktarı (µg/ml) : $OD_{260} \times 50 \times SF$

OD_{260} = 260 nm' deki absorbans değeri.

SF = Sulandırma Faktörü

DNA miktarı hesaplandıktan sonra her bir örnekten 10 µg alınarak 1 µg/ml EtBr içeren %1,7'lik agaroz jel elektroforezinde örnekler kuyucuklardan çıkıncaya kadar 75V: 25 mAmp' da daha sonra 150 V: 30 mAmp' da 1x TAE tamponu (0.04 M Tris Asetat ve 0.002 M EDTA pH:8), varlığında yürütülmüştür.

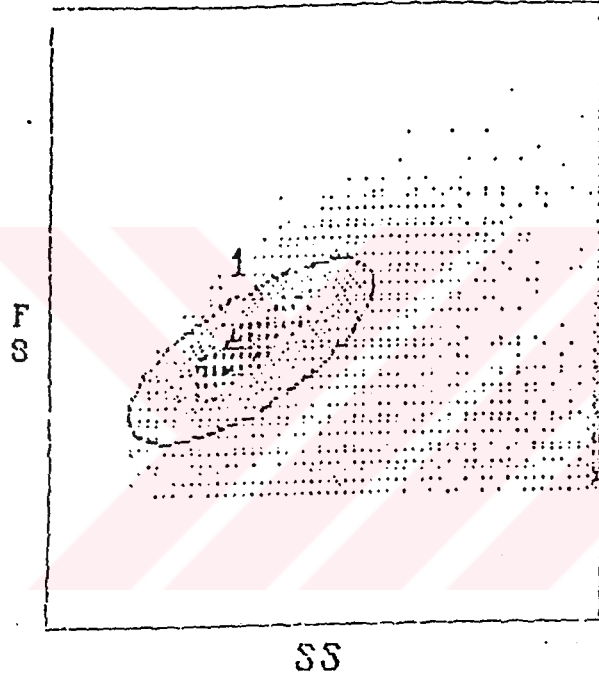
Sonuçlar UV transillüminatöründe (Vilber Lourtmat) gözlenmiş ve jellerin fotoğrafları (DS-34 Polaroid Kamera) çekilmiştir.



3. BULGULAR

3.1. K562/DOX Hücrelerinin P-gp İfadesinin Ölçülmesi

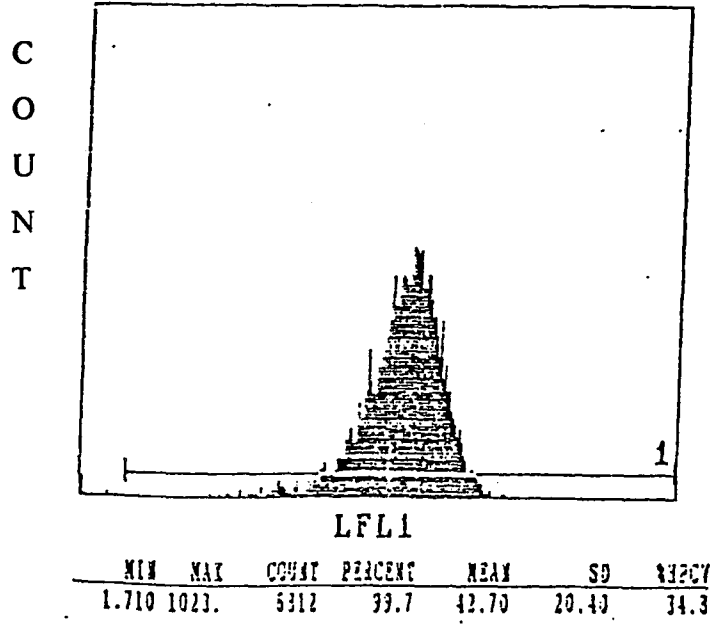
Yapılan Coulter Epics Elite Flourescein Flow Sitometri Analizi sonucunda K562/DOX hücrelerinin P-gp pozitifliği % 99,7 olarak bulunmuştur (Şekil 3.1.a, 3.1.b). IgG2a antikorlu ile yapılan negatif kontrol sonucu da % 1,6 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.1.c).



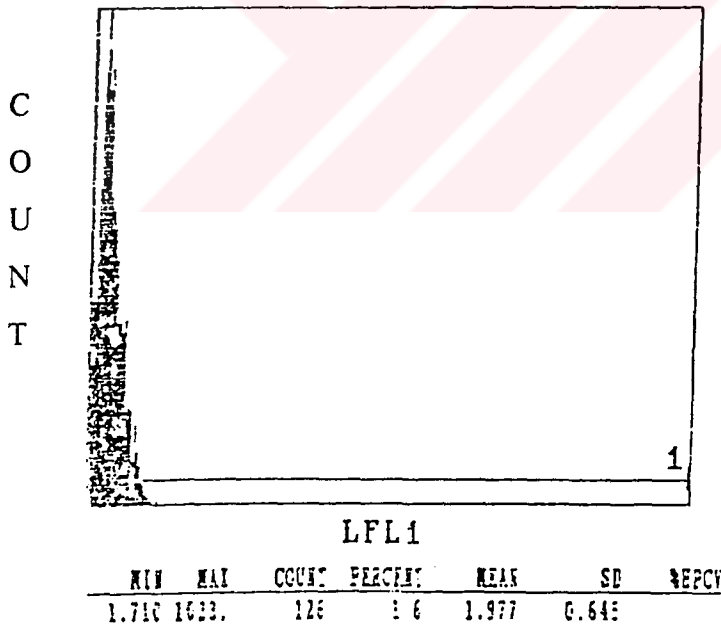
Şekil 3. 1. a) K562/DOX hücrelerinin flow sitometride hücre dizisi olarak görüntüsü

FS : Forward scatter

SS : Side scatter



Şekil 3. 1. b) K562/DOX hücrelerinin flow sitometride 4E3 monoklonal antikoruna ile yapılan P-gp pozitiflik analizi sonucu.

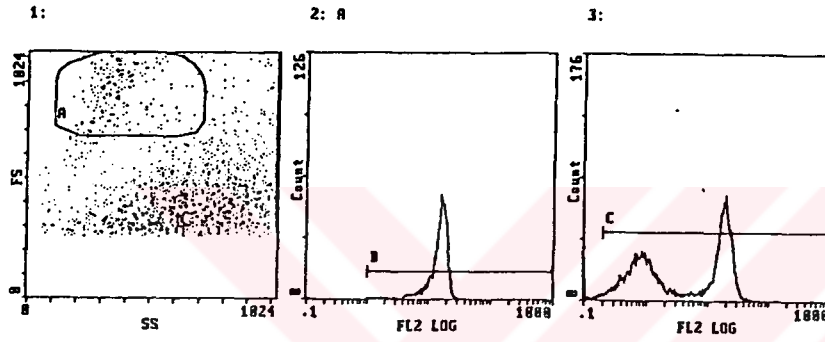


Şekil 3. 1. c) K562/DOX hücrelerinin flow sitometride IgG2a monoklonal antikoruna ile yapılan negatif kontrol analiz sonucu.

LFL1: Floresan 1 değerlerinin logaritmik gösterimi.

3.2. K562/Dox Hücrelerindeki P-gp Pompasının Fonksiyonun Ölçülmesi

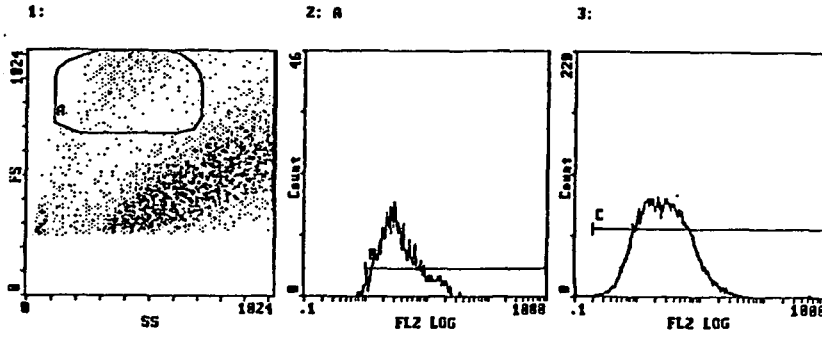
P-gp pompası tarafından dışarı atılan ve flow stometride 478 nm laser excitasyonu ve 570 nm bantpass filtresi ile okunabilen (FL2) daunobicin ilacı kullanılarak daunorubicin ile 1.5 ve 20 saat inkübe edilen K562 ve K562/Dox hücre dizilerinde elde edilen veriler şekil 3.2.a, 3.2.b, 3.2.e ve 3.2.f ile çizelge 3.1.a, 3.1.b, 3.1.e ve 3.1.f de gösterilmiştir. Bu pompanın P-gp fonksiyon inhibitörleri inhibisyonu ile olan sonuçlarda şekil 3.2.c, 3.2.d, 3.2.g, 3.2.h, 3.2.i, 3.2.k ile çizelge 3.1.c, 3.1.d, 3.1.g, 3.1.h, 3.1.i, 3.1.k da verilmiştir.



Şekil 3. 2. a) K562 + Daunorubicin (1.5 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. a) K562 + Daunorubicin (1.5 saatlik inkübasyon verileri).

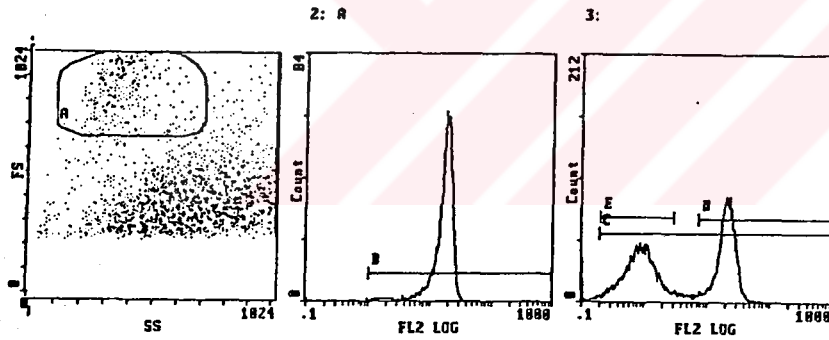
Stats: Normalized, Listgating: Disabled										
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A AUTO	27.2	3077	425.8	984.1	-448.0	1018.0	109	19.63	7.89
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
2	B B	99.8	3077	14.8		-448.0	1018.0	109		



Şekil 3. 2. b) K562/Dox + Daunorubicin (1.5 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. b) K562/Dox + Daunorubicin (1.5 saatlik inkübasyon verileri).

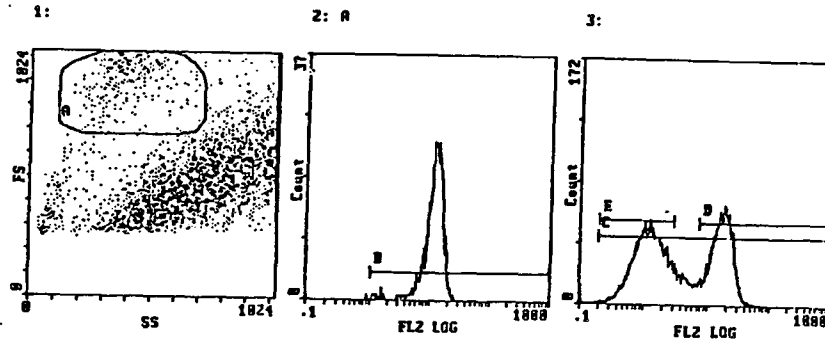
Stats: Normalized, Listgating: Disabled										
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A AUTO	10.5	2587	432.2	987.7	520.0	1016.0	88	22.13	8.74
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
2	B B	98.7	2553	3.78	3.28	2.78	23	2.02	1.04	1024.0
3	C C	99.5	24495	2.77	2.67	1.44	110	38.30	0.198	1024.0



Şekil 3. 2. c) K562+ Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. c) K562+ Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon sonucu).

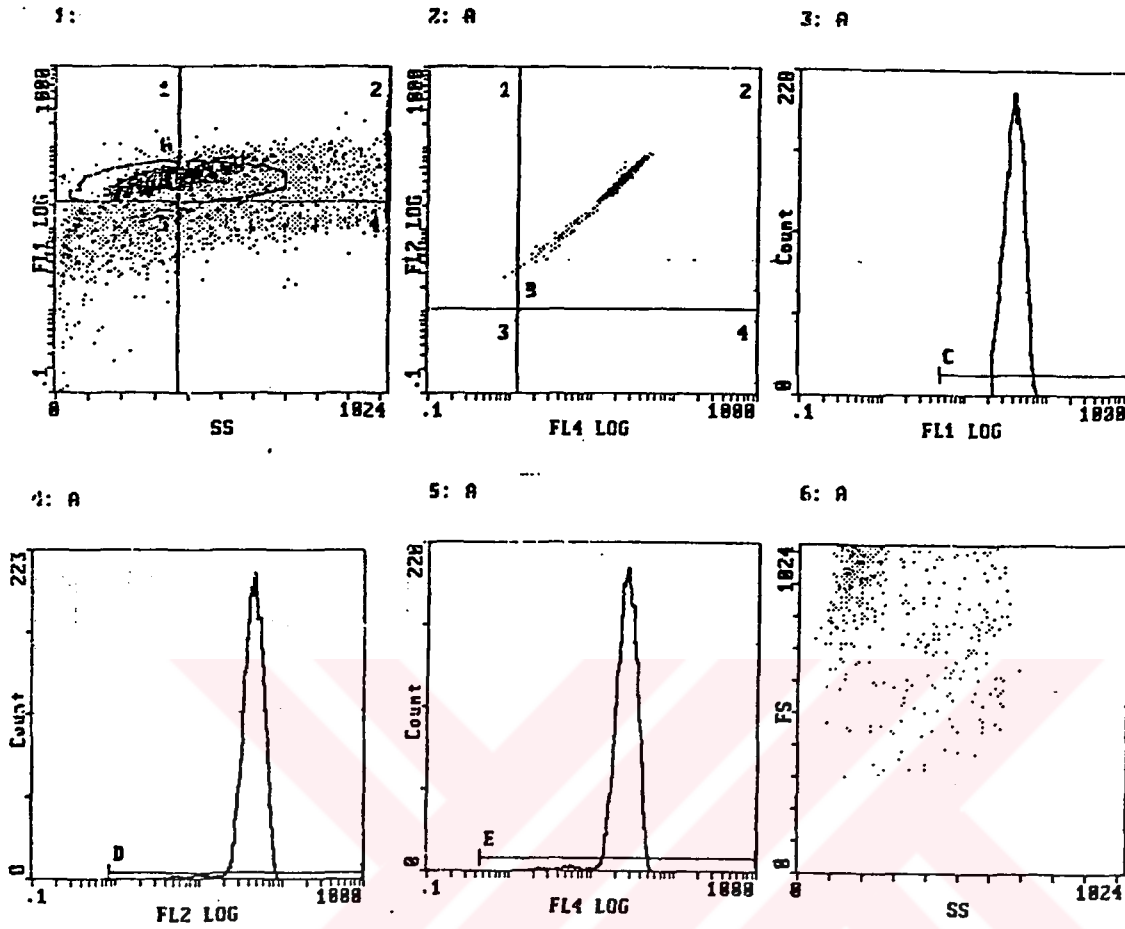
Stats: Normalized, Listgating: Disabled										
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A AUTO	24.7	3899	429.1	980.4	520.0	1016.0	148	19.68	8.27
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
2	B B	99.7	3889	16.6	18.5	18.7	84	10.80	1.04	1024.0
3	C C	97.8	15445	4.23	4.04	24.1	108	19.01	0.198	1024.0
	D D	48.2	7299	21.2	21.6	24.1	108	19.01	7.41	1024.0
	E E	47.1	7448	0.874	0.899	1.02	64	10.20	0.207	3.07



Şekil 3. 2. d) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. d) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).

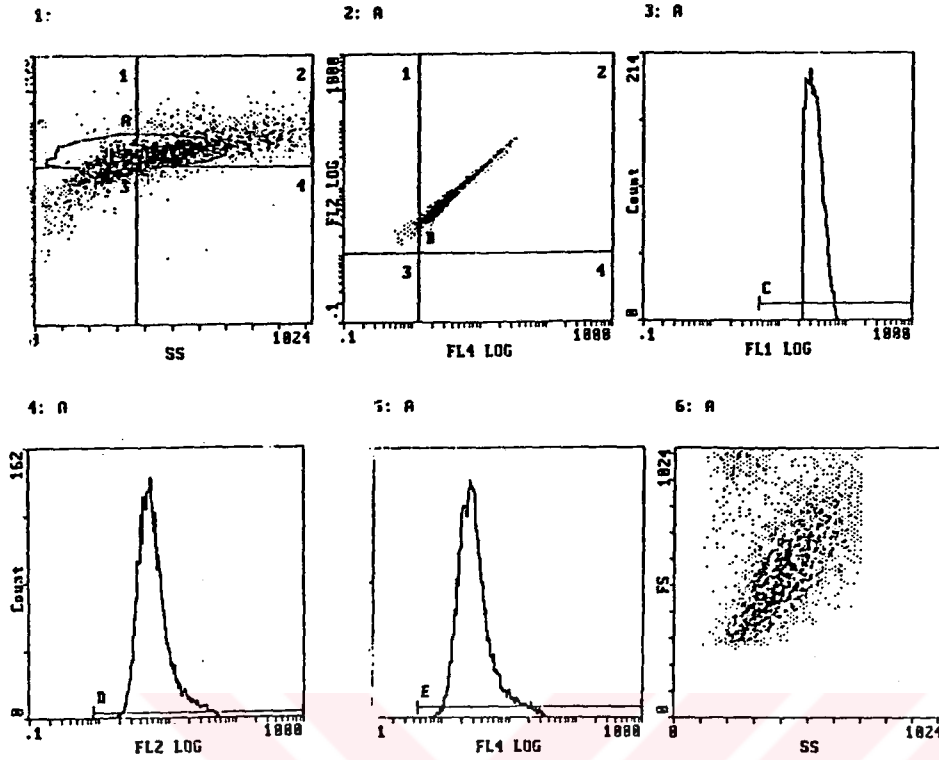
Stats: Normalized, Listgating: Disabled										
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A AUTO	10.2	1798	429.5	980.7	484.0	1016.0	81	22.37	9.20
2	B	99.7	1790	11.5	12.3	12.1	37	4.89	1.04	1024.0
3	C C	99.4	17453	4.02	3.22	18.5	88	30.95	0.198	1024.0
	D D	40.3	7082	17.1	17.3	18.5	88	30.95	7.41	1024.0
	E E	48.8	8579	1.19	1.22	1.07	82	12.87	0.207	3.07



Şekil 3. 2. e) K562 + Daunorubicin (20 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. e) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).

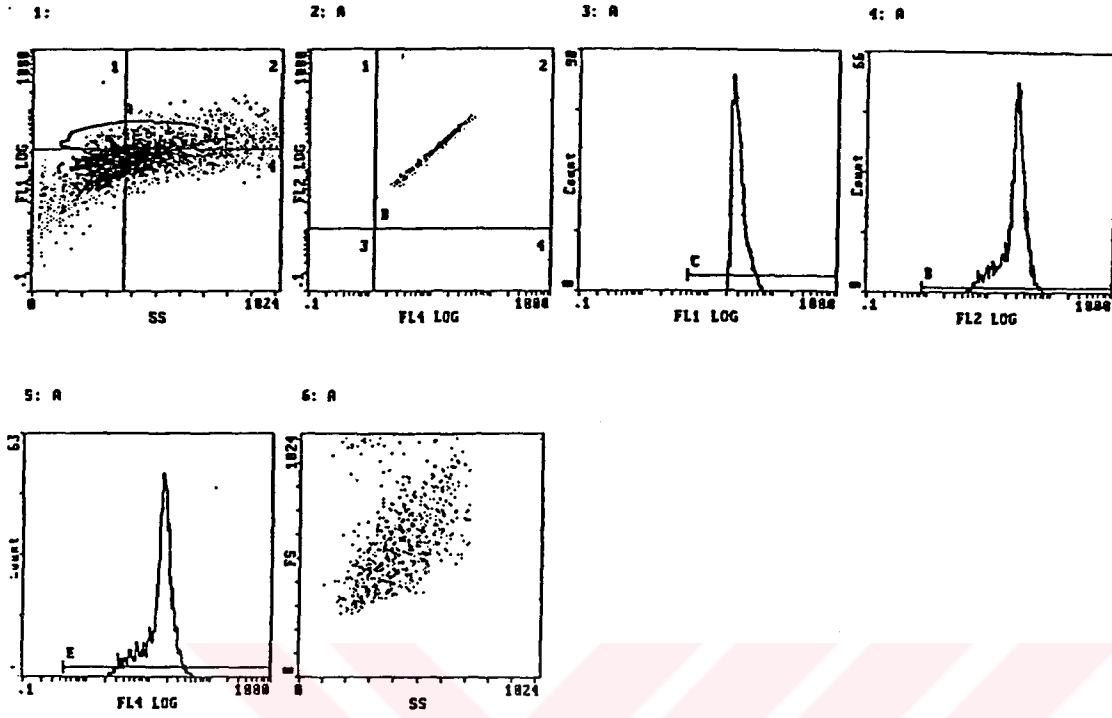
Stats: Normalized,		Listgating: Disabled								
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	F1 F	45.1	10743	267.9	36.5	288.0	37.4	90	22.49	23.86
	F2 F	35.4	8427	594.9	51.4	1016.0	66.5	79	38.15	40.97
	F3 F	11.1	2639	178.1	8.82	192.0	21.0	16	57.88	85.73
	F4 F	8.5	2024	682.1	13.2	1016.0	18.2	54	33.19	42.87
2	A A	66.9	15955	331.5	39.4	288.0	37.4	90	32.44	25.37
	B1 B	0.1	9	0.930	2.39	0.576	1.37	1	26.79	33.00
	B2 B	99.9	15943	24.7	42.1	26.1	43.2	900	39.89	37.74
	B3 B	0.0	3	0.107	0.280	0.102	0.348	1	3.39	76.78
	B4 B	0.0	0	****	****	****	****	..	..	..
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	15955	40.6	40.7	40.5	228	25.03	5.26	1024.0
4	D D	100	15952	43.3	45.2	45.2	223	23.90	0.871	1024.0
5	E E	100	15952	25.5	26.6	23.8	220	26.12	0.448	1024.0



Şekil 3. 2. f) K562/Dox + Daunorubicin (20 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. f) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).

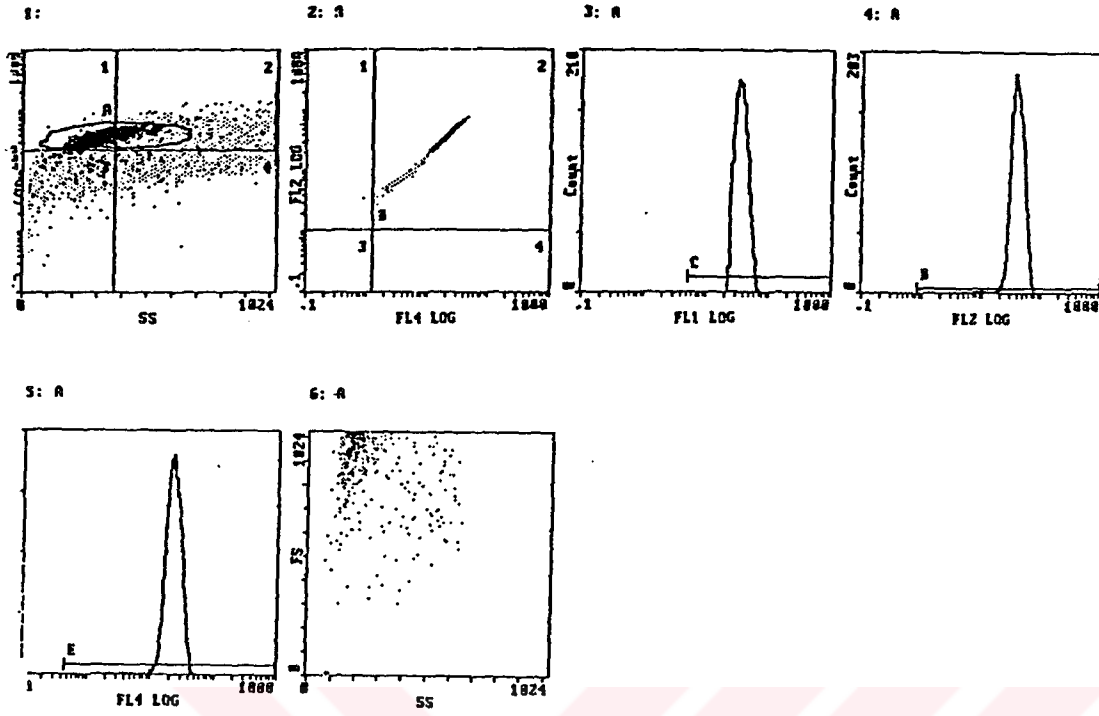
Stats: Normalized,		Listgating: Disabled								
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	F1 F	24.2	6565	285.5	29.7	296.0	24.3	73	19.97	28.99
	F2 F	50.6	13717	591.8	43.5	1016.0	82.5	75	32.73	45.01
	F3 F	22.5	6091	228.8	15.3	256.0	21.0	77	31.55	44.43
	F4 F	2.6	712	428.3	17.6	368.0	21.0	32	18.73	49.33
2	A A	58.6	15881	406.7	32.8	296.0	24.3	73	30.31	26.30
	B1 B	2.2	347	1.04	2.64	1.18	2.80	24	15.91	19.37
	B2 B	97.8	15531	3.08	6.19	2.43	4.99	269	60.43	54.33
	B3 B	0.0	3	0.402	0.442	0.243	0.102	1	35.93	108.56
	B4 B	0.0	0	----	----	----	----	..	..	..
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	15881	33.9	32.9	29.1	214	28.52	5.26	1024.0
4	D D	100	15879	6.27	5.68	5.26	162	29.09	0.871	1024.0
5	E E	100	15879	3.10	2.77	2.73	147	29.76	0.448	1024.0



Şekil 3. 2. g) K562/Dox + Daunorubicin +Verapamil (20 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. g) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).

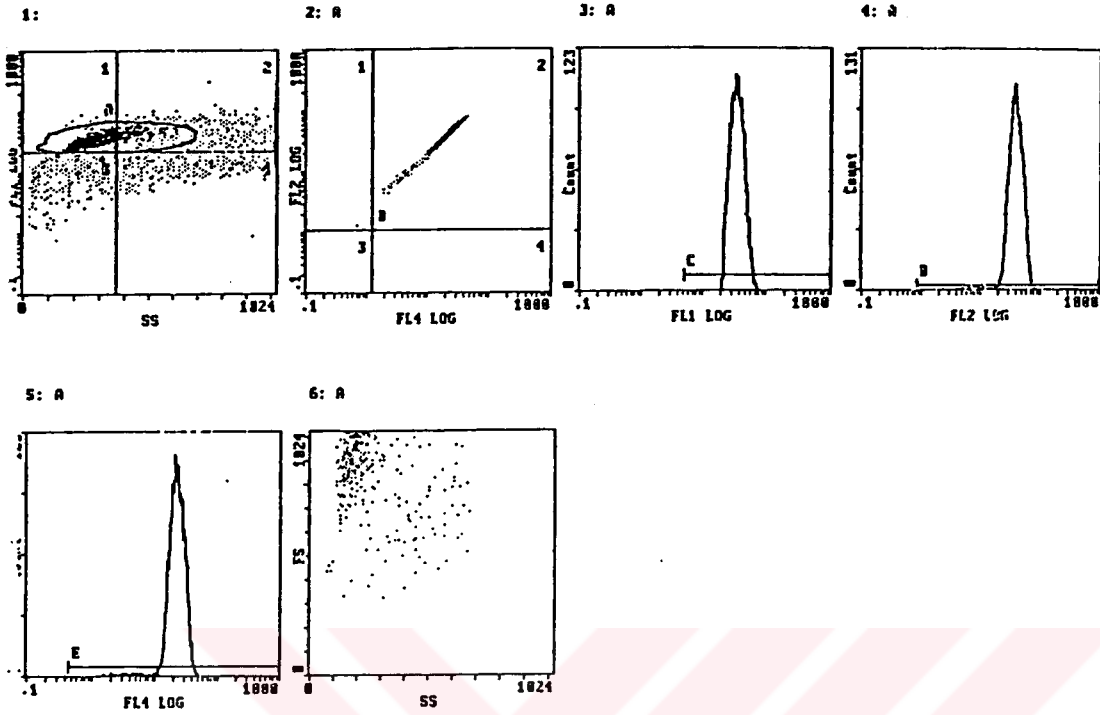
Ata: Normalized,		Listgating: Disabled								
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PtCnt	FPCVX	FPCVY
1	F1 F	4.7	998	294.3	28.3	328.0	22.6	18	17.61	25.20
	F2 F	23.8	5424	664.8	32.8	1016.0	28.0	55	31.59	38.20
	F3 F	39.8	9090	252.6	10.1	296.0	15.8	35	30.31	55.88
	F4 F	32.0	7315	521.3	14.4	376.0	16.9	34	27.80	31.50
	A A	17.7	4031	451.9	29.4	464.0	22.6	24	27.65	23.88
2	B1 B	0.0	0					..	..	..
	B2 B	100	4030	14.3	25.4	15.8	28.0	228	53.92	48.69
	B3 B	0.0	1	0.198	0.499	0.198	0.499	1	0.00	0.00
	B4 B	0.0	0					..	..	..
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	4031	30.3	28.6	24.5	90	12.68	5.28	1024.0
4	D D	100	4030	28.3	29.1	29.9	68	13.78	0.871	1024.0
5	E E	100	4030	14.8	18.8	16.6	63	12.18	0.448	1024.0



Şekil 3. 2. h) K562 + Daunorubicin +Verapamil (20 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. h) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).

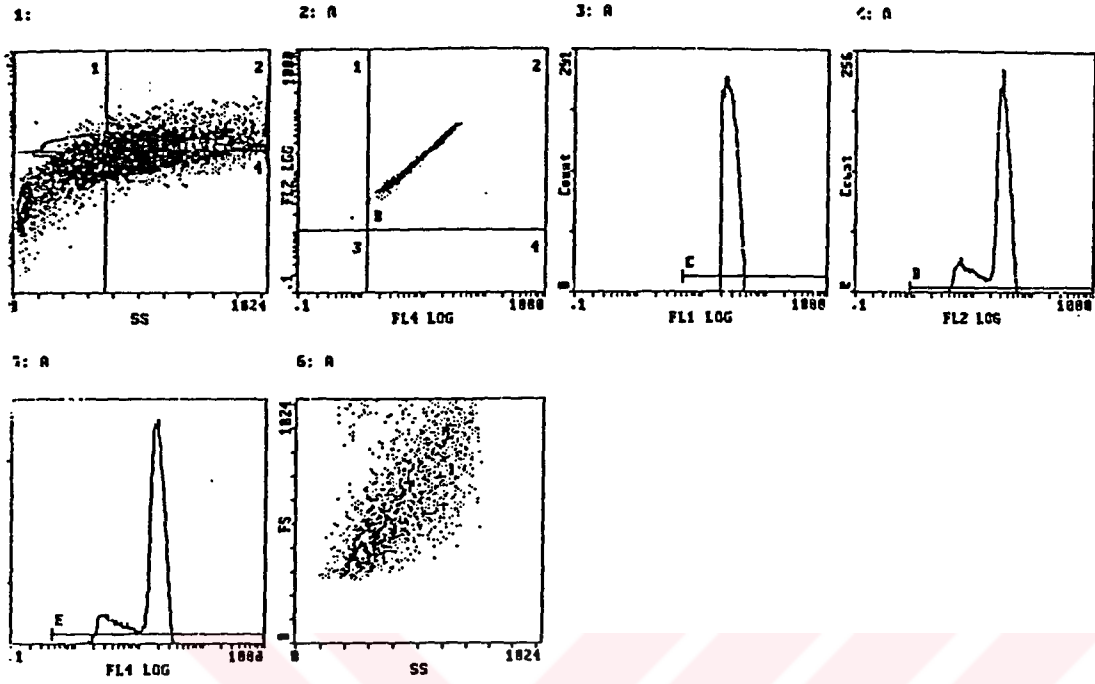
Stats: Normalized,		Listgating: Disabled								
	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	F1 F	48.4	10031	264.5	32.3	224.0	28.0	96	21.42	21.79
	F2 F	29.4	6096	590.8	46.4	368.0	43.2	59	38.46	39.91
	F3 F	13.1	2722	186.0	11.0	184.0	21.0	37	48.83	69.35
	F4 F	9.0	1063	651.1	13.2	1016.0	16.9	43	33.34	38.01
	A A	65.0	13466	317.2	35.1	224.0	28.0	96	31.92	23.34
2	B1 B	0.0	0	0.900	3.10	0.825	2.80	1	8.39	7.34
	B2 B	100	13461	21.5	37.8	19.6	34.8	835	33.60	31.62
	B3 B	0.0	0					..	..	..
	B4 B	0.0	0					..	..	..
st	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	13466	38.2	35.7	32.1	210	23.99	5.26	1024.0
4	D D	100	13466	39.0	39.4	36.1	203	24.90	0.871	1024.0
5	E E	100	13466	22.2	22.5	21.8	198	24.93	0.448	1024.0



Şekil 3. 2. i) K562 + Daunorubicin +CsA (20 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. i) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon verileri).

Stats: Normalized,		Listgating: Disabled								
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	F1 F	48.0	5818	284.8	33.3	232.0	30.1	57	21.53	22.80
	F2 F	30.1	3647	582.8	46.3	392.0	48.4	35	38.40	38.53
	F3 F	12.2	1482	180.0	10.6	192.0	21.0	14	52.97	70.95
	F4 F	9.7	1181	685.2	13.0	1016.0	18.9	31	32.78	38.71
	A A	68.2	8274	318.9	35.6	232.0	30.1	57	32.55	25.25
2	B1 B	0.0	3	0.887	2.00	0.715	1.27	1	21.22	33.58
	B2 B	100	8271	21.4	37.4	21.0	37.4	491	37.05	34.89
	B3 B	0.0	0					..	..	..
	B4 B	0.0	0					..	..	..
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPGV	Min	Max
3	C C	100	8274	38.8	38.5	35.4	123	23.87	5.26	1024.0
4	D D	100	8274	38.8	39.4	37.7	131	19.71	0.871	1024.0
5	E E	100	8274	22.1	22.8	22.4	122	22.76	0.448	1024.0



Şekil 3. 2. k) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (20 saatlik inkübasyon sonucu).

Çizelge 3. 1. k) K562/Dox + Daunorubicin +CsA (1.5 saatlik inkübasyon sonucu).

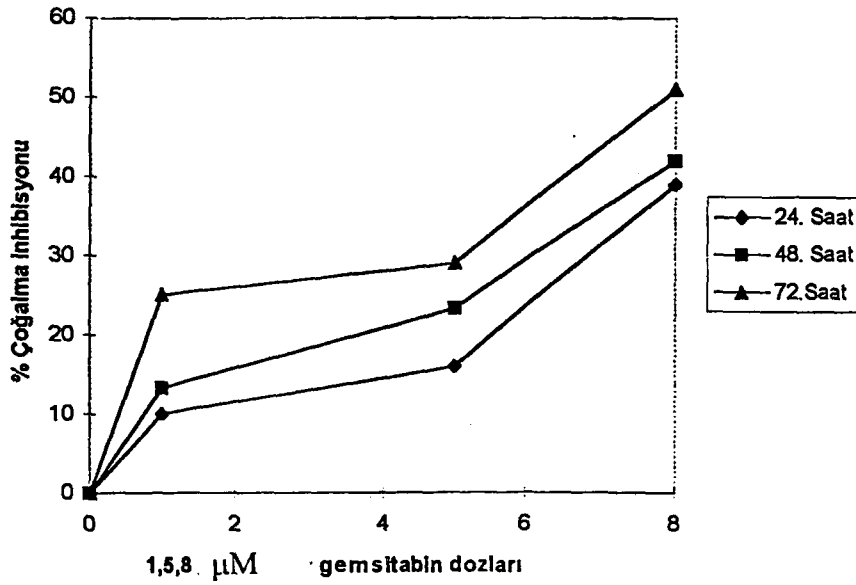
Stats: Normalized,		Listgating: Disabled								
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	F1 F	7.8	4183	298.7	27.2	320.0	22.6	71	15.86	19.80
	F2 F	31.7	16888	852.8	34.9	1018.0	53.6	148	33.02	36.82
	F3 F	37.4	19953	217.8	9.07	296.0	21.0	79	45.32	71.29
	F4 F	23.0	12278	539.5	14.4	378.0	11.8	62	28.32	28.55
	A A	33.8	17994	432.0	26.7	296.0	21.0	79	31.51	21.59
2	B1 B	0.0	8	1.02	2.75	0.665	2.20	1	23.09	25.70
	B2 B	100	17988	13.6	23.9	18.2	30.1	911	69.90	63.02
	B3 B	0.0	0	****	****	****	****	**	**	**
	B4 B	0.0	0	****	****	****	****	**	**	**
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	17994	27.6	27.1	25.9	291	25.71	5.26	1024.0
4	D D	100	17994	24.7	30.2	31.5	256	21.11	0.871	1024.0
5	E E	100	17994	14.0	17.7	17.1	243	20.90	0.448	1024.0

İlaç emilimini ölçen 1.5 saatlik daunorubicin inkübasyonu sonrası K562 hücreleri için hücre içinde kalan ilaç floresansı (Mean Channel Value =MCV) 14.8 iken K562/DOX için bu değer 2.77'e dek azalmıştır. P-gp fonksiyonunu inhibe eden CsA(cyclosporin A) ile K562 hücrelerinin MCV değeri minimal ölçüde artarken (K562 MCV=16.6), K562/Dox hücrelerinin MCV değeri yaklaşık 4 kat 11.5'e kadar yükselmiştir yani CsA ile daunorubicinin MDR P-gp K562/Dox hücrelerinin içinde kalması ilaç duyarlı ana hücrelerin aksine belirgin şekilde artmıştır.

İlacın hücre içinde muhafaza edilebilirliğini ölçen 20 saatlik inkübasyonda ise daunorubicin MCV değeri K562 için 43.3, K562/Dox için 6.7 bulunmuştur. Verapamil ile P-gp pompasının inhibisyonu ile Daunorubicin MCV değerleri K562 için 39, K562/Dox için 26.3 olarak bulunmuştur. Bir diğer P-gp inhibitörü olan CsA ile Daunorubicin MCV değeri K562 hücre dizisinde 38.6, K562/Dox hücrelerinde ise 24.7 olarak bulunmuştur.

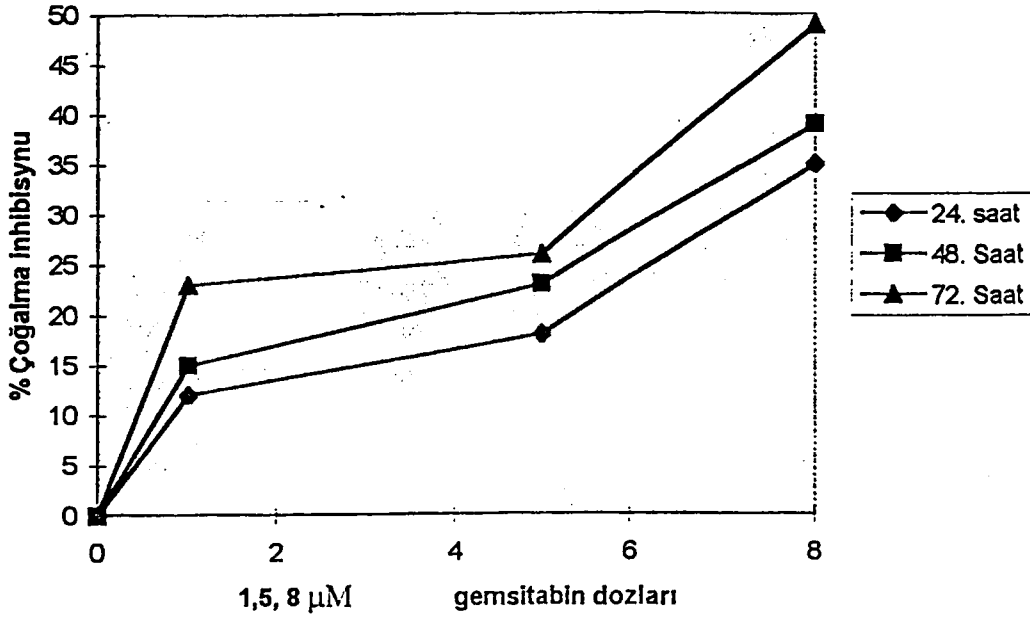
3. 3. Çoğalma İnhibisyonunun Ölçülmesi

Çalışmada kullanılan her iki hücre dizisinin gempitabine karşı olan duyarlılıkları K562/Dox hücre dizisi için daha düşük olarak bulunmuştur. K562 hücreleri için başlangıç dozları olan 1 μ M, 5 μ M ve 8 μ M gempitabin dozlarının etkisinde zamana bağlı olarak artış gözlenmiştir. 1 μ M ve 5 μ M lik dozlar 24. saatte sırası ile %10 ($SH \pm 1.7$) ve %16 ($SH \pm 1.4$) oranında çoğalma inhibisyonu gösterirken, 48. saatte %13 ($SH \pm 1.4$) ve %23 ($SH \pm 1.3$) oranında, 72 saat sonunda ise %24 ($SH \pm 2.8$) ve %29 ($SH \pm 1.9$) oranında çoğalmayı inhibe etmişlerdir. 8 μ M lik doz ise 24. ve 48. saatlerde %39 ($SH \pm 2.05$) ve %42 ($SH \pm 1.1$) oranında çoğalmayı inhibe ederken 72. saat sonunda optimum inhibitör doz olarak kendini göstermiş ve yaklaşık %51 ($SH \pm 1.7$) oranında çoğalmayı durdurucu etki göstermiştir (Şekil 3.3.a).



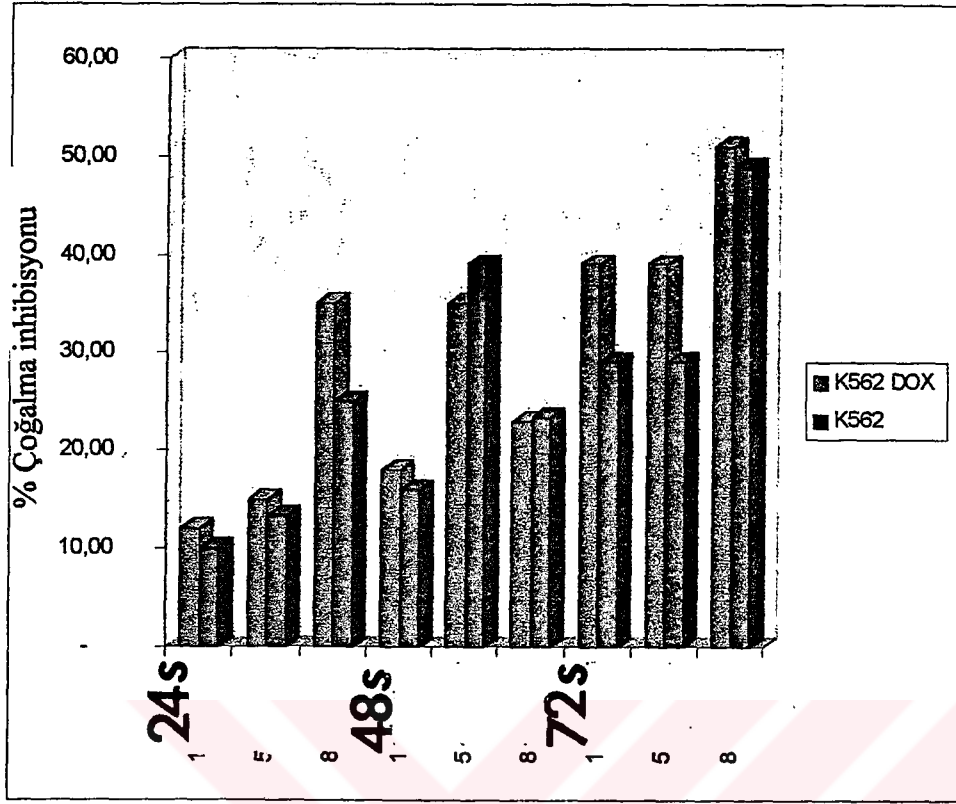
Şekil 3. 3. a) 1 µM, 5 µM ve 8 µM gemsitabin dozlarının K562 hücre dizisi üzerindeki zamana bağlı çoğalma inhibisyonu etkileri (Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalamasıdır).

Aynı dozlar P-gp (+) K562/Dox hücrelerine uygulandığında aşağıdaki sonuçlar gözlenmiştir. 1 µM ve 5 µM lik dozlar 24. saatte %12 ($SH \pm 1.7$) ve %18 ($SH \pm 1.5$) oranında çoğalma inhibisyonu oluştururken, 48. saatte %15 ($SH \pm 1.4$) ve % 23 ($SH \pm 2.3$) oranında, 72 saat sonunda ise %23 ($SH \pm 2.4$) ve %26 ($SH \pm 1.8$) oranında çoğalmayı inhibe etmişlerdir. 8 µM lik doz ise 24. ve 48. saatlerde % 35 ($SH \pm 1.6$) ve %39 ($SH \pm 1.0$) oranında çoğalmayı inhibe ederken 72. saat sonunda yine optimum inhibitör doz olarak kendini göstermiş ve yaklaşık %49 ($SH \pm 1.9$) oranında çoğalmayı durdurucu etki göstermiştir (Şekil 3.3.b).



Şekil 3. 3. b) 1 µM, 5 µM ve 8µM gemsitabin dozlarının K562/DOX hücre dizisi üzerindeki zamana bağlı çoğalma inhibisyonu etkileri. (Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalamasıdır.)

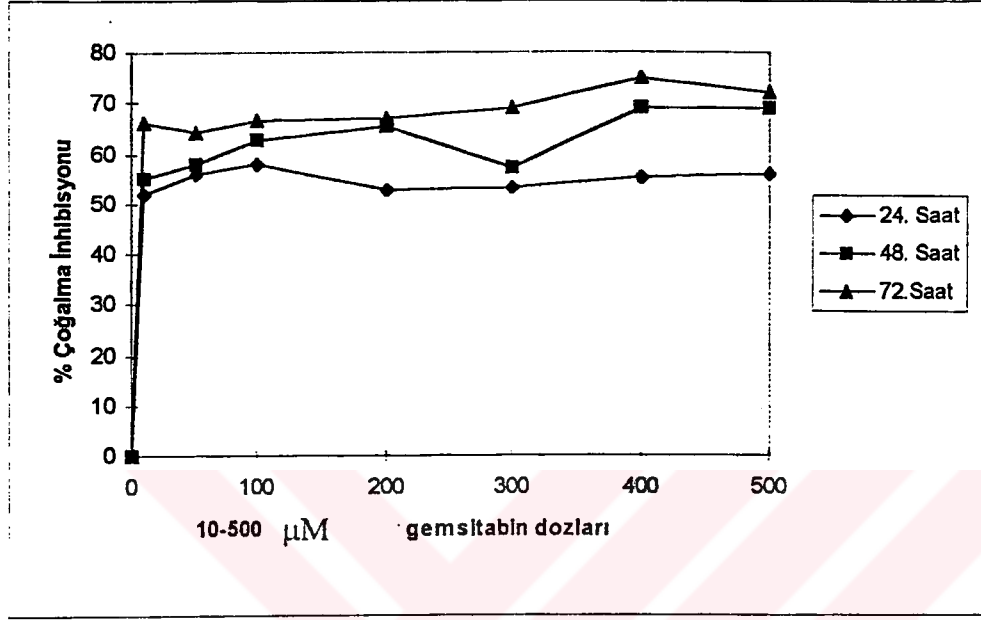
Şekil 3.3.c de de yukarıdaki dozların her iki hücre dizisi içinde hemen hemen aynı oranda inhibisyon etkisi gösteriyor gibi görülsede grafik değerlerinin istatistiği yapıldığında K562/Dox için daha düşük oranda sitotoksosite bulunmuştur ($p < 0.0001$, t değeri=3,95)



Şekil 3. 3. c) 1 μM, 5 μM ve 8μM gemsitabin dozlarının K562 ve K562/DOX hücre dizisi üzerindeki zamana bağlı çoğalma inhibisyonu etkileri.
(Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalamasıdır.)

Başlangıç dozları zamana ve doz miktarına bağlı olarak artış gösterdiği için dozlara 10 μM den 500 μM a kadar artırılarak devam edildiğinde 24. saatte K562 hücreleri için gemsitabinin 10 μM da %52 ($SH \pm 1.9$), 50 μM da %56 ($SH \pm 1.6$), 100 μM da % 58 ($SH \pm 1.9$), 200 μM da % 53 ($SH \pm 2.5$), 300 μM da % 54 ($SH \pm 1.0$), 400 μM da % 55 ($SH \pm 0.65$), 500 μM da %56 ($SH \pm 0.88$) oranında çoğalmayı inhibe ettiği bulunmuştur. 48. saatte 10 μM da %55 ($SH \pm 4$), 50 μM da % 58 ($SH \pm 3.6$), 100 μM da % 62.5 ($SH \pm 3.8$), 200 μM da %65.5 ($SH \pm 2.6$), 300 μM da %57 ($SH \pm 3.3$), 400 μM da %69 ($SH \pm 2$), 500 μM da %69 ($SH \pm 1.4$) oranlarında çoğalma inhibisyonu görülürken 72. saatte sonunda gemsitabin 10 μM da %66.3 ($SH \pm 2.6$), 50 μM da %64 ($SH \pm 3.5$), 100 μM da %66.6 ($SH \pm 4.6$), 200 μM da %67 ($SH \pm 3.2$), 300 μM da %69 ($SH \pm 2.3$), 400 μM da %75 ($SH \pm 3.0$), 500 μM da %72 ($SH \pm 1.4$) oranında çoğalmayı inhibe etmiştir. Grafikte de görüldüğü üzere 50 μM lik dozdan sonra

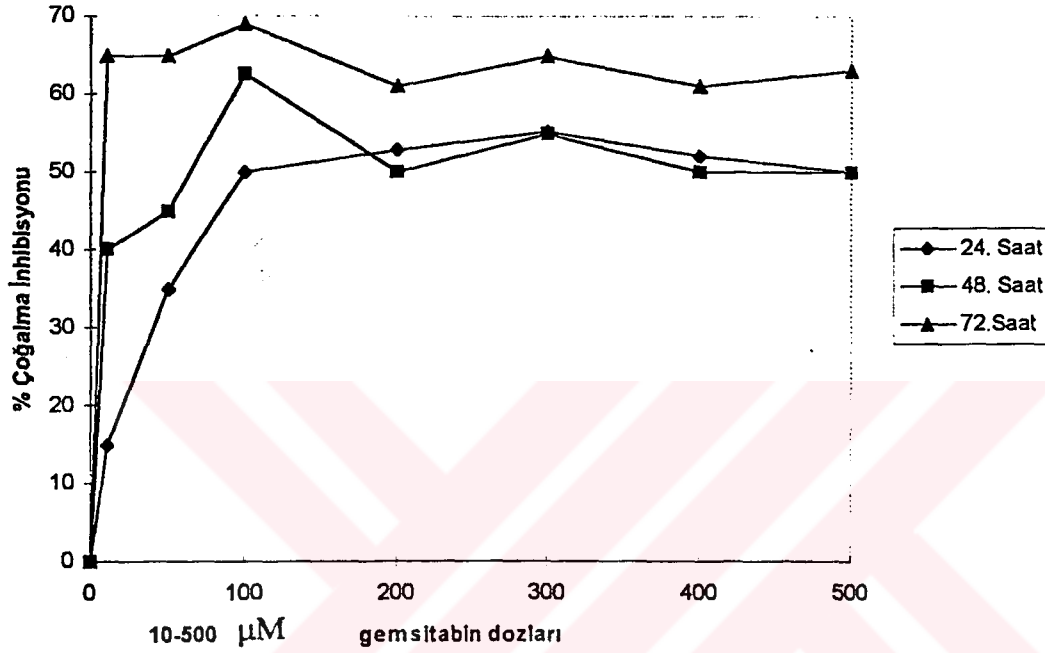
inhibisyon yüzdeleri çok fazla artmamıştır ve bundan sonra artan dozların plato çizdiği görülmüştür (Şekil 3. 3. d).



Şekil 3. 3. d) 10-500 µM gemisitabin dozlarının K562 hücre dizisi üzerindeki etkileri zamana bağlı çoğalma inhibisyonu etkileri.
(Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalamasıdır.)

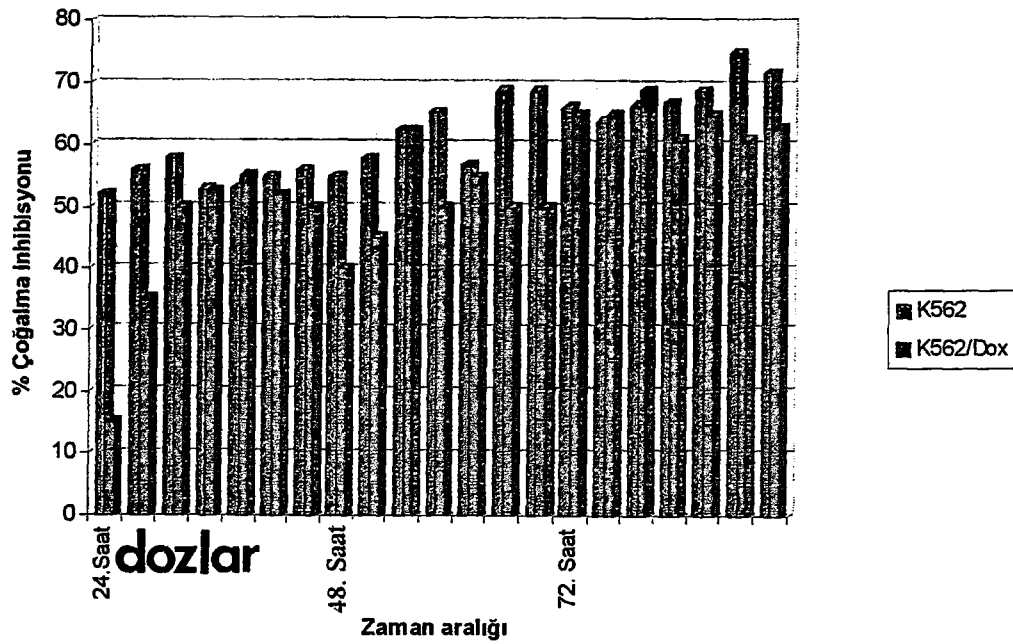
K562/DOX hücreleri içinde aynı dozlar uygulandığında çoğalmayı durdurucu etkileri 24 saat sonunda 10 µM da %45 ($SH \pm 1.4$), 50 µM da %45 ($SH \pm 1.6$), 100 µM da %50 ($SH \pm 0.8$), 200 µM da %53 ($SH \pm 0.5$), 300 µM da %55 ($SH \pm 1.9$), 400 µM da %52 ($SH \pm 1.1$), 500 µM da %50 ($SH \pm 1.7$) oranında çoğalmayı inhibe ettiği bulunmuştur. 48. saatte 10 µM da %49 ($SH \pm 0.7$), 50 µM da %58 ($SH \pm 0.5$), 100 µM da %62.5 ($SH \pm 1.0$), 200 µM da %55 ($SH \pm 1.3$), 300 µM da %57 ($SH \pm 0.8$), 400 µM da %50 ($SH \pm 0.6$), 500 µM da %51 ($SH \pm 0.7$) oranlarında çoğalma inhibisyonu görülürken 72. saatin sonunda gemisitabin K562/DOX hücrelerinin 10 µM da %65 ($SH \pm 1.1$), 50 µM da %65 ($SH \pm 0.4$), 100 µM da %69 ($SH \pm 1.1$), 200 µM da %61 ($SH \pm 0.9$), 300 µM da %65 ($SH \pm 0.6$), 400 µM da %62 ($SH \pm 1.0$), 500 µM da %64 oranında ($SH \pm 1.4$) çoğalmalarını inhibe etmiştir. Benzer şekilde bu hücre dizisi içinde

50 μM dan sonra artan dozların daha fazla etki göstermediği ve plato çizdiği görülmüştür. Bununla birlikte K562 hücre dizisinden farklı olarak ilk 48 saatte etkiler daha düşük düzeylerde gerçekleşirken 72. saatin sonunda bu hücre dizisinin sonuçları ile hemen hemen aynı oranlar bulunmuştur (Şekil 3. 3. e).



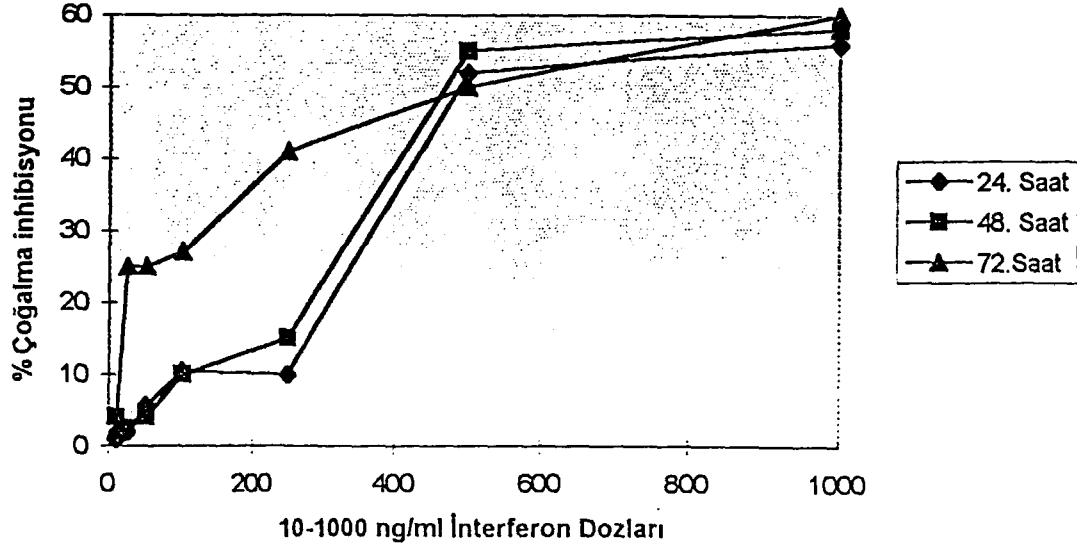
Şekil 3. 3. e) 10-500 μM gemsitabin dozlarının K562/DOX hücre dizisi üzerindeki zaman bağlı çoğalma inhibisyonu etkileri.
(Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalamasıdır.)

Şekil 3.3.f de de aynı dozların her iki hücre dizisinde gösterdiği etkiler birarada görülmektedir.



Şekil 3. 3. f) 10-500 μ M gemsitabin dozlarının K562 ve K562/DOX hücre dizisi üzerindeki zamana bağlı çoğalma inhibisyonu etkileri (Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalamasıdır).

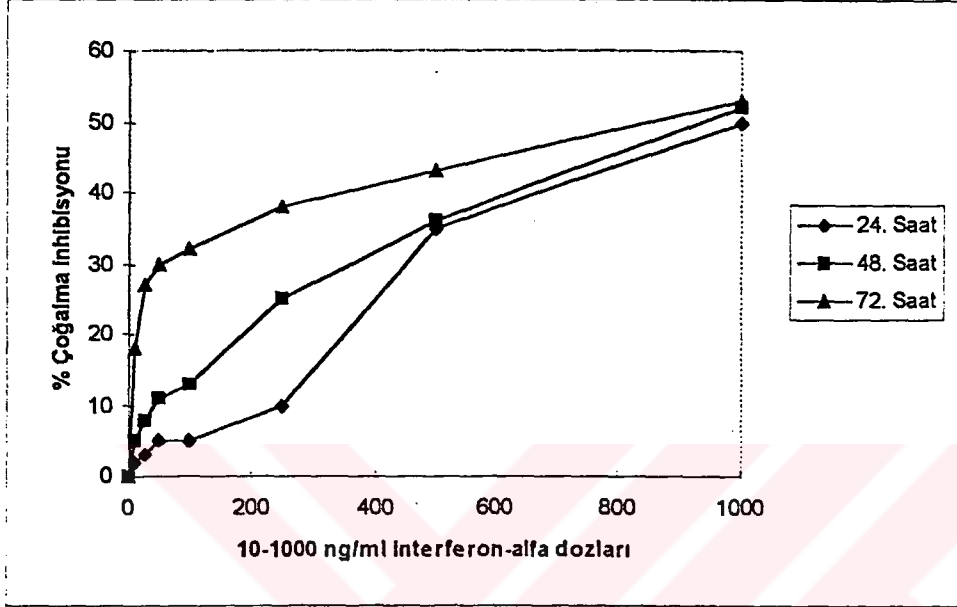
Bundan sonra IFN- α ile gemsitabin etkilerinin sinerjik olup olmadığının araştırılması başlatılmıştır. İlk olarak her iki hücre dizisine de sadece interferon alfa dozları uygulanmıştır. IFN α -2a' ya karşın K562 ve K562/DOX dizileri farklı duyarlılık göstermişlerdir. K562 hücreleri için ilk 24 saatin sonunda IFN α -2a' nın 10 ng/ml lik dozunda %1.6 ($SH \pm 1.1$), 25 ng/ml de %2 ($SH \pm 1.4$), 50 ng/ml de %5.6 ($SH \pm 0.7$), 100 ng/ml de %10.4 ($SH \pm 0.7$), 250 ng/ml de %18 ($SH \pm 0.8$), 500 ng/ml de %36 ($SH \pm 0.9$), 1000 ng/ml de %52 ($SH \pm 0.6$) oranlarında çoğalma inhibisyonu bulunmuştur. 48. saatte ise bu değerler 10 ng/ml de %4 ($SH \pm 1.0$), 25 ng/ml de %2.5 ($SH \pm 2.6$), 50 ng/ml de %5 ($SH \pm 1.8$), 100 ng/ml de %12 ($SH \pm 1.0$), 250 ng/ml de %28 ($SH \pm 2.2$), 500 ng/ml de %48 ($SH \pm 1.6$), 1000 ng/ml de %55 ($SH \pm 1.0$) olarak elde edilmiştir. 72 saatin sonunda IFN α -2a' nın 10 ng/ml lik dozu için %12.5 ($SH \pm 1.4$), 25 ng/ml için %25 ($SH \pm 1.2$), 50 ng/ml için %25 ($SH \pm 1.4$), 100 ng/ml için %20 ($SH \pm 1.1$), 250 ng/ml için %41 ($SH \pm 1.3$), 500 ng/ml için %42 ($SH \pm 1.2$) oranında çoğalma inhibisyonu gerçekleşirken ancak 1000 ng/ml lik konsantrasyon K562 hücreleri için %50 ($SH \pm 1.6$) oranında inhibisyon sağlayabilmiştir (Şekil 3.3.g).



Şekil 3. 3. g) 10-1000 ng/ml interferon-alfa 2a dozlarının K562 hücre dizisi üzerindeki zamana bağlı çoğalma inhibisyonu etkileri etkileri.
(Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalamasıdır).

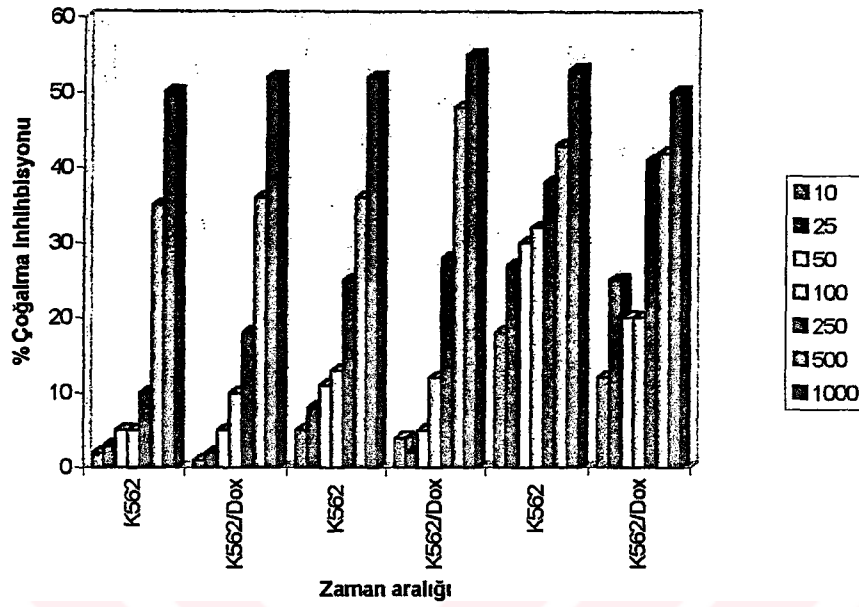
Aynı konsantrasyonlarda K562/DOX hücreleri için çok daha farklı sonuçlar alınmıştır. Zamana bağlı olarak aynı dozların inhibisyon etkisi daha fazla artmıştır. Zamana bağlı olarak gerçekleşen artış, doz artışı ile de paralellik göstermiştir. İlk 24 saat için inhibisyon değerleri 10 ng/ml de %2 ($SH \pm 2.5$), 25 ng/ml de %3 ($SH \pm 1.0$), 50 ng/ml de %5 ($SH \pm 1.3$), 100 ng/ml de %5 ($SH \pm 1.0$), 250 ng/ml de %10 ($SH \pm 2.1$), 500 ng/ml de %35 ($SH \pm 0.7$), 1000 ng/ml de %50 ($SH \pm 1.0$) olarak elde edilmiştir. 48. saatte aynı dozlarda 10 ng/ml de %5 ($SH \pm 1.5$), 25 ng/ml de %8 ($SH \pm 0.65$), 50 ng/ml de %11 ($SH \pm 2.5$), 100 ng/ml de %13 ($SH \pm 1.2$), 250 ng/ml de %25 ($SH \pm 1.3$), 500 ng/ml de %36 ($SH \pm 0.7$), 1000 ng/ml de %52 ($SH \pm 2.5$) olarak inhibisyon gerçekleşirken 72. saatin sonunda IFN α -2a' nın 10 ng/ml lik dozu için %18 ($SH \pm 2.5$), 25 ng/ml için %27 ($SH \pm 0.9$), 50 ng/ml için %30 ($SH \pm 0.8$), 100 ng/ml için %32 ($SH \pm 1.6$), 250 ng/ml için %38 ($SH \pm 1.0$), 500 ng/ml için %43 ($SH \pm 1.1$) oranında çoğalma inhibisyonu gerçekleşirken, 1000 ng/ml lik konsantrasyon K562/DOX

hücrelerinin çoğalmasını %53 ($SH \pm 1.2$) oranında inhibe etmiştir (Şekil 3. 3. h). K562 ve K562/Dox üzerinde IFN- α -2a etkisi ortalama değerleri 18.5 ± 4 ve 23.9 ± 17.3 olarak bulunmuştur. $P = 0.986$ olarak bulunmuş ve aradaki fark anlamsız olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3. 3. h) 10-1000 ng/ml interferon-alfa-2a dozlarının K562/DOX hücre dizisi zamana bağlı çoğalma inhibisyonu etkileri üzerindeki etkileri.
(Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalamasıdır.)

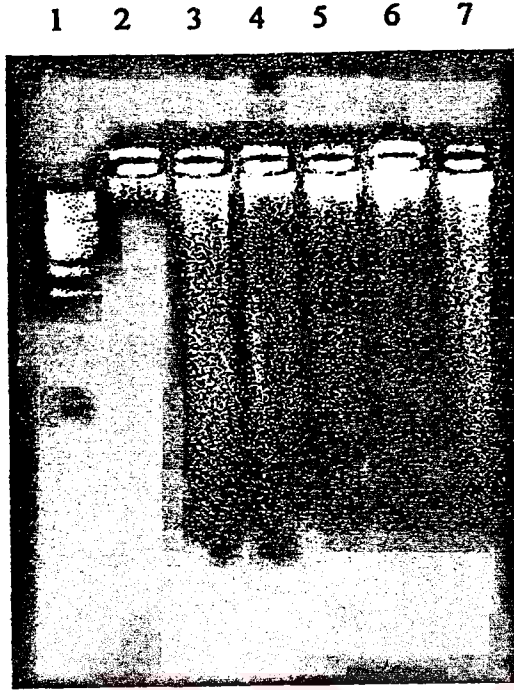
10-1000 ng/ml interferon-alfa-2a dozlarının her iki hücre dizisinde sahip olduğu etkiler Şekil 3.3.g de görülmektedir. Bu sonuçlardan sonra 200 ng/ml sabit interferon-alfa 2a dozu 10-500 μ M gempitabin dozları tek tek uygulanmış ancak hiçbir sinerjik etki bulunamamıştır.



Şekil 3. 3. i) 10-1000 ng/ml interferon-alfa-2a dozlarının K562 ve K562/Dox üzerindeki etkileri

3. 4. DNA Fragmentasyon Sonuçları

Bugüne kadar yapılan DNA izolasyon çalışmalarında 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M ve 300 μ M gemsitabin konsantrasyonları varlığında ve kontrol olarak gemsitabinle muamele edilmeyen K562 hücrelerinin DNA izolasyonları tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlar gemsitabinin 10 μ M lik konsantrasyondan itibaren DNA fragmentasyonuna yol açtığını ve apoptozisi indüklediğini düşündürmektedir. Yine aynı konsantrasyonlarda K562/DOX hücrelerinden de DNA izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda da aynı dozlarda DNA fragmentasyonu gözlenmiştir (Şekil 3. 4.a, Şekil 3.4.b).



1. 1 kb DNA marker
2. Kontrol
3. 10 μM Gemcitabin
4. 50 μM Gemcitabin
5. 100 μM Gemcitabin
6. 200 μM Gemcitabin
7. 300 μM Gemcitabin

Şekil 3. 4. a) K562 hücre dizisinde gemsitabinin apoptozisi indüksiyonu.



1. 1 kb DNA marker
2. Kontrol
3. 10 μM Gemcitabin
4. 50 μM Gemcitabin
5. 100 μM Gemcitabin
6. 200 μM Gemcitabin
7. 300 μM Gemcitabin
8. 400 μM Gemcitabin

Şekil 3. 4. b) K562/DOX Hücre dizisinde gemsitabinin apoptozisi indüksiyonu.

4. TARTIŞMA

Gemsitabin aktivitesini son derece özgün etki mekanizmaları ile sağlayan bir onkolitik ilaçtır. Çeşitli hücre sistemlerinde (HL-60 miyeloid, RPMI-8392 B-lenfoid gibi) denenmiş ve güçlü sitotoksik etki göstermiştir (Bouffard, 1991).Yapıları benzer olan diğer antikanser ilaçlarından gemsitabini daha etkin kılan da bu özgün spesifik etki mekanizmalarıdır (Hertel 1990).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda gemsitabinin çoklu ilaç direnci fenotipine sahip malign hücrelerdeki etkileri ise henüz açık değildir. İlaç direnci, onkolitik ilaç tedavisi altındaki hastalarda bu tedavinin başarısız kalmasına yol açan nedenlerin önde gelenlerindendir (Arceci 1993). Hücre kültürü sistemlerinin kullanıldığı çalışmalar tümör hücrelerinde ilaç direncinin çeşitli mekanizmalarla geliştiğini göstermiştir. İnsanda MDR 1 geni ürünü olan P-glikoprotein bu mekanizmalar içerisinde iyi karakterize edilen önemli bir çoklu ilaç direnci nedenidir (Arceci 1993). MDR 1 geni aşırı ifadesine sahip (P-gp) tümörlerin tanımlanması için yapılan çalışmalar kemoterapiye karşı oluşabilecek cevabın tahmin edilebilmesi ve P-gp'yi inhibe edebilen ajanlar aracılığı ile çoklu ilaç direncinin geri döndürülmesi yönündedir (Tsuruo 1981, Ford 1996). Bununla birlikte, bu ajanların sadece çok az bir kısmı uygun ve güvenli klinik, farmakolojik karakteristikleri sunabilmektedir. Bundan başka bir kısmının da toksisite profilini çoğu zaman aşması, bu ilaçların ÇİD' i yenmek için rutin kullanımını engellemektedir. Bu yüzden de daha etkin ve daha az toksik olan yeni ajanlara ihtiyaç olduğu açıktır.

Gemsitabinin ÇİD fenotipi üzerindeki etkinliği sadece KHAK (küçük hücreli akciğer kanseri) hücre dizilerinde bildirilmiştir (Jensen 1997, Bergman 1998). KHAK hücre dizileri ile yapılan bir çalışmada gemsitabinin P-gp ifade eden KHAK dizilerinde ilaç duyarlı ana hücre dizilerden daha etkin olduğu bildirilmiştir (Bergman 1998). Solid tümörler için bu çalışmalar her ne kadar fikir verse de hematolojik malignansiler için bu konu yine karanlıktır ve bu hücre dizilerinin çalışıldığı ortam ve zamandaki P-gp pompasının varlığı ve fonksiyonu belirtilmemiştir.

Bu amaçla yapılan çalışmada artan gemitabin dozlarının insan eritrolösemi hücre dizisi K562 ve bunun P-gp (+) varyantı K562/DOX üzerinde karşılaştırmalı olarak etkileri araştırılmaya çalışılmıştır.

Tüm deneylerde her iki hücre dizisi için de aynı dozlar kullanılmıştır. Başlangıç dozları olan 1 μ M, 5 μ M ve 8 μ M dan 8 μ M lik gemitabin dozu 72 saat sonunda K562 hücreleri için % 51 oranında çoğalmayı inhibe ederek, optimum inhibitör doz olarak kendini göstermiştir (Bkz. Şekil 3.3.a). Aynı dozlar K562/DOX hücreleri içinde kullanıldığında yine 8 μ M % 49 inhibisyon oranı ile optimum inhibitör doz olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 3.3.b). Artan konsantrasyonlarla çalışmaya devam edildiğinde; örneğin 10 μ M da 72 saatin sonunda K562 için % 66.3, K562/DOX için % 65 oranında inhibisyon bulunmuştur (Bkz. Şekil 3.3.d ve 3.3.e). Elde edilen bu bilgiler her iki hücre dizisinde de gemitabini hemen hemen eşit oranda büyümeyi durduruyor gibi gösterecek sonuçların istatistiği yapıldığında K562 hücrelerinde gemitabinin daha etkin olduğu bulunmuştur (Bkz. Şekil 3.3.f). Bu sonuçları hücre sitoplazmasında P-glikoprotein fonksiyonel olarak aktif olduğu sonucu ile (Bkz. Şekil 3.2.a,k) birlikte K562/DOX dizisinin çeşitli antikanser ilaçlarından, **Doksorubisin'e** K562 dizisinden 134 kez, **Daunorubisin' e** 80 kez, **Vincristin' e** 630 kez ve **VP16' ya** da 108 kez daha fazla direnç gösterdiğini (Nielsen 1992) göz önüne alarak değerlendirdiğimizde, gemitabinin çoklu ilaç direnci gösteren eritrolösemi dizilerindeki etkisinin parental hücrelere oranla daha düşük olmasının nedenini açıkça görmekteyiz. Solid tümörlerde yapılan çalışmalarla bu durumu karşılaştırdığımızda aksi bir durum söz konusudur ancak bu çalışmalarda p-glikoprotein fonksiyon testlerinin çalışılmaması olaya farklı bir boyut katmaktadır. Tüm bu sonuçlar gemitabin tedavisi gören pankreatik ve akciğer kanserli hastaların durumları ile birlikte değerlendirildiğinde gemitabinin P-gp (+) **ÇİD** tümörlerinin tedavisinde çok etkili bir yöntem olmadığını göstermektedir. Ayrıca bu onkolojinin diğer onkolitik ilaçlarla çapraz direnç yolu açabileceği ihtimali düşünülürse, kombinasyon tedavileri için de gemitabin uygun olmayan bir sitostatik gibi görünmektedir.

Çeşitli lösemi hücre dizileri K562, saçlı hücreli lösemi, Burkitt lenfoma ile yapılan çalışmalarla interferon- α 'nın lösemilerde etkili olduğu bilinmektedir (Özeş, 1992).

Çalışmada olası immünomodülatör yaklaşımlar için gemsitabinin interferon-alfa ile sinerjik etkileri olup olmadığı da araştırılmıştır. Bu çalışma ile elde edilen K562 hücre dizisi üzerinde interferon- α 'nın etkileri daha önceleri yapılan çalışmalarla paralel bulunmuştur (Bkz. şekil 3.3.g).

K562/DOX hücreleri içinse interferon- α 'nın etkileri K562 hücrelerinden çok büyük farklılık göstermemiştir (Bkz. Şekil 3.3.h). Böylece interferon- α 'nın çoklu ilaç direnci gösteren hücreler üzerinde de etkinliği konusuna da ışık tutulmuştur. Ancak gemsitabinle kombine interferon- α çalışmalarından elde edilen sonuçlar her ikisi arasında sinerjik bir etki olmadığı izlenimini vermektedir.

Ayrıca çalışmada gemsitabinin apoptotik etkileri de araştırılmış ve her iki hücre dizisi ile yapılan DNA izolasyon çalışmaları sonucu 10 μ M lik dozdan itibaren DNA fragmantasyonu görülmüştür (Bkz. Şekil 3.4.a, 3.4.b). Bu sonuçlar gemsitabinin sitotoksik etkisi ile bağlantılı olarak antitümoral özelliğin apoptozis yoluyla olduğu izlenimini vermektedir.

Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda gemsitabinin P-glikoprotein dışı nedenlerle oluşan ÇİD fenomeninde etkinliği olup olmadığının prelinik ve klinik olarak araştırılmasının kanser tedavisinde önemli yararlar sağlayabilmesi muhtemeldir.

5. SONUÇ

Bu çalışma da bilim dünyasında etkin bir yöntem olarak kullanılan tripan mavisi ile sayım yöntemi kullanılarak ölü ve canlı hücrelerin miktarı belirlenmek sureti ile gempitabin in P-glikoprotein çoklu ilaç direnci gösteren lösemi hücre dizilerinde etkinliği araştırılmıştır.

Çalışmanın sonunda gempitabinin çoklu ilaç direnci gösteren kanser hücreleri üzerinde, direnç geliştirmeyen hücre dizileri ile farklı oranlarda büyüme inhibisyonu etkisine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalarda bu ilacın apoptotizisi indüklediği de bulunmuş ve gösterdiği antitümöral etkinin bu yolla olabileceği ortaya koyulmuştur.

Elde edilen bu sonuçlar gempitabinin kemoterapiye direnç gösteren hastalar için çok uygun bir ilaç olmadığını göstermektedir ve tedaviye önemli katkılar sağlayabilecektir.

6. ÖZET

Gemsitabin (dFdC) özellikle pankreatik adenokarsinoma gibi kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olmalarıyla tanınan solid tümörlere karşı önemli etkinlik gösterebilen, yeni bir baz analogu antimetabolittir.

Çoklu İlaç Direnci (ÇİD), birbirinden etki mekanizması ve yapısal olarak farklılık gösteren birçok bileşiğe karşı cevapsızlığı tanımlayan fenomendir. P-glikoprotein (P-gp) hücre zarında bulunan ve enerji bağımlı bir pompa gibi fonksiyon göstererek bir çok ilacı hücre dışına atabilen 170 - kD lik bir glikoproteindir ve önemli bir ÇİD nedenidir. Kemoterapiye dirençli tümörlerde ümit vaad etmekte olmasına karşı gemsitabinin P-gp ÇİD mekanizmasından etkilenip etkilenmediği konusu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu amaçla bu çalışmada dFdC' nin insan eritrolösemi hücre dizisi K562, ve bunun P-gp (+) varyantı K562/DOX üzerinde etkileri araştırılmıştır. Ayrıca olası immünomodülatör yaklaşımlar için dFdC' nin interferon-alfa ile sinerjik etkileri de araştırılmıştır.

Tümör büyüme inhibisyonu, hemasitometre lamunda tripan mavis testi uygulanarak ölü ve canlı hücrelerin sayılması ile araştırılmıştır. K562/DOX hücrelerinin P-gp içerikleri 4E3 monoklonal antikoru kullanılarak flow sitometri ile tayin edilmiştir. Çalışmalarımız sonucunda K562/DOX hücrelerinin P-gp pozitifliği % 99.7 olarak bulunmuştur. Hücre sitoplazmasında P-glikoprotein fonksiyonel olarak aktif olduğunda daunorubicini hücre dışına atışı ve bu atılımın siklosporin A veya verapamil gibi P-glikoprotein fonksiyon inhibitörleri ile blokajıyla inhibe edilmesiyle gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda gemsitabinin her iki hücre dizisinde farklı inhibisyon etkilerine sahip olduğu istatistiksel olarak ta ortaya konulmuştur. Ayrıca gemsitabinin apoptozis üzerinde etkileri de DNA fragmentasyonu yolu ile araştırılmış ve 10 µM lik konsantrasyondan başlayarak apoptozisi de indüklediği bulunmuştur. Bu çalışma da interferon-alfa'nın gemsitabinle ile sinerjik etkiye sahip olup olmadığı konusu da araştırılmış ancak hiç bir sinerjik etki gözlenmemiştir.

Tüm bu sonuçlar gemsitabin tedavisi gören pankreatik ve akciğer kanserli hastalardan alınan sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde dFdC' nin P-gp (+) ÇİD tümörlerinin tedavisinde uygun ve etkili bir yöntem olmadığını göstermektedir.



7. SUMMARY

Gemcitabine (2', 2' difluorodeoxycytidine,) is a new nucleoside analog which exhibits substantial activity against solid tumors such as pancreatic adenocarcinoma that are well known for their poor response to chemotherapy and radiotherapy.

P-glycoprotein (P-gp) is a 170-kD plasma membrane glycoprotein which is shown to function as an energy dependent pump for the efflux of diverse anticancer drugs and consequently conferring multidrug resistance (MDR). Although gemcitabine seems to offer hope in chemotherapy resistant tumors, it is not known whether it has been effected from MDR mechanisms such as P-gp.

In the present study the antitumor and apoptotic effects of dFdC on erythroleukemia cell lines P-gp (-) K562, and its P-gp (+) MDR variant K562/DOX were evaluated. Furthermore it was studied whether gemcitabine is synergistic with interferon-alpha, for possible immunotherapeutic approaches in the future.

P-gp expression and function of cells were demonstrated with 4E3 monoclonal antibody and daunorubicin uptake and retention test by flowcytometry respectively. Inhibition of tumor growth was studied by means of trypan blue exclusion test. The P-gp positivity of K562/DOX cells was 99.7 %. In addition this P-gp is functionally active. At 72 h 10 μ M gemcitabine killed 65 % and 66.3 % of K562 and K562/DOX respectively. And it was also found that gemcitabine has apoptotic effects on these cells. Furthermore the results suggested that IFN-alpha is not synergistic with gemcitabine in our erythroleukemia tissue culture system.

In this study gemcitabine was shown to be more effective in P-gp (-) than in P-gp (+) erythroleukemia cell lines. These results together with chemotherapy resistant patients results suggest that gemcitabine is not an effective drug in the treatment of P-gp (+) MDR tumors.

8. KAYNAKLAR

- ARCECI, R. J. 1993. Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistant malignancies. *Blood*, 81 (9): 2215-2222.
- BARON, S., COPENHAVER, D. H., DIANZANI, F., FLEUISHMANN, W. R., HUGHES, T. K., KLIMPEL, G. R., NIELSE, D. W., STANTON, G. J. and TYRING, S. K. 1992. Interferons. *Principles and medical implications*, 212-213. Lippincott Edition p.423. New York.
- BECK, W. T. and DANKS, M. K. 1991. Charecteristics of multidrug resistance in humantumor cells. *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*. 3-46, Plenum publishing cooporation, p. 620, New York.
- BERGMAN, A. M., PINEDO, H. M., VEERMANN, G., KUIPER, C. M., PETERS, G. 1998. Increased sensitivity to gemcitabine of P-gp and MRP overexpressing human non-small cell lung cancer cell lines. *Advanced Experimental and Medical Biology*, 431: 591-4.
- BORST, P. and SCHINKEL, A. H. 1996. What have we learnt thus far from mice with disrupted p-glycoprotein genes? *European Journal of Cancer*, 32 (A) 6 : 985-990.
- BOUFFARD, D. Y., MOMPARDLER, L. F. and MOMPARDLER, R. 1991. Comparison of antineoplastic activity of 2' 2'-difluorodeoxycytidine and cytosine arabinoside against human myeloid and lymphoid leukaemic cells. *Anticancer Drugs*, 2 (1) : 49-55.
- BOUFFARD, D. Y., OHKAWA, T., KIJLAMA, H. 1996. Oligonucleotide modulation of MDR. *European Journal of Cancer*, 32(A): 1010-1017
- BOURHIS, J., BAINARD, J., HARTMAAN, O., BACCON-GIBOD, L., LEMERLE, J. and RIOUI, G. 1989. Correlation of MDR1 gene expression with chemotherapy in neuroblastoma *Journal of National Cancer Institute*, 81: 1401-1405.
- BOVEN, E., SCHIPPER, H. and ERKELENS, C. A. M. 1993. The influence of the schedule and the dose of gemcitabine on the antitumor efficacy in experimental human cancer. *British Journal of Cancer*, 68 (1) : 52-56.

- BRAAKHUIS, B. J. M., VAN DONGEN, G. A. M. S. and VERMORKEN, J. B. 1991. Preclinical in vivo activity of 2' 2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) against human head and neck cancer. *Cancer Research*, 51 (1) : 211-214.
- BRANCA, A. and BAGLIONI, C. 1981. Evidence that type I and II IFNs have different receptors, *Nature*, 294: 768-770.
- BROWN, P. C., THORGEIRSSON, S. S. and SILVERMAN, J. A. 1993. Cloning and regulation of the rat *mdr2* gene. *Nucleic Acids Research*, 21: 3885-3891.
- BUSCHMANN, E., ARCECI, R. J., CROOP, J. M., 1992. *mdr2* encodes p-glycoprotein expressed in the bile canalicular membrane as determined by isoform specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 18093-18099.
- CHAMBERS, T. C. 1996. Phosphorylation of proteins involved in multidrug resistance. In Gupta Tsuruo T. *Multidrug Resistance in Cancer Cells*, 121-133. John Wiley and Sons p.540 Chichester U. K.
- CHAN, H. S. L., HADDAD, G. and THORNER, P. S. 1991. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of the therapy for neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*, 325: 1608-1614.
- CHEN, C-J., CHIN, J. E. and UEDA, K. 1986. Internal duplication and homology with bacteria transport proteins in the *mdr 1* gene from multidrug resistant human cells. *Cell*, 47: 381-389.
- COHEN, J. J. 1993. Apoptosis. *Immunology Today*, 14 (3) : 126-129.
- CORDON CORDO C, O'BREIN J P, and BOCCIA J. 1989. Expression of the multidrug resistance gene product in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 38 : 1277-1287.
- CORNWELL, M.M., PASTAN, I. and GOTTESMANN, M. M. 1994. Certain calcium channel blockers binds specifically to multidrug resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to p-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 269 : 7243-7248.
- DE VITA, D. V., HELLMANN, S., ROSENBERG, S. A., 1997. Multidrug Resistance. *Cancer Principles and Practice of Oncology*, Vol:1 338-346, p. 985 5th Edition Lippincott Raven Publishing, New York.

- DEUTHARS, K. L., DUTHIE, M. and LING V. 1992. Identification of distinct P-glycoprotein gene sequences in rat . *Biochemistry and Biophysics*, 1130 : 157-165.
- DEVAULT, A. and GROS, P. 1990. Two members of the mouse mdr gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Molecular Cell Biology*, 10 : 1652-1663.
- ENDICOTT, J. A., JURANKS, P.P., SARANGI, P., GERKACH, J. H., DOUTHARS, K. L. and LING, V. 1987. Simultaneous expression of two p-glycoprotein genes in drug sensitive Chinese Hamster Ovary cell. *Molecular Cell. Biology*, 7: 4075-4081.
- ENDICOTT, J. A., SARANGI, F. and LING, V. 1991. Complete cDNA sequences encoding the Chinese Hamster p-glycoprotein gene family. *DNA Sequencing*, 2 : 89-101.
- ENDICOTT, J. A. and LING, V. 1993. Biochemistry of p-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Annual Reviews of Biochemistry*, 62: 385-477.
- FERRY, D. R., TRAUNECKER, H. and KERR, D.J. 1996. Clinical trials of p-glycoprotein reversal in solid tumors. *European Journal of Cancer*, 32 (A) 6 : 1070-1081.
- FISCHER, G. A., LUM, B.L., HAUSDORFF, J., and SIKIC, B.I. 1996. Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance. *European Journal of Cancer*, 32 A (6) : 1082-1089.
- FOJO, A. T., UEDA, K., SLAMON, D. J., POPLACK, D. G., GOTTESMAN M.M. and PASTAN, I. 1987. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 84 : 265-269.
- FORD, J. M. 1996. Experimental reversal of p-glycoprotein mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitizers, *European Journal of Cancer*, 32 (A) 6 : 991-1001.
- FRUYA, K. N., GERBHARDT, R., SCHUETZ, E. G. and SCHUETZ, J. D. 1994. Isolation of rat p-gp3 cDNA evidence for gender and zonal expression in the liver. *Biochemistry and Biophysics*, 1219 : 636-644.

- GANDHI, V. and PLUNKETT, W. 1990. Modulatory activity of 2' 2' difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinoside nucleoside. *Cancer Research*, 50 (12) : 3675-3680
- GERMANN, U. A., CHAMBERS, T., AMBUDKAR, S.V., PASTAN, I. And GOTTESMAN, M. M. 1995. Effects of phosphorylation on multidrug resistance. *Journal of Bioenergy Biochemistry*, 27: 53-61.
- GERMANN, U. A. 1996. P-glycoprotein- A mediator of multidrug resistance in tumour cells. *European Journal of Cancer*, 32 A (6) : 927-944.
- GOLDSTEIN, L. J. and FOJO, A. T. 1989. Expression of a multidrug-resistance gene in human cancers. *Journal of National Cancer Institute*, 81 : 844-849.
- GOLDSTEIN, L. J. 1996. MDR1 gene expression in solid tumours. *European Journal of Cancer*, 32 A (6) : 1039-1050.
- GOTTESMAN, M. M. and PASTAN, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporters. *Annual Reviews of Biochemistry*, 62 : 385-477.
- GREENBERGER, L. M., LOTHSTEIN, L., WILLIAMS, S. S. and HORTWITZ, S. B., 1988. Distinct precursors of p-glycoprotein are overproduced in independently isolated drug-resistant cell lines . *Proceedings of National Academy of Sciences*, 85 : 3762-3766.
- GROS, P., CROOP, J. and HOUSMAN, D. E. 1986.a.. Mammalian multidrug resistance gene complete cDNA sequence indicate strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, 47: 371-380.
- GROS, P., CROOP, J., RONINSON, IB. 1986.b. Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug resistant hamster cells. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 83 : 337-341.
- GROS, P., RAYMOND, M., BELL, J. and HOUSMAN, D. E. 1988. Cloning and characterization of a second member of the mouse mdr gene family. *Molecular Cell Biology*, 8 : 2770-2778.
- GROS, P. and SHUSTIK, C. 1991. Multidrug resistance: a novel class of membrane-associated transport proteins is identified. *Cancer Investigation*, 9 : 563-569.

- HEINEMANN, V. and PLUNKETT, W. 1992. Inhibitory action of 2'2'-difluorodeoxycytidine (dFdC) on cytidine 5'triphosphate synthetase. *Program and abstracts of NCI-EORTC Symposium*, Amsterdam The Netherlands.
- HERTEL, L. W., BODER, G. B. and KROIN, J. S., 1990. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine 2' 2' - difluorodeoxycytidine. *Cancer Research*, 50 (14) : 4417-4422.
- HICKMAN, J.A. 1996. Apoptosis and chemotherapy resistance. *European Journal of Cancer*, 32 A (6) : 921-926.
- HIGGINS, C. F. 1994. To flip or not to flip? *Current Biology*, 4 : 259-260.
- HSU, S. I., LOTHSTEIN, L. and HORTWITZ, S. B. 1989. Differential overexpression of three mdr gene family member in multidrug resistant j774.2 mouse cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264 : 12053-12060.
- HUANG, P. and PLUNKETT W. 1995. Induction of apoptosis by gemcitabine. *Seminars in Oncology*, 22 (4): 19-25
- ISAAC, A. and LINDENMAN, J. 1957. Virus interference ; The Interferon. *Proceedings of Royal Society London Biological Sciences*, 147 : 258-267
- JENSEN, P. B. 1997. In vitro cross resistance and collateral sensitivity in seven resistant small cell lung cancer cell lines: preclinical identification of suitable drug partners to taxotere, toxol, topotecan and gemcitabine. *British Journal of Cancer*, 75 (6) : 869-877.
- JULIANO, RL. and LING, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese Hamster ovary cell mutants. *Biochemistry Biophysics Acta*, 455 : 52-162.
- KANAMARU, H., KAKEHI, Y., YOSHIDA, O., NAKANISHI, S., PASTAN, I. and GOTTESMANN, M. M. 1989. MDR1 RNA levels in human renal cell carcinomas; correlation with grade and prediction of reversal doxorubicin resistance by quinidine in tumor explants. *Journal of National Cancer Institute*, 81 : 844-849.
- KARTNER, N., RIORDAN, R., and LING, V. 1989. Cell surface p-gp associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, Sep 23:21 (4617): 12858-8

- LEHNERT, M. 1996. Clinical Multidrug Resistance in Cancer: A Multifactorial Problems. *European Journal of Cancer*, 32 (A) 6 : 912-920.
- LOZZIO, C. and LOZZIO, B. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45 : 321-333.
- MARIE, J. P., SUBERVILLE, A. M. F., ZHOU, D., ZITTOUN, R. 1993. Correlation with treatment outcome and mdrl expression. *Leukemia*, 52 : 421-427
- MERIMANN, R. L., SCHULTZ, R. M. and HERTEL, L. W. 1994. Evaluation of antitumor activity of gemcitabine against human carcinoma xenografts, *Proceedings of the eighty-fifth annual meeting of the American Association for Cancer research*, 35 (85) : 448 San Francisco , California.
- MORRIS, D.I., GREENBERGER L. M. and BRUGGEMANN E. P. 1994. Localization of the forskolin labeling sites to both halves of p-glycoprotein: similarity of the sites labeled by forskolin and prazosin. *Molecular Pharmacology*, 46 : 329-337.
- MOSCONI, A. M., CRINO, A. L., KAPLAN, P. C. and GOODMAN, J. 1997. Combination therapy with gemcitabine in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, Vol. 33. Suppl. 1, pp. S14-S17
- NIELSEN, D. 1992. P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines. *Biochemica et Biophysica Acta*. Jul (7) 1139:169-183.
- OZES, O. N., REITER, Z., KLEIN, S., BLATT, L. and TAYLOR, M, W. 1992. A comparison of interferon conl with natural recombinant interferon alphas, antiviral, antiproliferative and natural killer cell inducing activities. *Journal of Interferon research*, 12 : 55-59.
- PETERS, G. J., RUIZ VAN HAPEREN, V. W. T., BERGMAN, A. M. and VEERMAN, G. 1996. Preclinical combination therapy with gemcitabine and mechanism of resistance, *Seminars in Oncology*, 23 (5) : 16-24.
- PLUNKETT, W., HUANG, P., SEARCY, E. and GANDHI, V. 1996. Gemcitabine preclinical pharmacology and mechanism of action. *Seminars in Oncology*, 23 (5): 3-5

- RICHERT, N. D., ALDWIN, L., NITECKI, D., GOTTESSMAN, M. M. and PASTAN, I. 1988. Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug resistant KB cells. *Biochemistry*, 27 : 7607-7613.
- RONINSON, I. B. 1992. The role of the MDR (P-gp) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology*. 9: 43 (1) 95-102
- ROTHENBERG, M. L., MICKLEY, L. A., and COLE, D. E., 1989. Expression of MDR1-P170 gene in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 74: 1388-1395.
- RUETZ, S. and GROS, P. 1994. Phosphatidyl translocase : a physiological role for the mdr2 gene. *Cell*, 77: 1071-1081.
- RUETZ, S. and GROS, P. 1995. Enhancement of mdr2 mediated Phosphatidyl translocation by the bile salt taurocholate. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 25388-25395.
- RUIZ VAN HAPEREN V W T, VEERMAN, G. and VERMORKEN, J. B. 1993. 2' 2' - difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumor cell lines, *Biochemical Pharmacology* , 46 (4): 762-766.
- RUSHMAN, E., ARCECI, R. J. and CROOP, J. M. 1992. mdr2 encodes p-glycoprotein expressed in the bilecanalicular membrane as determined by isoform specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 18093-18099.
- SAVAS, B., ODABASOGLU, A., KARAVELİ, Ş., ÜNDAR, L., 1998. Association of glutathione-pi expression with response to chemotherapy and radiotherapy. *Journal of Hematotherapy*, 7 (3) :302
- SCHINKEL, A. H., ROCKFS, M. E. M. and BORST, P. 1991. Characterization of the human mdr3 P-glycoprotein -specific monoclonal antibodies. *Cancer Research*, 51: 2628-2635.
- SCHINKEL, A. H., KEMP, S. and DOLLE, M. 1993. N-glycosylation and deletion mutant of the human mdr1 p-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 7474-748.
- SILVERMAN, J. A., RAUNIO, H. and GRANT, T. W. 1991. Cloning and characterization of a member of the rat multidrug resistance gene family. *Gene*, 100: 229-236.

- SMIT, J. J. M., SCHINKEL, A. H. and MOL, C. AAM. 1994. Tissue disruption of the human MDR3 p-glycoprotein. *Lab Investment*, 71: 638-649.
- SONNEVELD, P. 1996. Reversal of multidrug resistance in acute myeloid leukaemia and other haematological malignancies. *European Journal of Cancer*, 32 (A) 6: 1062-1068.
- SUGIMOTO, Y. and TSURUO, T. 1991. Development of multidrug resistance in rodent cell lines. *Molecular and Cellular biology of Multidrug resistance in Tumor Cells*. 57-70, New York Plenum publishing corporation p.580 New York.
- THIEBAUT, F., TSURUO, T., HARNADA, H., GOTESSMAN M. M., PASTAN, I. and THOMPSON, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462.
- TSURUO, T., IIDA, H., TSUGAKOSHI, S. and SAKURAI, Y., 1981. Overcoming of Vincristine resistance in P388 leukemia in vitro and in vivo through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastin by verapamil. *Cancer Research*, 41: 1967-1962.
- TSURUO, T., OH-HARA, T., SAITO, H., 1986. Characteristics of Vincristine resistant human myelogenous leukemia K562. *Anticancer Research*, 6 (4): 637-41
- WADLER, S., HAYNES, H., BEITLER, J. J., HU, X., FELS, S., CAMACHO, M., LEVINE, B. and WIERNIK, P. H., 1996. Phase II clinical trial with 5-fluorouracil, recombinant interferon-alpha-2b and cisplatin for patients with metastatic or regionally advanced carcinoma of esophagus. *Cancer*, 78 (1): 33-34.
- WALKER, R. P., KOKILEVA, L., LEBLANC, J. and SIKORSKA, M. 1988. Detection of initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Bio Techniques*, 15 (16): 1032-1039.
- WAUD, W. R., GILLBERT, K. S., GRINDEY, G. B., 1996. Lack of in vivo cross resistance with gemcitabine against drug-resistant murine P388 leukemias. *Cancer Chemotherapy and pharmacology* .38 (2) 178-180
- WEISSMAN, C and WEBER, H. 1986. The interferon genes. *Proceedings of Nucleic Acid Research and Molecular. Biology.*, Vol : 33, 251-26.
- WILLIAMS G T, and CHRISTOPHER A S, 1993. Molecular regulation of apoptosis: Genetic control on cell death . *Cell*, Vol: 74, 777-779.

- WILLINGHAM, M. C. 1987. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein, P170. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA.* 84: 7735-7738.
- WRIGHT S C, ZHONG J, LARRICK J W 1994. Inhibition of Apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *FASEB Journal*, Vol: 8, 654-660.
- WYLLIE, A. H., KERR J. F. R. And CURRIE A. R., 1980. Cell death : the significance of apoptosis. *International Review of Cytology.*, Vol: 68, 251.
- XU Y-Z, PLUNKETT W., 1992 Modulation of deoxycytidylate deaminase in intact human leukemia cells: action of 2' 2' - difluorodeoxycytidine, *Biochemical Pharmacology*, 44 (9) : 1819-1927.
- VAN ACKER, K., VAN HOVE, M. L.,BOOGAERTS, M., 1993. Evaluation of flow cytometry for detection of MDR in low resistance using Daunorubicin. *Cytometry* 14; 736-746.
- VAN DER BLICK A. M., BAAS F., TEN HOUTE de LANGE T. 1987. The human *mdr 3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO Journal.*, 6: 3325-3331.

ÖZGEÇMİŞ

Mehtap KILIÇ Eylül 1971 yılında Ankara’ da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimi Kahramanmaraş’ ta tamamladı. 1989 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’ ünden 1994 yılında Biyolog ünvanı alarak mezun oldu. Aynı yılda Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etti. 1996 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ nün açmış olduğu Yüksek Lisans sınavını kazanarak Biyoteknoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen bu görevine devam etmektedir

