

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE TÜMÖRÜNÜ TEDAVİ EDİCİ ETKİDEN SORUMLU
MİKROBAKTERİ HÜCRE DUVARI BİLEŞENLERİNİN HPLC
İLE AYRIŞTIRILMASI

Zeliha ERTÜRK

Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2011

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

**MESANE TÜMÖRÜNÜ TEDAVİ EDİCİ ETKİDEN SORUMLU
MİKROBAKTERİ HÜCRE DUVARI BİLEŞENLERİNİN HPLC
İLE AYRIŞTIRILMASI**

Zeliha ERTÜRK

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. N. Leyla AÇAN**

ANKARA

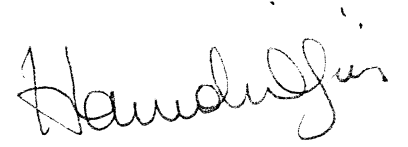
2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya programında Yüksek lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. İ. Hamdi Ögüş
(Hacettepe Üniversitesi)



Tez Danışmanı:

Prof. Dr. N. Leyla Açıan
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Gülberk Uçar
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Bekir Salih
(Hacettepe Üniversitesi)



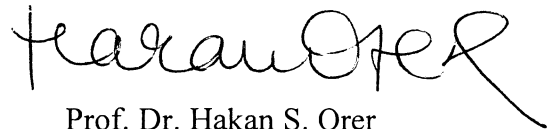
Üye:

Prof. Dr. Zeliha Büyükbingöl
(Ankara Üniversitesi)



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapmakta olduğum yüksek lisans eğitimim süresince başta tez danışmanım Prof. Dr. N. Leyla AÇAN ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE olmak üzere tüm öğretim üyelerine, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Dr. Esra Büber, Behram Sarkarati ve diğer araştırma görevlilerine ve mezuniyet sonrası öğrencilerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Mikobakteri hücrelerini temin eden Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Alpaslan ALP'e, örneklerin kütle spektroskopisi analizlerini gerçekleştiren ve yorumlarıyla katkıda bulunan H. Ü. Fen Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Bekir SALİH ve Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK'a, örneklerin rotavapor ile konsantre edilmesi konusunda yardımcı olan Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'na ve liyofilizasyon işlemlerinde yardımcı olan Eczacılık Teknolojisi Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduklarına inandığım aileme ve arkadaşlarıma bana göstermiş oldukları sabır ve anlayış için teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, SBAG-SANTEZ-5-105S361 no.lu projenin bir parçası olup TÜBİTAK aracılığı ile Sanayi Bakanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Ertürk, Z. Mesane tümörünü tedavi edici etkiden sorumlu mikobakteri hücre duvarı bileşenlerinin HPLC ile ayrıştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2011. BCG, *Mycobacterium bovis*'in tüberküloz aşısı olarak kullanılan bir suşu olup, bunun dışında yüzeysel mesane tümörlerinin tedavisinde de oldukça etkilidir. Ancak tedavide patojen olan BCG canlı bir şekilde mesane içine verildiğinden, bu uygulama birçok yan etkileri beraberinde getirmektedir. Araştırmalar patojen olmayan başka mikobakteri suşlarının çeşitli hücre ekstraktları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada BCG'nin yerini alabilecek insan için zararsız mikobakteri türleri ve bu etkiden sorumlu hücre duvarı ekstraktlarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma SBAG-SANTEZ-5-105S361 no.lu projenin bir parçası olup, daha önceki aşamada TNF-alfa ve IL-12 yanıtları *M. phlei* ile karşılaştırılan 95 mikobakteri suşu içerisinde 12 tanesi aday olarak seçildi. Bunlar içerisinde ön deneylerde sitotoksik aktivite tespit edilemeyen veya çok zayıf aktivite gösteren 6 tanesi elendi. Kalan 6 suşun IC₅₀ değerleri MTT ile tespit edildi. IC₅₀ değerleri sitokin yanıtları ile birlikte değerlendirilerek *M. bovis* ve *M. phlei* ile en çok benzeşen *M. brumae* ile çalışılmasına karar verildi. *M. brumae* hücrelerinin sonikasyonu ile elde edilen supernatan C18 ve SCX kolonlar kullanılarak ileri düzeyde ayrıştırıldı. Örneklerin protein ve şeker derişimleri belirlendi ve MALDI-TOF/MS profilleri çıkarıldı.

Anahtar kelimeler: Yüzeysel mesane kanseri, *Mycobacterium brumae*, yüksek performanslı sıvı kromatografi.

Bu tez çalışması, SBAG-SANTEZ-5-105S361 no.lu projenin bir parçası olup TÜBİTAK aracılığı ile Sanayi Bakanlığı tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Erturk, Z. Separation of mycobacterial cell wall extracts with HPLC responsible for therapy of bladder cancer. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Master Thesis in Biochemistry, Ankara 2011. BCG is a strain of *M. bovis* used as tuberculosis vaccine and in addition effective in therapy of superficial bladder cancer. But during therapy pathogen BCG is given into the bladder in lively form and this application leads to a lot of side effects. Researchs have focused on the use of various cell extracts of other non-pathogenic mycobacterial strains. This study aims to investigate mycobacterial strains, which are non-pathogen for human and will be used instead of BCG and their cell wall extracts responsible for this effect. This study is a part of SBAG-SANTEZ-5-105S361 project and in the previous stage 12 from 95 mycobacterial strains whose TNF-alfa and IL-12 responses were compared with *M. phlei*'s was selected as candidate. 6 of them which did not show sufficient cytotoxic activity in preliminary experiments was eliminated. The IC₅₀ values of remaining 6 strains were determined by MTT. By evaluating IC₅₀ values with cytokine responses together it was decided to study with *M. brumae* which is very similar to *M. bovis* and *M. phlei*. Supernatant obtained by sonication of *M. brumae* cells was separated by using C18 and SCX columns. Protein and sugar concentration of each fractions were determined and they were analysed by MALDI-TOF/MS.

Key Words: Superficial bladder cancer, *Mycobacterium brumae*, high performance liquid chromatography.

This thesis is a part of SBAG-SANTEZ-5-105S361 project and supported by Ministry of Industry through TUBITAK.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLO DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mesane Kanseri ve Mikobakterilerle İlişkisi	3
2.2. İmmünoloji ile İlgili Bilgiler	4
2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	7
2.4. Mikobakteri Hücre Duvarının Yapısı	9
2.4.1. Mikolilarabinogalakattan peptidoglikan (mAGP)	10
2.4.2. Lipoarabinomannan (LAM) ve Lipomannan (LM)	12
2.4.3. Fosfatidilinositol mannosit (PIM)	14
2.4.4. Sideroforlar	14
2.5. BCG'nin Etki Mekanizması	16
2.6. Toll Benzeri Reseptörler (Toll-like Receptor, TLR)	18
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	21
3.1. Gereçler	21
3.1.1. Hücreler	21
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler	21
3.1.3. Aletler	22
3.2. Yöntemler	22
3.2.1. Mikobakteri Hücrelerinin Üretilmesi	22
3.2.2. Uygun Mikobakterilerin Belirlenmesi ve Örneklerin Hazırlanması	23
3.2.2.1. <i>M. brumae</i> Hücre Duvarı Ekstrelerinin Hazırlanması (1. Aşama)	24
3.2.2.2. <i>M. brumae</i> Hücre Duvarı Ekstrelerinin HPLC ile Ayırıştırılması (1. Aşama)	25

3.2.2.3. <i>M. brumae</i> Hücre Duvarı Ekstrelerinin Hazırlanması (2. Aşama)	25
3.2.2.4. <i>M. brumae</i> Hücre Duvarı Ekstrelerinin HPLC ile Ayırıştırılması (2. Aşama)	25
3.2.3. Örneklerde Protein Derişiminin Tayini	26
3.2.4. Örneklerde Şeker Derişiminin Tayini	27
3.2.5. Ökaryotik Hücre Kültürü Çalışmaları	27
3.2.6. Örneklerde Sitokin Yanıtının Ölçülmesi	28
3.2.7. Örneklerde MTT Testleri	28
3.2.8. Örneklerin MALDI-TOF/MS Analizleri	29
4. BULGULAR	30
4.1. Mikobakteri Hücre Duvarı Örneklerinin Mesane Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri ve Sitokin Aktivasyonları	30
4.2. <i>M. brumae</i> 'den Elde Edilen Hücre Duvarı Örnekleri (1. Aşama)	32
4.3. <i>M. brumae</i> Hücre Duvarı Örneklerinin HPLC Analiz Sonuçları (1. Aşama)	33
4.4. <i>M. brumae</i> Hücre Duvarı Örneklerinin MALDI-TOF/MS Analiz Sonuçları (1. Aşama)	34
4.5. <i>M. brumae</i> Hücre Duvarı Örneklerinin Sitokin Aktivasyon Sonuçları (1. Aşama)	38
4.6. <i>M. brumae</i> 'den Elde Edilen Hücre Duvarı Örnekleri (2. Aşama)	39
4.7. <i>M. brumae</i> Hücre Duvarı Örneklerinin HPLC ve MALDI-TOF/MS Analiz Sonuçları (2. Aşama)	40
4.7.1. Birinci Boyut (C18, ters faz kromatografisi)	40
4.7.2. İkinci Boyut (SCX, Kuvvetli katyon değıştirici kromatografi)	45
4.8. Örneklerin Protein ve Şeker Derişimleri (2. Aşama)	63
5. TARTIŞMA	65
SONUÇ	70
KAYNAKLAR	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

AG	Arabinogalaktan
APC	Antigen Presenting Cell
ARB	Acide Resistance Bacteria
BAK	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i> Activated Killer
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
BSA	Bovin Serum Albumin
cm	Santimetre
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
Da	Dalton
dak	Dakika
DC	Dendritic Cell
Eks.	Ekstraksiyon
GlcNAc	N-asetilglikozamin
GPI	glikozil fosfatidil inositol
GPL	Glikopeptidolipitler
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFN- γ	İnterferon- γ
IL-6	İnterlökin-6
IR	Infrared
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole-Limpet Hemosiyanin
LAK	Lymphokin Activ Killer
LAM	Lipoarabinomannan
LM	Lipomannan
LPS	Lipopolisakkarit
mAG	Mikolilarabinogalaktan
mAGP	Mikolilarabinogalaktan peptidoglikan
MALDI-TOF/MS	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight / mass spectroscopy

ml	Mililitre
mM	Milimolar
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
MS	Mass spektrometry
Mur	Muramik asit
MTT	3-(4,5- <u>Dimethylthiazol</u> -2-yl)-2,5 <u>diphenyl</u> tetrazolium bromide
<i>M.bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M.brumae</i>	<i>Mycobacterium brumae</i>
<i>M.chitae</i>	<i>Mycobacterium chitae</i>
<i>M.murale</i>	<i>Mycobacterium murale</i>
<i>M.phlei</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>
N	Normal
NF κB	Nuclear Factor κB
NK	Natural Killer
NKT	Naturel Killer T Cell
nm	Nanometre
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PDA	Photodiod Array
PG	Peptidoglikan
PGL	Fenolik glikolipitler
PGN	Peptidoglikan
PI	Fosfatidil inositol
PIM	Fosfatidil-miyo-inositol mannosit
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTFE	Politetrafloroetilen
SCX	Strong Cation Exchanger
sn	Saniye
TDM	Trehaloz dimikolat
TFA	Trifloroasetik asit

TLC	Thin Layer Chromatography
TLR	Toll-Like Receptor
TMM	Trehaloz monomikolat
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör- α
TURMT	Transüretal Mesane Tümörü Rezeksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Mikobakteri hücre duvarı yapısı	10
Şekil 2.2. LAM'ın genel yapısı	12
Şekil 2.3. Farklı mikobakteri türlerine ait LAM ve LM yapıları	13
Şekil 2.4. Mikobaktin molekülünün genel yapısı	15
Şekil 2.5. Ekzokelin MS ve karboksimikobaktin moleküllerinin yapısı	15
Şekil 2.6. BCG'nin etki mekanizması	16
Şekil 2.7. BCG hücre duvarı iskeletinin yapısı	20
Şekil 3.1. Bradford yöntemi (mikro metod) protein standart eğrisi	26
Şekil 3.2. Fenol sülfürik asit metodu ile şeker derişimi standart eğrisi	27
Şekil 4.1. <i>M. brumae</i> hücre duvarına ait çeşitli yöntemlerle elde edilen örnekler (1. Aşama)	32
Şekil 4.2. B2 örneğine ait 280 nm'de gözlenen C18 analiz sonucu	33
Şekil 4.3. B3 örneğine ait 280 nm'de gözlenen C18 analiz sonucu	33
Şekil 4.4. B3-C2 örneğine ait SCX analiz sonucu	34
Şekil 4.5. B2 örneğinin kütle spektrumu	34
Şekil 4.6. B2-C1 örneğinin kütle spektrumu	35
Şekil 4.7. B2-C2 örneğinin kütle spektrumu	35
Şekil 4.8. B3 örneğinin kütle spektrumu	36
Şekil 4.9. B3-C1 örneğinin kütle spektrumu	36
Şekil 4.10. B3-C2 örneğinin kütle spektrumu	37
Şekil 4.11. B3-C2S3 örneğinin kütle spektrumu	37
Şekil 4.12. <i>M. brumae</i> hücre duvarına ait çeşitli yöntemlerle elde edilen örnekler (2. Aşama)	39
Şekil 4.13. HB3 örneğine ait 280, 205 ve 260 nm'de gözlenen C18 analiz sonuçları	40
Şekil 4.14. HB3 örneğinin kütle spektrumu	41
Şekil 4.15. HB-C1 örneğinin kütle spektrumu	42
Şekil 4.16. HB-C2 örneğinin kütle spektrumu	43
Şekil 4.17. HB-C3 örneğinin kütle spektrumu	44

Şekil 4.18. HB-C1 örneğine ait 280, 205 ve 260 nm’de gözlenen SCX analiz sonuçları	45
Şekil 4.19. HB-C1S1 örneğinin kütle spektrumu	46
Şekil 4.20. HB-C1S2 örneğinin kütle spektrumu	47
Şekil 4.21. HB-C2 örneğine ait 280, 205 ve 260 nm’de gözlenen SCX analiz sonuçları	48
Şekil 4.22. HB-C2S1 örneğinin kütle spektrumu	49
Şekil 4.23. HB-C2S2 örneğinin kütle spektrumu	50
Şekil 4.24. HB-C2S3 örneğinin kütle spektrum	51
Şekil 4.25. HB-C3 örneğine ait 280, 205 ve 260 nm’de gözlenen SCX analiz sonuçları	52
Şekil 4.26. HB-C3S1 örneğine ait 280, 205 ve 260 nm’de gözlenen C18 analiz sonuçları	53
Şekil 4.27. HB-C3S1C1 örneğinin kütle spektrumu	54
Şekil 4.28. HB-C3S1C2 örneğinin kütle spektrumu	55
Şekil 4.29. HB-C3S2 örneğine ait 280, 205 ve 260 nm’de gözlenen C18 analiz sonuçları	56
Şekil 4.30. HB-C3S2C1 örneğinin kütle spektrumu	57
Şekil 4.31. HB-C3S2C2 örneğinin kütle spektrumu	58
Şekil 4.32. HB-C3S3 örneğine ait 280, 205 ve 260 nm’de gözlenen C18 analiz sonuçları	59
Şekil 4.33. HB-C3S3C1 örneğinin kütle spektrumu	60
Şekil 4.34. HB-C3S3C2 örneğinin kütle spektrumu	61
Şekil 4.35. HB-C3S3C3 örneğinin kütle spektrumu	62
Şekil 5.1. B3 örneğine ait 280 nm’de gözlenen C18 analiz sonucu	66
Şekil 5.2. B3 örneğine ait 280 nm’de gözlenen C18 analiz sonucu	67

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Sitokin aileleri	5
Tablo 2.2. Mikobakterilerin sınıflandırılması	8
Tablo 2.3. Farklı TLR'ler ve ligandları	19
Tablo 3.1. Belirlenen 12 mikobakteri suşu	23
Tablo 4.1. Mikobakteri suşlarına ait ön deneyde tespit edilen IC ₅₀ değerleri	30
Tablo 4.2. Seçilen 6 suşun MTT, IL-12 ve TNF- α sonuçları	31
Tablo 4.3. 1. Aşama <i>M. brumae</i> hücre duvarı örneklerine ait TNF- α aktivasyonu sonuçları ve MALDI/MS pikleri	38
Tablo 4.4. Örneklerin protein, şeker derişimleri ve MALDI/MS pikleri (2. Aşama)	63

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar, hastalık yapıcı etkilerinin yanı sıra antibiyotik üretmeleri, çamaşır tozu üretiminde enzim sağlamaları, mikrobiyal insektisit olarak kullanılmaları ve çeşitli gıdaların (peynir, yoğurt, şarap, sirke vb) üretiminde rol almaları nedeniyle insan yaşamı için önemlidir (1). Mikroorganizmalar, bütün bu biyoteknolojik kullanımlarının yanı sıra tıp alanında antimikrobiyal ve antitümöral olarak da kullanılmaktadır.

Tümörle eş zamanlı bakteriyel enfeksiyona sahip hastalarda tümördeki kendiliğinden gerileme ve iyileşme ile ilgili incelemeler yaklaşık 300 yıl öncesine dayanmaktadır. 1813 yılında Vautier, gaz kangreni olan hastalarında tümörün gerilediğini gözlemlemiştir. Günümüzde gaz kangreninin *Clostridium* cinsi bakterilerin enfeksiyonu sonucu olduğu bilinmektedir. 1868’de Busch ve 1882’de Fehleisen, tümörlü hastalarına *Streptococcus pyogenes*’in neden olduğu yılancık hastalığı aşılama çalışmaları yapmıştır. William Coley’in 1890’da geliştirdiği ısıyla öldürülmüş *Streptococcus pyogenes* ve *Serratia marcescens* bakterilerinin karışımı olan Coley zehiri, 1963’ten beri sarkomalı hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. *Clostridium* türleri ile yapılan benzer çalışmaların beklenen sonucu vermemesi bu alanda durağan bir döneme girilmesine neden olsa da, 1976 yılında Morales, Eidinger ve Bruce’un yüzeysel mesane tümörlerinde bir mikobakteri suşu olan BCG ile elde ettiği başarılı sonuçlar, bu alanda bir dönüm noktası niteliği taşımaktadır (2).

Son yıllarda bakteriyoloji ve moleküler biyolojideki gelişmeler, kanser tedavisinde bakteriyel uygulama alanlarını genişletmiştir. Patojenik bakterilerin onkolitik ajan olarak kullanımı, bakteriyel toksinlerin ve genetik olarak modifiye edilmiş bakterilerin tümörün seçici tahribi için kullanımı, *Vibrio cholerae* ve *Yersinia enterocolitica*’nın kanser gen tedavisi için vektör olarak kullanımı ve bazı mikrobiyal kökenli enzimlerin kanser kemoterapisinde ilaç olarak kullanımı bu uygulamalara örnek teşkil etmektedir (3).

Günümüzde hala yüzeysel mesane tümörlerinin tedavisinin bir parçası olan BCG, immünoterapötik bir kanser tedavi yöntemi olup, canlı BCG’nin mesane içine damlatılması şeklinde uygulanmaktadır. Bu olayın tam mekanizması bilinmemesine rağmen, BCG’nin tümör hücrelerinin imhasını gerçekleştiren güçlü bir yerel immün

yanıt sağladığı düşünülmektedir. Ancak bu uygulamada güvenlikle ilgili bazı endişeler söz konusu olmaktadır. Çünkü patojen olan BCG canlı olarak verilmekte olup, uygulanması birçok yerel ve sistemik yan etkileri beraberinde getirmektedir. Yeni araştırmalar, çeşitli klinik cevapların oluşumunu sağlayan ancak canlı bir mikobakteri nedeniyle oluşabilecek istenmeyen yan etkileri olmayan mikobakteri hücre çeper preparatlarının olası kullanımı üzerine odaklanmıştır (4). *M. phlei* ile yapılan bazı çalışmalarda hem *M. phlei* hücre duvarı ekstresinin hem de *M. phlei* hücre duvarı-DNA kompleksinin mesane kanserinde antikanser aktivitesinin olduğu bulunmuştur (5, 6). Yapılan çalışmalar mikobakteri hücre duvarı ekstresinin tek başına tedavi için yeterli olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma mesane tümörü tedavisinde BCG'nin yerini alabilecek, insan için daha zararsız ve üretilmesi kolay mikobakteri türleri ve bu etkiden sorumlu hücre duvarı bileşenlerinin araştırılması konulu SBAG-SANTEZ-5-105S361 no.lu projenin bir parçasıdır. Projenin bir önceki bölümünde sitokin aktivasyonları *M. bovis* ile karşılaştırılan 95 mikobakteri suşu arasından insan makrofajlarında TNF-alfa ve IL12 uyarıcı aktiviteleri *M. bovis* suşuna denk veya daha iyi olan suşlar incelenmiş ve patojenlik ve üreme hızları da göz önüne alınarak 12 aday suş seçilmiştir. Bu çalışmada ise önce bu suşların mesane tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT testi ile incelenmesi ve hem ELISA hem de MTT sonuçlarının ortak değerlendirilmesi sonucu seçilecek suş hücreleri geniş çapta üretilerek hücre duvarı ekstralarının HPLC ile ileri düzeyde ayrıştırılması ve antitümoral/immünstimülan etkiden sorumlu bileşenlerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Kanseri ve Mikobakterilerle İlişkisi

Mesane kanserinin nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte aromatik kimyasallar, anilin boyaları, benzidin bileşiklerine maruziyet, α -naftalen ve β -naftalenin idrara salınımına neden olduğu için sigara içimi, kahve içimi, suni tatlandırıcı kullanımı, bakteri, parazit, mantar ve virüs enfeksiyonları, mesane taşı ve genotoksik kemoterapi ajanlarının mesane kanseri gelişimi ve ilerlemesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca mesane tümörüyle ilgili bazı onkogenler ve tümör baskılayıcı genler de tanımlanmıştır (7, 8).

Mesane kanseri dünyada, erkekler arasında 4. ve kadınlar arasında 10. en yaygın kanser türüdür (9). Türkiye’de ise 55 yaş üstü erkeklerde yaygınlık bakımından 2. sırada yer almaktadır (10). Bu hastalıktan ölüm hızının çok yüksek olmaması ise, kronik bir hastalık olduğunun göstergesidir ve yeni ilaçların geliştirilmesine duyulan ihtiyacı vurgular.

Hastaların %75’inde hastalık erken yüzeyel evrede, idrarda mikroskopik kan görülmesi ile teşhis edilmektedir. % 65 rekürens ve % 30 ilerleme oranı nedeniyle bu hastalar hayat boyu denetim altında olmak zorundadır (7).

Tümörün derece ve evresine bağlı olarak farklı tedavi alternatifleri bulunmaktadır.

İntravezikal tedaviler kemoterapi ve immünoterapi olmak üzere kabaca 2 sınıfa ayrılmaktadır. Kemoterapide Mitomisin C, Doksorubisin, Epirubisin, Tiotepa ve Gempitabin gibi kimyasalların; immünoterapide ise interferon, KLH (Keyhole-Limpet Hemosiyanin) ve BCG gibi immünolojik ajanların mesane içine damlatılması söz konusudur (8).

Uluslararası Mesane Kanseri grubu, düşük riske sahip hastalarda tümörün cerrahi olarak çıkarılmasından sonra intravezikal kemoterapi önermektedirler. Diğer yandan, orta ve yüksek riskli hastalıklarda ve tekrarlamalarda tercih edilen tedavi BCG tedavisidir (11). BCG etkili bir terapötik olmasına rağmen, patojen olması ve sistemik BCG reaksiyonları ve allerjik reaksiyonlar gibi ölümcül yan etkileri

nedeniyle kullanımı sınırlıdır (11, 12). Ayrıca eğer hasta BCG tedavisine cevap vermişse, uzun süreli kullanımı komplikasyon riskini artırır.

Mesane tümörünün immünolojik tedavisi için daha az toksik ve daha kuvvetli ajanlar bulmak üzere yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar daha çok *M. phlei* üzerinde yoğunlaşmıştır. 61 denek kullanılan bir çalışmada *M. phlei* hücre duvar ekstresinin antitümöral etki gösterdiği ve toksisite profilinin BCG'den daha iyi olduğu gösterilmiştir (5). *M. phlei* ve *M. smegmatis* ile yapılan çalışmalar proteince zengin hücre duvarı proteinlerinin TNF- α ve IL-12 salgılanmasına yol açtığını göstermiştir (8, 13).

2.2. İmmünoloji ile İlgili Bilgiler

Enfeksiyonlara karşı immün yanıt, vücuttan patojenlerin temizlenmesinde bir sinerji içerisinde çalışan doğal ve kazanılmış immün sistemlerin bir ürünüdür. Hızlı bir şekilde üretilip indüklenebilen mediyatörlere sahip olan doğal immün yanıt, ilk etapta enfeksiyon ajanlarının çoğalması ve yayılmasının engellenmesinde büyük öneme sahiptir. Kazanılmış immün yanıtın oluşumu oldukça geç olmasına rağmen, patojenlerin yok edilmesinde çok büyük etkiye sahip özelleşmiş efektör mekanizmalarını içermektedir (14). Doğal bağışıklık, makrofajlar, doğal öldürücü hücreler (natural killer cell, NK), nötrofiller, eozinofiller, $\gamma\delta$ T hücreleri, doğal öldürücü T hücreleri (natural killer T cell, NKT), dendritik hücreler ve IFN üreten hücrelerden; kazanılmış bağışıklık ise dendritik hücreler ve diğer antijen sunucu hücreler (antigen presenting cell, APC), B hücreleri, CD4⁺ T hücreleri ve CD8⁺ T hücrelerinden oluşmaktadır.

Doğal ve kazanılmış bağışıklık arasında temel bir bağlantı bulunmaktadır. Bu bağlantı, bağışıklık sistemi hücreleri ve sitokinler arasındaki kompleks etkileşimler ile düzenlenmektedir. Bu sitokinler, patojenlere ve tehlike sinyallerine cevap olarak makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doğal immün sistem hücreleri tarafından hızlı bir şekilde üretilmekte ve doğrudan veya dolaylı olarak dendritik hücre öncülleri, B ve T hücreleri gibi belirli hücreleri etkileyerek immün yanıt oluşumunu sağlamaktadır (15). Bu bağlamda, dendritik hücrelerin antijen sunumu fonksiyonu ve kazanılmış immün yanıtı başlatmak için lenf nodlarına göçünü düzenlemekte ve T ve

B hücrelerinin efektör fonksiyonları, göç etme özellikleri ve hafıza hücrelerine farklılaşmalarında rol oynamaktadırlar (16).

Sitokinler, bir grup çözünebilir glikoproteinler ve düşük molekül ağırlıklı (5-140 kD) peptitlerdir. 80' den fazla sitokin tanımlanmış olup, bu moleküller, hücreler arasındaki etkileşimi sağlayarak hücre ve doku fonksiyonlarının düzenlenmesi, embriyonik gelişimin koordine edilmesi, hücre büyümesi ve olgunlaşması, yaraların iyileşmesi, akut faz reaksiyonları ve septik şoku içeren immün yanıt oluşumu ve yeni kan damarı oluşumu gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer almaktadır (17).

Üstlendikleri fonksiyonlar göz önüne alınarak farklı sitokin aileleri tanımlanmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Sitokin aileleri (18)

Sitokin ailesi	Örnekler	Aktiviteler
İnterlökinler	IL-1a, IL-1b, IL1ra, IL-2, IL-26	Doğal ve kazanılmış bağışıklığın düzenlenmesi
Kemokinler	Monosit kemotaktik faktör	Lökosit kemotaksisi ve aktivasyonu
Tümör nekroz faktörleri	TNF- α , TNF- β	Tümör sitotoksitesi
İnterferonlar	IFN- α , IFN- β IFN- γ	Antiviral İmmün düzenleyici
Koloni stimüle edici faktörler	G-CSF, M-CSF, IL-3, 5, 6 ve 7	Miyelopoiesis
Nörotrofin ve nöropoietinler	Sinirsel büyüme faktörü	Sinirsel büyüme ve farklılaşma
Büyüme faktörleri	Fibroblast büyüme faktörü Endotel hücre büyüme faktörü	Hücre büyümesinin düzenlenmesi

İnterferonlar, 20. yy'ın ortalarında ilk keşfedilen sitokin ailesi olup Tip-I ve Tip-II olmak üzere iki alt aileye ayrılmaktadır. Tip-I interferonlar (IFN- α , IFN- β , IFN- τ , IFN- ω) antiviral sitokinler olup NK hücrelerinin aktivasyonu ve proliferasyonunu sağlamakta, Tip-II interferonlar (IFN- γ) ise immünregülatör sitokinler olup makrofajları aktive etmenin yanı sıra MHC sınıf-II ekspresyonunu tetiklemekte ve antijen sunumunu etkilemektedir.

İnterlökinler, interferonların yanı sıra ilk tanımlanan sitokinler arasında olup ilk olarak IL-1 ve IL-2 tanımlanmış ve “lökositler arasındaki medyatörler” anlamında interlökin ismi verilmiştir. IL-1, sitokinlerin tek bir fonksiyonlarının olmadığını, aksine çok sayıda fonksiyona sahip (pleiotrop) olduklarını gösteren önemli bir örnektir. Değişik isimler altında farklı işlevleri üstlenmiştir. Örneğin, endojen pirojen (EP), lenfosit aktive edici faktör (LAF) ve lökosit endojen medyatör (LEM). Günümüzde 23 adet interlökin tanımlanmış durumdadır. Örneğin, IL-18 monosit kökenli bir sitokin olup, IL-12 ile birlikte IFN- γ üretimini tetiklemekte (19), IL-6 hematopoiesis ve inflamasyonda görev almakta ve IL-10 ise IL-1 ve IL-6 gibi bazı proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltmaktadır (17).

Tümör nekroz faktörleri ailesinin prototipi TNF- α olup, bunun dışında TNF- β , CD30L, CD40L, CD95L, FasL, TRAIL, NGF gibi bir dizi medyatör de bu aileye dahil edilmiştir. Bu sitokinlerin görevi lenf nodlarının gelişimini tetikleyerek immün regülasyonun sağlanması, antitümör etkisinin ve apoptozun indüklenmesidir.

Koloni stimüle edici faktörler, hematopoiesis öncü hücrelerinin farklılaşması ve çoğalmasını düzenleyen faktörler olarak bilinmekte olup bunlara granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), granülosit koloni stimüle edici faktör (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) ve makrofaj koloni stimüle edici faktör (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) dahildir. Hücre farklılaşmasının sağlanması dışında ek görevleri de vardır. Örneğin, GM-CSF nötrofillerin antimikrobiyal aktivitelerini ve monositlerin sitokin üretimlerini de tetiklemektedir.

Büyüme faktörleri, hematopoetik olmayan hücrelerin büyümesini etkileyen sitokin ailesidir (19). Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF) epidermal ve mezenkimal hücrelerin farklılaşmasında, platelet kökenli büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF) doku tamirlerinde, fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor, FGF) ise çok sayıda hücre çeşitinin proliferasyonu yanı sıra anjiogeneizde rol oynamaktadır (17).

Kemokinler, yani kemotaktik sitokinler, diğer sitokinlerden daha küçük boyutlarda (8-10 kD) spesifik kimyasal ve fonksiyonel özellikleri olan bir gruptur. Granülositler ve monositler için kemotaktik etkisi olan sitokinlerdir. Diğer sitokinlerden farklı olarak hücre membranındaki G-protein bağlı reseptörlere etki

etmektedirler. 50'den fazla kemokin bulunmakta olup bunlar başlangıçtaki sistein kalıntıları arasında başka aminoasit olup olmadığı ve kaç tane olduğuna göre C, CC, CXC ve CX3C olmak üzere 4 alt aileye ayrılmışlardır (20).

2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Mikobakteriler, kolay boyanamayan, fakat boyandıktan sonra asit ve alkolle renkleri giderilemediği için “aside dirençli” şeklinde de nitelendirilen çomak şekilli bakterilerdir. Bu grupta, patojen olmayan saprofit türlerin yanı sıra, enfeksiyöz granuloma tipinde lezyonlar yapan ve ciddi hastalıklara neden olan *Mycobacterium tuberculosis* (tüberküloz etkeni) ve *Mycobacterium leprae* (leprozi etkeni) gibi patojen türler de yer almaktadır.

Mikobakteriler, gram pozitif ya da gram negatif olarak sınıflandırılmazlar. Bazik boyalarla bir kez boyandıktan sonra, iyod eriyiği ile işleme bağlı olmaksızın, alkol ile renkleri giderilememektedir. İçerisinde % 3 oranında klorür asidi bulunan etil alkol bütün bakterilerin boyasını çabucak giderdiği halde, mikobakterilere bu etkiyi gösterememektedir. Aside dirençlilik hücre yapısının tümüne bağlı bir özelliktir. Aside-dirençli bakterilerin tanınması için Ziehl-Neelsen boyama yöntemi kullanılmaktadır.

Mikobakteriler, zorunlu aeroblardır. Enerjilerini birçok basit karbon bileşiklerini oksitleyerek elde ederler. Fazla CO₂ bulunuşu üremelerini artırır. Üremeleri bakterilerin çoğundan daha yavaştır. Saprofit şekiller daha hızlı ürerler, daha çok pigment yaparlar ve aside patojenlerden daha az dirençlidirler (21).

Mikobakteriler literatürde çeşitli şekillerde sınıflandırılmakta ve farklı genotipik ve fenotipik özellikler dikkate alınarak tanımlanmaktadır. 16S rRNA geni, 65 kDa ısı şok protein geni, superoksit dismutaz geni gibi genotipik özelliklerin yanı sıra hücre çeperindeki mikolik asit içeriği, boyanma özellikleri, üreme hızları ve patojenlik gibi etkenler hem sınıflandırma hem de karakterizasyon için önemli olmuştur (22).

Genel anlamda mikobakteriler içerisinde iki grup tanımlanmıştır. Bunlar *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi ve nontüberküloz mikobakterilerdir. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi, farklı konaklarda tüberküloz etkeni olan

mikobakterileri içermekte olup, klasik üyeleri *M.tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum* ve üç yaygın olmayan üye *M. microti*, *M. canettii* ve *M. pinnipedii*'dir. Bu bakteriler geniş bir konak yelpazesine sahip olup yalnızca sığır ve insanda değil diğer evcil ve yabani hayvanlarda da tüberküloza neden olmaktadır (23). *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi üyeleri birbirlerinden konak, fenotip ve patojenlik yönünden ayrılmaktadır. Bazı türler (*M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*) yalnızca insanda veya rodentlerde (*M. microti*) patojen iken diğerlerinin (örneğin *M. bovis*) konak spektrumu oldukça geniştir. Bu nedenle *M. bovis BCG* gibi aşı olarak da kullanılabilirler (24).

Tipik tüberküloz ve lepra basilleri dışında kalanlar ise nontüberküloz, anonim, atipik veya oportünist olarak adlandırılmaktadır. Nontüberküloz mikobakteriler ilk defa 1931'de Pinnars tarafından izole edilmiştir. Pinnars, bu mikobakterilerin tüberküloz açısından patojen olmadığını ve antitüberküloz ilaçlara karşı zayıf yanıtının olduğunu bulmuştur. Bugün bu bakterilerden bir kısmının pulmoner hastalıklar, lenf nodu iltihapları, deri lezyonları ve disemine (vücuda yayılıcı) hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (25). Bu mikobakteriler patojenlik ve üreme hızları açısından sınıflandırılabilirler (Tablo 2.2).

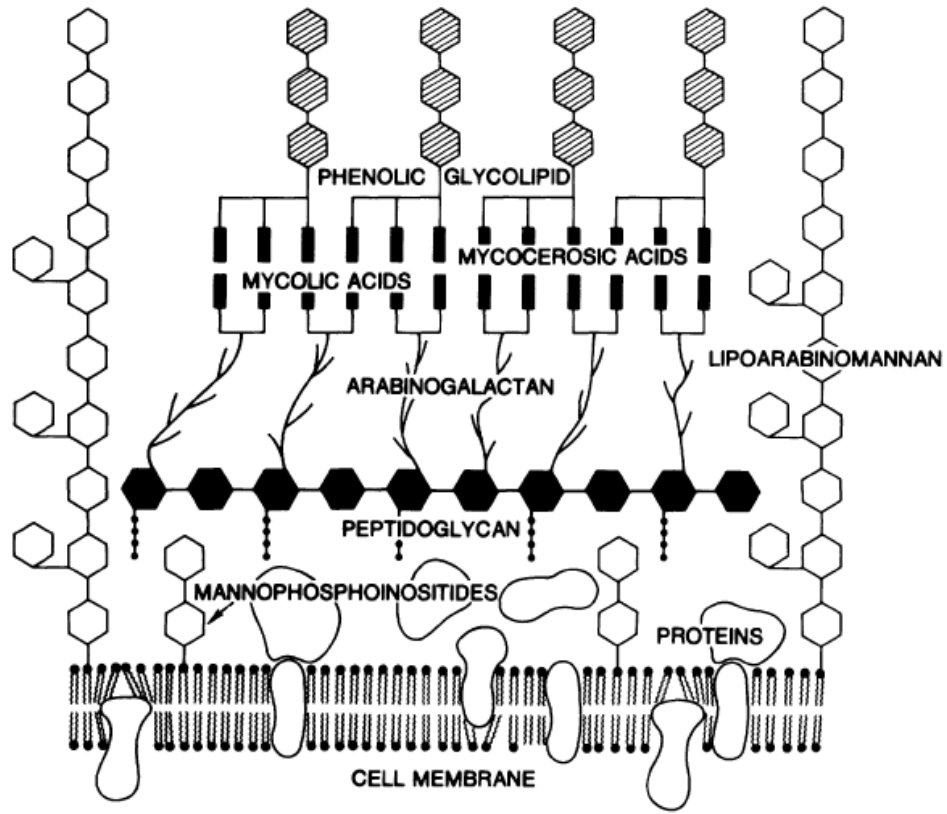
Tablo 2.2. Mikobakterilerin sınıflandırılması (26).

	Yavaş üreyen	Hızlı üreyen
Patojenik	<i>M. bovis</i> , <i>M. bovis BCG</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. leprae</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. celatum</i> , <i>M. ulcerans</i> ...	<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. mageritense</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. porcinum</i> , <i>M. novacastrense</i> ...
Nonpatojenik	<i>M. cookii</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. hiberniae</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. triviale</i>	<i>M. agri</i> , <i>M. aichiense</i> , <i>M. aurum</i> , <i>M. brumae</i> , <i>M. chitae</i> , <i>M. chubuense</i> , <i>M. diernhoferi</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. tokaiense</i> , <i>M. vaccae</i>

2.4. Mikobakteri Hücre Duvarının Yapısı

Mikobakteri hücre duvarları lipitler açısından oldukça zengindir. Normalde lipofilik ve amfifilik ajanların lipit bölgeleri sayesinde hücre duvarından geçmesi beklenirken, mikobakteriler bu ajanlara dahi yüksek düzeyde direnç göstermektedir. Bu bağlamda mikobakteri hücre duvarındaki lipit bölgelerinin geçirgenlikte etkili bir bariyer olarak nasıl işlev gördüğünün anlaşılması önem kazanmaktadır (27).

Mikobakteri hücre duvarı ile ilgili oldukça fazla araştırma yapılmaktadır. Çünkü hücre duvarı yeni antibiyotikler için mükemmel hedefler olan eşsiz kimyasal özellikler içermektedir. Mikobakterilerin diğer bakterilere oranla daha küçük boyutlarda oluşu, hidrofobisiteleri, asite dirençli boyanma özellikleri ve çoğu antibiyotiğe direnç göstermelerinin hücre duvar yapısıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (28). Çok kompleks olan mikobakteri hücre duvarı, bakterinin büyümesi, konak içerisinde hayatını devam ettirmesi ve immünolojik yanıtların oluşumu açısından önemli roller oynamaktadır. Araştırmalar mikobakteri hücre çevresinin üç kısımdan oluştuğunu göstermiştir: Plazma zarı, hücre duvarı ve kovalent olmayan bağlarla bağlı glikanlar, lipitler ve proteinler (29). Mikobakteri hücre duvarının majör bileşenleri ise iki lipitli bir polisakkarit olan mikolilarabinogalakattan kompleksi (mAG) ve lipoarabinomannan (LAM)dır (30). Mikolilarabinogalakattan, mikolik asitlerin arabinogalakattan ile bağlanması sonucu oluşmakta olup bu yapıya peptidoglikanın fosfodiester bağı ile bağlanmasıyla mikolilarabinogalakattan peptidoglikan (mAGP) yapısı oluşmaktadır. Bu yapı ise hücre duvarının temel iskeleti niteliğindedir (28). Bunlar dışında mikolilarabinogalakattan ve lipoarabinomannan yapıları arasına girmiş lipomannan (LM), fosfatidil-miyo-inositol mannosit (PIM), fenolik glikolipitler (PGL) ve glikopeptidolipitler (GPL) gibi bir dizi glikolipit de yer almaktadır (30). Lipoarabinomannan, lipomannan ve fosfatidil-miyo-inositol mannosit bileşenleri büyük oranda hücre zarı içerisine doğru bağlanmakla birlikte, hücre yüzeyinin en dışında da bulunmakta ve immün sistemle ilişkiyi sağlamaktadır (29). Şekil 2.1’de mikobakteri hücre duvarının tipik yapısı görülmektedir.



Şekil 2.1. Mikobakteri hücre duvarı yapısı (31)

2.4.1. Mikolilarabinogalakтан peptidoglikan (mAGP)

Hücre duvarı matriksinin temel yapısı, peptidoglikanın arabinogalakтана bağlanması ve mikolik asitlerle esterleşmesi sonucu oluşan mikolilarabinogalakтан peptidoglikandan oluşmaktadır.

Peptidoglikan (PG) yapısı, farklılık gösterebilen N-asetilglukozamin (GlcNAc) ve modifiye muramik asit (Mur) üniteleri içermektedir. PG'ın tetrapeptit yan zinciri L-Alanin, D-Glutamin, mezo diaminopimelik asit ve D-Alanin'den oluşmaktadır. PG bakterilerde ortak bulunan bir yapıdır. Buna karşın mikobakteriyel PG iki bakımdan farklılık göstermektedir: Muramik asitlerin bir kısmı veya tamamı glikolik asit ile açillenerek N-glikozil muramik asit yapısında bulunmaktadır. Diğer bir fark ise tetrapeptit yan zincirinde mezo diaminopimelik asit bulunmasıdır.

Arabinogalaktan (AG), redükte bir uca sahip arabinoz molekülü içeren serolojik olarak aktif dallanmış bir zincir olup, hücre duvarının en önemli polisakkaritlerinden biri olarak kabul edilmektedir (32). Arabinogalaktan polimeri, doğada nadir rastlanan D-arabinofuranoz ve D-galaktofuranoz moleküllerinden oluşmaktadır. Arabinanın redükte olmayan ucu dallanmış bir pentaarabinofuranoz yapısal motifi içermektedir. Galaktan ise 5. ve 6. karbondan bağlı β -D-galaktofuranoz ünitelerinden oluşmakta olup, arabinan zincirleri galaktan yapısına 5 nolu karbondan bağlanmaktadır. Lineer galaktan ise PG'ların muramik asitlerinden bazılarının 6. karbonuna diglikozil fosforil köprüsü ile bağlanmaktadır (28).

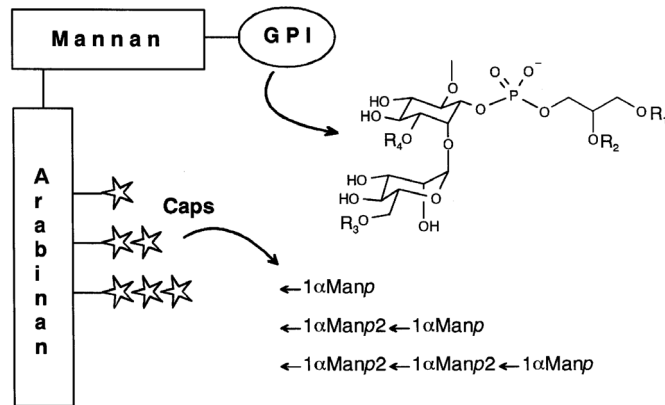
Mikolik asitler, yüksek molekül ağırlıklı α -alkil dallanma gösteren β -hidroksi yağ asitleri (C70–C90) olup, mikobakteri hücre duvarının en önemli bileşenlerindendir. Hücre kuru ağırlığının %40 ila 90'ını oluşturmaktadır.

Mikolik asitlerin yapısı 1960'larda kütle spektrometresi (MS), nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve infrared (IR) spektroskopisi yöntemleri kullanılarak geniş oranda çözülmüştür. Mikolik asitler, merkezi bir karbon zinciri üzerinde bir veya iki adet çift bağ veya siklopropan halkaları, β -hidroksil grubu, bunun yanı sıra başka oksijenli fonksiyonel gruplar ve metil dallanmaları içermektedir (33). Bilinen iki mikolik asit ailesi mevcuttur. Bunlar oksijenli mikolik asitler ve oksijenli bir fonksiyonel grup içermeyen mikolik asitlerdir. *M. tuberculosis* gibi yavaş üreyen patojenik mikobakterilerde mikolik asitler siklopropan halkalarının eklenmesi ile değişime uğrarken, *M. smegmatis* gibi hızlı üreyen saprofit türlerde bu gerçekleşmemektedir (28). Mikolik asitlerin büyük bir kısmı hücre duvarındaki arabinogalaktan yapısı ile esterleşmiş durumdadır, ancak kültür ortamına bağlı olarak ayrıca trehaloz dimikolat (TDM), trehaloz monomikolat (TMM), mikolat fosfolipitler ve diğer mikolik asit içeren lipidler olarak da bulunabilmektedir. TDM, mikobakteri hücre duvarının dış tabakasında yer almakta olup başta tüberküloz olmak üzere mikobakteriyel hastalıkların patojenezinde önemli roller üstlendiği bilinmektedir. TDM üzerine yapılan araştırmalar, molekülün damar içine uygulama sonucunda rat akciğerinde granuloma oluşumu, ratlarda yüksek toksisite, immün stimülasyon, ratlarda tümör ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı spesifik olmayan direnç oluşumu, konak-parazit etkileşimleri ve makrofajlarda fagozom-lizozom birleşmesinin engellenmesi gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir

(34). Bu tür uzun zincirli yağ asitlerinin bulunması, mikobakteri hücre duvarının yüksek hidrofobisitesi ve düşük geçirgenliğinden büyük oranda sorumludur (33).

2.4.2. Lipoarabinomannan (LAM) ve Lipomannan (LM)

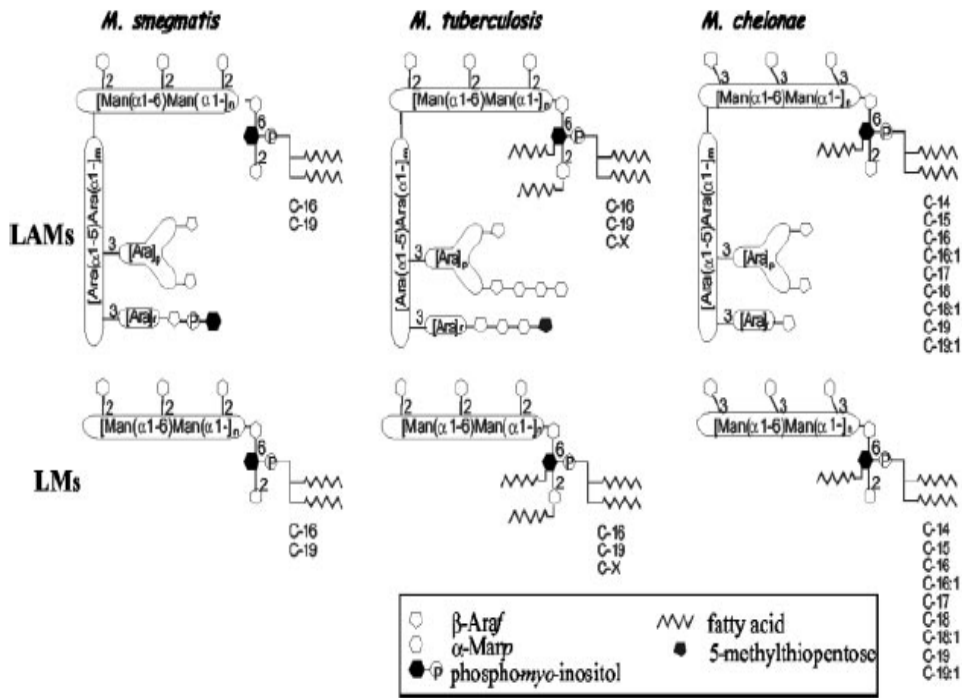
Lipoarabinomannan ve lipomannanlar, mikobakteriyel hücre duvarının majör bileşenlerinden olan kompleks lipoglikanlardır. Bu glikokonjugatlar, farklı hücrelerle olan etkileşimleri sayesinde insan bağışıklık sisteminde önemli role sahip virülens faktörleri olarak kabul edilmektedirler. Bu moleküller, antimikobakteriyel immün savunmayı güçlendirmek veya immün yanıtları inhibe ederek mikobakterinin konak hücrede hayatta kalmasına yardımcı olmak gibi geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahiptirler. Proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin üretiminin düzenlenmesi, makrofajların mikrobiyel aktivitelerinin inhibisyonu ve T lenfosit proliferasyonunun baskılanması bu aktiviteler arasındadır (35).



Şekil 2.2. LAM'ın genel yapısı (36)

Hem LAM hem de onun arabinoz içermeyen ve öncü molekülü olarak kabul edilen LM, mikobakteriyel glikolipitler olan ve 1940'lardan beri bilinen fosfatidil inositol mannosit içeren moleküllerdir (37). LAM, karbonhidrat omurgası, glikozil fosfatidilinositol bölgesi ve arabinana bağlı başlık motifi olmak üzere 3 kısımdan meydana gelmektedir (Şekil 2.2). İki homopolisakkarit olan D-mannan ve D-arabinan karbonhidrat omurgasını oluşturmaktadır. Mannanın redükte ucuna GPI (glikozil fosfatidil inositol) bağlıdır. Arabinan kısmı ise ya mannosil ya da

fosfoinositol içeren bir başlık motifi taşımaktadır (36). Arabinana bağlı motife göre LAM'lar 3 sınıfa ayrılmaktadır. ManLAM, mannosil taşımakta olup, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis BCG* ve *M. avium* için karakterizedir. PILAM, fosfoinositol taşımakta olup, *M. smegmatis* gibi patojen olmayan türlerden izole edilmiştir. Son grup olan CheLAM ise hem mannoz hem de fosfoinositolden yoksun olup *M. chelonae*'den izole edilmiştir (35) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Farklı mikobakteri türlerine ait LAM ve LM yapıları (35)

LAM yapısındaki farklılıklar, çeşitli fonksiyonel özelliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. ManLAM'lar, insan makrofajlarında TNF-α ve IL-12 salınımını inhibe etmekte olup, *M. tuberculosis*, *M. bovis BCG* ve *M. avium*'un makrofajlar içerisinde hayatta kalma ve çoğalma kapasitesi, onların ManLAM'larının anti-inflamatuar etkisi sayesinde. Buna karşın PILAM'lar, TNF-α ve IL-12 üretimini stimüle etmekte olup, *M. smegmatis*'in aktif makrofajlar içerisinde hayatta kalamama özelliği PILAM'lara karşı oluşturulan proinflamatuar yanıtların bir sonucudur (38, 39).

2.4.3. Fosfatidilinositol Mannosit (PIM)

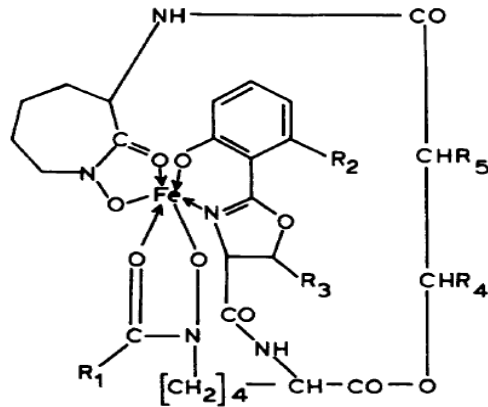
PI (fosfatidilinositol) ve PIM (fosfatidilinositol mannosit), hem mikobakteri hücre zarı hem de hücre çeperinin en önemli fosfolipitleridir. PI ve PIM'in mikobakteri hücre duvarı fosfolipitlerinin yaklaşık % 56'sını ve hücre zarı fosfolipitlerinin yaklaşık % 37'sini oluşturduğu öne sürülmektedir. Bu bileşikler, mikobakteri hücre çevresinde önemli ligand ve immünodeterminantlar olan LM ve LAM moleküllerinin yapısına katılmaktadır. PI ve PIM ortak olarak gliserolün 1. pozisyonunda ester bağı ile bağlı tüberkülostearik asit ve 2. pozisyonunda ester bağı ile bağlı palmitik asit içermektedir. PI, PIM, LM, ve LAM arsında şu şekilde bir ilişki olduğu düşünülmektedir: PI→ PIM→ LM→ LAM (40).

2.4.4. Sideroforlar

Organik moleküller biyolojik sistemlerde öncü moleküllerden sentezlenebildiği halde, hücrelerin gelişimi ve çoğalması için gerekli olan metallerin dışarıdan tedarik edilmesi gerekmektedir. Bu, demirin de içinde bulunduğu bütün iz elementleri için geçerlidir. Yüksek yapıli organizmalar demiri daha düşük yapıli organizmalardan sağlamaktadır. Ancak bakteri, mantar ve bitkilerde demirin biyolojik kullanımı, ferri demirinin düşük çözünürlüğü ile sınırlıdır. Bu yüzden mikroorganizmaların demir mineralini çözünür hale getirme ve tutma mekanizmalarına ihtiyaçları olmaktadır. Bu işi ise sideroforlar denilen peptit yapıli bir dizi molekül üstlenmektedir. Sideroforlar, düşük molekül ağırlıklı demir şelatörleri olup, inorganik ferri demiri ile kompleks oluşturarak taşınmasını sağlamaktadır (41).

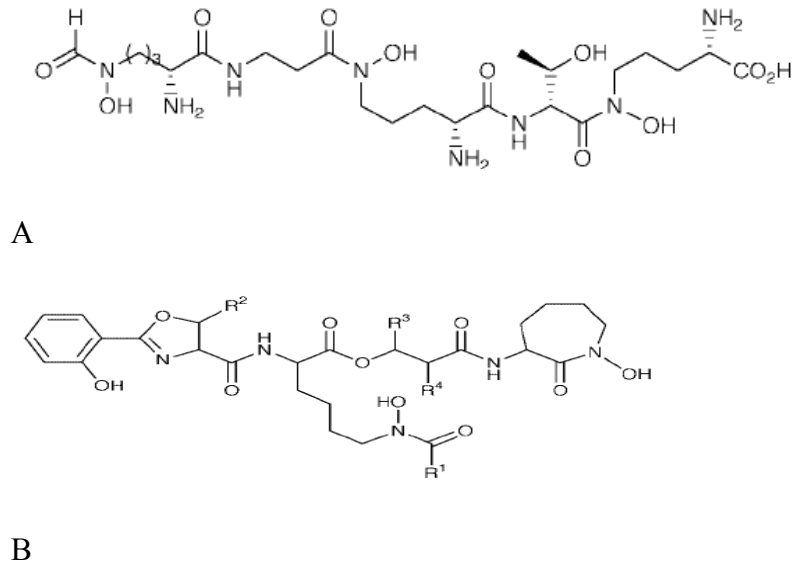
Mikobakterilerde mikobaktinler, ekzokelinler ve karboksimikobaktinler olmak üzere 3 tip siderofor sentezlenmekte ve kullanılmaktadır. Mikobaktinler, ilk keşfedilen mikobakteriyel sideroforlardır. İlk olarak *M. phlei*'den Mikobaktin P izole edilmiştir. Sonrasında farklı mikobaktinler de izole edilerek yapıları tanımlanmıştır (42). Farklı mikobakteri türleri farklı uzunlukta alkil yan zincirlere sahip olan homolog yapıda mikobaktinler üretmektedir. Bu nedenle farklı mikobaktinlerin

analizi ile farklı türlerin tanımlanması söz konusudur. Şekil 2.4’de bir mikobaktin molekülünün genel yapısı görülmektedir (43).



Şekil 2.4. Mikobaktin molekülünün genel yapısı (43)

1975’te ilk defa mikobaktinlerden farklı özellikler taşıyan ekzokelin MS *M. smegmatis*’ten izole edilmiştir. 1995’te ekzokelin MS ile birlikte *M. neoarum*’dan izole edilen ekzokelin MN’nin yapıları tanımlanmıştır. Aynı yıl patojenik olan *M. avium* ve *M. tuberculosis*’ten yapı olarak mikobaktinlere benzeyen sideroforlar izole edilerek karboksimikobaktinler diye isimlendirilmiştir (42). Şekil 2.5’de ekzokelin MS ve karboksimikobaktin molekülünün genel yapısı görülmektedir.

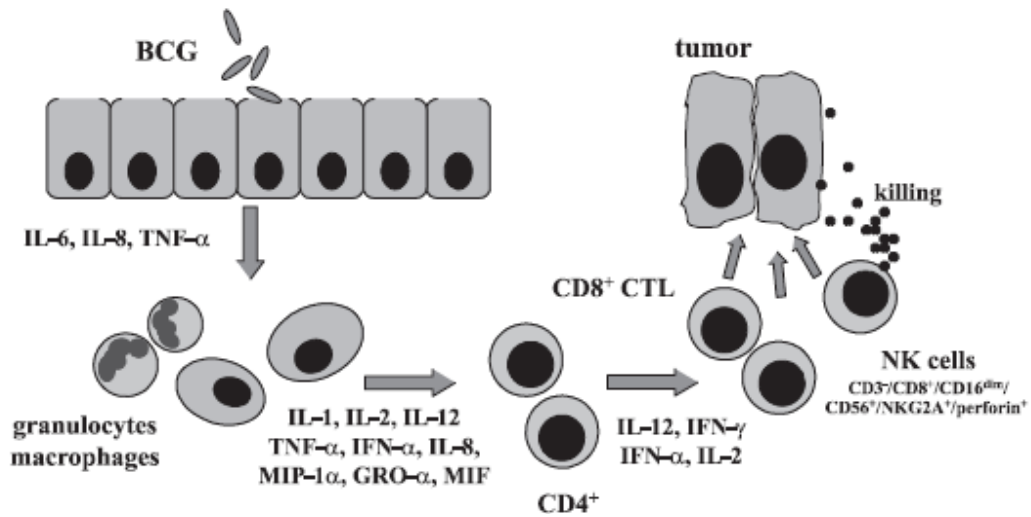


Şekil 2.5. Ekzokelin MS (A) ve karboksimikobaktin (B) moleküllerinin yapısı (42).

2.5. BCG'nin Etki Mekanizması

BCG, *Mycobacterium bovis*'in avirulent hale getirilmiş suşundan oluşan tüberküloz aşısıdır. Yüzeyel mesane kanserinin tedavisinde kullanımı TURMT sonrası BCG'nin belirli dozlarda mesane içine damlatılması şeklindedir.

Gerek laboratuvar şartlarında gerekse kemirici mesane kanseri modelleri ve hasta materyalleri ile yapılan çalışmalar, BCG'nin mesane lümenine verilmesi sonucu ortaya çıkan antitümör etkilerin mekanizmasını ortaya koymuştur. Bazı başlangıç verilerinde BCG'nin tümör hücreleri üzerine direkt antiproliferatif, sitotoksik veya proapoptotik etkileri olduğu görülmüştür. Her ne kadar in vitro şartlarda bu etki gösterilmiş olsa da, kemirici tümör modelleriyle yapılan çalışmalar, in vivo koşullarda konaktaki fonksiyonel bir immün sistemin BCG'nin antitümör etkisinde gerekli olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, BCG'nin sağladığı antitümör etkilerin çözünebilir ve hücreyel immün mediatörlerinin karşılıklı etkileşimlerini içeren bir dizi olay sonucu ortaya çıktığı ve doğal ve adaptif immün sistemlerinin karşılıklı etkileşimlerinin BCG'nin antitümör etkisinde rolü olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (44).



Şekil 2.6. BCG'nin etki mekanizması (44).

Mesane içine BCG damlatılmasından sonra mikobakteriler mesane epitel hücrelerine bağlanmaktadır. Bu bağlanma hücre dışı matriksin bir elemanı olan fibronektin tarafından sağlanmakta olup BCG endositoza uğramaktadır. BCG ve epitel arasındaki kontakt antitümör aktivitesinin ortaya çıkmasında önemlidir (45). BCG'nin epitel hücreleri ile etkileşimi immünolojik açıdan önemli olaylar meydana getirmektedir. IL-8 gibi kemokinlerin, granülosit-makrofaj stimüle edici faktör, TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve hücre içi adezyon molekül-1 gibi adezyon moleküllerinin indüklenmesi meydana gelen önemli olaylardandır (7). Sitokinler, makrofajlar ve nötrofiller gibi doğal immün sistem hücrelerini etkilemekte ve bu hücreler mesane çeperini geçerek karakteristik sitokin ve kemokinleri lokal ortama salgılamaktadır (44). BCG stimülasyonunda asıl mekanizma direkt veya dolaylı olarak CTL, NK, LAK ve BAK gibi efektör hücrelerin üretilmesidir. Efektör hücrelerin üretimi sitokinler tarafından stimüle edilmektedir. Sitokinler, özellikle IFN- γ , tümör hücresindeki MHC sınıf-II ve hücre içi adezyon molekülü-1'in eksprese edilmesini sağlamaktadır. Bu sayede tümörlü hücreler efektör hücreler tarafından tanınmakta ve imha edilebilmektedir (45).

Bunların dışında konak immün hücreleri ile BCG arasındaki direkt etkileşimin mekanizmasını anlamak da önemlidir. Bu konuda yapılan çalışmalar, BCG'nin hedef myeloid hücreye bağlanması ve aktivasyonun gerçekleşmesinin farklı reseptör-ligand ilişkileri ile sağlandığını göstermiştir. Örneğin, insan dendritik hücrelerinde C tipi lektin reseptör familyasının bir üyesi olan DC-İŞARETİ'nin BCG ve *M. tuberculosis*'in bağlandığı majör reseptör olduğu tanımlanmıştır. Buna karşın aktivasyon ve sitokin üretimi ancak TLR'ler ile indüklenmektedir (44) (Şekil 2.6).

2.6. Toll Benzeri Reseptörler (Toll-like Receptor, TLR)

Toll benzeri reseptörler, doğal immün sistem hücreleri tarafından eksprese edilen bir model tanıyıcı reseptörler (pattern recognition reseptor, PRR) sınıfıdır. Bu reseptörler, patojen tarafından eksprese edilen çok çeşitli molekülleri tanıma kabiliyetine sahiptir. TLR ailesine ait 11 üye tanımlanmış olup bunlar metillenmemiş CpG içeren DNA, flagellin, glikolipit, peptidoglikan, ısı şok proteinleri, taksol gibi çok sayıda yapıyı tanımaktadır (46).

Toll, ilk defa *Drosophila*'da keşfedilmiş bir tip-1 transmembran reseptörüdür. 1997'de Toll'ün insandaki homoloğu olan "toll benzeri reseptörler" keşfedilmiştir. Hem *Drosophila*'daki Toll hem de memeli TLR'si hücre dışı bir LRR ve sitoplazmik bir TIR bölgesine sahiptir. LRR, 20-29 aminoasitten oluşmuş lösine zengin bir protein birimi olup yalnızca TLR'ler değil CD14, glikoprotein 1b ve RP105 gibi başka proteinlerde de bulunmaktadır. Sitoplazmik TIR bölgesi memelilerdeki IL-1R ailesi proteinlerinin sitoplazmik bölgesiyle homologdur. IL-1R ailesinin hücre dışı bölgeleri ise TLR'lerinkinden oldukça farklıdır (47).

Stimülasyon üzerine TLR'ler dimerize olmakta ve TLR sinyali için gerekli bir sitoplazmik adaptör molekül olan myeloid farklılaşmasından sorumlu protein (myeloid differentiation primary response protein, MyD88) ile birleşerek NF κ B aktivasyonu ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini sağlayan sinyal yolağını harekete geçirmektedir. Bu yüzden TLR'ler doğal immün sistemi aktive etmekte ve patojene eşlik eden moleküler yapıları (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) tanıyarak kazanılmış immün yanıtın oluşmasını sağlamaktadır (46). PAMP'lar, konak immün sistemini aktive eden mikrobiyal bileşenlerdir. Mikroorganizmalar çok çeşitli olmasına rağmen ortak bazı yapısal özelliklere sahiptirler. Gram negatif bakterilerde lipopolisakkarit, gram pozitif bakterilerde peptidoglikan ve lipoteikoik asit ve mikobakterilerde lipoarabinomannan tipik PAMP yapılarıdır (44). Her TLR özel bir PAMP yapısını tanımaktadır. Tablo 2.3'de farklı TLR'ler ve bunların ligandları görülmektedir.

Tablo 2.3. Farklı TLR'ler ve ligandları (48)

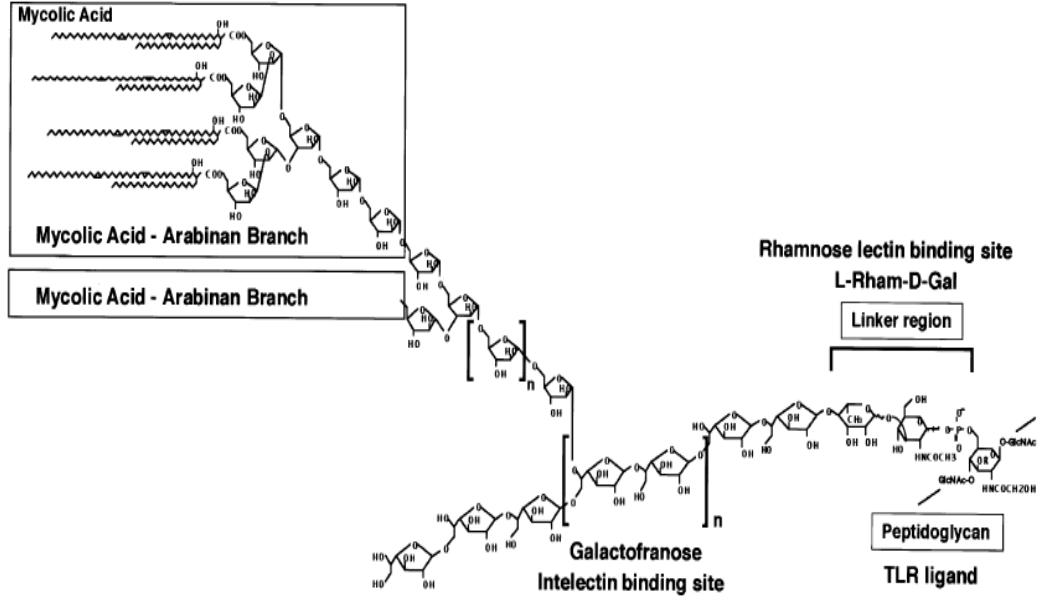
Reseptörler	Ligandlar
TLR2 (TLR6 veya TLRX)	Bakteri lipoproteinleri(farklı kaynaklardan) Peptidoglikan Zimosen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) GPI (<i>T. Cruzi</i>) LPS (<i>Leptospira interrogans</i>) LPS (<i>P. gingivalis</i>) Lipoarabinomannan (<i>M. tuberculosis</i>)
TLR4	Fosfatidilinositol dimannosid (<i>M. tuberculosis</i>) LPS Taksol HSP60
TLR5	Fibronektin EDA
TLR9	F protein Flagelin CpG DNA

(TLRX, diğer TLR'leri ifade etmektedir).

PAMP tanınması doğal immün sistemde geçerlidir. Ancak doğal immün sistemin aktivasyonu ise lenfosit yanıtı için gereklidir. İnsanda ve birçok omurgalıda iki immün sistem birlikte çalışmaktadır. Doğal immün sistemde ligandlar lipit ve şeker yapılı olan PAMP'lar iken adaptif immün sistemde antijenlerdir. Doğal immün sistemde reseptörler TLR'ler iken adaptif immün sistemde T hücre reseptörleri, antijen reseptörleri ve antikorlardır.

BCG de doğal immün sistem için önemli bir modülatör olup yapılan çalışmalarda BCG'nin dendritik hücre olgunlaşması ve monositlerin makrofajlara farklılaşmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Şekil 2.7'de BCG'nin hücre duvarı iskeleti ve olası reseptör bağlanma bölgeleri görülmektedir. Görüldüğü üzere BCG hücre duvarı temelde mikolik asitler, arabinogalaktan ve peptidoglikan yapıları

içermektedir. Yapılan çalışmalarda BCG'nin asıl reseptörlerinin TLR2 ve TLR4 olduğu ve peptidoglikan bölgesinin TLR sinyali ile sağlanan sitokin aktivasyonu ve dendritik hücre olgunlaşması için aktif merkez olduğu tespit edilmiştir (49).



Şekil 2.7. BCG hücre duvarı iskeletinin yapısı (49)

Önceleri her bir TLR'nin tek bir organizma sınıfını tanıyabildiği düşünülmekteydi. Örneğin, TLR4'ün LPS sayesinde gram negatif bakterileri, TLR2'nin PGN sayesinde gram pozitif bakterileri, diğer TLR'lerin de yine özgül PAMP'lar sayesinde başka mikroorganizmaları tanıyabildiği görüşü hakimdi. Ancak yapılan çalışmalar sonrasında bu görüş değişmiştir. Günümüzde immün hücrelerinin bir mikrobun farklı özelliklerinin tanınmasında birden fazla TLR'yi eşzamanlı olarak kullandığı anlaşılmıştır. Örneğin, TLR5 TLR4 ile dimer oluşturarak kamçılı bir gram negatif organizmayı, TLR2 ve TLR6 ile birleşerek de kamçılı bir gram pozitif organizmayı tanıyabilmektedir (48).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Hücreler

M. agri, *M. aichiense*, *M. aurum*, *M. brumae*, *M. chitae*, *M. chubuense*, *M. diernhoferi*, *M. gadium*, *M. murale*, *M. obuense*, *M. tokaiense* ve *M. vaccae* hücreleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A. D.'ndan temin edildi. İnsan mesane tümör hücresi dizisi T-24 (DSMZ, Almanya) ve insan monosit hücre dizisi THP-1, Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye'den sağlandı.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler

Potasyum monohidrojen fosfat (K_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), asetonitril (HPLC grade), Sigma-Aldrich, Almanya'dan; aseton (C_3H_6O), Riedel-de Haen A.G., Almanya'dan; trifloroasetik asit (CF_3CO_2H), etanol (C_2H_5OH), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), sülfürik asit (H_2SO_4), Merck, Almanya'dan; sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin-BSA), Thermo Scientific (BCA protein tayin kiti), A.B.D.'den; ortofosforik asit (H_3PO_4), BDH Chemicals, İngiltere'den; (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sodyum klorür (NaCl), Sigma Chemical Company, A.B.D.'den; 0,45 μm PTFE şırınga filtre, filtre kağıtları, Whatman, İngiltere'den; pH kağıtları, Macherey-Nagel, Almanya'dan; Coomassie Brilliant Blue G-250, Serva, Almanya'dan; insan monositer seri hücreleri (U 937), TNF ve IL-12 ölçüm kitleri, Immunoguide, Matriks Biyoteknoloji, Türkiye'den ve Invitrogen Biosource, ABD'den; ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) plakları ve hücre kültür plakları NUNC A/S, Danimarka'dan; Middlebrook 7H9 besiyeri Difco, A.B.D.'den sağlanmıştır.

3.1.3. Aletler

Bakterilerin üretilmesinde Nüve etüv; sterilizasyonda otoklavı; tartımda Mettler Toledo analitik terazisi; pH ölçümlerinde Consort pH metresi; manyetik karıştırıcı olarak IKAMAG; Nanopure infinity distile su cihazı; sonikasyon işleminde Sonics marka Vibracell VCX-750 model sonikatör; Telstar Bio II-A güvenlik kabini; santrifügasyonda Sorvall RC-5B Superspeed santrifüjü ve Eppendorf Centrifuge S4177R mikrofüjü; protein tayininde Shimadzu UV-1601 UV-Visible spektrofotometresi; hücre sayımında Leica marka mikroskop; ELISA ölçümlerinde Spektramax M2 Molecular Devices spektrofotometresi; MALDI-TOF/MS analizleri için Voyager-DE Pro kütle spektrometresi; HPLC cihazı: Schimadzu LC-6AD pompalar, SPD-M20A dedektör (Photo diod array detector, PDA), CTO-20AC kolon fırını, FRC10A fraksiyon kollektörü, kolonlar: Teknokroma Europa Peptide 120 C18 5 µm 25x0.7; Teknokroma Tracer Extrasil SCX 5 µm 25x 0.7; Heto Powerdry PL3000 liyofilizatör; BUCHI V850 Vakum kontrol edici, BUCHI R210 rotavapor, BUCHI V700 vakum pompası, Thermo Scientific EZ COOL 80 soğutucu.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Mikobakteri Hücrelerinin Üretilmesi

Mikobakterilerin üretilmesinde gliserollü (% 0,2) Middlebrook 7H9 (4.7 g/1000 ml) sıvı besiyeri kullanıldı. Bu besiyerinde mikobakteriler 37°C’de, 28 - 40 günde üretildi. Üreme periyodu sonunda besiyerlerinden örnekler alınarak aside dirençli boyama (Acide Resistance Bacteria-ARB) ve Gram boyama ile üreme kontrolü yapıldı. Hücreler, sıvı besiyerinden filtrasyon ile toplandı. İki kez 50 mM potasyum fosfat pH 7,2 tamponu ile yıkandı ve elde edilen hücre stokları -20°C’de saklandı.

3.2.2. Uygun Mikobakterilerin Belirlenmesi ve Örneklerin Hazırlanması

SBAG-SANTEZ-5-105S361 nolu projenin bir önceki aşamasında Middlebrook 7H9 besiyerinde üretilen 95 adet mikobakteri suşu sonike edilerek supernatanları alınmış ve monosit hücre dizisi olan THP-1 ile muamele edilerek TNF- α ve IL-12 yanıtları ölçülmüştür (50). Bu çalışma sonucu *M. phlei*'ye ek olarak 12 adet mikobakteri suşu yüzeysel mesane tümörü tedavisi için aday olarak seçilmiştir. Bu mikobakteriler Tablo 3.1'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Belirlenen 12 mikobakteri suşu

Mikobakteri Suşu	İnkübasyon süresi (Gün)	ATCC#	DSMZ/NTCC#
<i>M. agri</i>	7	ATCC 27406	DSM 44515
<i>M. aichiense</i>	11	ATCC 27280	NT 4801
<i>M. aurum</i>	11	ATCC 23366	NT 4101
<i>M. brumae</i>	7	ATCC 51384	DSM 44177
<i>M. chitae</i>	11		NT 4301
<i>M. chubuense</i>	11	ATCC 27278	NT 4701
<i>M. diernhoferi</i>	22	ATCC 19340	NT 2301
<i>M. gadium</i>	11	ATCC 27726	NT 5001
<i>M. murale</i>	7		DSM 44340
<i>M. obuense</i>	7	ATCC 27023	DSM 44075
<i>M. tokaiense</i>	11		NT 4901
<i>M. vaccae</i>	7	ATCC 29678	

Bu suşlar içerisinde en uygun suşun seçilmesi ve uygun olmayanların elenmesi amacıyla her birinin T-24 mesane kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodyum bromür (MTT) testi ile belirlendi. Bunun için öncelikle her suşa ait hücre örneğinden 1,5 ml alınıp her birine 3'er ml 20 mM potasyum fosfat pH 7,4 tamponu eklenerek 30°C'ye ayarlanmış sonikatörde, 20 sn çalıştırılıp 40 sn bekletilmek suretiyle 15'er dakika sonike edildi. Sonike edilen örnekler Eppendorf Centrifuge S4177R cihazında 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatanlar alındı. MTT sonucunda supernatanlara ait IC₅₀ değerleri hesaplandı. Mikobakteri suşlarının IC₅₀ değerleri TNF- α ve IL-12 sonuçları ile birlikte değerlendirilerek uygun olabilecek mikobakteri suşları belirlendi. Bu mikobakteriler arasından seçilen *M. brumae* ile ilgili deneyler zamanla HPLC yöntemi üzerinde deneyim kazanılması nedeniyle bazı yöntem farklılıkları olmakla birlikte tekrar edildi. Bunlar 1. Aşama ve 2. Aşama olmak üzere hem Yöntemler hem de Bulgular kısmında belirtildi.

3.2.2.1. *M.brumae* Hücre Duvarı Ekstrelerinin Hazırlanması (1. Aşama)

M. brumae hücre örneği 1'e 2 oranında (1 ml örnek+2 ml tampon şeklinde) 20 mM potasyum fosfat pH 7,4 tamponu ile karıştırılarak 30°C'ye ayarlanmış sonikatörde 20 sn çalıştırılıp 40 sn bekletilerek 15 dakika sonike edildi. Sonikasyonda tapered mikrotip (3 mm çapında) prob kullanıldı. Sonikasyon sonrası örnek, SS-34 rotorda 27000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatan alınarak **B1** örneği elde edildi. B1 örneğinin bir kısmı 0,2 μ m'lik PTFE filtreden geçirilerek **B2** örneği elde edildi. Diğer kısmın pH'sı 6 N HCl ile 2'ye indirildi. Örneğe 1'e 1 oranında aseton eklendi ve bir gün +4°C'de bekletildi. Asetonlu örnek SS-34 rotorda 12000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Supernatan alındı ve rotavaporda asetonu uçurulup konsantre edilerek **B3** örneği elde edildi.

3.2.2.2. *M.brumae* Hücre Duvarı Ekstrelerinin HPLC ile Ayırıştırılması (1. Aşama)

B2 ve B3 örnekleri çeşitli akış hızlarında ters faz kromatografi (C18) kolonundan geçirilerek preparatif ayrımı yapıldı. Mobil faz olarak % 0,1 oranında TFA içeren su ve % 0,1 oranında TFA içeren asetonitril kullanıldı. Elde edilen örnekler 48 saat liyofilize edilerek toz haline getirildi ve su ile çözüldü. B3 örneğinin C18 analizinde elde edilen ikinci zirve kuvvetli katyon değiştirici (strong cation exchanger, SCX) kolondan geçirildi. Mobil faz olarak 20 mM potasyum fosfat pH 7,4 tamponu ve % 25 (v/v) metanol içeren 5 mM fosfat pH 3 tamponu kullanıldı. Analizler PDA dedektörü ile izlendi.

3.2.2.3. *M.brumae* Hücre Duvarı Ekstrelerinin Hazırlanması (2. Aşama)

M. brumae hücre örneğine 1'e 1 oranında potasyum fosfat pH 7,4 tamponu eklenerek madde 3.2.2.1'deki şartlarda sonike ve santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası supernatan alındı. Çökeltinin üzerine eşit hacimde su eklenerek 20 dakika kaynatıldı ve aynı şartlarda santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Her santrifüj sonunda elde edilen supernatanlar birleştirilerek **HB1** örneği elde edildi.

HB1 rotavaporda konsantre edilerek **HB2** örneği elde edildi. HB2 0,45 µm'lik PTFE filtreden geçirilerek **HB3** örneği elde edildi.

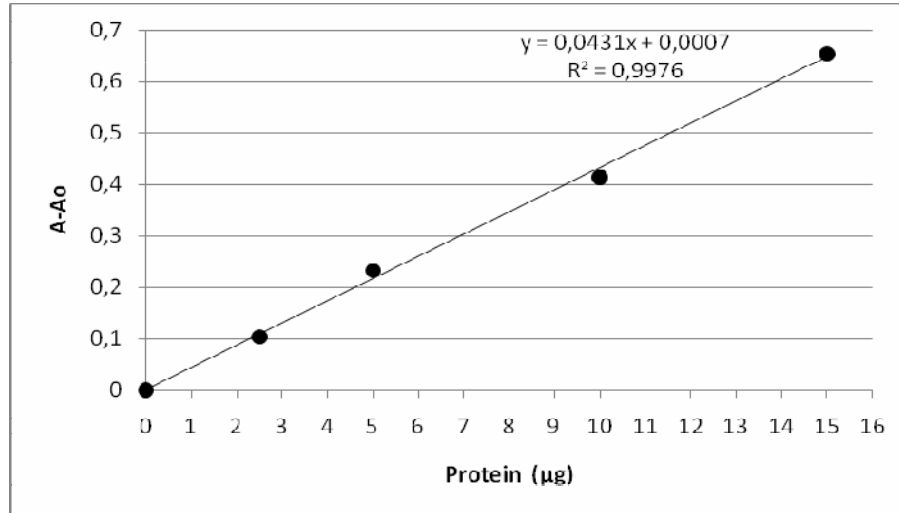
3.2.2.4. *M. brumae* Hücre Duvarı Ekstrelerinin HPLC İle Ayırıştırılması (2. Aşama)

HB3, çeşitli akış hızlarında ters faz kromatografi (C18) kolonundan geçirilerek preparatif ayrımı yapıldı. Mobil faz olarak % 0,1 oranında TFA içeren su, % 0,1 oranında TFA içeren asetonitril ve %30'luk asetonitril çözeltisi kullanıldı. C18 çıktılarının her biri çeşitli akış hızlarında kuvvetli katyon değiştirici (strong cation exchanger, SCX) kolondan geçirildi. Mobil faz olarak % 25 (v/v) asetonitril içeren 5 mM fosfat pH 3 tamponu (mobil faz A) ve % 25 asetonitril ve 500 mM sodyum

klorür içeren 5 mM fosfat pH 3 tamponu (mobil faz B) kullanıldı. Elüsyon tuz gradienti ile yapıldı (51). HB3 örneğinin C18 analizinde elde edilen 3. zirveye ait SCX çıktıları tekrardan C18 kolondan geçirildi. Her analiz sonunda toplanan örnekler 48 saat liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu. Tüm analizler PDA dedektörü ile izlendi.

3.2.3. Örneklerde Protein Derişiminin Tayini

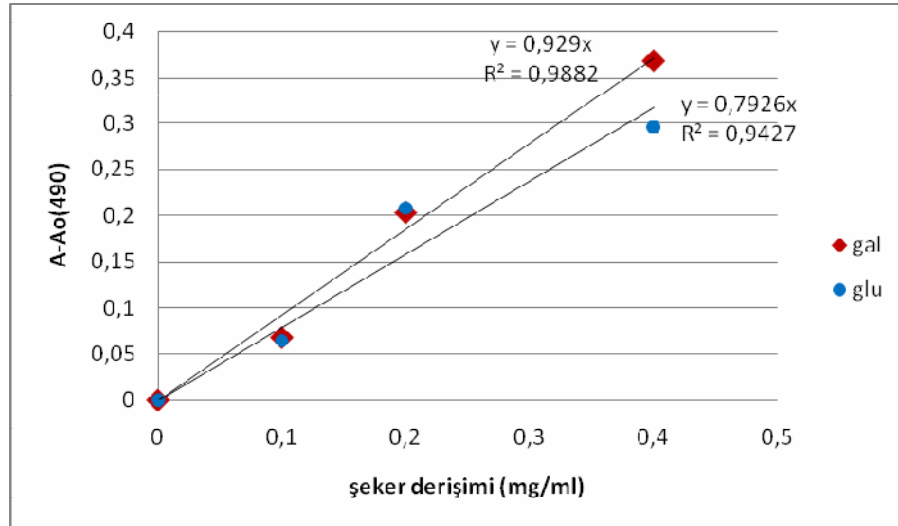
Örneklerde protein miktarının tayini için Bradford Yöntemi kullanıldı (52). Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250'nin seyreltik asit çözeltisinde turuncu olan renginin proteine bağlanması ile mavi renge dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Örneklerin 595 nm'deki absorpsanları ölçülerek bulunan değerlerin her seferinde seçilen protein standardı değerine oranlanması sonucu örneklerdeki protein miktarları hesaplandı. Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Örneklerin protein derişiminin tayininde kullanılan standart eğri Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1. Bradford yöntemi (mikro metod) protein standart eğrisi ($\lambda = 595$ nm)

3.2.4. Örneklerde Şeker Derişiminin Tayini

Şeker analizi için mikropalakaya uyarlanmış fenol sülfürik asit metodu kullanıldı (53). 0.4, 0.2 ve 0.1 mg/ml’lik şeker standartları (glukoz ve galaktoz) hazırlandı. 96 kuyucuklu mikropalkanın her bir kuyucuğuna 50 µl örnek konulduktan sonra hızlıca 150 µl konsantre sülfürik asit ve 30 µl % 5’lik (g/L) fenol solüsyonu (sulu) eklendi. 90°C’lik elektrikli ısıtıcıda 5 dakika bekletildikten sonra 5-10 dakika bekletilerek oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 490 nm’deki absorbansları ölçüldü. Örneklerin şeker derişiminin tayininde kullanılan standart eğri Şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2. Fenol sülfürik asit metodu ile şeker derişimi standart eğrisi ($\lambda=490$ nm)

3.2.5. Ökaryotik Hücre Kültürü Çalışmaları

İnsan monosit hücre dizisi THP-1 ve mesane tümör hücresi dizisi T-24 ısıyla inaktif hale getirilmiş %10 fötal sığır serumu, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde ve %5 CO₂’li inkübatörde 37°C’de üretildi. Hücreler her 3-4 günde bir pasajı yapılarak çoğaltıldı. Hücre sayısı thoma lami ve tripan blue boyası kullanılarak mikroskopik inceleme ile tespit edildi.

3.2.6. Örneklerde Sitokin Yanıtının Ölçülmesi

Ölçümler için Biosource firmasına ait invitrogen ELISA kitlerinin protokolü uygulandı. Pozitif kontrol olarak 1 µg/ml LPS kullanıldı.

Standart ve örnek kuyucuklarına 50 µl, kör kuyucuğuna 100 µl standart seyrelme tamponu pipetlendi. 100'er µl standart ve örnek çözeltileri uygun kuyucuklara eklendi. Plaklar oda sıcaklığında 2 saat bekletildi ve kuyucuklardaki süpernatant atıldıktan sonra 4 kez yıkandı. Kromojen körü dışında bütün kuyulara 100 µl biotinillenmiş anti TNF-alfa eklendi. 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra süpernatant atılıp, kuyular 4 kez yıkandı. Kromojen körü dışındaki bütün kuyucuklara Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra süpernatantlar uzaklaştırılarak kuyucuklar 4 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa stabilize kromojen (TMB, tetrametilbenzidin) eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi. Kuyucuklara durdurma çözeltisi eklendi. 450 nm'deki absorbanslar ELISA okuyucusunda ölçüldü.

İstatistikler Minitab13 paket programının (Minitab Inc, ABD) "Basic Statistics" modülü ile yapıldı.

3.2.7. Örneklerde MTT Testleri (54)

(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodyum bromür (MTT) açık sarı renkli bir bileşiktir. Canlı hücreler tarafından parçalandığı zaman koyu mavi bir formazan ürünü açığa çıkar.

T-24 hücreleri 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolakalara ekilip 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 24 saat inkübe edildi. Mikobakteri örnekleri belirlenen konsantrasyonlarda kuyucuklara uygulandı. 72 saat sonunda her kuyucuğa son konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde MTT eklendi. 4 saatlik inkübasyonun sonunda kuyucuklara %10 SDS eklenerek 16 saat daha bekletildi. Sonuçlar 570 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucuda değerlendirildi.

3.2.8. Örneklerin MALDI-TOF/MS Analizleri (55, 56)

Kütle spektrometrik analizler, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde yapıldı. 3,5-dimetoksi-4-hidroksisinamik asit ve α -siyano-4-hidroksisinamik asit matrisler, içinde % 0.1 oranında TFA bulunan, 50:50 (v:v) oranında asetonitril ve distile su içeren çözücüde, mililitrede 10 mg matris bulunacak şekilde hazırlandı.

4. BULGULAR

4.1. Mikobakteri Hücre Duvarı Örneklerinin Mesane Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri ve Sitokin Aktivasyonları

Ön deney olarak, Tablo 3.1'deki 12 mikobakteri suşundan sekizine MTT testi uygulandı. Bulgular Tablo 4.1'dedir. Bu tabloya göre sitotoksik aktivite tespit edilemeyen *M. aichiense* ve *M. vaccae* ile sitotoksik etkilerinin çok zayıf olduğu gözlenen *M. aurum*, *M. gadium*, *M. obuense*, *M. tokaiense* elendikten sonra geri kalan *M. phlei* ile birlikte 7 suşun IC₅₀ değerleri MTT ile tespit edildi. Bu suşlara ait IC₅₀ değerleri ve sitokin aktivasyon düzeyleri Tablo 4.2'de görülmektedir.

Tablo 4.1. Mikobakteri suşlarına ait ön deneyde tespit edilen IC₅₀ değerleri

Mikobakteri suşu	IC ₅₀ (µg/0,1 ml)
<i>M. gadium</i>	5,83
<i>M. phlei</i>	5,83
<i>M. obuense</i>	3,41
<i>M. vaccae</i>	Tespit edilemedi
<i>M. diernhoferi</i>	0,98
<i>M. aurum</i>	6,54
<i>M. aichiense</i>	Tespit edilemedi
<i>M. tokaiense</i>	6,04

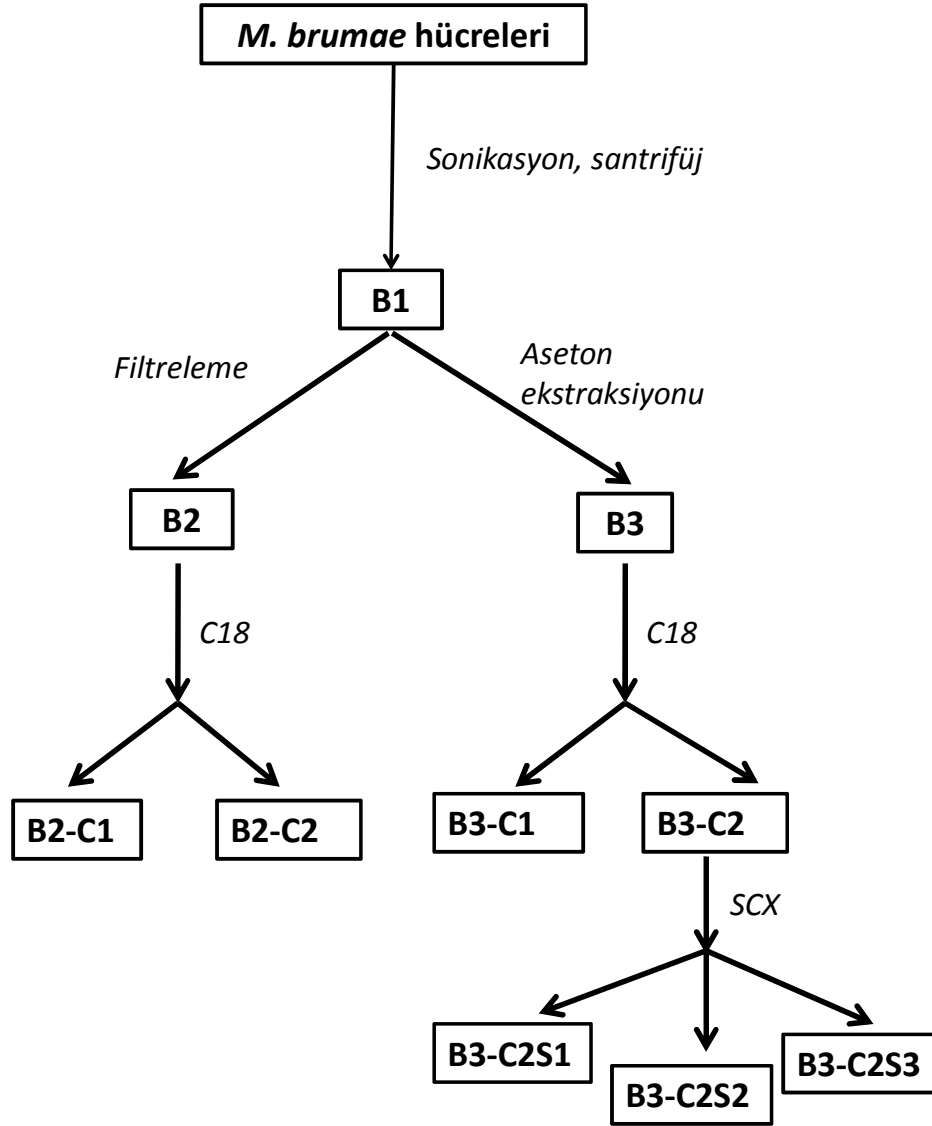
Tablo 4.2. Seçilen 6 suşun MTT, IL-12 ve TNF- α sonuçları (N=3)

	MTT (IC ₅₀ , μ g/ml)		IL-12 (pg/ μ g protein)		TNF α (pg/ μ g protein)	
Suş	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD
<i>M.murale</i>	14.11	13.24	28.37	7.81	7259	264
<i>M.brumae</i>	11.72	12.45	7.27	6.27	11068	1757
<i>M.diernhoferi</i>	19.69	17.01	19.38	7.15	4199	1211
<i>M.chubuense</i>	24.58	7.8	7.53	3.11	7982	786
<i>M.phlei</i>	24.06	23.31	7.58	0.97	9908	699
<i>M.chitae</i>	27.39	11.48	15.63	10.58	10927	812
<i>M.agri</i>	315	70	30.72	3.50	7839	431

M. agri dışındaki mikobakteriler için IC₅₀ değerleri arasında anlamlı bir fark görülmedi. Bu gruptaki 5 suşun mesane tümör hücresi üzerindeki antitümoral etkisinin *M. phlei*'nin etkisinden istatistiksel olarak farksız olduğu görüldü. Bu mikobakterilerin, *M. phlei* yerine mesane tümörü tedavisinde yararlı olabileceği düşünüldü. Standart sapmalar yüksek olduğu için, HPLC çalışmalarında kullanılacak mikobakteri seçiminde sitokin aktivasyonu sonuçları ve MTT sonuçları birlikte değerlendirildi. Sonuçta, IC₅₀ değerinin düşük ve sitokin aktivasyon değerlerinin (özellikle TNF- α değerinin) yüksek olması nedeniyle ***M. brumae*** ile çalışılmasına ve *M. brumae*'nin HPLC ile ileri düzeyde ayrıştırılarak antitümör etkiden sorumlu bileşenin tespitine karar verildi.

4.2. *M. brumae*'den Elde Edilen Hücre Duvarı Örnekleri (1. Aşama)

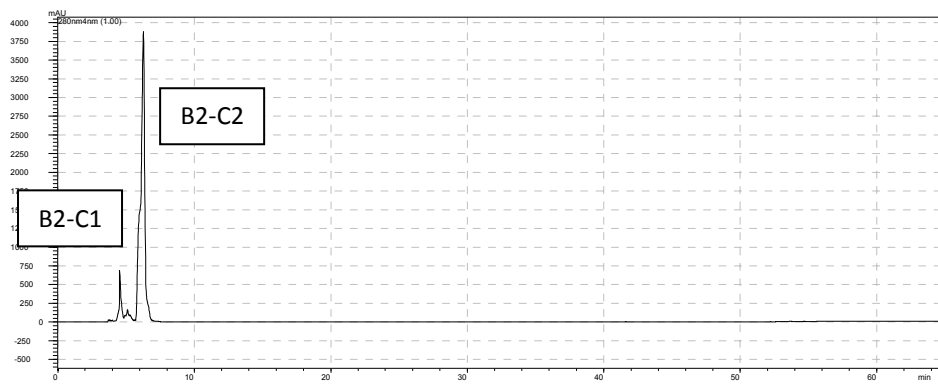
M. brumae hücre duvarına ait çeşitli aşamalarda elde edilen örnekler Şekil 4.1'de görülmektedir.



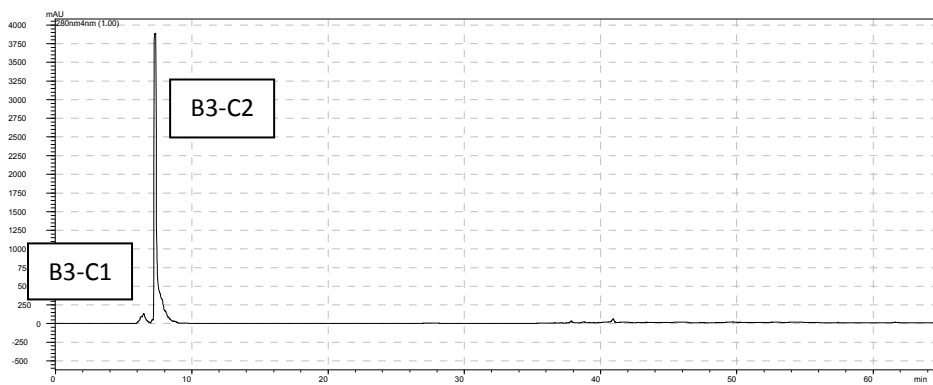
Şekil 4.1. *M. brumae* hücre duvarına ait çeşitli yöntemlerle elde edilen örnekler (1. Aşama)

4.3. *M. brumae* Hücre Duvarı Örneklerinin HPLC Analiz Sonuçları (1. Aşama)

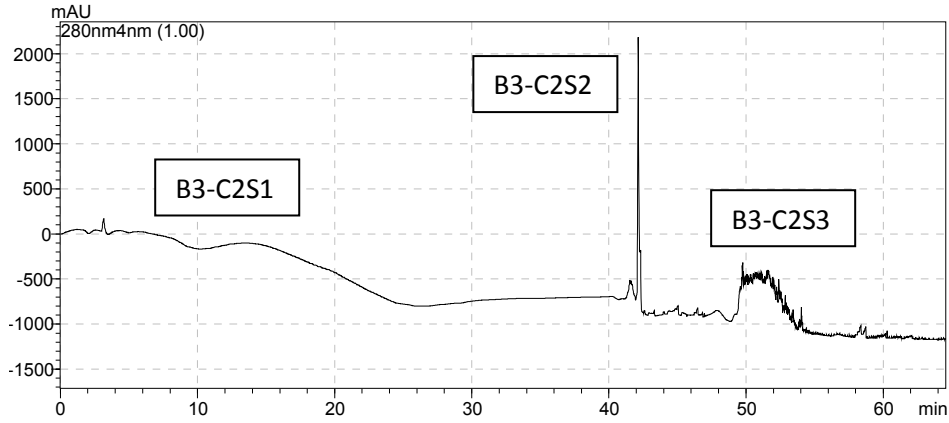
Sulu fazda hazırlanmış B2 ve bu örnekten aseton ekstraksiyonu ile hazırlanmış B3 örneklerinin C18 analizinde B2-C1, B2-C2, B3-C1 ve B3-C2 olmak üzere ikişer pik toplandı. B3-C2 pikinin SCX analizi sonucu ise B3-C2S1, B3-C2S2 ve B3-C2S3 olmak üzere 3 pik toplandı. Analiz sonuçları ve elüsyonun hangi şartlarda sağlandığı Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.2. B2 örneğine ait 280 nm'de gözlenen C18 analiz sonucu (*örnek hacmi: 1 ml, akış hızı: 2 ml/dak, gradient: 60 dakikada 0'dan % 60'a % 0.1 TFA içeren asetonitril*).

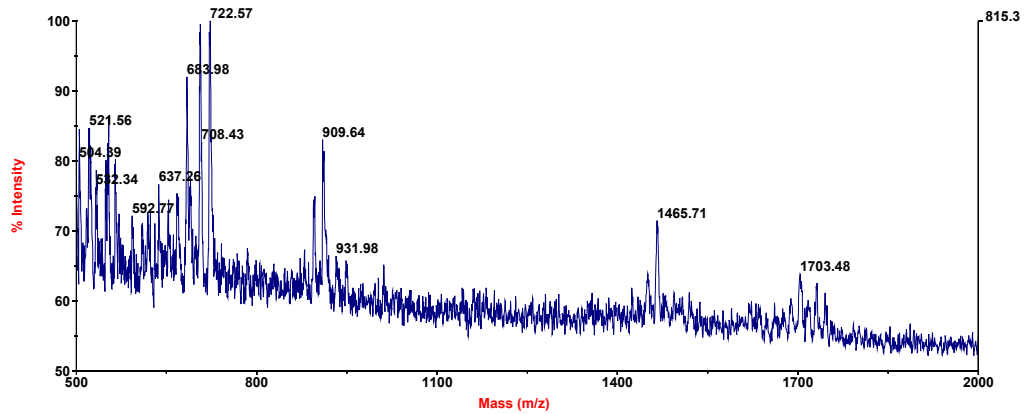


Şekil 4.3. B3 örneğine ait 280 nm'de gözlenen C18 analiz sonucu (*örnek hacmi: 1 ml, akış hızı: 2 ml/dak, gradient: 60 dakikada 0'dan % 60'a % 0.1 TFA içeren asetonitril*).

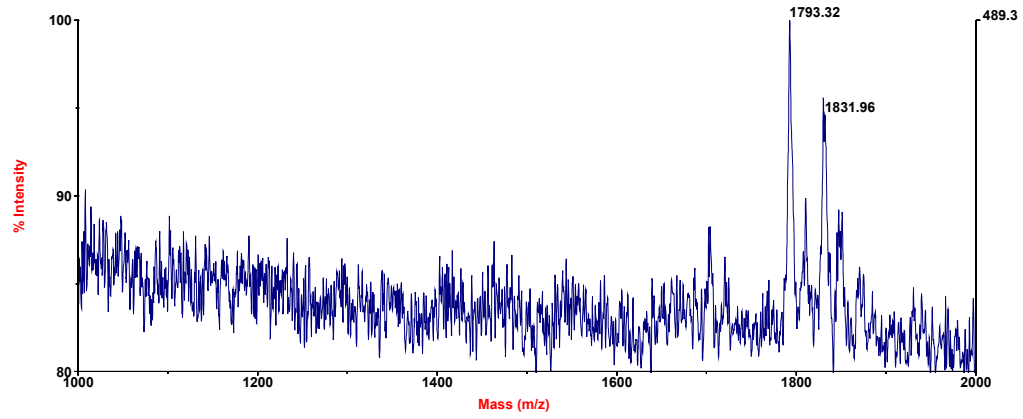
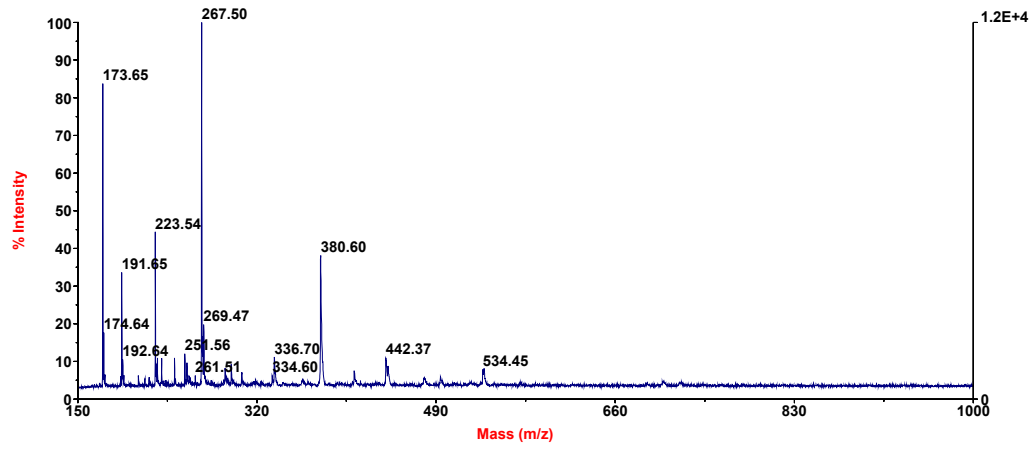


Şekil 4.4. B3-C2 örneğine ait SCX analiz sonucu (*Örnek hacmi: 1 ml, total akış hızı: 2 ml/dak, gradient: 60 dakikada 0'dan % 100'e mobil faz 2. Mobil fazlar : 20 mM KP pH 7.4 (1) ve % 25 (v/v) metanol içeren 5 mM fosfat pH 3 tamponu (2)*)

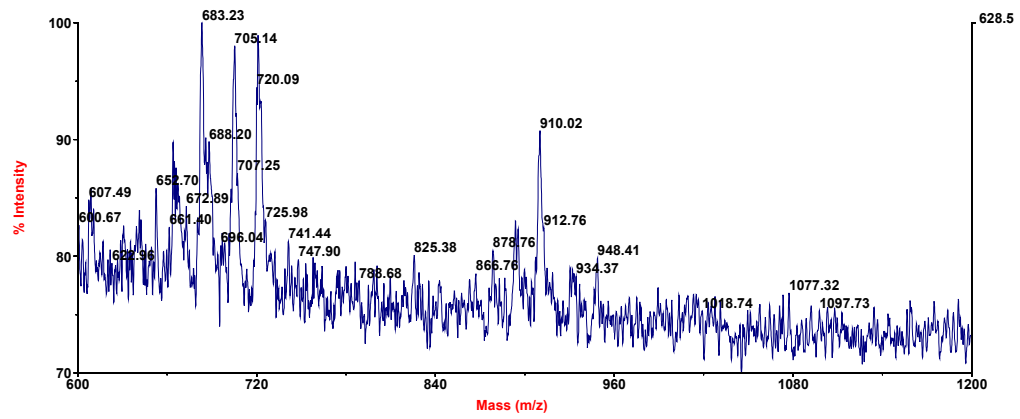
4.4. *M. brumae* Hücre Duvarı Örneklerinin MALDI-TOF/MS Analiz Sonuçları (1. Aşama)



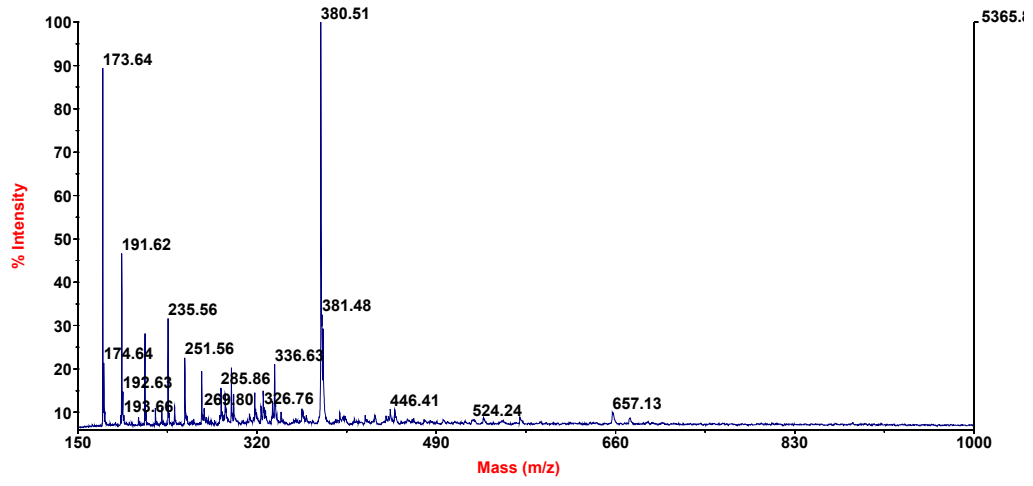
Şekil 4.5. B2 örneğinin kütle spektrumu.



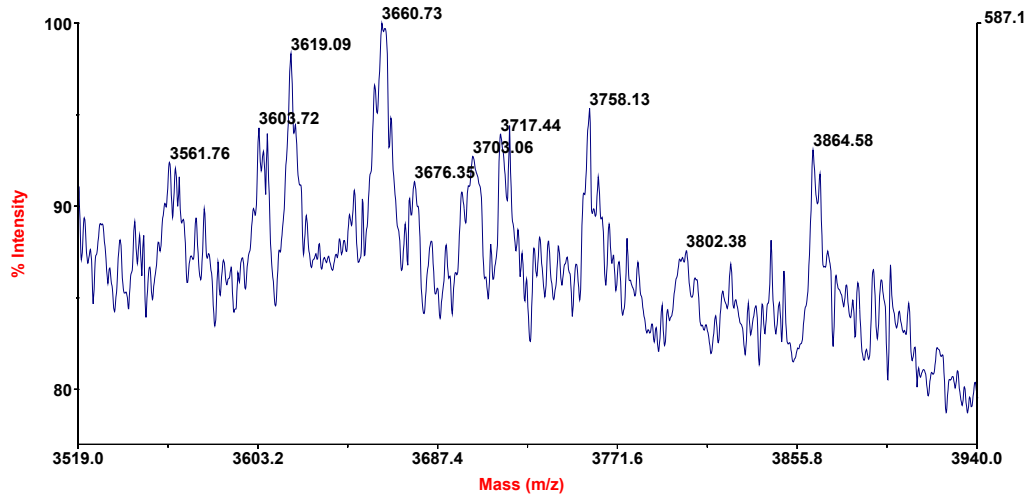
Şekil 4.6. B2-C1 örneğinin kütle spektrumu.



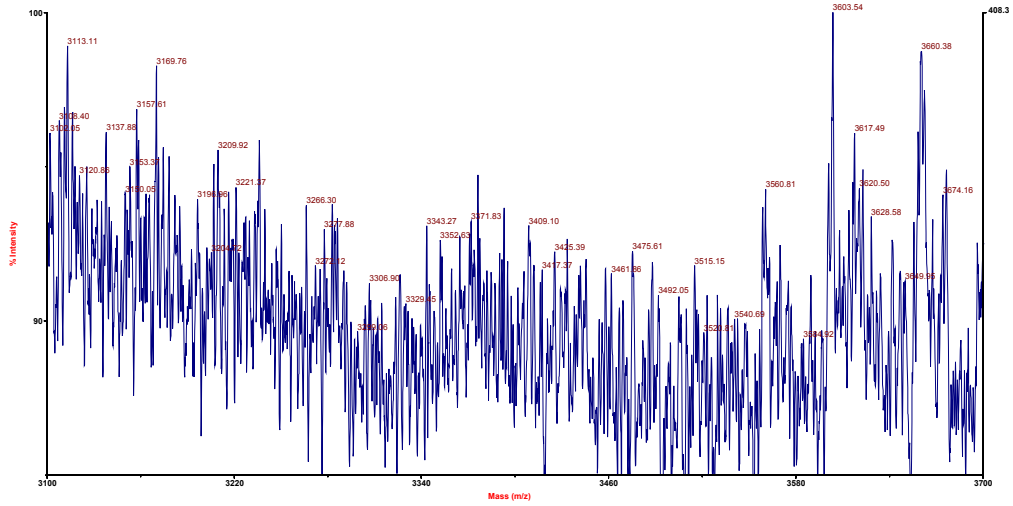
Şekil 4.7. B2-C2 örneğinin kütle spektrumu.



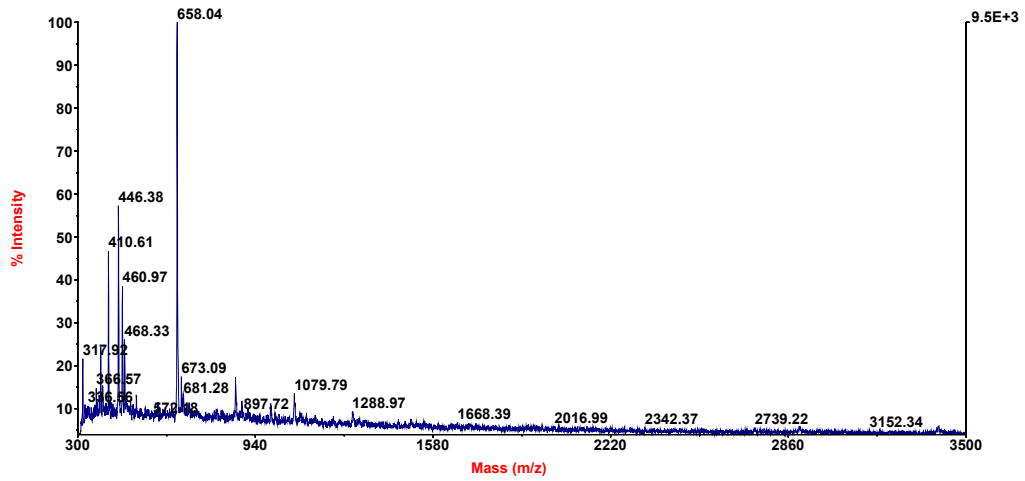
Şekil 4.8. B3 örneğinin kütle spektrumu.



Şekil 4.9. B3-C1 örneğinin kütle spektrumu.



Şekil 4.10. B3-C2 örneğinin kütle spektrumu.



Şekil 4.11. B3-C2S3 örneğinin kütle spektrumu.

4.5. *M. brumae* Hücre Duvarı Örneklerinin Sitokin Aktivasyon Sonuçları (1. Aşama)

Tablo 4.3. 1. Aşama *M. brumae* hücre duvarı örneklerine ait TNF- α aktivasyonu sonuçları ve MALDI/MS pikleri (* 0.1 mg/ml, ** 0.5 mg/ml, diğerleri 1 mg/ml protein içerir, N=3).

Örnek No	TNF- α (pg/ml)	MALDI-MS pikleri (Da)
B1 (filtrelenmiş supernatan)	348.3 $\pm$ 19.0	465, 721, 1704, 3600
B2-C1 (B1 C18 pik 1)	151.4 + 23.2*	667, 1003, 1793
B2-C2 (B1 C18 pik 2)	186.5 $\pm$ 39.2	667, 910, 1083
B3 (aseton ekstraktı)	173.9 $\pm$ 7.9	380, 657-673
B3-C1 (B3 C18 pik 1)	212.3 $\pm$ 0	3604, 3660, 3865
B3-C2 (B3 C18 pik 2)	143.1 $\pm$ 11.9	3100- 3600
B3-C2S3 (B3-C2 SCX pik 3)	223.8 $\pm$ 0**	2738, 2900, 3400

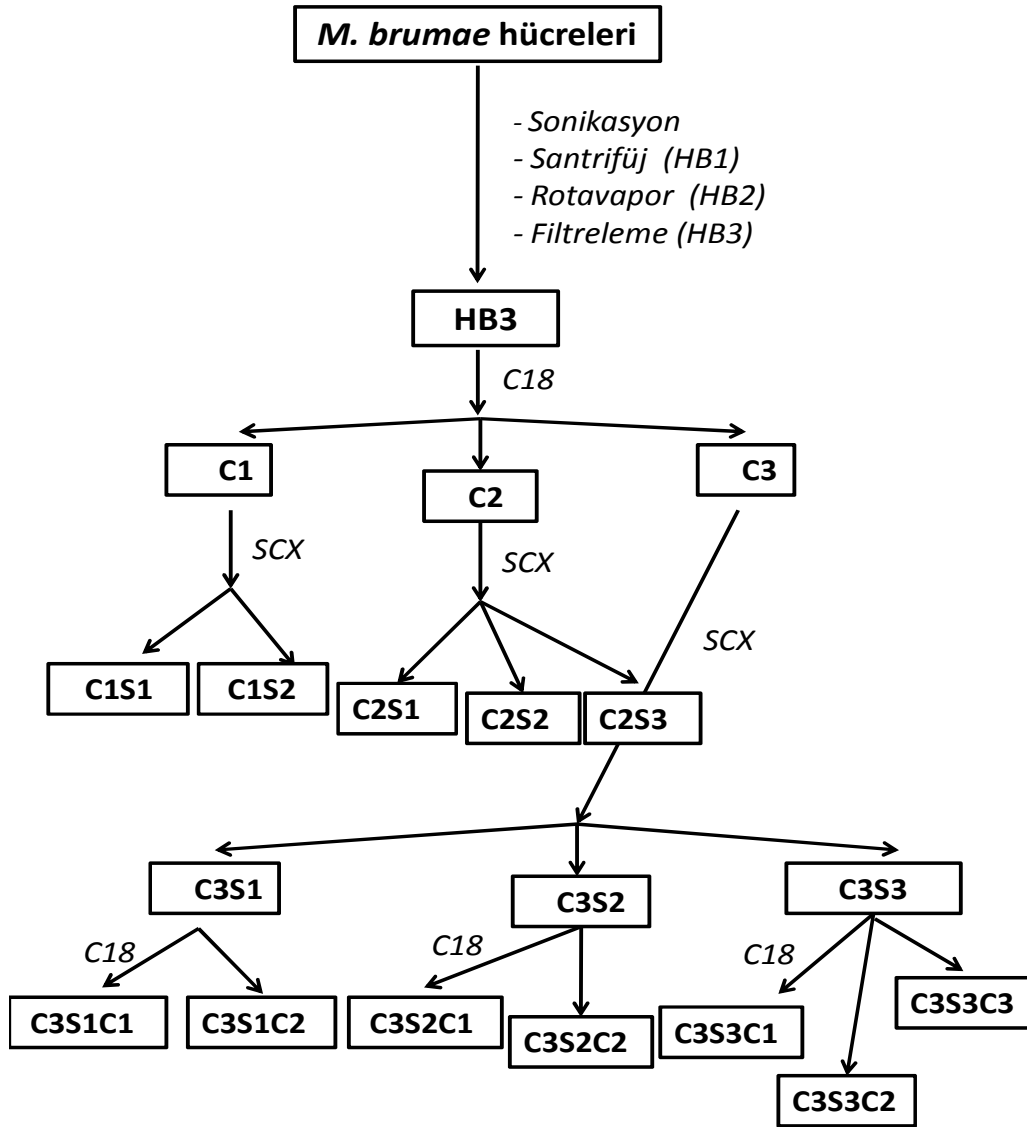
B2 ve B3 elüsyon profillerinin benzediği ancak B3-C1 intensitesinin B2-C1 intensitesinden çok daha düşük olduğu görülmektedir. Tablo incelendiğinde B2-C1 örneğinin TNF alfa aktivitesinin diğer fraksiyonlara göre oldukça yüksek olduğu ve B3-C1 örneğinde aktivitenin azaldığı, **1793** Da molekül ağırlığındaki pikin de kaybolduğu görülmektedir. Bu 1793 Da molekül ağırlığına sahip yapının aktiviteden sorumlu yapılardan biri olduğu düşünülmüştür. Bu yapı sulu ortamda çözünen ve organik faza geçmeyen bir yapıdır.

B3-C2S3 fraksiyonundaki aktivitenin de diğer fraksiyonlardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu fraksiyonun MALDI-MS spektrumu **1793** Da molekül ağırlığındaki yapıya ek olarak **2738, 2900, 3400** molekül ağırlığına sahip yapıların da sitokin aktivasyonunda rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bulgulara dayanılarak 2. aşamada, sonikasyon ile elde edilen örnek doğrudan doğruya HPLC ile iki boyutlu ayırıma tabi tutulmuştur.

4.6. *M. brumae*'den Elde Edilen Hücre Duvarı Örnekleri (2. Aşama)

M. brumae hücre duvarına ait çeşitli aşamalarda elde edilen örnekler Şekil 4.12'de görülmektedir.

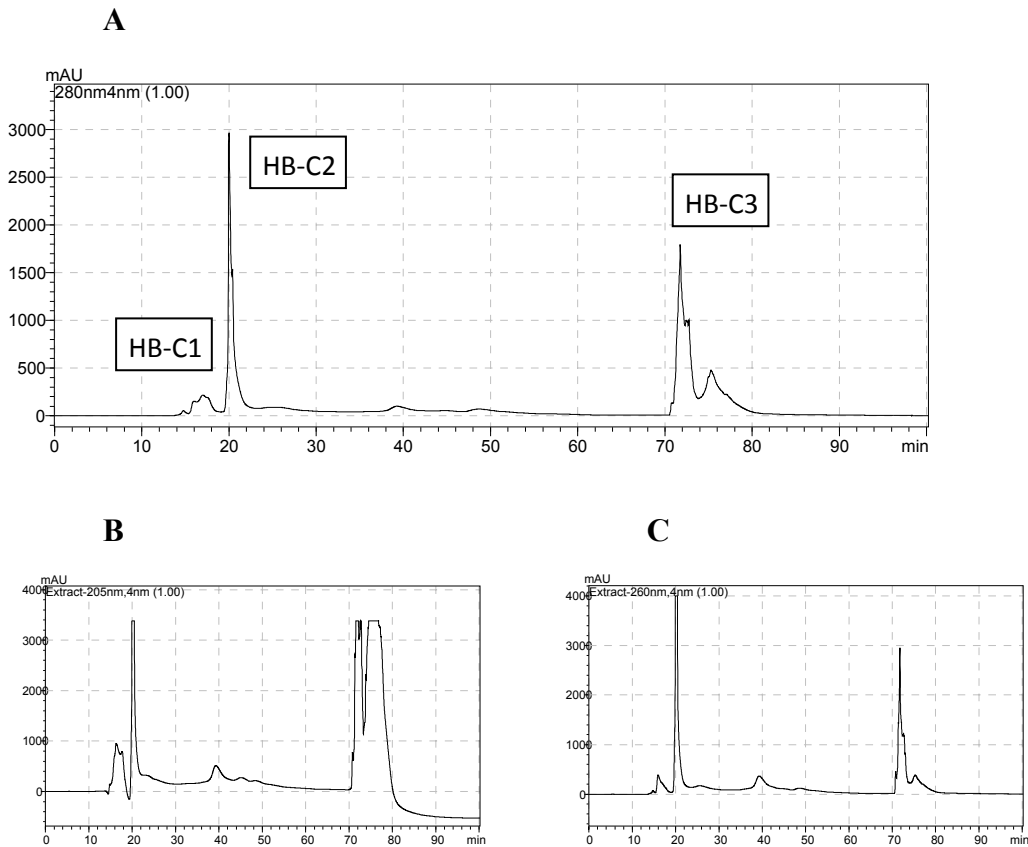


Şekil 4.12. *M. brumae* hücre duvarına ait çeşitli yöntemlerle elde edilen örnekler (2. Aşama)

4.7. *M. brumae* Hücre Duvarı Örneklerinin HPLC ve MALDI-TOF/MS Analiz Sonuçları (2. Aşama)

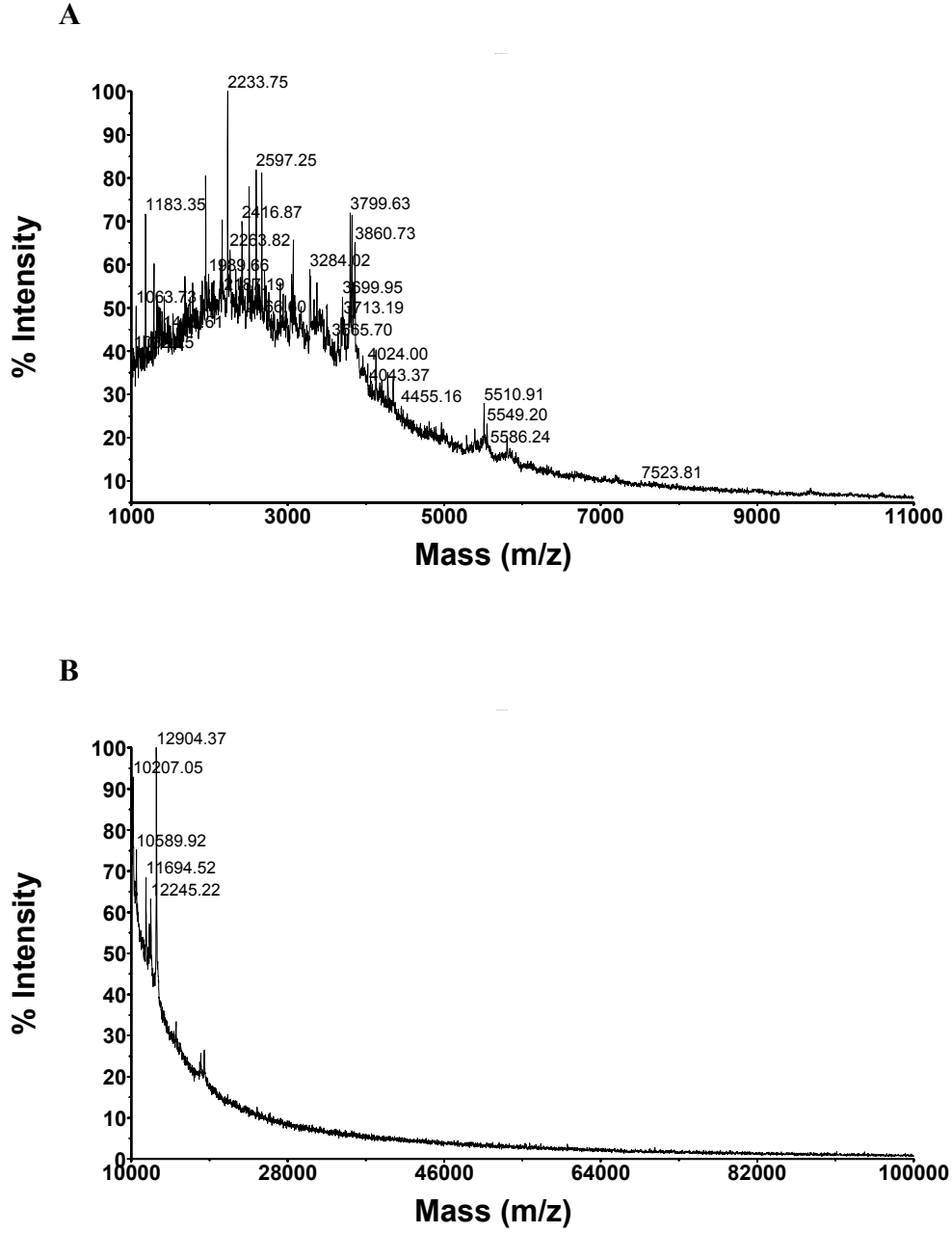
4.7.1. Birinci Boyut (C18, ters faz kromatografisi):

HB3 örneğinin elüsyonu için birkaç farklı şartta deneme yapıldı. Öncelikle örnek 1 ml/dak akış hızında Şekil 4.2'deki gradient şartları ile elüe edildi. Daha sonra Şekil 4.13'deki şartlar denendi. Aynı şartlar akış hızı 0,8 ml/dak yapılarak tekrarlandı. Gradient ile izokratik elüsyon profilleri arasında farklılık olmadığı gözlemlenerek örneğin kalan kısmı Şekil 4.13'deki şartlarda elüe edildi. Elüsyon sonunda **HB-C1**, **HB-C2** ve **HB-C3** olmak üzere 3 pik toplandı. Şekil 4.13'de HB3 örneğinin elüsyon profili görülmektedir.

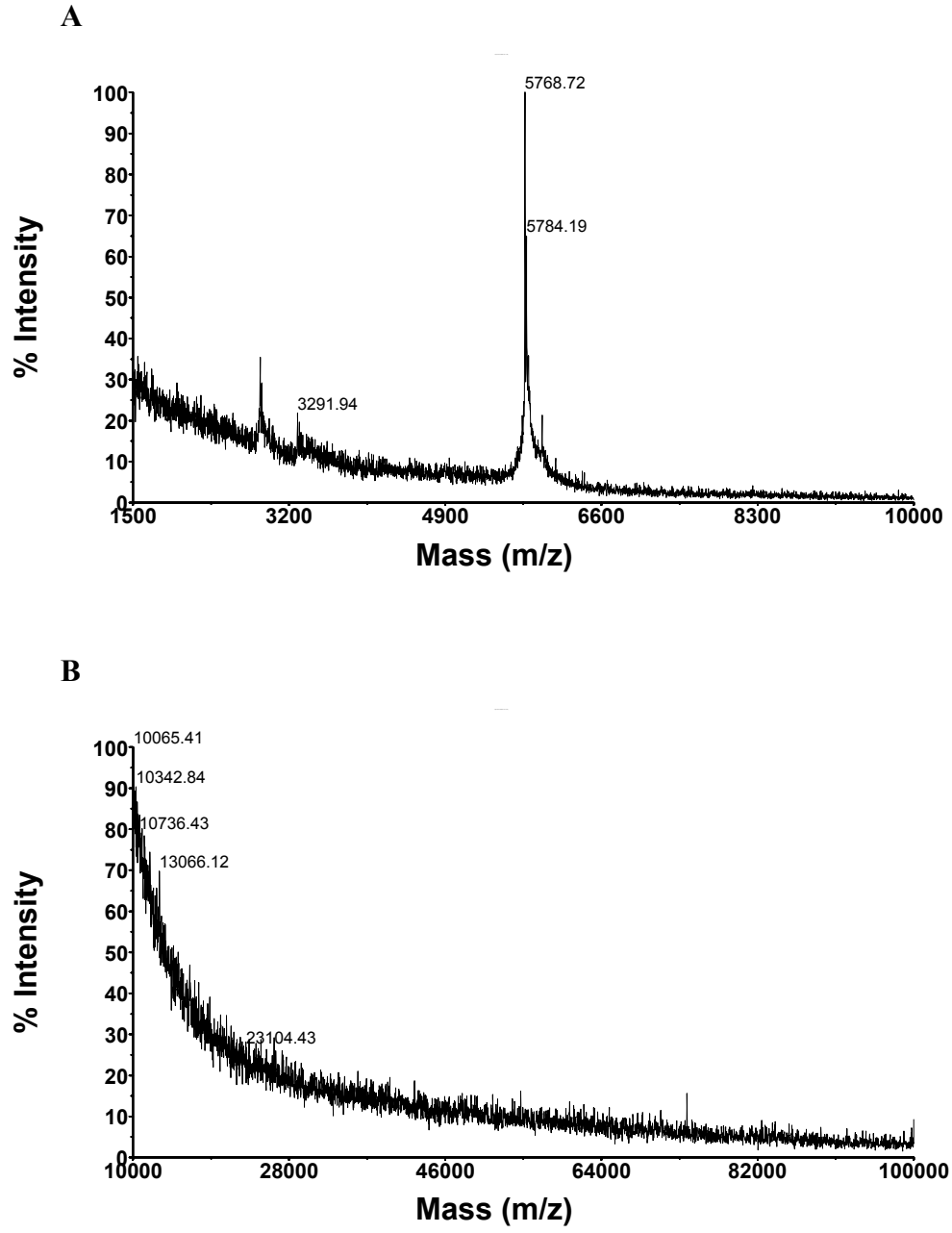


Şekil 4.13. HB3 örneğine ait A) 280, B) 205, C) 260 nm'de gözlenen C18 analiz sonuçları (Örnek hacmi: 500 µl, ilk 50 dakikada 0,9 ml/dak akış hızında %0,1 oranında TFA içeren su ve 50. dakikadan itibaren 2 ml/dak akış hızında %30'luk asetronitril çözeltisi)

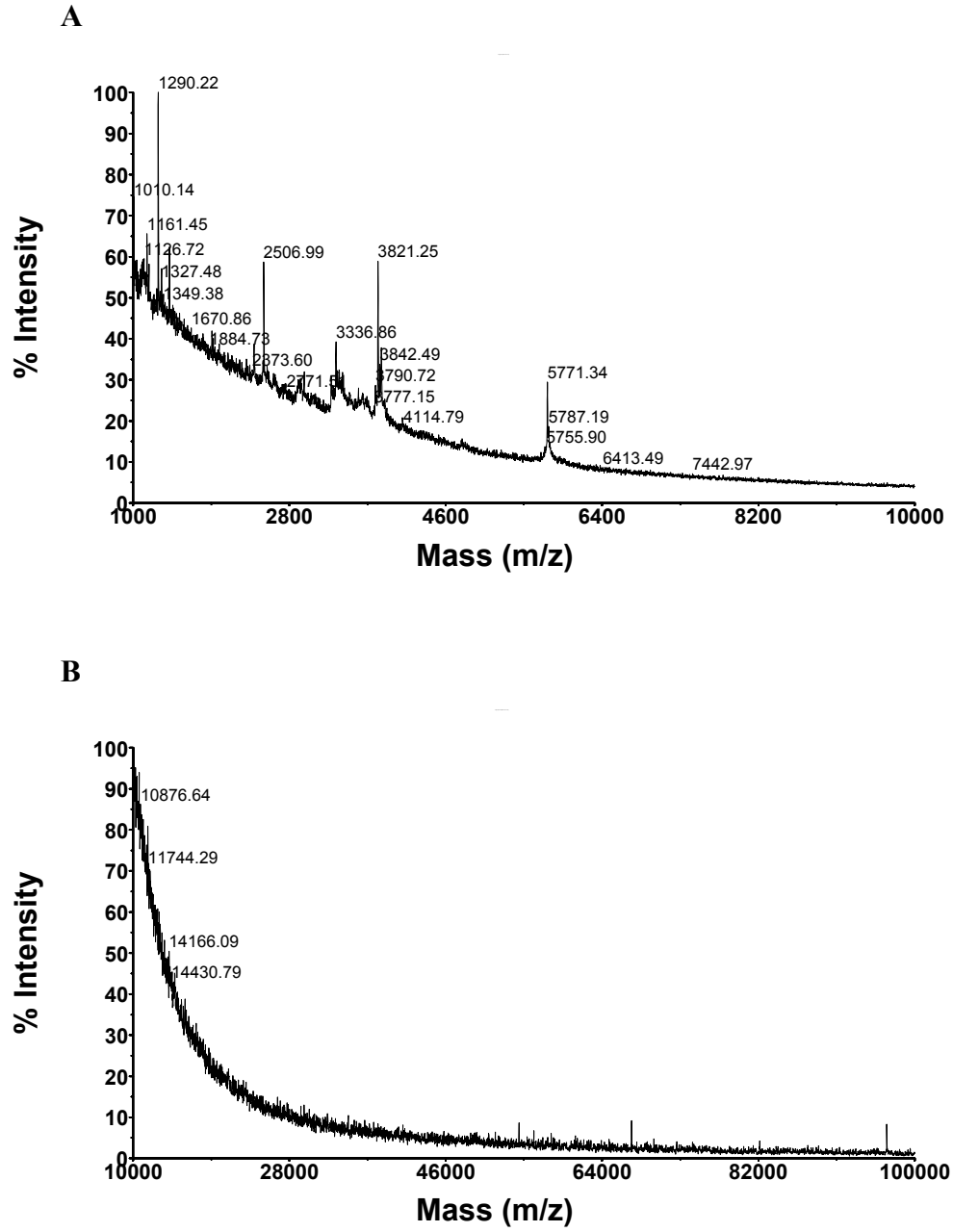
Şekil 4.14- 4.17 arasında HB3 örneğinin C18 çıktılarına ait MALDI/MS profilleri görülmektedir.



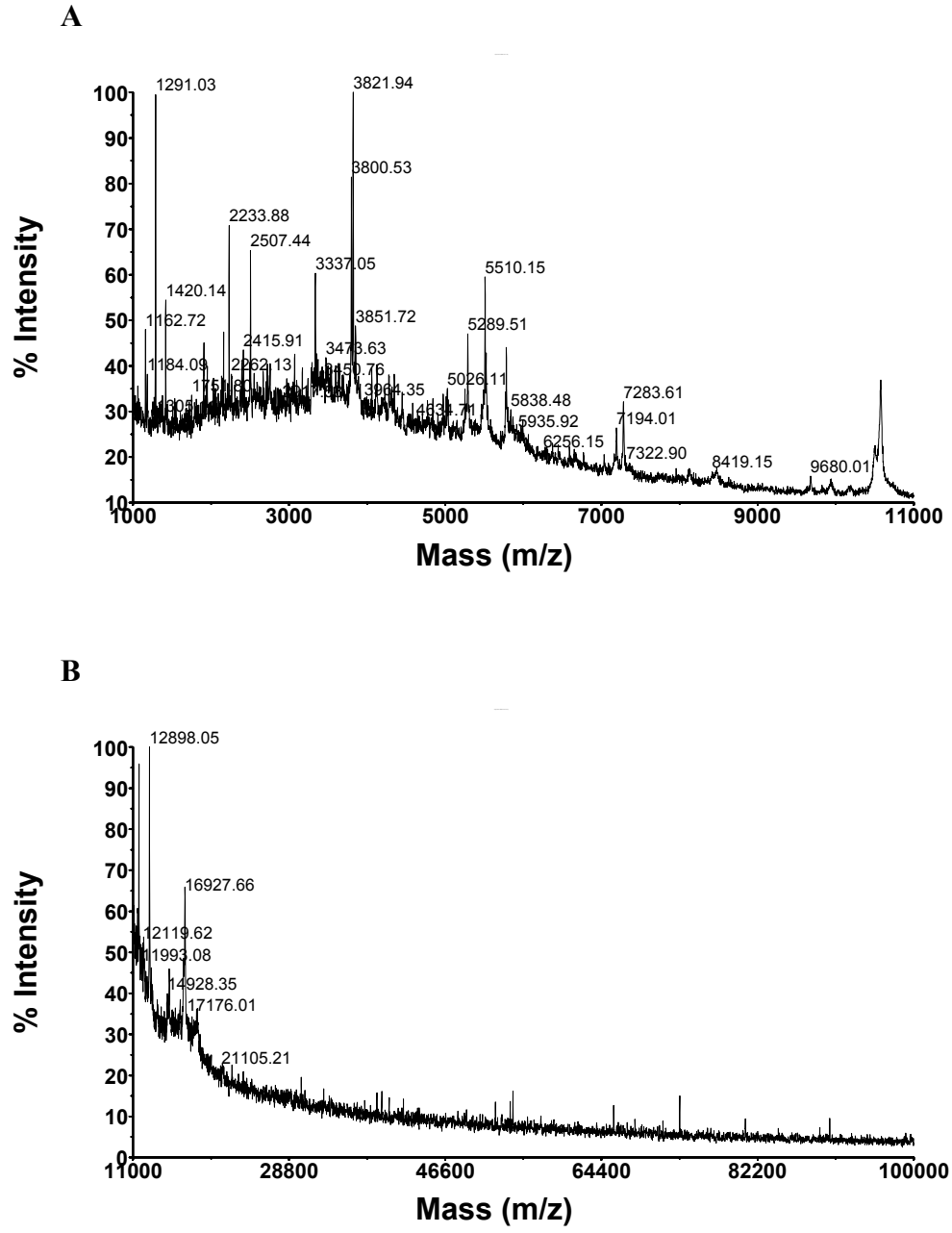
Şekil 4.14. HB3 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-11000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).



Şekil 4.15. HB-C1 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).



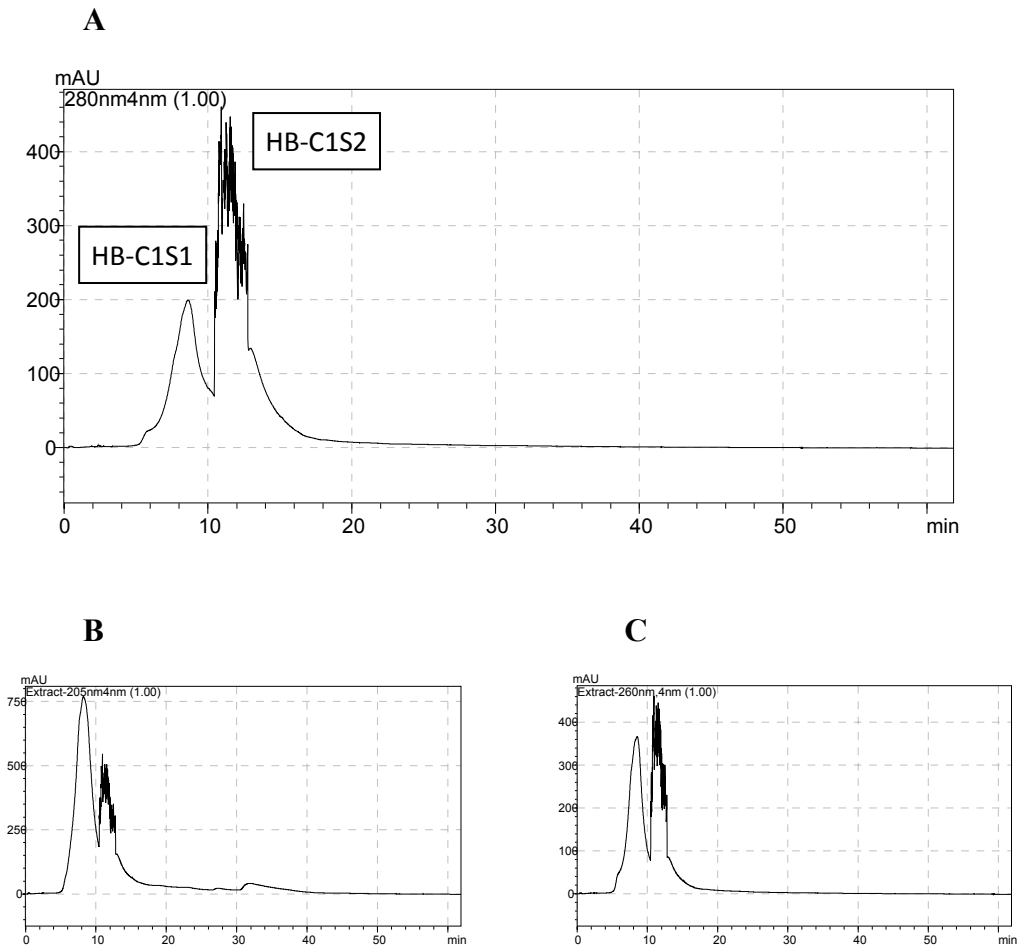
Şekil 4.16. HB-C2 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).



Şekil 4.17. HB-C3 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).

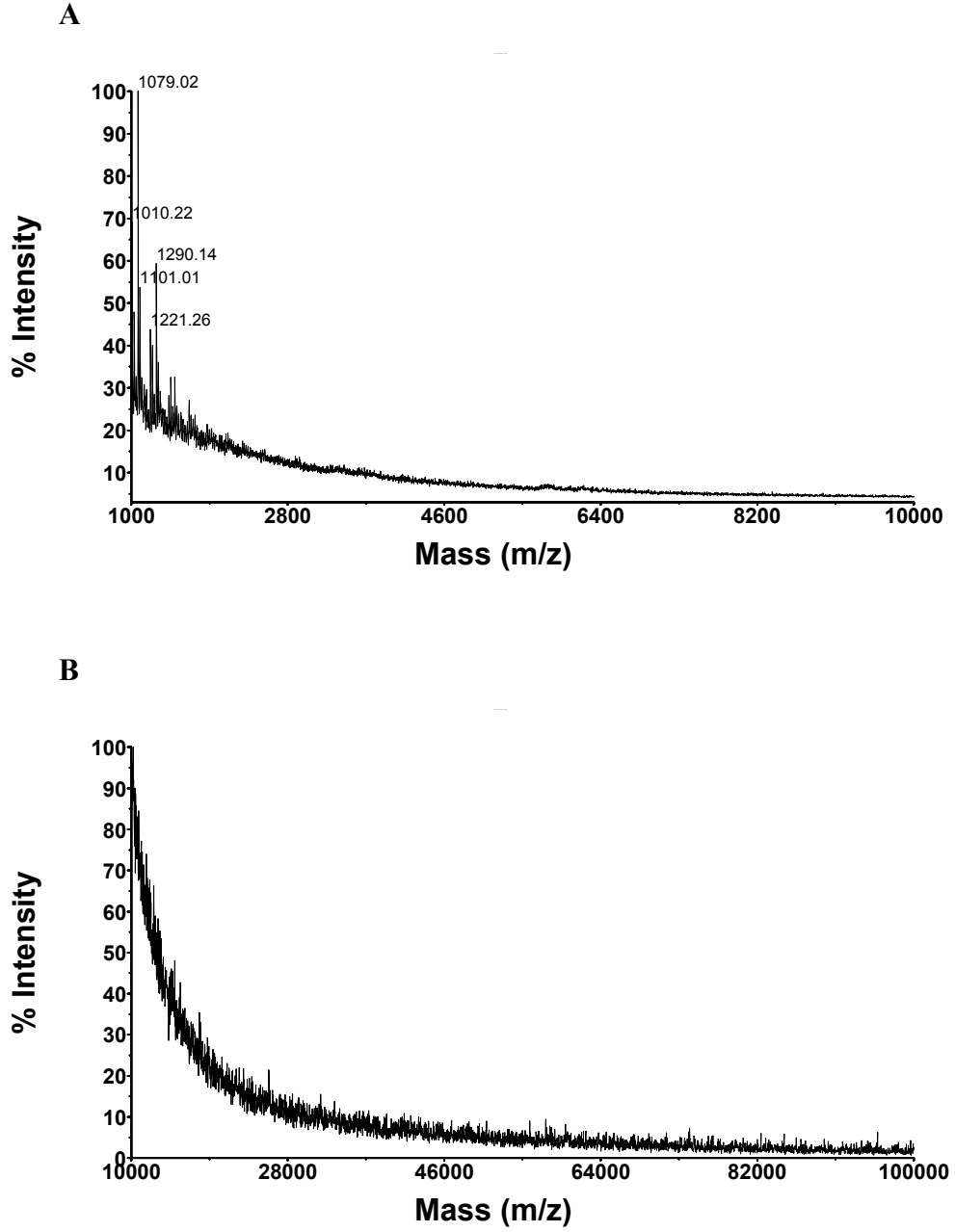
4.7.2. İkinci Boyut (SCX, Kuvvetli katyon değiştirici kromatografi):

C18 ıktılarının her biri çeşitli şartlarda SCX kolondan geçirildi. HB-C1 rneęi öncelikle 2 ml/dak akış hızı ve şekil 4.18'deki gradient şartlarında elüe edildi. Daha sonra akış hızı 1 ml/dak'ya düşürüldü. şekil 4.18'deki şartlarda 1. pikin 2. pikten ayrılarak daha belirginleştiği görüldü. Örneğin SCX analizi sonucu **HB-C1S1** ve **HB-C1S2** olmak üzere 2 pik toplandı. şekil 4.18'de HB-C1 rneęinin SCX analiz sonucu görülmektedir.

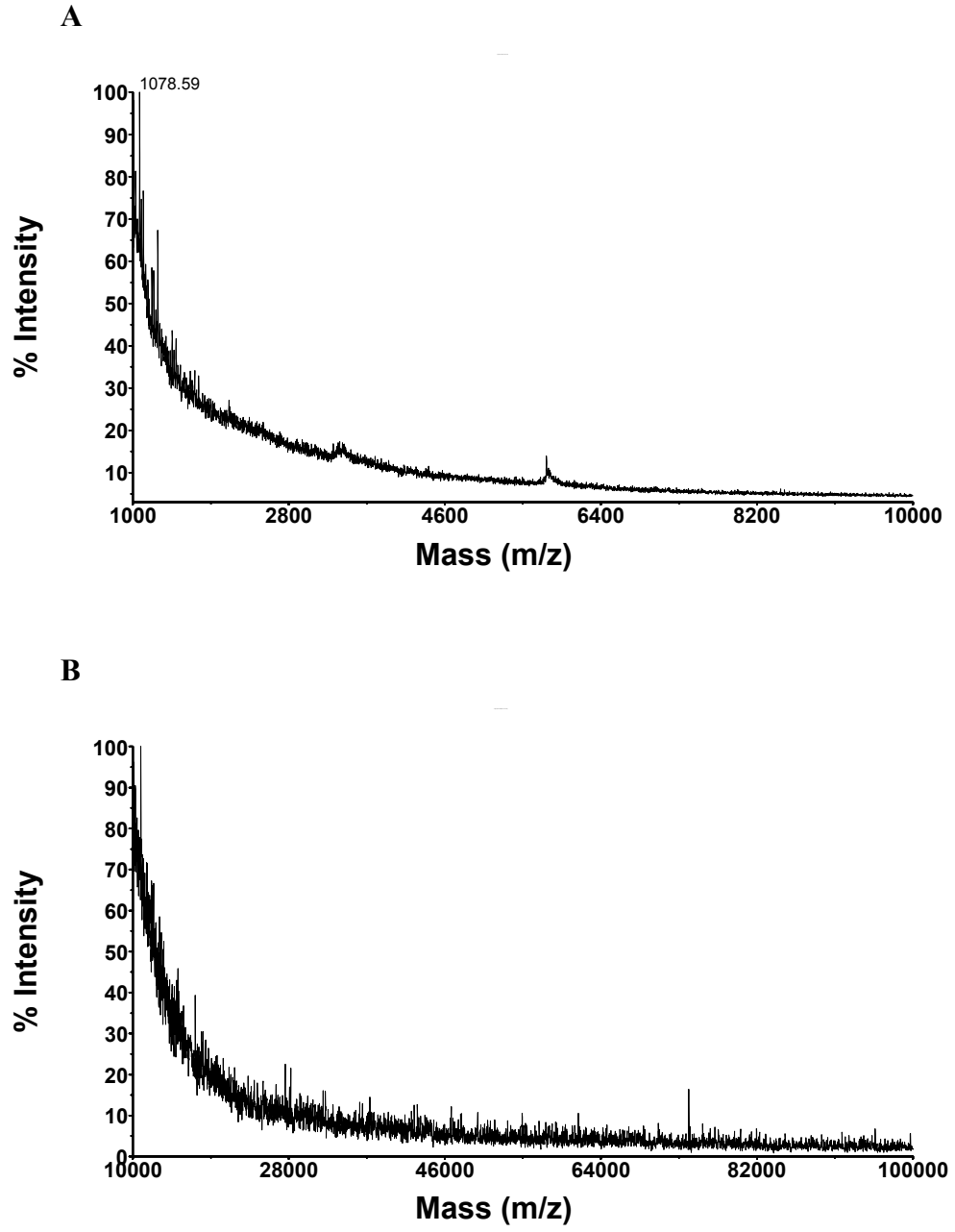


şekil 4.18. HB-C1 örneğine ait A) 280, B) 205, C) 260 nm'de gözlenen SCX analiz sonuçları (*rnek hacmi: 200 l, total akış hızı: 1 ml/dak, gradient: Mobil faz B 60 dakikada 0'dan %30'a*).

Şekil 4.19 ve 4.20’de HB-C1 örneğinin SCX çıktılarına ait MALDI/MS profilleri görülmektedir.

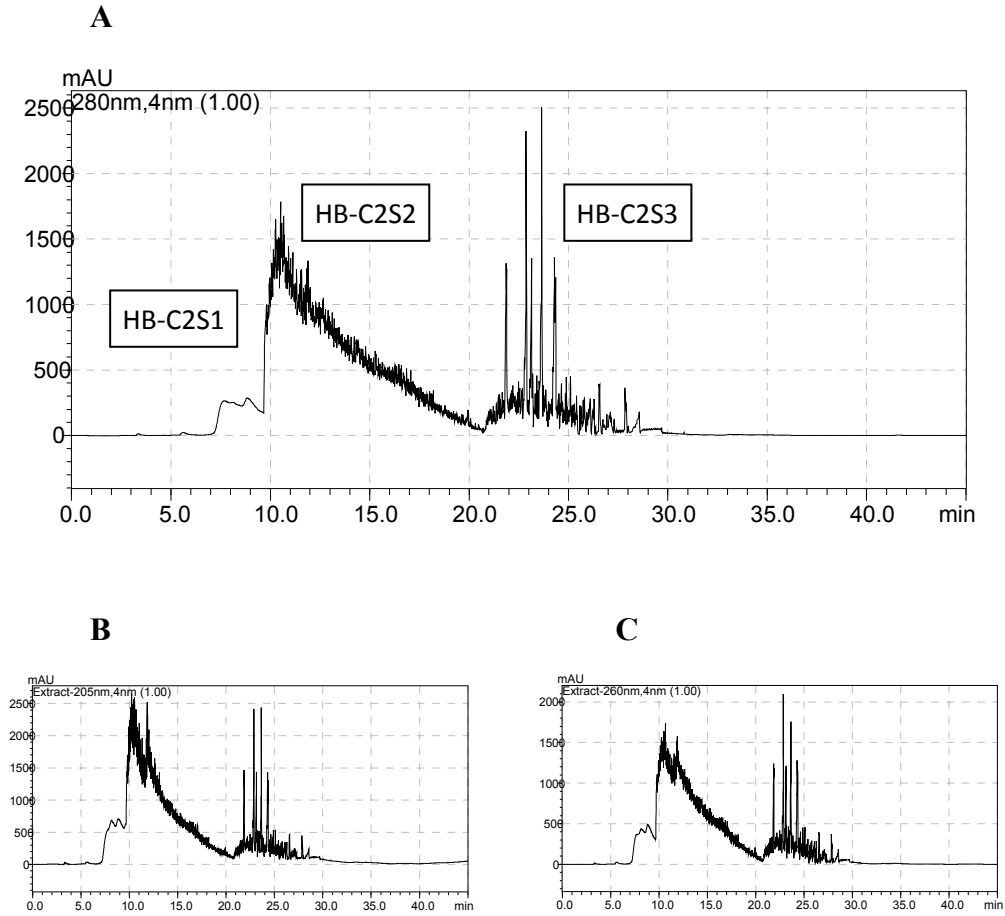


Şekil 4.19. HB-C1S1 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).



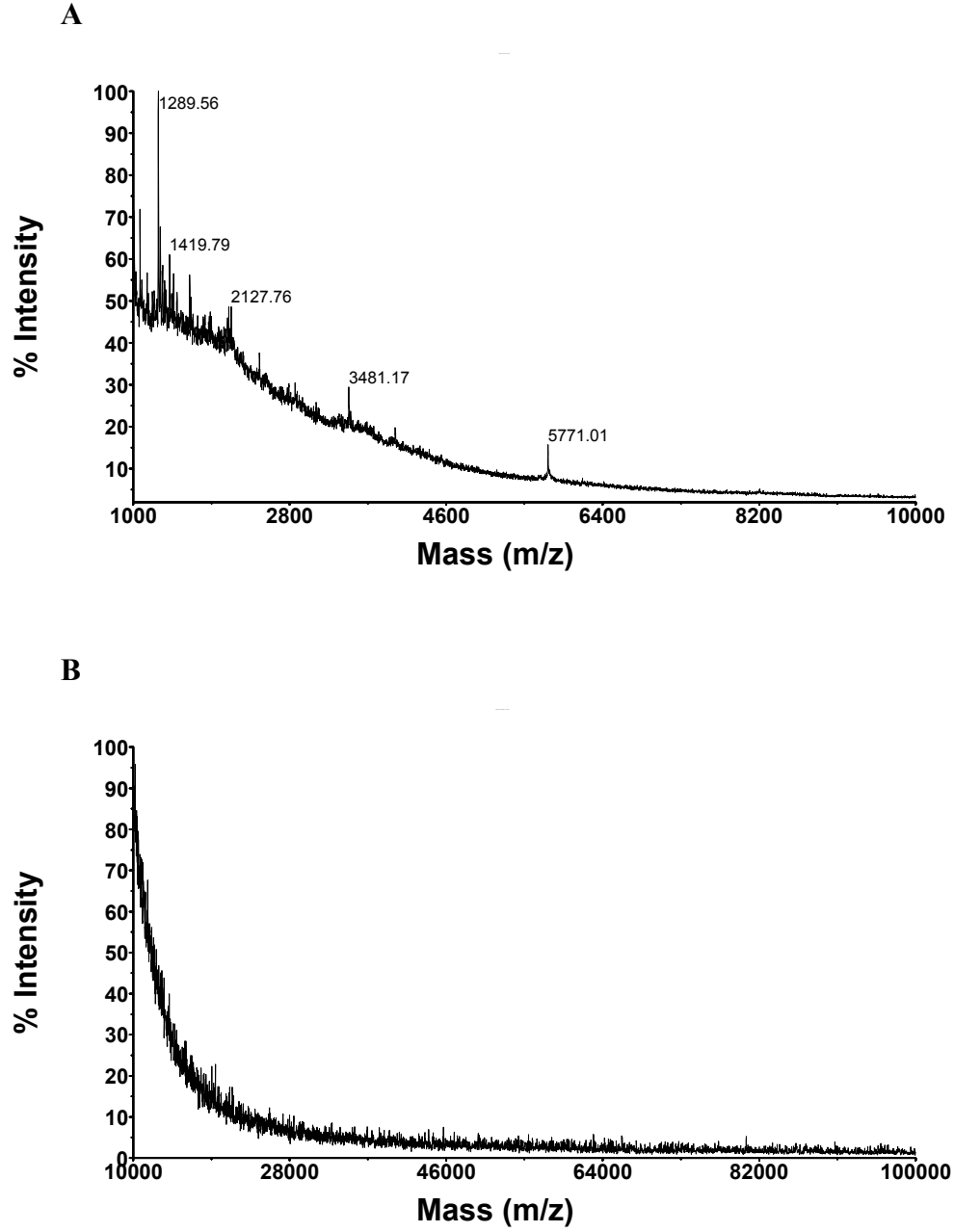
Şekil 4.20. HB-C1S2 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).

HB-C2 örneği öncelikle 1 ml/dak akış hızında ve Şekil 4.21'deki gradient şartlarında elüe edildi. Daha sonra akış hızı 1,5 ml/dak'ya çıkarıldı. Örneğin kalan kısmı Şekil 4.21'deki şartlarda elüe edilerek **HB-C2S1**, **HB-C2S2** ve **HB-C2S3** olmak üzere 3 pik toplandı. Şekil 4.21 HB-C2 örneğinin SCX analiz sonuçlarını göstermektedir.

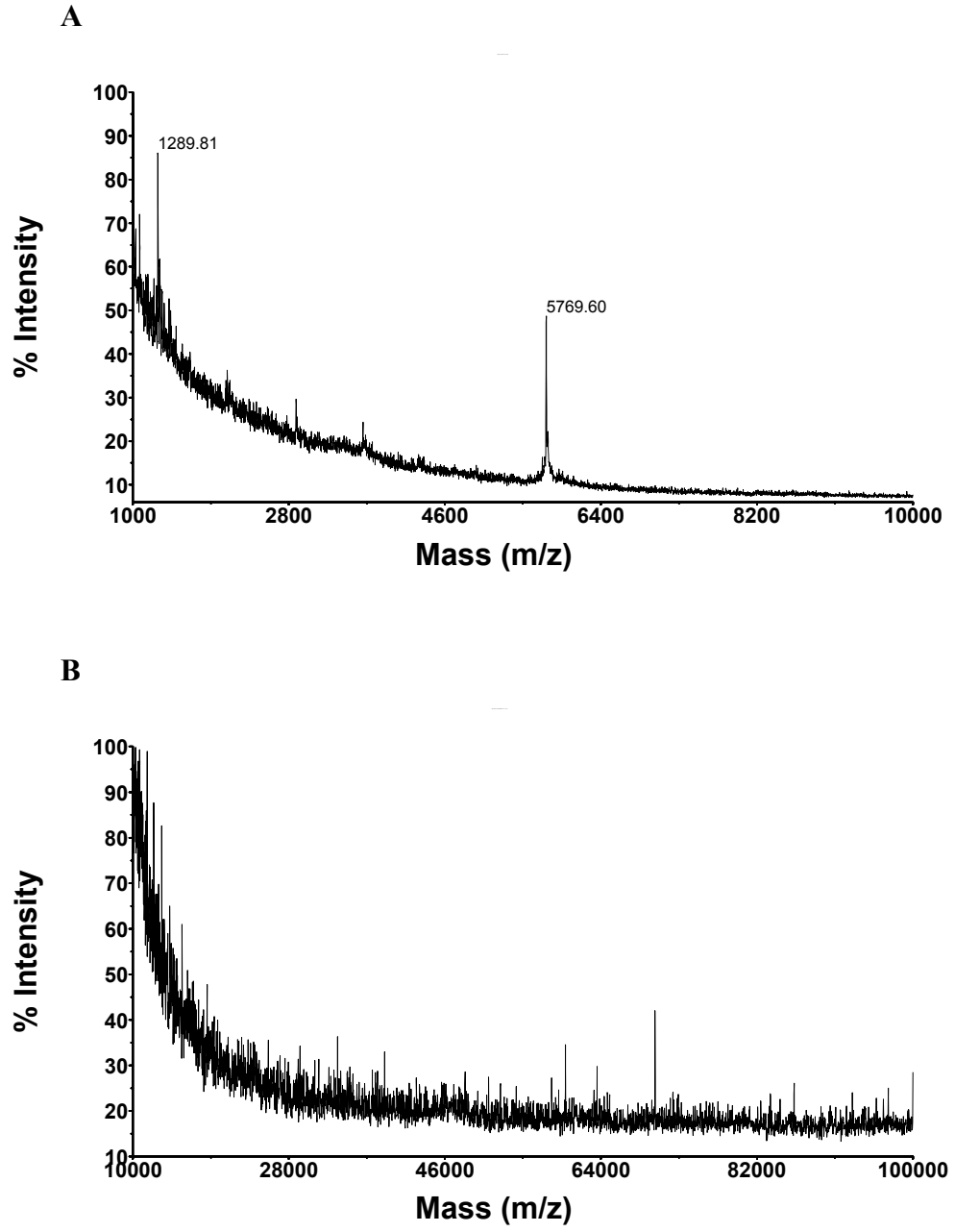


Şekil 4.21. HB-C2 örneğine ait A) 280, B) 205 ve C) 260 nm'de gözlenen SCX analiz sonuçları (Örnek hacmi: 200 μ l, total akış hızı: 1,5 ml/dak, gradient: Mobil faz B 60 dakikada 0'dan %30'a).

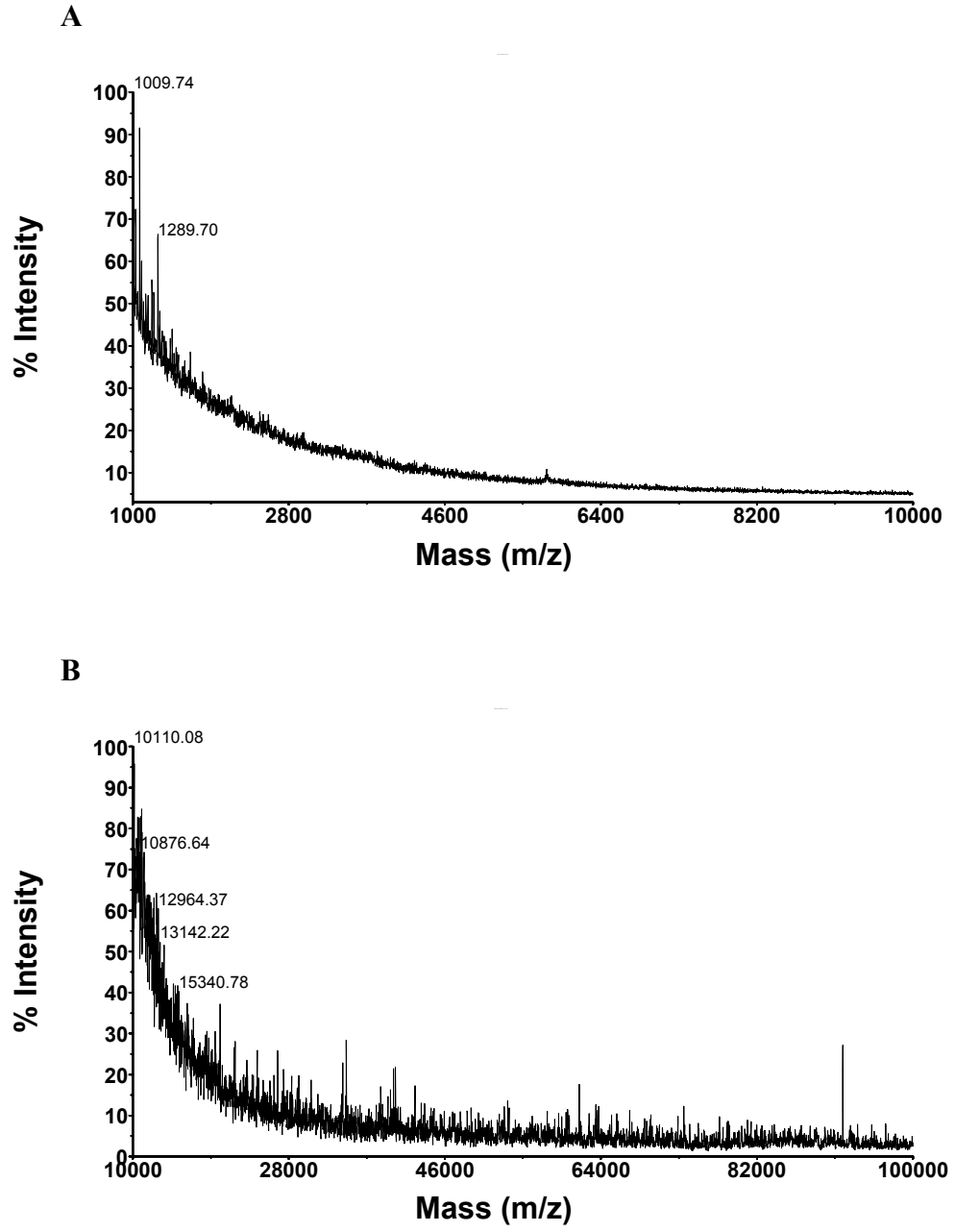
Şekil 4.22- 4.24 arasında HB-C2 örneğinin SCX çıktılarının MALDI-MS profilleri görülmektedir.



Şekil 4.22. HB-C2S1 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).

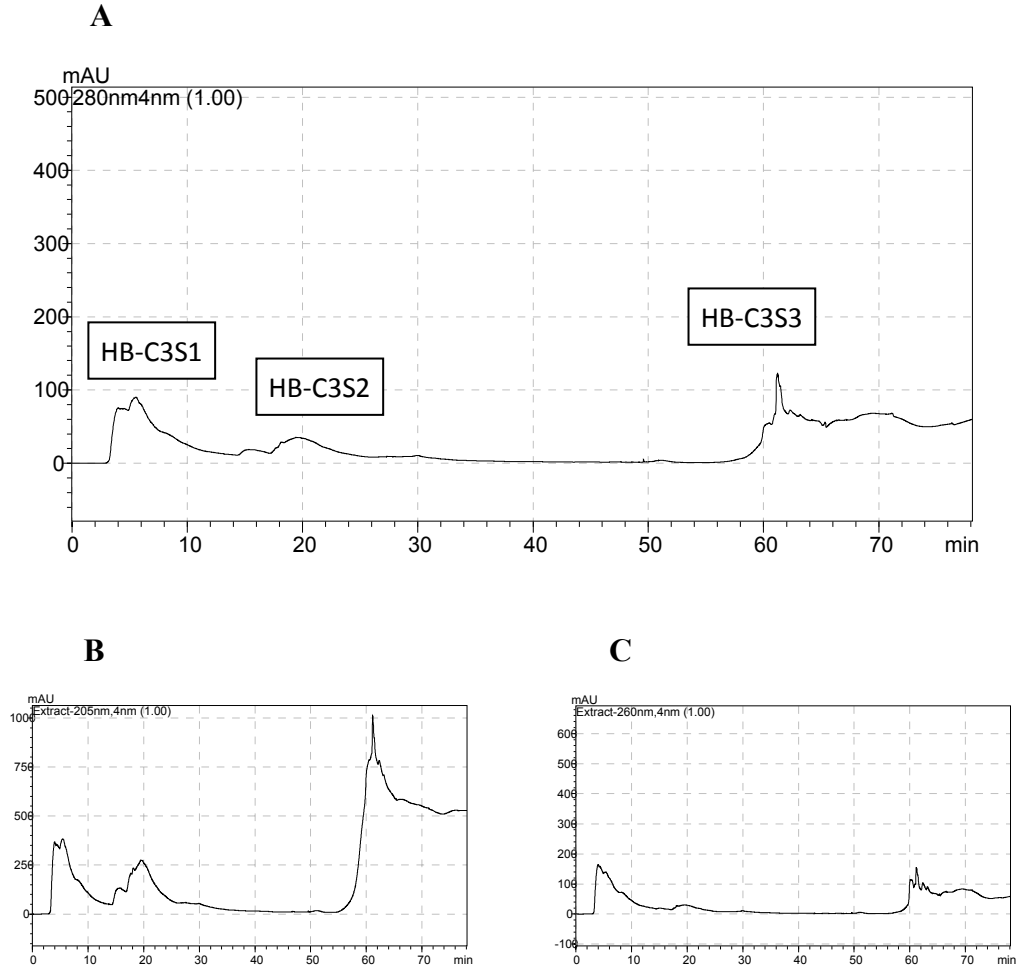


Şekil 4.23. HB-C2S2 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).



Şekil 4.24. HB-C2S3 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).

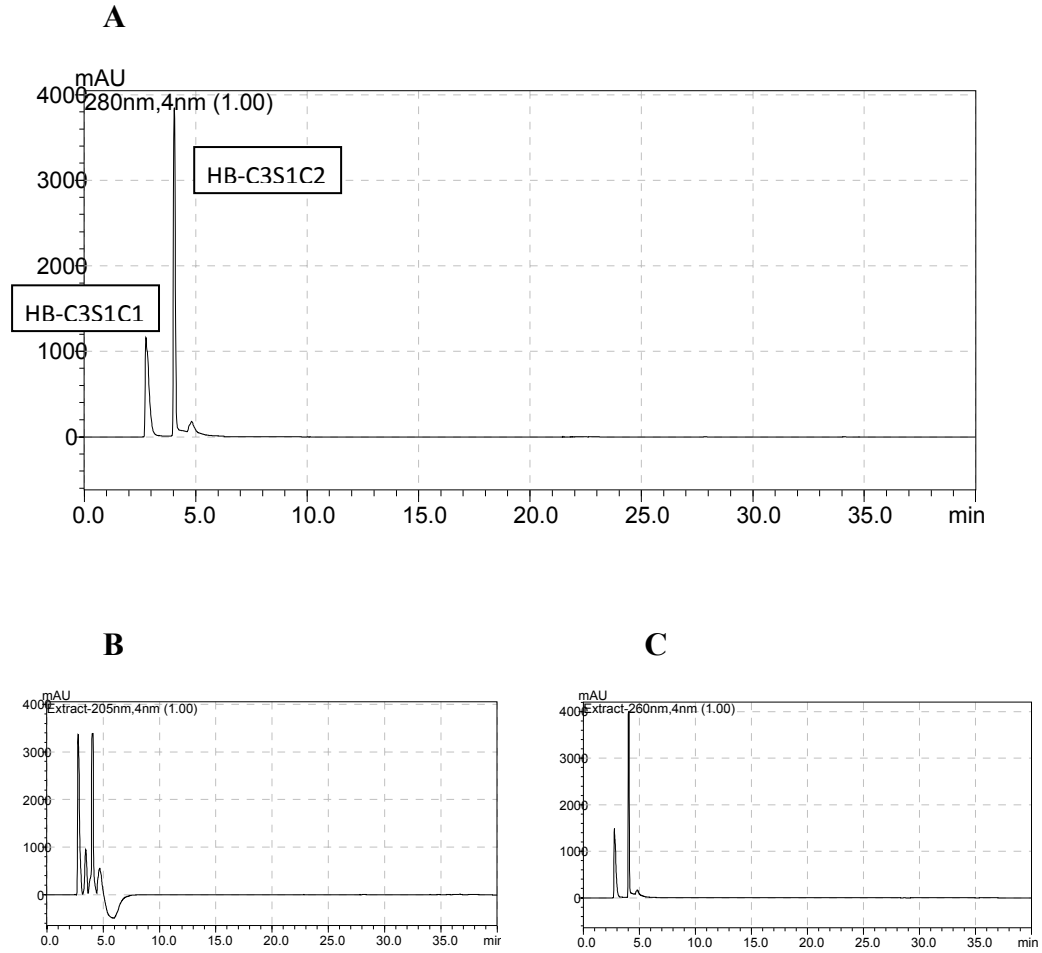
HB-C3 örneği Şekil 4.25'deki şartlarda SCX kolona yüklendi ve analiz sonucu **HB-C3S1**, **HB-C3S2** ve **HB-C3S3** olmak üzere 3 pik toplandı. Bütün örnek aynı şartlarda elüe edildi. Şekil 4.25'te HB-C3 örneğinin SCX analiz sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.25. HB-C3 örneğine ait A) 280, B) 205 ve C) 260 nm'de gözlenen SCX analiz sonuçları (Örnek hacmi: 500 μ l, total akış hızı: 2 ml/dak, gradient: Mobil faz B 60 dakikada 0'dan %30'a).

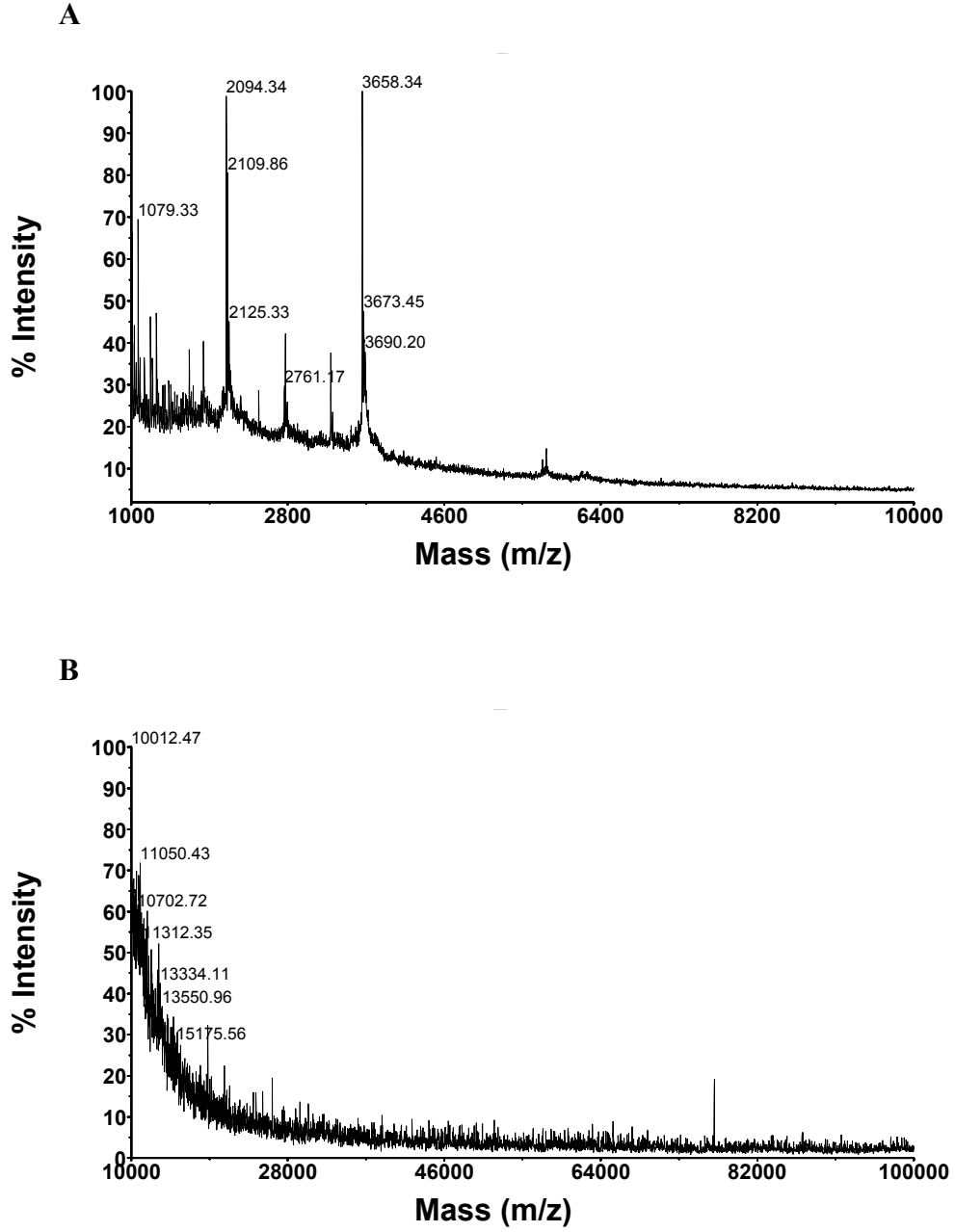
HB-C3 örneğine ait SCX analizinde iyi bir ayırım sağlanamadığı için SCX çıktıları tekrar C18 kolonundan geçirildi.

HB-C3S1 örneği Şekil 4.26'daki şartlarda elüe edildi ve analiz sonucu **HB-C3S1C1** ve **HB-C3S1C2** olmak üzere 2 pik toplandı. Şekil 4.26 HB-C3S1 örneğinin C18 analiz sonuçlarını göstermektedir.

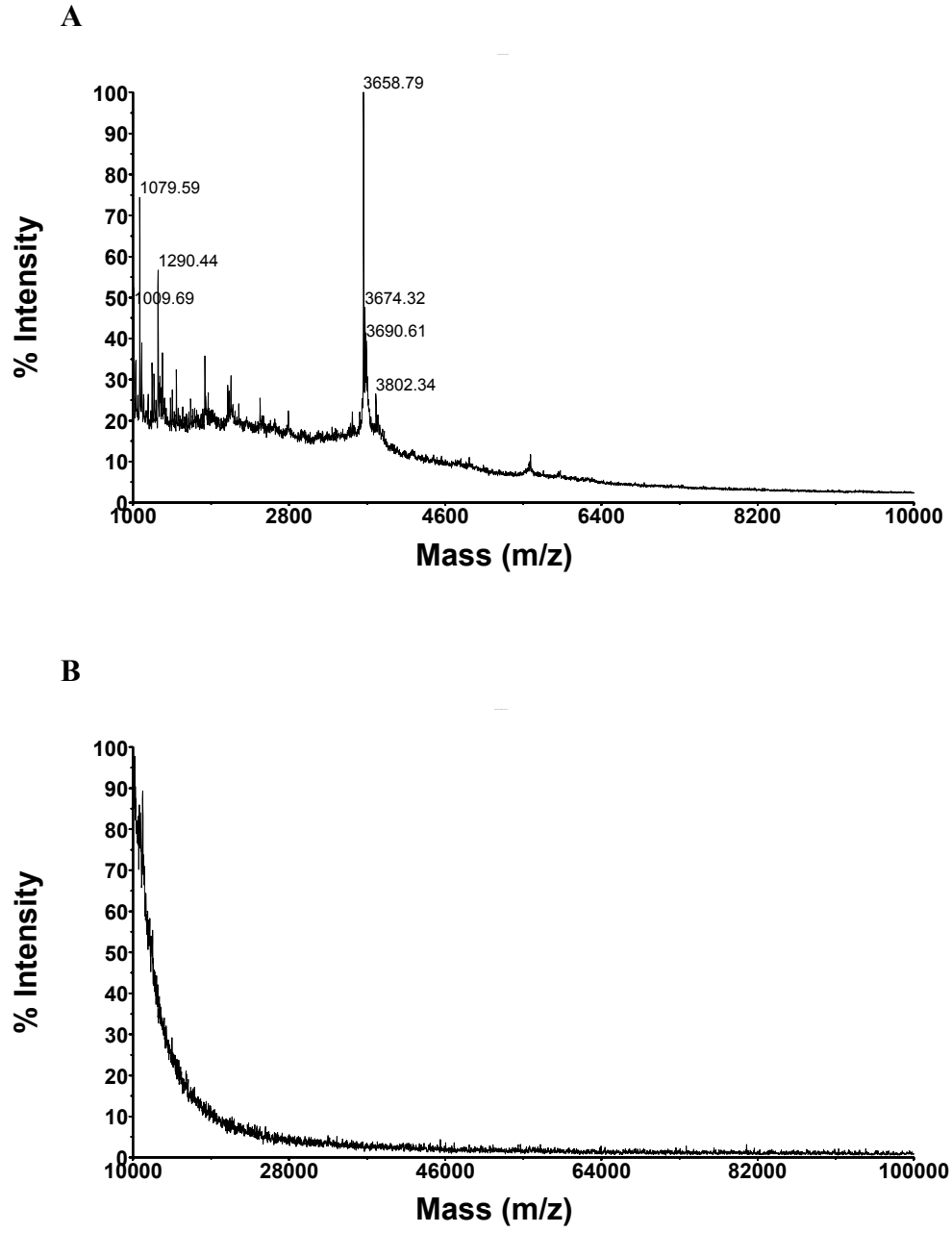


Şekil 4.26. HB-C3S1 örneğine ait A) 280, B) 205 ve C) 260 nm'de gözlenen C18 analiz sonuçları (Örnek hacmi:500 μ l, akış hızı:3 ml/dak, ilk 15 dakika %0,1 oranında TFA içeren su 15. dakikadan sonra %30'luk asetoniitril çözeltisi)

Şekil 4.27 ve 4.28’de HB-C3S1 örneğinin C18 çıktılarının MALDI/MS profilleri görülmektedir.

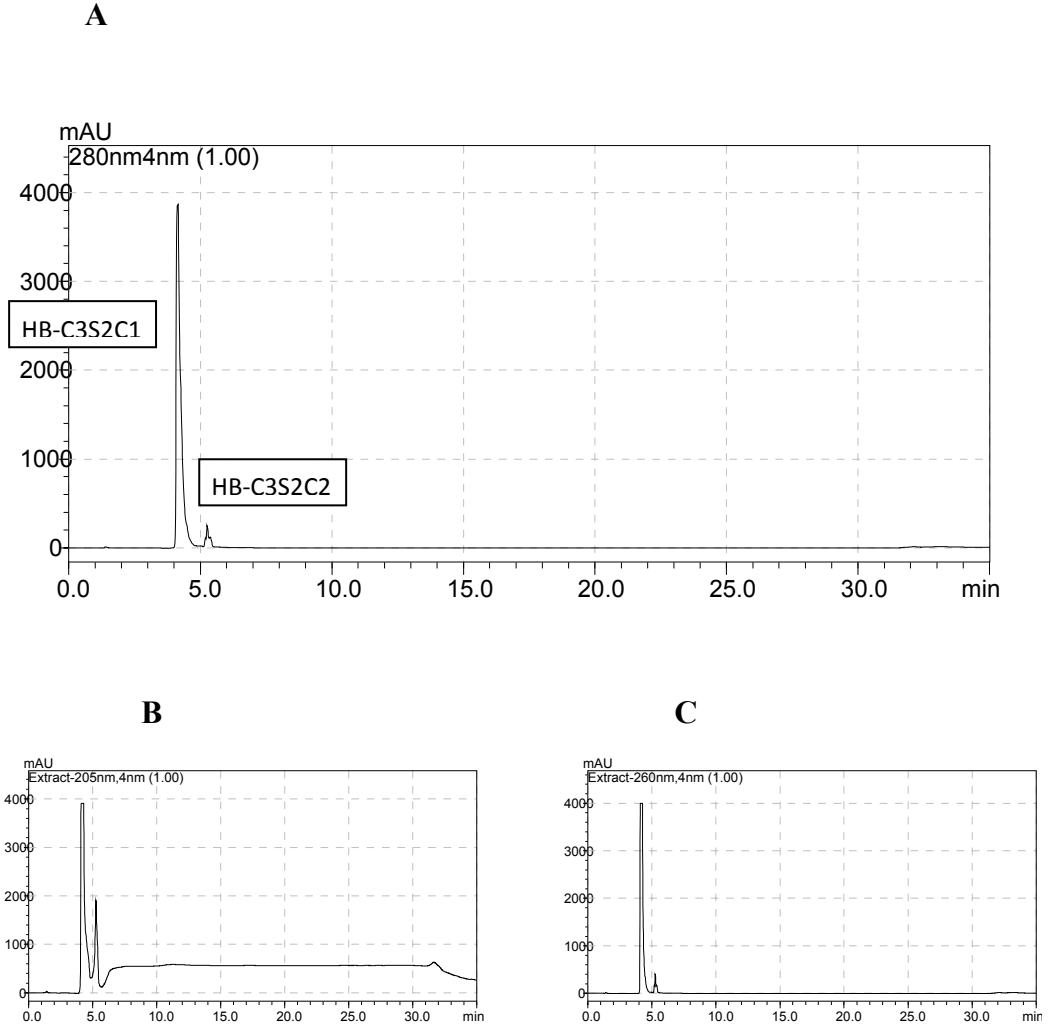


Şekil 4.27. HB-C3S1C1 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).



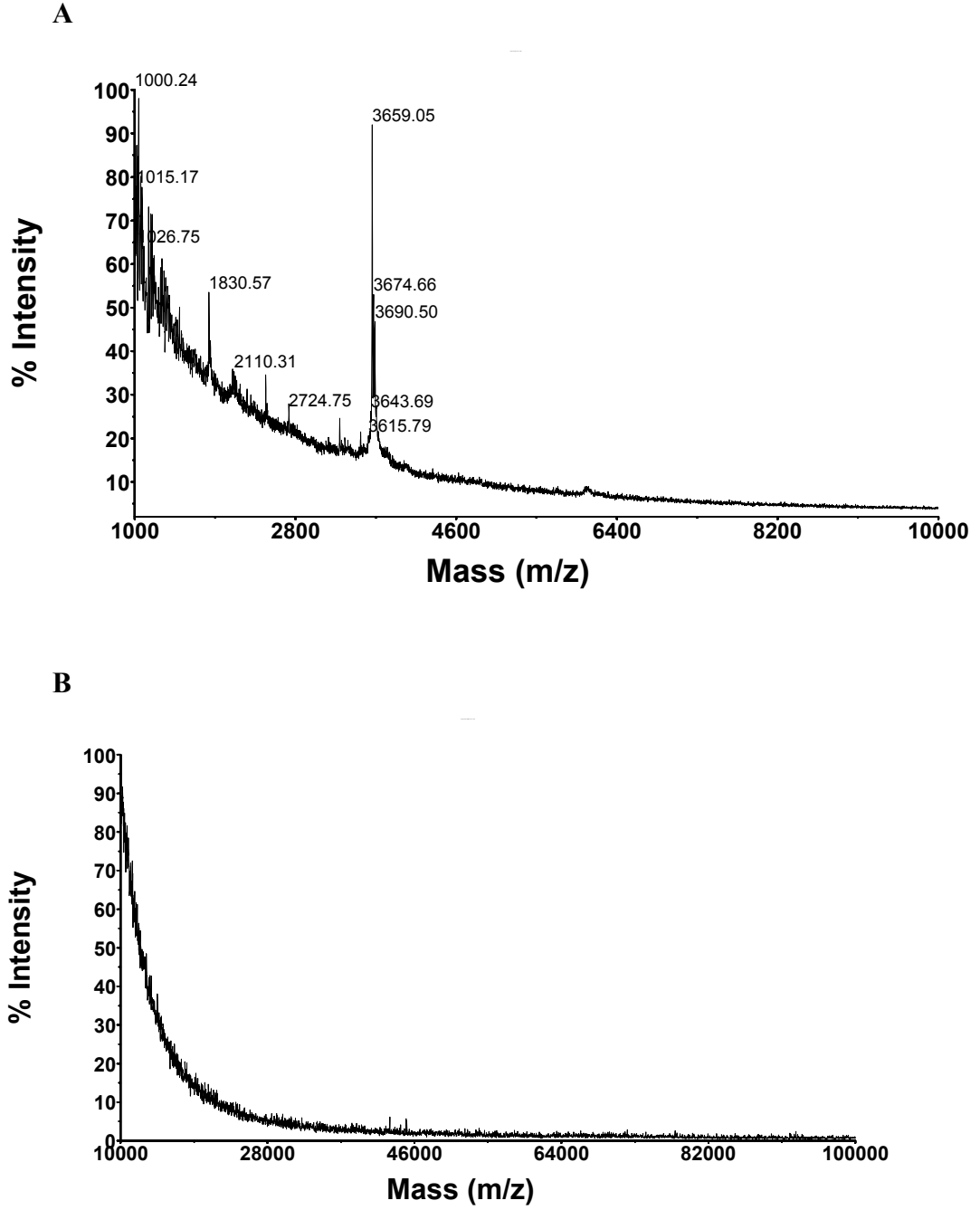
Şekil 4.28. HB-C3S1C2 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).

HB-C3S2 örneği Şekil 4.29'daki şartlarda C18'den geçirildi ve analiz sonucu **HB-C3S2C1** ve **HB-C3S2C2** olmak üzere 2 pik toplandı. HB-C3S2 örneğinin C18 analiz sonuçları Şekil 4.29'da görülmektedir.

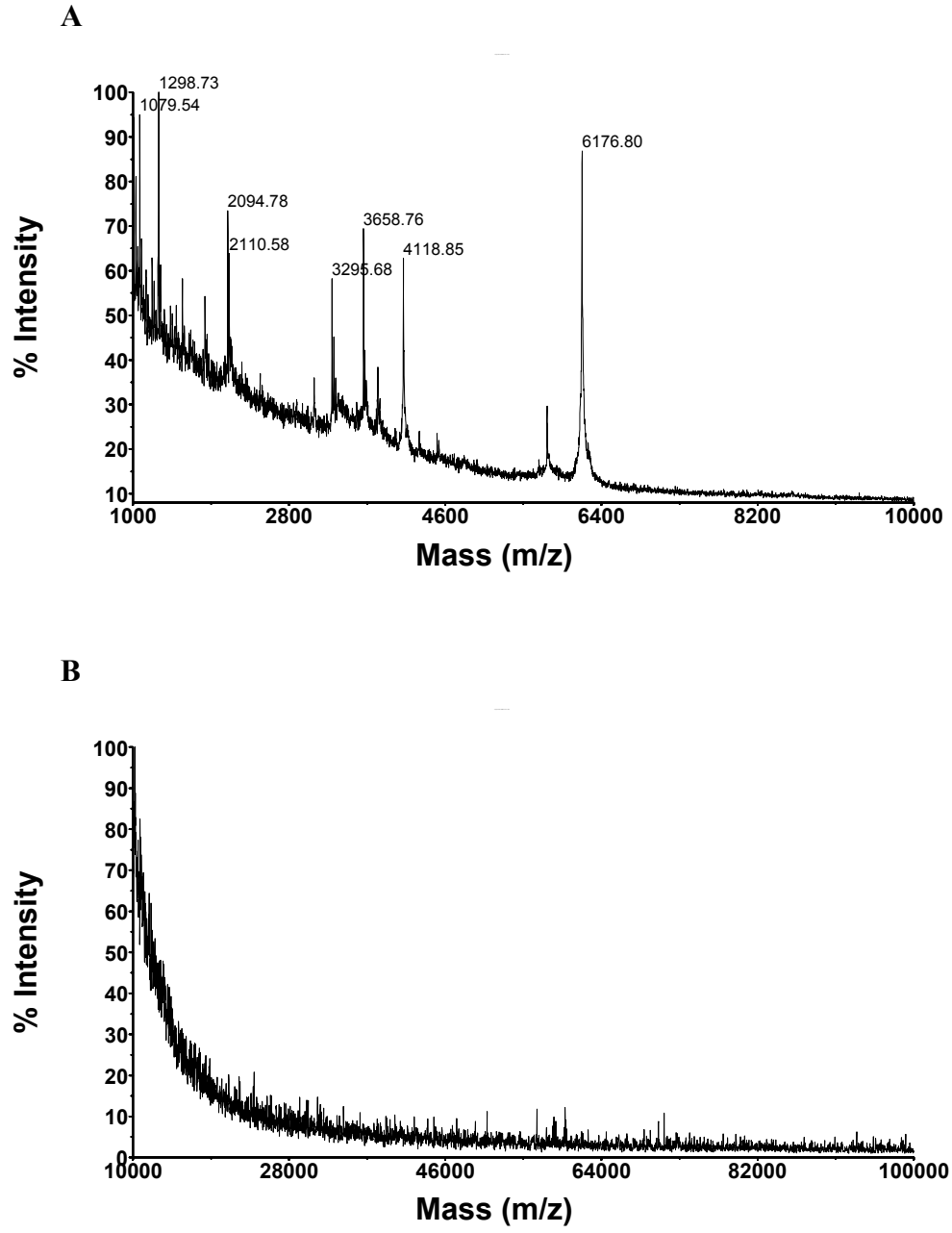


Şekil 4.29. HB-C3S2 örneğine ait A) 280, B) 205 ve C) 260 nm'de gözlenen C18 analiz sonuçları (Örnek hacmi:1 ml, akış hızı:3 ml/dak, ilk 15 dakika %0,1 oranında TFA içeren su 15. dakikadan sonra %30'luk asetonyitril çözeltisi)

Şekil 4.30 ve 4.31’de HB-C3S2 örneğinin C18 çıktılarının MALDI/MS profilleri görülmektedir.

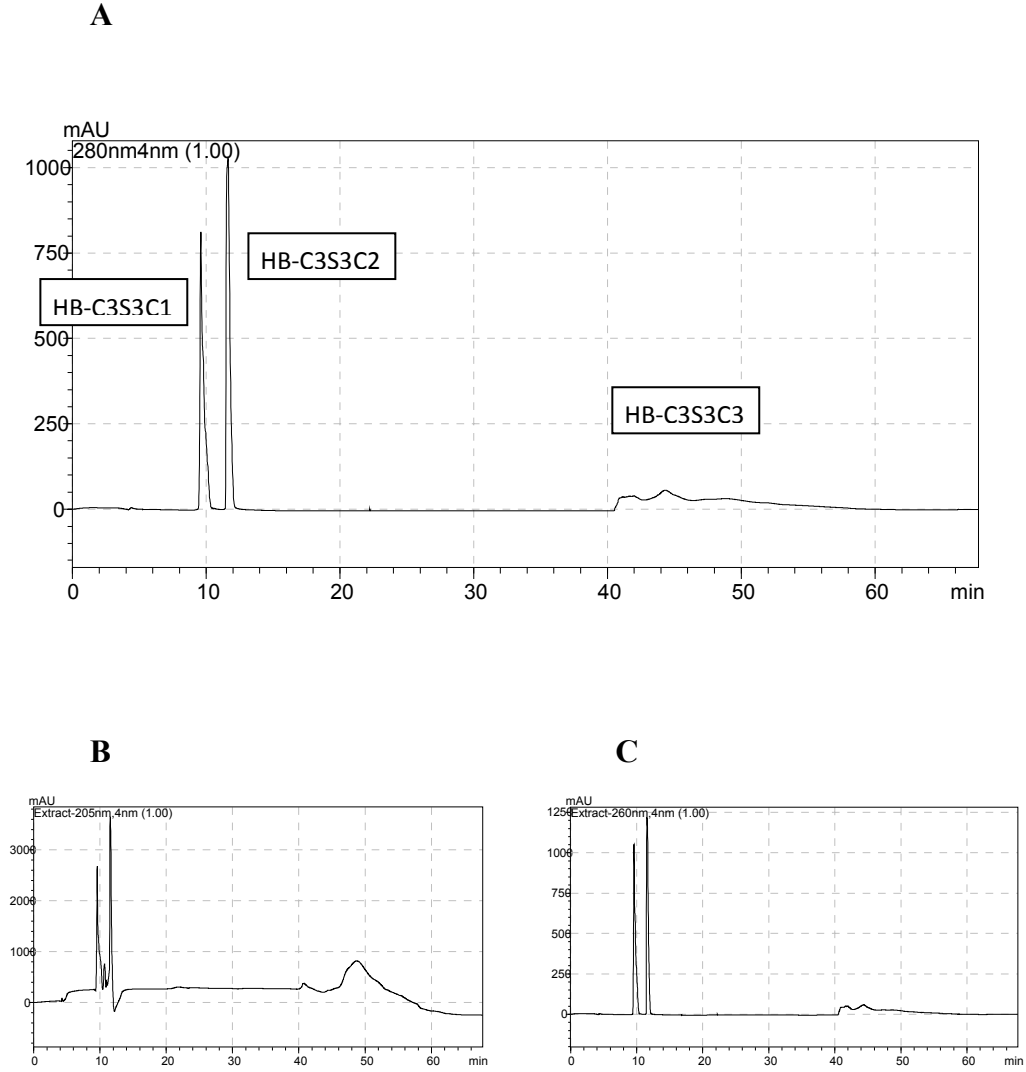


Şekil 4.30. HB-C3S2C1 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).



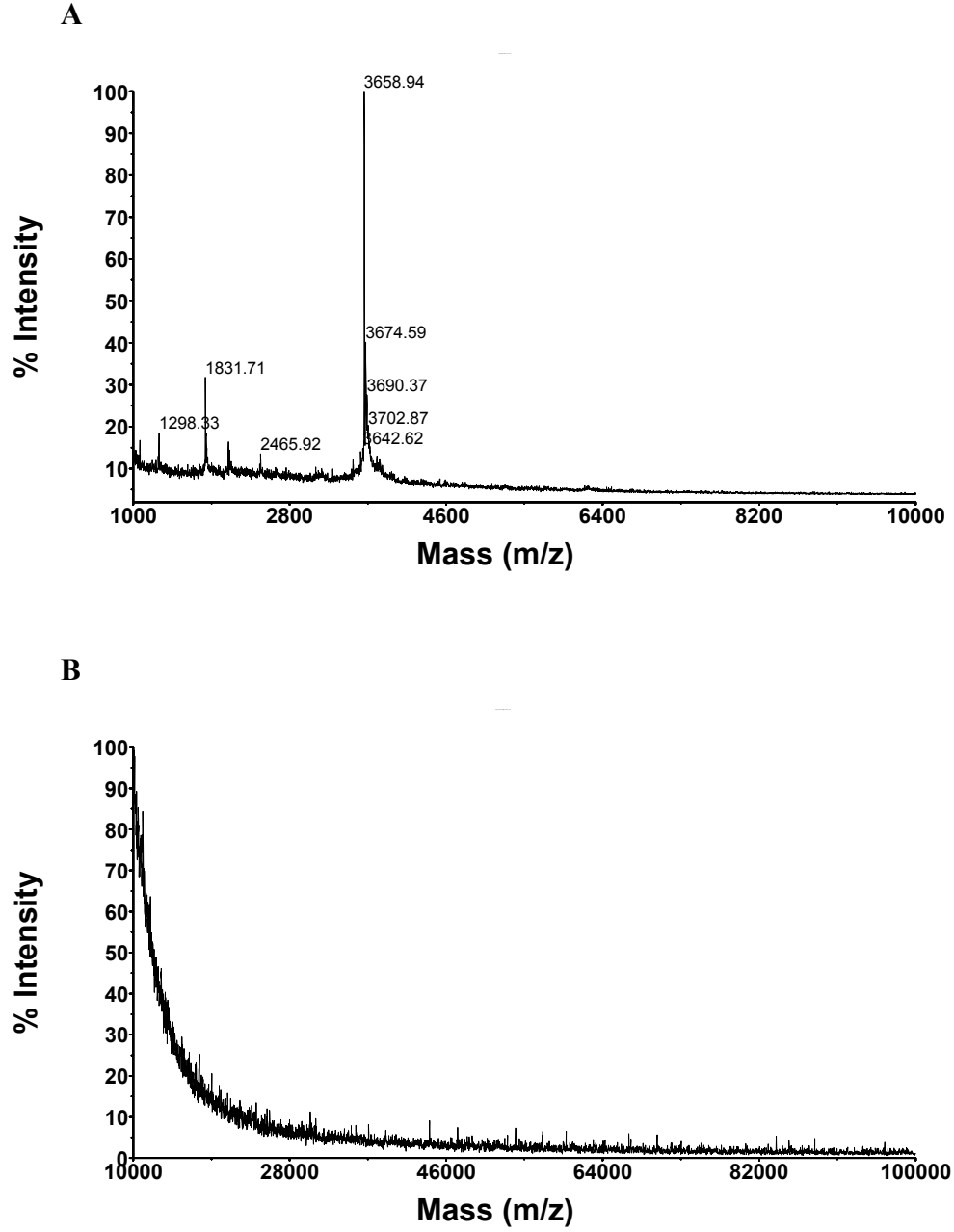
Şekil 4.31. HB-C3S2C2 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).

HB-C3S3 örneği Şekil 4.32'deki şartlarda C18'den geçirildi ve analiz sonucu **HB-C3S3C1**, **HB-C3S3C2** ve **HB-C3S3C3** olmak üzere 3 pik toplandı. HB-C3S3 örneğinin C18 analiz sonuçları Şekil 4.32'de görülmektedir.

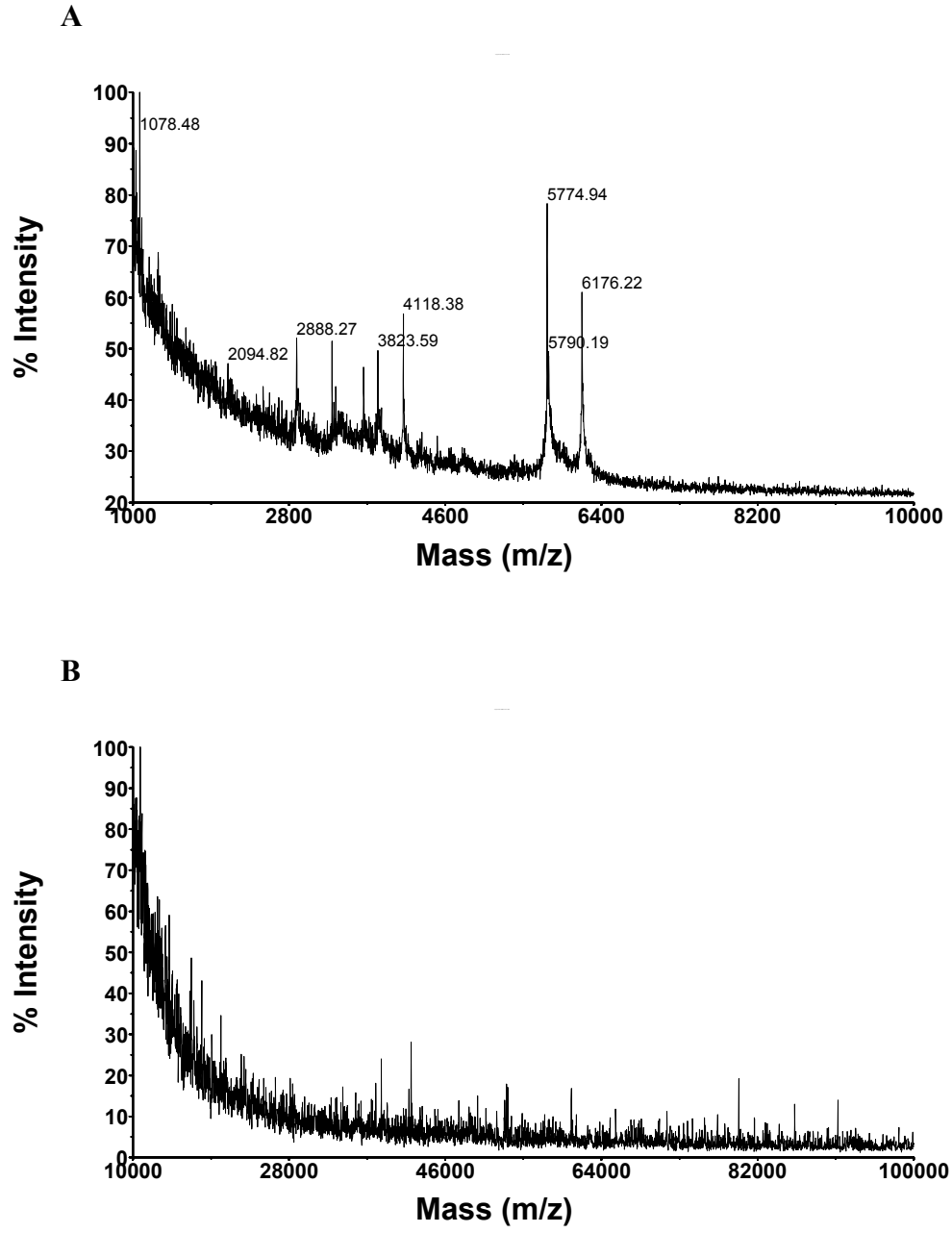


Şekil 4.32. HB-C3S3 örneğine ait A) 280, B) 205 ve C) 260 nm'de gözlenen C18 analiz sonuçları (*Örnek hacmi: 500 µl, akış hızı: 1,5 ml/dak, ilk 25 dakika %0,1 oranında TFA içeren su 25. dakikadan sonra %30'luk asetoniitril çözeltisi*)

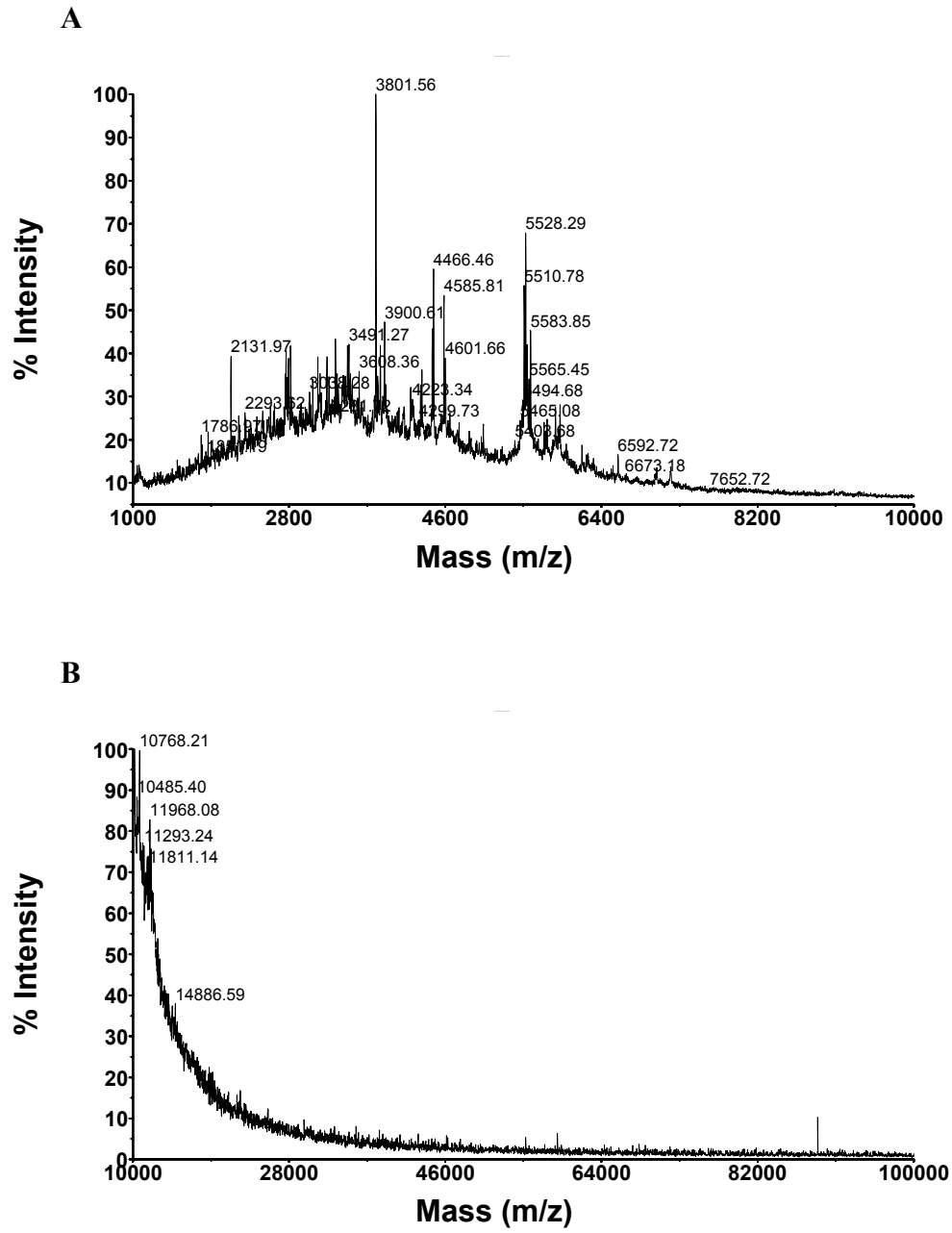
Şekil 4.33- 4.35 arasında HB-C3S3 örneğinin C18 çıktılarının MALDI/MS profilleri görülmektedir.



Şekil 4.33. HB-C3S3C1 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).



Şekil 4.34. HB-C3S3C2 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).



Şekil 4.35. HB-C3S3C3 örneğinin kütle spektrumu. A) Alt bölge (1000-10000 Da), B) Üst bölge (10000-100000 Da).

4.8. Örneklerin Protein ve Şeker Derişimleri (2. Aşama)

Tablo 4.4. Örneklerin protein, şeker derişimleri ve MALDI/MS pikleri

Örnekler	Protein derişimi (µg/ml)	Şeker derişimi (mg/ml)	MALDI/MS pikleri
HB3	1400	15,26	1183.35, 2233.75, 2416.87, 2597.25, 3799.63, 3860.73, 10207.05, 10589.92, 12245.22, 12904.37
HB-C1	5	3,82	5768.72, 5784.19, 10065.41, 10342.84, 10736.43, 13066.12
HB-C2	3,3	3,45	1010.14, 1290.22, 2506.99, 3336.86, 3821.25, 5771.34, 5787.19, 5755.90, 10876.64, 11744.29
HB-C3	500	2,96	1291.03, 1420.14, 2233.88, 2507.44, 3337.05, 3473.63, 3800.53, 3821.94, 5289.51, 5510.15, 7283.61, 12898.05, 16927.66
HB-C1S1	–	2,40	1010.22, 1079.02, 1101.01, 1290.14, 1221.26
HB-C1S2	–	1,02	1078.59
HB-C2S1	–	1,38	1289.56, 1419.79, 2127.76, 3481.17, 5771.01
HB-C2S2	–	1,74	1289.81, 5769.60
HB-C2S3	–	0,31	1009.74, 1289.70, 10110.08, 10876.64
HB-C3S1	–	0,52	Yapılmadı
HB-C3S2	–	0,13	Yapılmadı
HB-C3S3	–	0,43	Yapılmadı
HB-C3S1C1	–	0,12	1079.33, 2094.34, 2109.86, 2125.33, 3658.34, 3673.45, 10012.47, 11050.43
HB-C3S1C2	–	0,55	1009.69, 1079.59, 1290.44, 3658.79, 3674.32, 3690.61
HB-C3S2C1	–	0,54	1000.24, 1015.17, 1830.57, 3659.05, 3674.66, 3690.50
HB-C3S2C2	–	0,04	1079.54, 1298.73, 2094.78, 2110.58, 3295.68, 3658.76, 4118.85, 6176.80
HB-C3S3C1	–	0,07	1298.83, 1831.71, 3658.94, 3674.59, 3690.37
HB-C3S3C2	–	0,12	1078.48, 2888.27, 3823.59, 4118.38, 5774.94, 5790.19, 6176.22
HB-C3S3C3	1,5	0,23	2131.97, 3801.56, 3900.61, 4466.46, 4585.81, 5510.78, 5528.29, 5583.85, 10768.21, 11968.08

Tablo 4.4'te 2. aşamada HPLC analizlerinde elde edilen fraksiyonların protein ve şeker derişimleri ve bu fraksiyonların MALDI/MS profillerinde görülen belirgin pikler gösterilmiştir. Görüldüğü gibi başlangıç örneği olan HB3'te hem protein hem de şeker derişimi oldukça yüksektir. HB3 örneğinin C18 analizi sonucu elde edilen C1, C2 ve C3 örneklerinde protein bulunmasına rağmen bu fraksiyonların SCX çıktılarında Bradford metodu ile protein tespit edilememiştir. Yalnızca C3S3 fraksiyonunun C18 analizi sonucu elde edilen 3. pikte çok düşük derişimde protein tespit edilmiştir. Örneklerin şeker derişimi, fenolsülfürik asit metodu kullanılarak belirlenmiştir. HB3 örneği ve bu örneğin C18 çıktıları olan C1, C2 ve C3 fraksiyonlarında şeker derişimlerinin yüksek olduğu görülmektedir. C3S2C2 ve C3S3C1 fraksiyonları dışında diğer örneklerde kayda değer şeker derişimleri tespit edilmiştir.

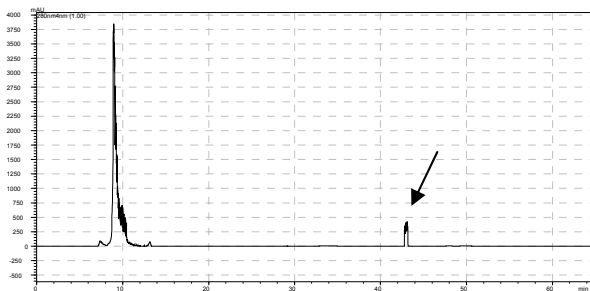
5. TARTIŞMA

Mesane kanseri yaygın kanser türlerinden olup, olguların yaklaşık % 70'i yüzeysel mesane tümörleridir. Yüzeysel mesane tümörlerinin tedavisinde transüretal mesane tümörü rezeksiyonu sonrası intravezikal tedaviler tümörün temizlenmesi ve tekrarının önlenmesi açısından önemli olmaktadır. En sık kullanılan intravezikal tedavilerden birisi canlı BCG'nin mesane içerisine verilmesi şeklindedir. Ancak BCG'nin patojen bir tür olması, birçok yan etkilerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle BCG'ye alternatif olabilecek farklı mikobakteri türleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (4). *M. phlei* hücre duvarı ekstresi ve *M. phlei* hücre duvarı-DNA kompleksinin mesane kanserinde etkili olduğu gösterilmiştir (5, 6). *M. phlei*'nin yanı sıra *M. smegmatis*'in de benzer aktivite gösterdiği saptanmıştır (8). Bu durum başka mikobakteri türlerinde de aktiviteye rastlanabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma, “Mesane Tümörü Tedavisinde Etkili Olabilecek Mikobakteri Türleri ve Bu Etkiden Sorumlu Hücre Duvarı Bileşenlerinin Araştırılması” isimli SANTEZ projesinin son kısmını oluşturmaktadır. İlk kısımda *M. phlei*'nin hücre duvarı ekstrelerinin sitokin aktivasyonundaki etkileri incelenmiştir. İkinci kısımda ise 95 mikobakteri suşunun hücre duvar ekstrelerinin sitokin aktivasyonları belirlenmiş ve sitokin aktivasyon değerleriyle birlikte patojenlik ve üreme hızları da dikkate alınarak 12 suş aday olarak seçilmiştir. Bu mikobakterilerden ön deneylerde sitotoksik aktivite tespit edilemeyen *M. vaccae* ve *M. aichiense* ve aktiviteleri yetersiz bulunan *M. gadium*, *M. obuense*, *M. aurum* ve *M. tokaiense* elenmiştir. Tablo 4.1'de bu suşların ön deneylerde tespit edilen IC₅₀ değerleri gösterilmiştir. Burada *M. phlei* de dahil 7 mikobakteri suşunun sitotoksik aktivitelerinin *M. diernhoferi*'nin aktivitesi yanında oldukça zayıf kaldığı görülmektedir. Sonuçlar, patojen olan *M. bovis*'e alternatif olarak kabul edilen ve üzerine araştırmalar yapılan *M. phlei*'den daha etkili ve patojen olmayan başka mikobakteri türlerinin olabileceğini düşündürmektedir.

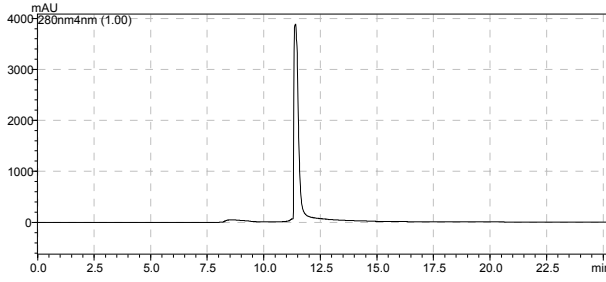
Eleme sonrasında kalan 6 suşun sonikasyon ile elde edilen supernatanlarında IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Bunlar içerisinde yalnızca *M. agri*'nin IC₅₀ değerinin yüksek olduğu, diğer suşların ise birbirine yakın değerler gösterdiği görülmektedir. Standart sapmaların yüksek olması nedeniyle uygun mikobakterilerin belirlenmesinde IC₅₀ değerlerinin tek başına değerlendirilmesinin uygun olmayacağına, sitokin aktivasyon sonuçlarının da göz önüne alınması gerektiğine karar verilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucu *M. brumae* ile çalışılması uygun bulunmuştur. Ayrıca literatürde *M. brumae* ile ilgili bu tarz bir çalışma bulunmamaktadır.

M. brumae'nin sonikasyonu sonucu elde edilen supernatan HPLC ile ileri düzeyde ayrıştırılıp aktiviteyi sağlayan bileşenin tespitine çalışılmıştır. Bazı yöntem farklılıkları ile birlikte ayrıştırma işlemi iki defa tekrarlanmıştır. İki aşama arasındaki en önemli yöntem farklılıklarından biri ilk aşamada supernatanın bir kısmının aseton ekstraksiyonuna tabi tutulmasıdır. Hem sonikasyon sonrası supernatan (B2) hem de aseton ekstresi (B3) aynı elüsyon şartlarında HPLC ile ayrıştırılmaya çalışılmıştır. Her iki örneğin analizinden de ikişer pik toplanmıştır. Bazı analizlerde alıkonma süresi 40-50 dakika arasında olan üçüncü bir pik daha gözlenmiş ancak analizlerin büyük çoğunluğunda gözlenmediği için değerlendirmeye alınmamıştır. Şekil 5.1'de 3. pikin de gözlendiği aseton ekstraksiyonu ile elde edilen B3 örneğine ait C18 analiz sonucu görülmektedir.



Şekil 5.1. B3 örneğine ait 280 nm'de gözlenen C18 analiz sonucu (örnek hacmi: 1 ml, akış hızı: 2 ml/dak, gradient: 60 dakikada 0'dan % 60'a % 0.1 TFA içeren asetonitril).

Aseton ekstresi ve sonikasyon sonrası supernatanın HPLC elüsyon profilleri birbirine benzemekle birlikte, aseton ekstresinde 1. pikin intensitesinin düştüğü hatta bazı analizlerde kaybolduğu görülmüştür (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. B3 örneğine ait 280 nm’de gözlenen C18 analiz sonucu (örnek hacmi: 1 ml, akış hızı: 1 ml/dak, gradient: 60 dakikada 0’dan % 40’a % 0,1 TFA içeren asetronitril).

Tablo 4.3’de örneklerin sitokin aktivasyon düzeyleri incelendiğinde, supernatan C18 çıktısı 1. pikin (B2-C1 örneği) TNF- α aktivitesinin diğer fraksiyonlara göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu pikin MALDI/MS profili incelendiğinde 1793, 1832 civarı molekül ağırlığına sahip yapıların sitokin aktivasyonunda etkili olduğu söylenebilir. Ancak aseton ekstraksiyonu sonrası elde edilen örneğin C18 1. piki olan B3-C1 fraksiyonunun sitokin aktivasyonunun B2-C1’e göre oldukça düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca aseton ekstraktında, supernatanda görülen 1793 Da molekül ağırlığına sahip pik de kaybolmuştur. Bu durum B2-C1 örneğinde yer alan aktiviteden sorumlu yapının sulu ortamda çözünen ve organik faza geçmeyen bir yapı olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle 2. aşamada yapılan ayırmalarda aseton ekstraksiyonundan vazgeçilmiştir.

Bu çalışmada aktiviteden sorumlu olduğu düşünülen yapıların molekül ağırlıkları *M. phlei* ile yapılan çalışmada tesbit edilen (13) yapıların molekül ağırlıkları ile karşılaştırıldığı zaman (10000-12000 Da) nisbeten düşük olduğu görülmektedir. Bu farklılık mikobakteri suşları arasındaki farklılıklardan olabilir. Elde edilen düşük molekül ağırlıklı *M. brumae* ekstrelerinde antifungal aktivite tesbit edilememiştir. Bu da *M. phlei* ile elde edilen sonuçlarla farklılık oluşturmaktadır. Ancak, elimizdeki semikantitatif yöntemlerle çok düşük derişimli örnekler elde edilmekte, bu durum ise sonuçların değerlendirmesini etkilemektedir.

2. aşamada *M. brumae* hücre duvarı ekstrelerinin HPLC ile daha ince ayırımı amaçlanmıştır. 1. aşamadan farklı olarak örnekler iki boyutlu ayırma tabi tutulmuştur. 1. boyut ayırım ters faz kromatografi kolonu (C18), 2. boyut ayırım ise kuvvetli katyon değiştirici kolon (SCX) ile sağlanmıştır. Hem 1. hem de 2. aşamada yapılan analizlere ait grafikler incelendiğinde özellikle de SCX kolonda istenen nitelikte bir ayırımın gerçekleştirilemediği görülmektedir. Özellikle aynı örneğin aynı şartlarda kolona yüklenmesi sonucu aynı pik farklı alıkonma sürelerinde elüe

olabilmektedir. Her ne kadar preparatif bir ayırım amaçlanıyor olsa da, analizlerde bir maddenin alıkonma süresinin bilinmesi önemlidir. Analizlerdeki bu tutarsızlıkların farklı nedenleri olabileceği düşünülmektedir. Büyük hacimdeki lupa yüklenen örnek hacminin preparatif bir analiz için oldukça düşük olması, semipreparatif olan pompaların özellikle düşük akış hızlarını sağlayamaması ve bu nedenle düşük akış hızlarında gradient gerektiren analizlerin çoğu zaman gerçekleştirilememesi ve sık sık basınçla ilgili problemler yaşanması bu nedenler arasında sayılabilir.

HPLC analizlerinde toplanan fraksiyonlarda ne tür moleküller olabileceği hakkında fikir yürütmek için örneklerin MALDI/MS profilleri yanı sıra protein ve şeker derişimlerine bakılmıştır (Tablo 4.4). C18'e girecek supernatanda (HB3 örneğinde) protein derişimi oldukça yüksek olmasına rağmen, C18 çıktılarında özellikle de C1 ve C2 örneklerinde protein derişiminin düştüğü, C3 örneğinde protein derişiminin diğerlerine göre nispeten yüksek olduğu görülmektedir. Başlangıçtaki proteinin büyük kısmı C3 fraksiyonunda toplanmıştır. Ancak C3 örneğinin ne SCX ne de C18 çıktılarında kayda değer bir protein derişimine rastlanmıştır. Bu durum başlangıçtaki proteinin analizler sırasında fraksiyonlara dağıldığı ve Bradford yöntemi ile saptanamayacak kadar seyreltiğini düşündürmektedir. Ayrıca fraksiyonlar içerisindeki bazı maddelerin mevcut proteinin tayinini engellemiş olması da mümkündür. Bu fraksiyonlarda protein dışında 280 nm'de absorbans veren aromatik halkalı başka yapılar bulunması ihtimali de mevcuttur. Nitekim şeker analizi sonucu protein tespit edilemeyen örneklerin çoğunda şeker tespit edilmiştir. Bu örneklerin HPLC profillerine bakıldığında çoğunun 280 nm'de oldukça düşük absorbanslar verdiği görülmektedir. Bunlardan C3S2C2 ve C3S3C1 dışındakilerde kayda değer şeker derişimlerine rastlanmış olup bunların mikobakteri hücre duvarının tipik bileşenleri olan glikanlar (örneğin, LAM, LM, PIM vb.) ve mkobiaktin, eksokelin gibi sideroforlar olabileceği düşünülmektedir. Mikolilarabinogalakattan peptidoglikan yapısı parçalanıp peptidoglikanlar, arabinogalakattanlar ve mikolik asitler farklı fraksiyonlara dağılmış olabilir. C3S2C2 ve C3S3C1 örneklerinde ise ne önemli düzeyde şeker (sırasıyla 0.04 ve 0.07 mg/ml) ne de protein saptanmıştır. Ayrıca 280 nm'deki absorbansları da

oldukça düşük olan bu piklerin mikolik asitler (MA 1000-6000 Da civarı) olabileceği düşünülmektedir.

M. phlei ile yapılan çalışmalarda da sitokin aktivasyonuna yol açan aktivitenin daha çok hücre duvarının suda çözünen bileşenlerinde bulunduğu ve bu yapıların 3808, 9207, 11533, 12460 and 21587 Da molekül ağırlığına sahip peptitler olabileceği sonucuna ulaşılmıştı (8, 13). Bu bulgular Wang grubunun bulguları ile benzerlik göstermektedir (57). Bu araştırmacıların izole ettiği molekül, 60 ila 90 kDa arasında molekül ağırlığına sahip aseton ve etanolde çözünürlüğü düşük ve ısıya dayanıklı olan bir glikandır. Bu bulgular arasındaki tek fark molekül ağırlıkları olup bu durum türler arasındaki farklılıklardan veya ekstrakt hazırlama ve molekül ağırlığı tayin etme metotlarındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

M. brumae ile elde edilen bulguların da benzer olacağı, ancak molekül ağırlıkları arasında yine bazı farklılıklar bulunduğu anlaşılmaktadır. İlk çalışmalarda MA yaklaşık 1800 ve 3000 arası yapıların sitokin aktivasyonuna yol açtığı ancak bu yapılarda mikolik asit ve peptidoglikanların bir arada olduğu gözlenmiştir. 2. aşamada ise 1. aşamadan farklı olarak mikolik asit ve glikanlar birbirinden daha iyi ayrılabilirdi için sitokin aktivasyonu ve sitotoksikite deneyi sonuçları etkili yapılar hakkında daha iyi bilgi verecektir.

Elimizdeki verilerle moleküllerin yapıları hakkında fikir yürütmek oldukça zordur. MALDI/MS analizleri, içeriğini bilmediğimiz bu örneklerin molekül ağırlıkları hakkında fikir sahibi olmamızı sağlayacaktır. Fakat ileri bir yapı analizi için NMR, MS/MS gibi yapıyı aydınlatmaya yönelik yöntemler kullanılması daha yararlı olacaktır. Bu moleküllerin sitokin aktivasyonu ve sitotoksik etkilerinin tespit edilmesi ile bu yapılar hakkında daha anlamlı değerlendirmeler yapılacaktır. Hem moleküllerin aktivitelerinin doğru tespiti hem de yapılarının aydınlatılmasında ön koşul ileri düzeyde iyi bir saflaştırma ve kantitatif ayırma sistemi ile daha fazla miktarda örnek ayırımı yapılarak çalışmanın tekrarlanması yararlı olabilir.

SONUÇ

Bu çalışmada;

- 1- MTT ve TNF alfa sonucu seçilen 12 aday mikobakteriden *M. brumae* seçildi.
- 2- Aseton ekstraksiyonu yapılan ve yapılmayan hücre lizatları HPLC ile ayrılarak TNF alfa sonuçlarına bakıldı. Suda çözünen fraksiyonda aktivite bulunduğu görüldü. Bu fraksiyon peptidoglikan ve mikolik asit içerikliydi. Etkili yapılar, 1800-3000 Da civarı molekül ağırlığına sahipti.
- 3- C18 ve SCX kombinasyonu ile daha ileri düzeyde bir ayrıştırma ile mikolik asit ve glikanların ayırımına çalışıldı.
- 4- Bu ayrılan fraksiyonların sitokin aktivasyonu ve sitotoksik etkisinin incelenmesi gerekmektedir. Daha ileri çalışmalarda MS/MS, NMR gibi yöntemlerle yapılar daha iyi aydınlatılabilir.

KAYNAKLAR

1. Singleton, P. (2004). Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine.
2. Wei, M. Q., Mengesha, A., Good, D. ve Anne, J. (2008). Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. Cancer Letters, 259, 16–27.
3. Aydın, S., Geçkil, H., Çaylak, E. ve Kılıç, N. (2004). Mikroorganizmaların Kanser Tedavisinde Kullanımı. Fırat Tıp Dergisi, 9(2), 30-34.
4. Morales, A., Phadke, K. ve Steinhoff, G. (2009). Intravesical Mycobacterial Cell Wall-DNA Complex in the Treatment of Carcinoma In Situ of the Bladder After Standard Intravesical Therapy Has Failed. The Journal of Urology, 181, 1040-1045.
5. Morales, A., Chin, J. L. ve Ramsey, E. W. (2001). Mycobacterial cell wall extract for treatment of carcinoma in situ of the bladder. The Journal of Urology, 166, 1637.
6. Menard, S., Reader, S., Filion, B., Filion, M. C. ve Philips, N. C. (2001). Antiproliferative activity of Mycobacterium phlei DNA and Mycobacterium bovis strain bacillus calmette guerin DNA towards human bladder cancer cells. European Journal of Cancer, 37, 5216.
7. Alexandroff, A. B., Jackson, A. M., O'Donnell, M. A. ve James, K. (1999). BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. Lancet, 353, 1689-94.
8. Keskin, M.S. (2004). “*M. Phlei*, *M. Smegmatis*: Patojen Olmayan Mikobakteri Türlerinin Antitümöral Etkileri”. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ankara.
9. Jemal, A., Tiwari, R. C., Murray, T., Ghafoor, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E. J. Ve Thun, M. J. (2004). Cancer statistics, 2004. CA Cancer J Clin, 54, 8 –29.
10. Fidaner, C., Eser, S. Y. ve Parkin, D. M. (2001). Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. Eur J Cancer, 37, 83-93.
11. Brausi, M., Rizzi, F. Ve Bettuzzi S. (2008). Eur Urol Suppl, 7: 615-617

12. Lamm, D. L., Van Der Meijen, P. M., Morales, A. ve ark. (1992). Incidence and treatment of complications of Bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *Journal of Urology*, 147, 596-600.
13. Orhan, B., Büber, E., Keskin, S., Çelikbıçak, Ö., Salih, B., Alp, A., Sarıbaş, Z., Özen, H. ve Açıan, N. L. Therapeutic Effects of *Mycobacterium phlei* Cell Wall Extracts. *Turk J Med Sci (Baskıda)*.
14. Bon, A. L. ve Tough, D. F. (2002). Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Current Opinion in Immunology*, 14, 432–436.
15. Belardelli, F. ve Ferrantini, M. (2002). Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *TRENDS in Immunology*, 23, 201-208.
16. Chabalgoity, J. A., Baz, A., Rial, A. ve Grille, S. (2007). The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 18, 195–207.
17. Dunlop, R. J. ve Campbell, C. W. (2000). Cytokines and advanced cancer. *Journal of Pain and Symptom Management*, 20/3, 214-232.
18. Hopkins, S. J. (2003). The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine*, 5, 45–57.
19. Loppnow, H. (2001). Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Der Internist*, 42, 13-27.
20. Verri, W. A., Cunha, T. M., Parada, C. A., Poole, S., Cunha, F. Q. ve Ferreira, S. H. (2006). Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?. *Pharmacology & Therapeutics*, 112, 116–138.
21. Jawetz, E., Melnick, J. L. ve Adelberg, E. A. (1972) *Tıbbi Mikrobiyoloji* (M. Akman ve E. Gülmezoğlu, Çev.). Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
22. Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 319–354.

23. Du, Y., Qi, Y., Yu, L., Lin, J., Liu, S., Ni, H., Pang, H., Liu, H., Si, W., Zhao, H. ve Wang, C. (2010). Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) isolated from cattle in northeast and northwest China. *Research in Veterinary Science*.
24. Soo, P., Horng, Y., Chang, K., Wang, J., Hsueh, P., Chuang, C., Lu, C. ve Lai, H. (2009). A simple gold nanoparticle probes assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* complex from clinical specimens. *Molecular and Cellular Probes*, 23, 240–246.
25. Kullavanijaya, P. (1999). Atypical mycobacterial cutaneous infection. *Clinics in Dermatology*, 17, 153–158.
26. Barry, C. E., Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A. ve Yuan, Y. (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res*, 37, 143-179.
27. Liu, J., Barry, C. E., Besra, G. S. ve Nikaido, H. (1996). Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 29545-29551.
28. Chatterjee, D. (1997). The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1, 579-568.
29. Alsteens, D., Verbelen, C., Dague, E., Raze, D., Baulard, A. R. ve Dufrene, Y. F. (2008). Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 456, 117–125.
30. Tam, P. H. ve Lowary, T. L. (2009). Recent advances in mycobacterial cell wall glycan biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, 618–625.
31. Brennan, P. J. (1989). Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Reviews of Infectious Diseases*, 11, 420-430.
32. Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83, 91–97.

33. Salman, M., Brennan, P. J. ve Lonsdale, J. T. (1999). Synthesis of mycolic acids of mycobacteria: an assessment of the cell-free system in light of the whole genome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1437, 325-332.
34. Lima, V. M. F., Bonato, V. L. D., Lima, K. M., Dos Santos, S. A., Dos Santos, R. R., Gonçalves, E. D. C., Faccioli, L. H., Brandão, I. T., Rodrigues-Junior, J. M. ve Silva, C. L. (2001). Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and no in tuberculosis. *Infection and Immunity*, 69, 5305-5312.
35. Vignal, C., Gue'rardel, Y., Kremer, L., Masson, M., Legrand, D., Mazurier, J. ve Ellass, E. (2003). Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF- α and IL-8 secretion by a cd14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 171, 2014–2023.
36. Nigou, J., Gilleron, M., Rojas, M., Garcia, L. F., Thurnher, M. ve Puzo, G. (2002). Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes and Infection*, 4, 945–953.
37. Chatterjee, D., Hunter, S. W., Mcneil, M. ve Brennan, P. J. (1992). Lipoarabinomannan multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 6228-6233.
38. Gue'Rardel, Y., Maes, E., Briken, V., Chirat, F., Leroy, Y., Loch, C., Strecker, G. ve Kremer, L. (2003). lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 36637–36651.
39. Nigou, J., Gilleron, M., Cahuzac, B., Boune'ry, J. D., Herold, M., Thurnher, M. ve Puzo, G. (1997). The phosphatidyl-*myo*-inositol anchor of the lipoarabinomannans from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Gue'rin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 23094–23103.

40. Salman, M., Lonsdale, J. T., Besra, G. S. ve Brennan, P. J. (1999). Phosphatidylinositol synthesis in mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1436, 437-450.
41. Drechsel, H. ve Jung, G. (1998). Peptide siderophores. *Journal of Peptide Science*, 4, 147-181.
42. Vergne, A. F., Walz, A. J. ve Miller, M. J. (2000). Iron chelators from mycobacteria (1954–1999) and potential therapeutic applications. *The Royal Society of Chemistry*, 17, 99-116.
43. Hall, R. M. ve Ratledge, C. (1984). Mycobactins as chemotaxonomic characters for some rapidly growing mycobacteria. *Journal of General Microbiology*, 130, 1883-1892.
44. Brandau, S. ve Suttman, H. (2007). Thirty years of BCG immunotherapy for non muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61, 299-305.
45. Razack, Azad H. A. (2007). *Bacillus Calmette–Guérin* and bladder Cancer. *Asian Journal of Surgery*, 30(4), 302-9.
46. Sweet, L., Zhang, W., Fewell, H., Serianni, A., Boggess, W. ve Schorey, J. (2008). *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids require specific acetylation and methylation patterns for signaling through toll-like receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 33221-33231.
47. Takeuchi, O. ve Akira, S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *International Immunopharmacology* 1, 625–635.
48. Underhill, D. M. ve Ozinsky, A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology*, 14:103–110.
49. Seya, T., Matsumoto, M., Tsuji, S., Begum, N. A., Azuma, I. ve Toyoshima, K. (2002). Structural–functional relationship of pathogen-associated molecular patterns: lessons from BCG cell wall skeleton and mycoplasma lipoprotein M161Ag. *Microbes and Infection* 4, 955–961.

50. Yuksel, Z. S., Buber, E., Kocagoz, T., Alp, A., Saribas, Z. Ve Acan, N. L. (2011). Mycobacterial Strains That Stimulate the Immune System Most Efficiently as Candidates for the Treatment of Bladder Cancer. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20, 24-28.
51. Crimmins, D. L. (1997). Strong cation-exchange high performance liquid chromatography as a versatile tool for the characterization and purification of peptides. *Analytica Chimica Acta*, 352, 21-30.
52. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
53. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. ve Yuan C. Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339, 69–72
54. Twentyman, P. R. ve Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*, 56, 279–285.
55. Vorm, O., Roepstorff, P. ve Mann, M. (1994). Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal Chem*, 66, 3281-3287.
56. Cohen, S. ve Chait, B. T. (1996). Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins. *Anal. Chem*, 68, 31-37.
57. Wang, R., Klegerman, M. E., Marsden, I., et al. (1995). An anti-neoplastic glycan isolated from *Mycobacterium bovis* (BCG vaccine). *Biochem J*, 311, 867-872.