İNSAN SERVİKAL KARSİNOMA HÜCRE DİZİSİNDE NİTRİK OKSİT İLE YÖNLENDİRİLEN HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDE HİDROJEN PEROKSİDİN ETKİSİ

Effects of Hydrogen Peroxide on Nitric Oxide Mediated Cellular Death in Human Cervical Carcinoma Cell Line

Yasemin BASKIN[1], Nur OLGUN[2]

[1]Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, İZMİR

[2]Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, İZMİR

İletişim:
Yasemin BASKIN,
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü Göztepe, 35350, İZMİR
Tel: 0232 285 3162
Faks: 0232 224 5989
E-posta: ybaskin65@yahoo.co.uk

ÖZET

Amaç: Nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROT) gibi organ mikroçevre faktörleri ve onların apoptoz ile etkileşimleri, normal hücrelerin ve kanser hücrelerinin davranışlarını etkileyebilir. Bu olasılık sağaltım stratejileri için yeni hedefler sağlayabilir. NO'nın tümör hücresinin yaşamını sürdürmesi, redoks homeostazı; tümör hücrelerinin genetik ve epigenetik yapılanması gibi olaylarda rolü bulunmaktadır. Bu çalışmada NO'nın yönlendirdiği hücre ölümünde ROT'un [Hidrojen peroksit (H_2O_2) ile taklit edilmiştir] etkileri araştırılmıştır.

Yöntem: İnsan servikal karsinoma hücre dizisi (HeLa); Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) ile üretilmiştir. Hücrenin yaşamı ve proliferasyonları, niceleyici koloritmetrik bir 3 (4,5 dimetiltiyazol- 2 il)-2,5- difenil tetrazolyum bromid (MTT) deneyi ile taranmıştır. DNA'ya bağlanan boya Hoechst 33342 (HOE 33342) ve propidyum iyodid (PI), nükleer morfoloji ve membran bütünlüğünün kantifikasyonu ve mikroskopik identifikasyonu için ayırt edici boya çalışması olarak kullanılmıştır.

Bulgular: HeLa hücreleri yalnızca L-arjinin (NO uyarıcısı) ile uyarıldığında (NO grubu) % 66± 9.2 hücre ölmüş ve ölen bu hücrelerin % 51±7.3'ü "apoptotik yolak"tan geçerek olmuştur. NO, H_2O_2 varlığında (peroksi nitrit grubu) uyarıldığında daha fazla hücre ölmüş (% 98.3±1.7) ve bu ölümler "nekrotik yolak"tan geçerek olmuştur (% 69.3±5.7). Hücreler H_2O_2 ile uyarıldığında (peroksit grubu) bütün hücreler ölmüş (% 99.3±4.1) ve hücresel ölüm "nekrotik yolak" üzerinden olmuştur (% 85±6.9).

Sonuç: HeLa hücrelerinde L-arjinin (L-arg) ve H_2O_2'nin hücresel ölümü belirgin olarak, fakat farklı yolaklardan giderek arttırdıkları görülmüştür. Ancak birlikte kullanıldıklarında, H_2O_2'nin, L-arg'in yarattığı hücresel ölümü "apoptotik yolak"tan, "nekrotik yolak"a çevirdiği gözlemlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Nitrik oksit, hidrojen peroksit, kanser mikroçevresi, apoptoz, nekroz, servikal karsinoma hücre dizisi.

ABSTRACT

Objective: Organ microenvironment factors such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), and their interactions with apoptosis may influence the behavior of normal and cancer cells. This possibility may provide new targets for therapy strategies. The effect of NO on tumor cell survival is influenced by multiple factors, including the levels of redox homeostasis, and genetic and epigenetic make up of tumor cells. The effects of ROS [mimicked by hydrogen peroxide(H_2O_2)] on NO-mediated cellular death were examined in this study.

Method: Human cervical carcinoma cell line (HeLa) was grown using Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM). Cell survival and proliferations were determined by a quantitative colorimetric MTT assay. The DNA binding dye Hoechst 33342 and propidium iodide (HOE/PI) were used together in a differential dye uptake assay for microscopic identification and quantification of membrane integrity and nuclear morphology.

Results: When HeLa cells were induced by L-arginine (NO inducer) alone (nitric oxide group), 66 $\pm$ 9,2 % of cells died, and of these cells 51 $\pm$ 7,3 % died through an "apoptotic pathway". We found that when NO was induced in the presence of H_2O_2 (peroxynitrite group), more cells died (98, 3 $\pm$ 1, 7 %) through a "necrotic pathway" (69, 3 $\pm$ 5, 7 %). When cells were induced by hydrogen peroxide (peroxide group) all cells died (99, 3 $\pm$ 4, 1 %) and cellular death was through a "necrotic pathway" (85 $\pm$ 6, 9 %).

Conclusion: In HeLa cells L-arginine (L-arg) and H_2O_2 significantly increased cellular death but in distinct pathways. But when treated together the presence of H_2O_2 shifted cellular death caused by L-arg from apoptotic pathway to necrotic pathway.

Key words: Nitric oxide, hydrogen peroxide, cancer microenvironment, apoptosis, necrosis, cervical carcinoma cell line.

GİRİŞ

Apopitoz, nekroz ile ölen hücrelerin yaptığının tersine (şişip, daha sonra eriyip, içeriklerini hücreler arası ortama bırakırlar) DNA parçalanması, kaspazın etkin hale gelmesi, mitokondriyal zar bütünlüğünün bozulması gibi özgün morfolojik ve biyokimyasal özellikler ile kendini gösterir (1). Fas ligant, staurosporin (SS) (protein kinaz c inhibitörü), radyasyon veya nitrik oksit (NO) gibi birçok uyarı şekli apoptoza gidecek şekilde kaspaz zincirini uyarabilir (2).

NO, birçok hücre çeşidinde nitrik oksit sentaz enzimi yardımı ile (NOS), L-arg'in guanido azotu ve moleküler oksijenden üretilmektedir (3). Mikroçevreye bağlı olarak NO, nitrosonyum katyonu, nitroksil anyonu veya peroksinitrit gibi reaktif azot türlerine (RAT) çevrilebilir (3, 4).

Süperoksit ile NO'nun tepkimesi, son derecede reaktif oksidan bir tür olan, peroksinitrit oluşumu ile sonuçlanır. Peroksinitritin in vivo oluşumunun hücre ölümünü gösterdiği düşünülmüştür (5). NO'nun kimyasının süperoksit ve peroksinitrit ile etkileşimi sonucunda, NO'nun DNA hasarı, protein tiyollerin değişimi veya solunum zincirindeki ve Krebs Döngüsü'ndeki mitokondriyal enzimlerin inaktivasyonu gibi toksik etkileri ortaya çıkabilir. Bütün bu tepkimeler NO tarafından uyarılan apoptoza bağlanabilir (6-8).

Apoptozun NO donörleri tarafından uyarılması, endojen NO'dan daha etkindir. Birçok hücre NO donörlerine farklı yanıtlar verir ve yine farklı donörler hücre ölümünü uyarırken farklı kinetikler gösterirler (9). Diğer taraftan farklı RAT'ların sinyal transdüksiyonunda ve gen ekspresyonunda farklılıklara neden olduğu düşünülmektedir. Farklı RAT'lar aynı proteinin işlevsel etkisini arttırabilir veya başka bir işleve değiştirebilir (6, 9).

Bu çalışmanın amacı, kanser tedavisine benzer koşullar için SS ile apoptoz uyarılmış servikal karsinoma hücrelerinde, mikroçevre koşulları üzerinde NO-H_2O_2 etkileşiminin in vitro etkilerini gözlemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücreler ve Deneysel Uygulamalar

Deneylerde insan servikal karsinoma (HeLa) hücre dizisi kullanılmıştır (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nden Aykut Özkul'un armağanıdır). Hücre dizisi Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu'nda (DMEM, Sigma), % 5 fetal sığır serumunda (FBS) (Biochrome KG) ve % 1 penisilin/streptomisin (PS) (Biochrome KG) ile canlandırılmıştır. Hücreler 37 °C'de, % 5 CO_2 ve %95 nem ortamında canlı tutulmuştur.

HeLa hücreleri, aşağıdaki mikroçevre ajanlarının seri sulandırımları ile farklı gruplarda karşılaştırılmışlardır:

1.NO donörü olarak L-arg (0.02 mM-2.00 mM)
2.Geri dönüşlü bir NO inhibitörü olarak N(omega)-Nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) (0.004 mM-0.5 mM)
3.Protein kinaz inhibitörü staurosporin (SS), apoptoz uyarıcısı olarak (0.02 mM-3.0mM)
4.Reaktif oksijen türü üreticisi olarak H_2O_2 (0.004 mM-0.5 mM).

Tüm kimyasallar Sigma'dan temin edilmiştir.

Sitotoksisite Deneyi

HeLa hücreleri, % 2' lik FBS'li DMEM içinde, $1x10^4$ yoğunlukta olacak şekilde 96 gözlü mikrotitre plağına dağıtılmıştır. Tüm deney grupları üçer kuyucukta gerçekleştirilmiş ve en az üçer kez de yinelenmiştir. Hücrelere, çoğalmaya başladıktan sonraki ilk günden itibaren, belirtilen uyarıcılar 24 saat uygulanmıştır. Hücrelerin yaşaması ve proliferasyonları kantitatif kolorimetrik MTT deneyi ile (Chemicon International) değerlendirilmiştir. MTT (3 (4,5 dimetiltiyazol- 2 il)-2,5- difenil tetrazolyum bromid), canlı hücrenin mitokondriyal süksinat dehidrogenaz ile koyu mavi bir formazan ürün verdiği, soluk sarı renkte bir substrattır. MTT stok solüsyonu (5 mg/mL) 100μL olarak kuyucuklara dağıtılmış ve 37°C'de 4 saat bekletilmiştir. Sürenin sonunda MTT alınmış ve 0.04 N HCl 100μL olarak kuyucuklara dağıtılmıştır. Absorbanslar 540 nm test dalga boyu ve 620 nm

ikincil dalga boyunda okutulmuştur. Uyarılmamış hücrelerden elde edilen değerler % 100 kabul edilmiştir. Hücre yaşamının yüzdesi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

P=[(A) uyarılmış hücrelerde/(A) kontrol hücrelerinde] x 100.

Apoptoz ve hücre ölümünün morfolojik olarak değerlendirilmesi

Hücre ölümünün değerlendirilmesi ve kantitasyonu klasik morfolojik kriterler ve aynı zamanda işlevsel vital boyalar kullanılarak yapılmıştır. Hoechst 33342 (HOE 33342, bisbenzimid H 33342, Sigma), çift sarmallı DNA'nın AT'den zengin bölgelerine özgü bir boyadır. Bu yöntem, hücre membranlarının bu iki boyaya geçirgenlikleri arasındaki farklılıklar esas alınarak kurgulanmıştır. Ölü hücreler her iki boyaya geçirgendir. Canlı hücreler her iki boyayı da dışarı atar. Apoptotik hücreler propidyum iyodidi (PI) atar, ancak HOE'yi atamaz. Bu yöntem zamana bağlıdır.

Hücreler boyama başlamadan önce fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra %100 soğuk metanol eklenmiş ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Metanol çekildikten sonra hücreler fosfat tuzu solüsyonu (Phosphate Buffer Saline, PBS) ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra 15 dakika 37 derecede HOE boyası (5 μg/mL) uygulanmıştır. Boyamadan sonra hücreler yine 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Mikroskopiden hemen önce PI (50 μg/mL) uygulanmıştır. Hücreler bir Olympus BHZ, RFCA mikroskop (Japonya) altında, 330 nm eksitasyon dalga boyu ve 420 nm bariyer filtrede incelenmiştir (10). Beş farklı alanda en az 200 hücre sayılarak değerlendirmeler yapılmıştır.

Değerlendirmeler şöyle yapılmıştır:

1.Canlı hücreler: Normal çekirdek, mavi/yeşil soluk kromatin,

2.Apoptotik hücreler:

(erken apoptoz): Çekirdek içinde kromatin yoğunlaşması ve bozulmamış çekirdek sınırları ile hayli yoğun parlak mavi/yeşil kromatin;

(geç apoptoz): Hiçbiri PI ile boyanmamış olduğu için bozulmamış bir sitoplazmik membran içinde çekirdeğin daha küçük cisimlere ayrılması,

3.Nekrotik hücreler:

(erken nekrotik hücreler): Dağılmamış bir çekirdek, hasara uğramış bir sitoplazmik membran ve büyümüş kırmızı bir çekirdek,

(geç nekrotik hücreler): Sitoplazma kaybolmuş ve hasara uğramış/bozulmuş çekirdek membranı ve parlak kırmızı boyanmış, biraz yoğunlaşmış çekirdek.

Nitrit Ölçümü

Griess Ayracı ile nitrit olarak ölçülmüştür. Nitrit, nitrik oksidin hızlı oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. 96 gözlü bir mikrotitre plağında, alınan her 100μL örnek (her kuyucukta başlangıç hücre sayısı $1x10^4$'tür) 100μL Griess Ayracı (eşit volümde %0.2 naftilendiamin dihidroklorid ve %2 sulfanilamid, %5 fosforik asit içinde hazırlanır) ile karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, mikroplak okuyucuda (540 nm) okutulmuştur. Standart olarak sodyum nitrit kullanılmıştır (0128 μM) (11).

İstatistik Analiz

Nitrit değerlendirmeleri ve apoptotik deneyler en az 3 bağımsız deney ile değerlendirilmiştir. Her deney grubunda 8 kuyucuk çalışılmıştır (minimum n=24). İki deney grubu arasındaki karşılaştırma iki-yönlü t-test ile $p<0,05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar deney ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir.

BULGULAR

HeLa Hücrelerinin Doza Bağlı Değişen Yaşayabilirliği

L-arg'in hücre ölümü üzerine anlamlı etkisi 0.5 mM konsantrasyondan sonra başlar ve doza bağlı olarak artar. H_2O_2, yalnız kullanıldığında hücre ölümü üzerine anlamlı etkisi 0.004 mM konsantrasyonda başlar, doza bağımlı olarak

artar. L-arg, sabit konsantrasyonu 0.01mM olan H_2O_2 ile birlikte kullanıldığında hücre ölümü üzerine sinerjik etki gösterirler ve anlamlı etki 0.01 mM konsantrasyonda başlar. NO yanıtları L-NAME ile inhibe edilen grupta hücresel ölüm, yalnızca temel besleyici ortamda yaşatılan kontrol hücreleri ile aynı oranlardadır. Staurosporine (SS) ile oluşturulan sağaltım grubunda hücresel ölümün anlamlı olarak etkilendiği konsantrasyon, 0.04 µM olarak saptanmıştır (Şekil 1).

HeLa hücrelerinde SS, L-arg, H_2O_2 ve L-NAME için hücresel proliferasyonu yaklaşık olarak %100 durduran konsantrasyonları (IC_{100}) içeren bir sitotoksisite testi ile (MTT testi), doz-yanıt eğrileri çizilmiştir. HeLa hücrelerinin yaklaşık IC_{50} dozları SS, L-arg, H_2O_2 ve L-NAME için sırasıyla, 1.050 µM, 875 µM, 31 µM ve >500 µM olarak bulunmuştur. Buna göre, servikal karsinoma hücrelerinde, mikroçevrede ROT bulunuyorsa, 28 kez daha düşük konsantrasyonda L-arg kullanımı ile aynı sitotoksik etki elde edilebilmektedir (Tablo 1).

NO Donörü L-arg Aracılığı İle Oluşan Hücre Ölümünün Özellikleri

Canlı hücreler, Hoechst 33342 ve Propidium Iodide (HOE/PI) ile boyandıklarında, çekirdekleri olağan, mavi/yeşil soluk boya almış düzenli kromatin yapıları olan bir morfoloji sergilerler (Şekil 2A). İki mM konsantrasyonda L-arg ile 24 saat süresince bekletilen HeLa hücrelerinde, morfolojik değişimler gözlenir (Şekil 2C). Apoptotik sürecin erken evresindeki hücrelerin çekirdek ve sitoplazma zarları sağlamdır. Ancak çekirdek içinde kromatin yoğunlaşması gözlenir. Hücreler 1 mM L-arg ile birlikte apoptoz uyarıcı etkisi bilinen SS (1µM) ile bekletildiğinde morfolojik göstergeler apoptozun geç evrelerini tanımlar (Şekil 2B). Apoptozun geç evresinde bulunan bu hücreler, sitoplazmik bir zar ile çevrilmiş küçük çekirdeksel yapılar olarak tanımlanan çekirdeksel parçalanmalar gösterirler. Buna karşın hücreler H_2O_2 varlığında, çok sayıda boşluk içeren, soluk, canlı hücrelere karşın daha küçük bir sitoplazma; tamamen sağlam bir çekirdek ile hasarlı bir sitoplazma zarı olarak belirgin nekrotik hücre morfolojisi sergilerler (Şekil 2D).

NO'nun Neden Olduğu Apoptotik Hücre Ölümü ve H_2O_2 Varlığı

Yirmi dört saat süresince 0.1 mM H_2O_2 ile oluşturulan oksijen radikallerinden zengin mikroçevre ortamında tutulan HeLa hücrelerinin %99.3±4.1'i ölmektedir. Bu hücrelerin % 85±6.9'u nekrotik yolla; % 14±2.5'i apoptotik yolla ölmektedir. NO donörü L-arg ile oluşturulan mikroçevrede aynı sürede daha az hücre ölmektedir; %66±9.2. Ancak bu hücrelerin, %51±7.3'ü apoptotik yolla, %15±0.8'i nekrotik yolla ölmektedir. İki mM NO donörü L-arg ile oluşturulan NO'dan zengin ortamda gözlenen bu ölüm yüzdesi, ortama 0.01mM H_2O_2 eklenerek peroksinitritten zengin bir mikroçevre oluşturulduğunda, % 98.3±1.7'ye artar. Üstelik bu hücrelerin % 69.3±5.7'si nekrotik yolla ölmektedir (Şekil 3A).

NO ile Yönlendirilen SS ile Uyarılmış Apoptoz

HeLa hücrelerinde kimyasal bir ajan olan SS, apoptotik temelli bir sağaltım yaklaşımına model oluşturmak üzere kullanılmıştır. Sağaltım modeli grubunda hücrelerin %69.7±0.5'i ölmüş, bu ölümlerin %59.7±3.9'i apoptotik

Tablo 1: Sağaltım ve mikroçevre bileşenlerinin HeLa hücrelerinindeki IC_{50} dozları*

Etken	Sitotik IC50 dozları (µM)
L-Arg	875
L-Arg +H_2O_2 (10µM)	30
+H_2O_2	31
Staurosporine	1.05
LNAME	>500

*Etkenlerin yoğunluğuna karşı yaşayan hücrelerin yüzdesi (% yaşayan hücre) olarak grafiklenen her bir değer en az üç ölçüm sonucunda türetilmiştir. Kontrol hücrelerine karşı, hücresel proliferasyonu % 50 durduran etken konsantrasyonu (µM) sitotoksik (IC_{50}) dozu olarak kaydedilmiştir.

yolla, %10±4.0'ü nekrotik yolla olmuştur. Buna karşın NO zengin ortamda SS etkisi ile hücrelerin %90.3±4.5'i ölmüş, bunların %80.0±7.7'si apoptotik yolla olmuştur. Staurosporinin neden olduğu apoptotik hücre ölümü endojen kaynaklı NO üretimi uyarıldığında, %34 artmıştır. SS ile uyarılan apoptotik hücre ölümü, NOS inhibitörü L-NAME kullanılarak NO üretimi durdurulduğunda ancak %32 oranında engellenebilmektedir.

L-NAME ile gözlenen hücre ölümünde, kontrol hücrelerinden anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3A).

Hücre Dışı Bölgede NO Yanıtlarında Görülen Değişim ve Hücrelerin Nekrotik Ölüm Yüzdeleri

H_2O_2 ile mikroçevre ortamı, reaktif oksijen türleri (ROT) açısından zenginleştirildiğinde, hücre ölümleri ağırlıklı olarak (%85±6.9) nekrotik yolla olmaktadır. Bu grubun hücre dışı nitrit içeriği 106±0.4 µM olarak saptanmış ve tüm gruplar içerisinde nitrit içeriği yanında nekrotik ölüm yüzdesi en yüksek grup olarak yer almıştır. L-arg ile endojen NO sentezi uyarılmış ve eş zamanlı olarak H_2O_2 uygulanan HeLa hücrelerinde, hücre dışı nitrit içeriği 103±0.4 µM olarak saptanmıştır. Nekrotik hücre ölümü H_2O_2 uygulanan gruptan daha düşük (%69.3±5.7), ancak belirgin olarak baskın olan ölüm şeklidir. L-arg ile uyarılmış hücrelerde (5.5±0.08 µM), L-NAME (5.45±0.1 µM) ve kontrol grubuna (5.8±0.08 µM) yakın nitrit değerleri ölçülmüştür. Her üç grupta da apoptotik ölüm baskındır. SS ile eş zamanlı olarak L-arg ile uyarılan hücrelerde hücre dışı nitrit miktarı 7.2±0.57 µM olarak artmış ancak kontrol grubundan anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu grupta da apoptotik ölüm baskındır (Şekil 3B).

TARTIŞMA

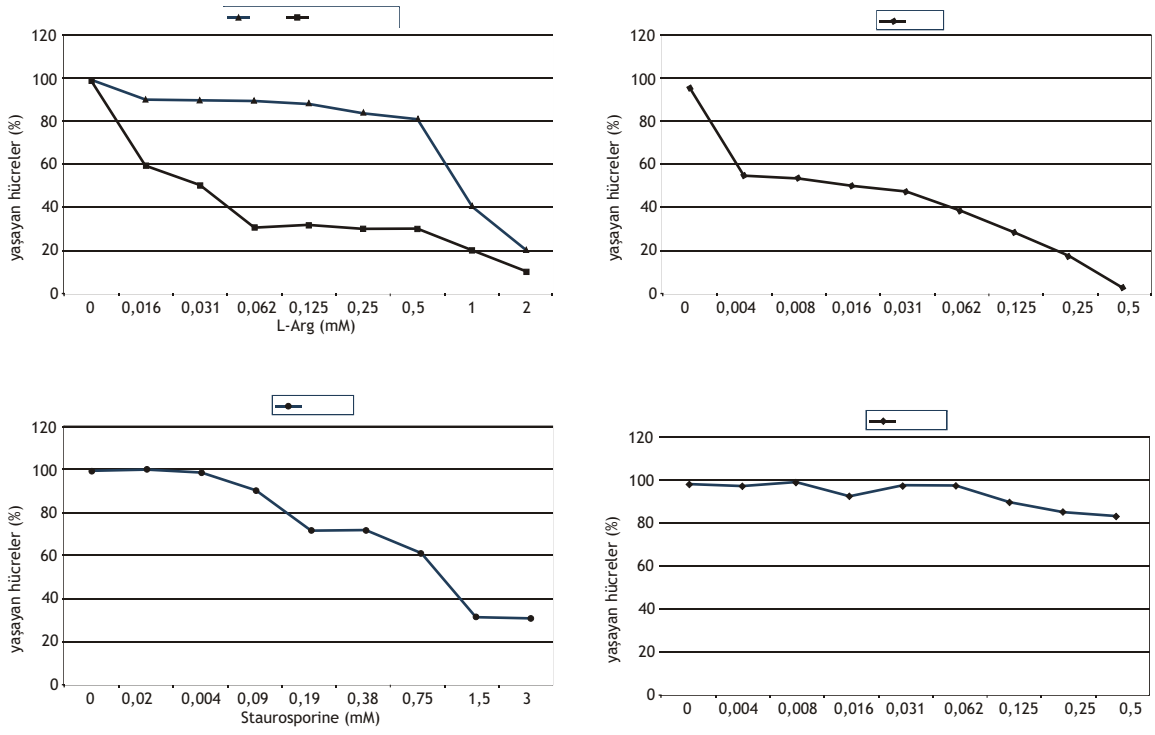
Bu çalışmada, servikal karsinoma hücre dizisinde mikroçevresel değişikliğe yanıt değerlendirilmiştir; L-arg, doz bağımlı olarak, apoptotik yolaktan hücre ölümünü uyarmıştır. ROT'tan zengin ve endojen NO'nun uyarıldığı bir çevrede, hücre ölümü yüksek olmuştur. NO'nun neden olduğu ölüm apoptotik yolaktan olurken, ROT+NO uyarılan ortamda nekrotik ölüm baskın bulunmuştur.

Bu sonuçlar, ortamdaki ROT varlığının hücre ölümünün yönünü değiştirdiğini göstermektedir. İnsan meme hücre dizilerinde, redoks homeostazı değiştiğinde nekrotik ölümün ve aynı zamanda NO sinyalleşme kapasitesinin arttığı, bunun yanında ROT oluşumu ve süperoksid anyon oluşumu ya da glutatyon azalmasının da hücreleri NO ile yönlendirilen apoptoz uyarımına duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (12-14). Buna ek olarak, lenfoma hücrelerinde apoptozu indükleyen kemoterapi sonrasında daha dirençli kanser hücreleri oluşmuştur (15).

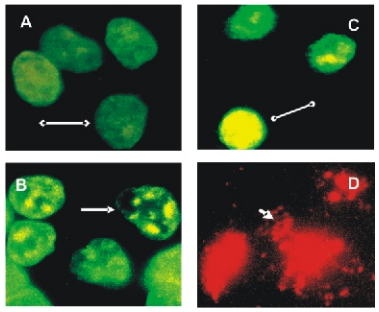
Bu çalışmada SS'nin önceden uygulanması, daha sonra oluşturulacak NO ile uyarılmış apoptozun etkisini arttırmıştır. Roche ve ark. NOS inhibitörlerinin *in vitro* ortamda melanoma hücrelerinde apoptozu baskıladığını bildirmişlerdir (15). Sade ve Sarin iNOS'dan yoksun T-hücrelerinin apoptozdan korunduğunu göstermişlerdir (16). Bunun yanında iyonize radyasyon ve nitrik oksit donörü insan servikal kanserinde apoptoza karşı duyarlılığa neden olmuştur (17).

Yine bu çalışmada artan SS'nin endojen NO ile birlikte apoptotik hücre ölümünü arttırdığı ve NOS inhibitörü kullanılarak NO etkisinin azaltılmasının SS'nin etkisini de azalttığının gösterilmesi, NO'nun, bu süreçte rol aldığını ancak tek neden olmadığını düşündürmektedir.

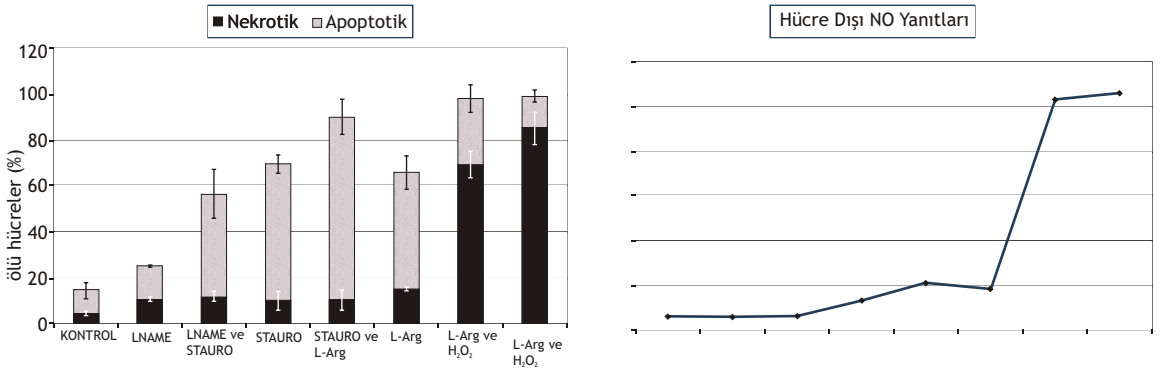
Kültür ortamında biriken nitrit olasılıkla nekrotik hücre ölümüne bağlıdır, çünkü nekrotik ölümde bütün hücre içi bileşenler hücre dışı ortama dökülürler. Ayrıca ROT da iNOS ekspresyonunu arttırır (16). Bu durumda daha ileri çalışmalar gereklidir. NO'nun biyoregülatör rolü daha önceki çalışmalarda vurgulanmıştır



Şekil 1: Sağaltım ve mikroçevre etmenlerinin doz-yanıtları. Sağaltım ve mikroçevre etmenlerinin HeLa hücrelerinde gösterdikleri *in vitro* sitotoksik etkinin ölçülmesinde, 96 gözlü kültür tabaklarında bir konsantrasyon eğim şeması oluşturulmuştur. HeLa hücreleri temel besleyici ortam ile $1x10^5$ hücre ml^{-1} olarak hazırlanmış ve her göze $1x10^4$ hücre $göz^{-1}$ olarak ekilmiştir. Hücreler etkenleri içeren besleyici ortamda 24 saat tutulmuştur. A) L-arg doz yanıtları için 0.02-2.00 mM konsantrasyon aralığı kullanılmış ve eş zamanlı olarak H_2O_2 (0.01mM) ile birlikte kullanınımı karşılaştırılmıştır. B) H_2O_2 doz yanıtları için 0.004-0.50 mM konsantrasyon aralığı kullanılmıştır. C) Staurosporine doz yanıtları için 0.02-3.00 µM konsantrasyon aralığı kullanılmıştır. D) L-NAME doz yanıtları için 0.004-0.50 mM konsantrasyon aralığı kullanılmıştır ve kontrol hücreleri % 5 temel besleyici ortamda tutulmuştur. Hücrelerin yaşayabilirliği yöntemlerde tanımlanan MTT test ile ölçülmüştür. MTT testi için kullanılan her değer bağımsız üç farklı deneyde ve en az üç gözde yinelenerek elde edilmiştir. Tüm veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiş, kontrol hücreleri ile karşılaştırma için güven aralığı * $p < .05$ olarak seçilmiştir.



Şekil 2: HeLa hücrelerinde görülen morfolojik değişimler. (A) HeLa hücreleri % 5 temel besleyici ortamda; (B) 1mM L-arg ve 1µM SS; (C)2mM L-arg ve (D) 1mM H_2O_2 ortamlarında 24 saat tutulan hücreler sabitlenip Hoechst 33342 ve PI ile boyanmıştır (yöntemlerde ayrıntılı olarak tanımlanmıştır). Hücre morfolojilerindeki özellikler; **köşeli ok (A):** normal yaşayan hücre; **uzun ok (B):** geç evre apoptotik hücre; **yuvarlak ok (C):** erken evre apoptotik hücre; **ok başı (D):** geç evre nekrotik hücre olarak tanımlanmıştır (x400 büyütme).



Şekil 3. Mikroçevrede yer alan serbest radikallerin staurosporine'in neden olduğu apoptotik hücre ölümü ve hücre dışı NO salınımı üzerine etkileri. (A) Hücreler, 2mM L-arginine (L-arg); 0.5mM L-NAME (LNM); 1μM staurosporine (SS); 0.1mM hidrojen peroksit (H_2O_2); 2mM L-arg ile eş zamanlı olarak 0.01mM H_2O_2; 1μM SS ile eş zamanlı olarak 0.5mM L-NAME; 1μM SS ile eş zamanlı olarak 2mM L-arg içeren besleyici ortamlarda, 37°C, 5% CO_2 koşullarında, 24 saat tutulmuş ve hücre ölümü Hoechst 33342/propidium iodide çekirdek boyaması ile değerlendirilmiştir. HeLa kontrol hücreleri yalnızca %5 DMEM besleyici ortamında tutulmuştur. (B) Hücre dışı Nitrit birikimini ölçmek için, süre sonunda ilgili gurupların 100 μL besleyici ortamları eşit miktar Griess ayıracı ile karıştırılarak ölçüm yapılmıştır. Test, üç bağımsız deney ortamında, her biri dört ya da sekiz kez yinelenerek gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiş ve karşılaştırmalar kontrole karşı *p<.05 olarak değerlendirilmiştir.

(18,19). Daha önceki bir çalışmamızda NO'nun çevredeki redoks potansiyeline bağlı olarak benzer bir süreci farklı yolaklara yönlendirebildiği gösterilmiştir (20).

NO ile yönlendirilen hücre ölümü, birçok tümör-çevre etkileşimini de içine alacak şekilde, karmaşık bir süreçtir. Reaktif oksijen ve azot metabolitlerinin etkileşimleri hücresel mikroçevrede sofistike bir sisteme dayanmaktadır(21). Bundan başka bu moleküllerin etkileşimi, iki temel sinyal yolağı ile sonuçlanır. Bunlar HOCl/hidroksil radikalleri ve NO/peroksinitrit yolaklarıdır. Ek olarak nitril kloritin etkilenmesi de alternatif bir yolak olarak ele alınabilir (22,23). Serbest radikallerin aşırı miktarları peroksinitrite ve diğer güçlü oksidan metabolitlere neden olsa da metabolitler arası farklılığı açıklayan bir moleküler model henüz tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, oksijen ve azot metabolitlerinin etkileşiminin birçok doğal anti tümör sistemi tarafından kullanıldığı gösterilmiştir (23, 24).

Kanser sağaltımında, organ mikroçevresinin yönetimi gelecekteki çalışmalara yön verebilir. Tümör mikroçevresi içinde NO'yu hedef alan çalışmalar, kanser sağaltımında daha uygun, daha az zararlı ve etkili sağaltımları kurgulayabilir ve yeni sağaltım stratejilerinin gelişmesine olanak tanıyabilir.

Teşekkür

Bu çalışmada Nitrit değerlendirmelerindeki katkıları için Doç. Dr. Hüseyin Baskın'a, makalenin yazımındaki değerli eleştirileri nedeniyle Prof. Dr. İ.Hakkı Bahar'a teşekkürlerimizi sunarız.

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Desteği Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2001 -0928.01.01.01).

KAYNAKLAR:

1. Sen S, D'Incalci M. Apoptosis: Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. FEBS Letters, 1992; 307:122-129.
2. Mohr S, McCormick TS, Lapetina EG. Macrophages resistant to endogenously generated nitric oxide-mediated apoptosis are hypersensitive to exogenously added nitric oxide donors: Dichotomous apoptotic response independent of caspase 3 and reversal by the mitogen-activated protein kinase (MEK) inhibitor PD 098059. Proc Natl Acad Sci, 1998; 95: 5045-5050.
3. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, 2002; 82: 47-95.
4. Brüne B, Von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. Eur J Pharmacology, 1998; 351: 261-272.
5. Cookson MR, Ince PG, Shaw PJ. Peroxynitrite and hydrogen peroxide induced cell death in the NSC34 neuroblastoma X spinal cord cell line: role of poly (ADP-Ribose) polymerase. Journal of Neurochemistry, 1998; 70: 501-508.
6. Melkova Z, Lee SB, Rodriquez D, Esteban M. Bcl-2 prevents nitric oxide-mediated apoptosis and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage. FEBS Letters, 1997; 403: 273-278.
7. Brüne B: Nitric oxide. NO apoptosis or turning it ON? Cell Death and Differentiation, 2003; 10: 864-869
8. Oh-Hashi K, Maruyama W, Isobe K. Peroxynitrite induced GADD34, 45, and 153 via p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Free Radical Biology and Medicine, 2001; 30: 213-221.
9. Xie K, Huang S. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. Free Radical Biology and Medicine, 2003; 34: 969-986.
10. Shacter E, Williams JA, Hinson RM, Senturker S, Lee YJ. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. Blood, 2000; 96: 308-313.
11. Baskin H, Ellerman-Eriksen S, Lovmand J, Mogensen CS. Herpes simplex virus type 2 synergizes with interferon-gamma in the induction of nitric oxide production in mouse macrophages through autocrine secretion of tumor necrosis factor-alfa. J Gen Virol, 1997; 78: 195-203.
12. Brune B. The intimate relation between nitric oxide in apoptosis and cell survival. Antioxid Redox Signal, 2005; 3-4: 497-507.
13. Steinmann M, Moosmann N, Schimmel M, Gerhardus C, Bauer G. Differential role of extra-and intracellular superoxide anions for nitric oxide-mediated apoptosis induction. In Vivo, 2004; 18: 293-309.
14. Mc Keague AL, Wilson DJ, Nelson J. Staurosporine-induced apoptosis and Hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines. British Journal of Cancer, 2003; 88: 125-131.
15. Rocha M, Kruger A, Van Rooijen N, Schirrmacher V, Umansky V. Liver endothelial cells participate in T-cell-dependent host resistance to lymphoma metastasis by production of nitric oxide in vivo. Int J Cancer, 1995; 63: 405-411.
16. Sade H and Sarin A. Reactive oxygen species regulate quiescent T-cell apoptosis via the BH3-only proapoptotic protein BIM. Cell Death and Differentiation, 2004; 11:416-23.
17. Park IC, Woo SH, Park MJ et al. Ionizing radiation and nitric oxide donor sensitize Fas-induced apoptosis via up regulation of Fas in human cervical cancer cells. Oncol Rep, 2003; 10: 629-633.
18. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 2001; 282: 1075-1079.
19. Heigold S, Sers C, Bechtel W, Ivanovas B, Schafer R, Bauer G. Nitric oxide mediates apoptosis induction selectively in transformed fibroblasts compared to non transformed fibroblasts. Carcinogenesis, 2002; 23: 929-941.
20. Baskin Y, Baskin H, Guner G, Tuzun E, Oto O. The inversely proportional relation between nitric oxide and lipid peroxidation in atherosclerotic plaque formation in human. Int J Cardiol, 2003; 9: 53-57.
21. Tews DS. Cell death and oxidative stress in gliomas. Neuropathology and Applied Neurobiology, 1999; 25: 272-284.
22. Toomey D, Condron C, Wu QD et al. TGF-beta1 is elevated in breast cancer tissue and regulates nitric oxide production from a number of cellular sources during hypoxia reoxygenation injury. Br J Biomed Sci, 2001; 58: 177-183.
23. Bauer G. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. Anticancer Res, 2000; 20: 4115-39.
24. Engelmann I, Bauer G. How can tumor cells escape intercellular induction of apoptosis? Anticancer Res, 2000; 20: 2297-306.