

**KERSETİN VE EPİGALLOKATEŞİN GALLAT'IN C6 GLİOBLASTOMA MULTIFORME
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN VE BU ETKİLERDE
KALSİYUMUN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Cavid Memmedov

Yüksek Lisans Tezi

**KERSETİN VE EPİGALLOKATEŞİN
GALLAT'IN C6 GLİOBLASTOMA
MULTİFORME KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN VE
BU ETKİLERDE KALSİYUMUN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Cavid MEMMEDOV

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Kasım 2006

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Seval KORKMAZ

Jüri ve Enstitü Onayı

Cavid Memmedov'un Kersetin ve Epigallokateşin Gallat'ın C6 Glioblastoma Multiforme Kanser Hücreleri Üzerine Toksik Etkilerinin ve Bu Etkilerde Kalsiyumun Rolünün Araştırılması başlıklı, Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 08 / Aralık / 2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Yrd. Doç. Dr. Seval KORKMAZ Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Kevser EROL Osmangazi Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nuntarih ve.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Cavid Memmedov
Doğum tarihi ve yeri : 1980, Berde / Azerbaycan
Uyruđu : Azeri
Medeni durumu : Bekar
İletişim Adresleri : Nizami cad. sokak 4, No:19 374320
Berde / Azerbaycan.
Telefon : 0555 209 68 48; 0536 561 16 33.
e-mail : c_berdeli@hotmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : Tefvik İsmayılov adına 1 sayılı ilköğretim okulu, (1986–1992).
Lise : Bakü Özel Türk Lisesi, (1992-1998).
Üniversite : Anadolu Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi, (1998–2004).
Yabancı Dil : Türkçe, İngilizce, Rusça.

Bilimsel Etkinlikler

Katıldığı Kurs ve eğitim : Kimya olimpiyat Kursları, 1996-1998,
Bakü, Azerbaycan.

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim sırasında, bana Farmakolojiyi sevdiren, hücre kültürüyle tanışmama sebep olan, her zaman beni sabırla dinleyerek bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Seval KORKMAZ'a teşekkür etmeyi kendime borç bilirim.

Her zaman ilgisini gösteren ve yardımcı olan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e,

Tezimin her aşamasında yardımcı olan ve her zaman bana neşesiyle moral veren Biolog Zerrin CANTÜRK ve Öğr. Gör. Ahmet SARAÇOĞLU'na,

Tezimin deney aşamasının zorlu ilk günlerinde bana yardımcı olan arkadaşlarım Özlem YILMAZ ve Uzm. Ecz. Nisa İNAL HOCAOĞLU'na,

Tezimin yazım aşamasında bana yardımcı olan Füsun YUMRUKÇAL'a,

Maddi ve manevi bana olan desteklerinden dolayı Dr. Mehmet ÖNGÜN ve yüksek hemşire Candan ÖNGÜN'e,

Zor günlerimde hep yanımda olan ve hayatımın her anında hep yanımda olmasını istediğim Belgin YAVUZ'a,

Beni tüm eğitim hayatım boyunca hep destekleyen ve gösterdikleri sevgi ve anlayışla bugün burada olmamı sağlayan Ailem'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Kanser hastalığı üzerinde çalışmama sebep olan ve 02.07.2006'ta Kolon Kanserinden kaybettiğim biricik babamı saygıyla anıyor ve tezimi babama ithaf ediyorum!

**KERSETİN VE EPİGALLOKATEŞİN GALLAT'IN C6 GLİOBLASTOMA
MULTİFORME KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN VE
BU ETKİLERDE KALSİYUMUN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Bu çalışmada, kersetin ve epigallokateşin gallatın, C6 gliomalar üzerine etki mekanizmaları ve bu mekanizmalarda kalsiyumun rolü araştırılmıştır.

Yöntem olarak MTT, nötral kırmızısı ölçümü, sülfrodamin ölçümü ile akridin oranj yöntemleri kullanılmıştır. Kersetin ve epigallokateşin gallatın sitotoksik etkilerinde kalsiyumun rolünü anlamak için kalsiyum fosfat (homeopatik tarzda) ve tapsigargin kullanılmıştır. Hem tek başına uygulanan kersetin hem de epigallokateşin gallat, C6 hücreleri üzerine doz ve zamana bağımlı sitotoksik ve apoptotik etkiler göstermiştir. Kersetinin kalsiyum fosfat ile kombinasyonu mitotik hücre ölümüne sebep olurken, tapsigargin ile kombinasyonu kaspazlara bağı olmayan hücre ölümüne sebep olmuştur. Epigallokateşin gallatın kalsiyum fosfat ile kombinasyonu, epigallokateşin gallatın apoptotik etki mekanizmasını değiştirmemiştir. Ancak epigallokateşin gallatın tapsigargin ile kombinasyonları kersetine benzer şekilde kaspazlara bağımlı olmayan hücre ölümüne sebep olmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada hücre içi kalsiyum dengesini değiştirerek hücreleri apoptozdan farklı hücre ölümlerine de sevkedebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: kersetin, epigallokateşin gallat, tapsigargin, kalsiyum fosfat, glioma, hücre ölümü

**INVESTIGATION OF TOXIC EFFECTS OF QUERCETIN AND
EPIGALLOCATECHIN GALLATE
ON C6 GLIOBLASTOMA MULTIFORME CELLS AND EFFECTS OF
CALCIUM FOR THESE MECHANISMS**

ABSTRACT

In this study, mechanisms of effects of quercetin and epigallocatechin gallate on C6 glioblastoma multiforme cells and role of calcium for these mechanisms were searched.

As testing methods MTT, Neutral Red, Sulforodamin-B, Acridine Orange were used. Calcium phosphate (in homeopathic manner) and thapsigargin were used for understanding of role of calcium for cytotoxic effects of quercetin and epigallocatechin gallate. By unique application of quercetin and epigallocatechin gallate gave rise to dose and time dependent cytotoxic and apoptotic effects on C6 cells. While, combinations of quercetin with calcium phosphate brought about mitotic cell death, combinations of epigallocatechin gallate with thapsigargin caused to caspase-independent cell death. Combination of epigallocatechin gallate with calcium phosphate could not alter apoptotic mechanisms of epigallocatechin. However, combination of epigallocatechin gallate with thapsigargin gave rise to caspase-independent cell death like that of quercetin.

As a conclusion, in this study, it was shown that cells can induce to different cell death from apoptosis by perturbation of intracellular calcium balance.

Key Words: quercetin, epigallocatechin gallate, thapsigargin, calcium phosphate, glioma, cell death.

İÇİNDEKİLER

ÖZGEÇMİŞ.....	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ.....	2
Kanserli Hücre Biyolojisi	2
<i>Hücre Siklusu</i>	4
<i>Apoptoz ve Kanser</i>	5
BEYİN TÜMÖRLERİ	7
Pilositik Astrositoma.....	8
Fibriller Astrositoma	8
Glioblastoma Multiforme ve Anaplastik Astrositoma.....	8
KANSER HÜCRELERİNİN ÖNEMLİ ÖZELLİKLERİ	9
Klonal Orijin.....	9
İmmortalite	9
Genetik İnstabilite.....	9
Kontakt inhibisyonun ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı	9
Proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak devamlı artışı.....	9
Anjiogenez.....	9
Metastaz	10
ÇALIŞMADA KULLANILAN TEST MADDELERİ	10
Kersetin.....	10
Epigallokateşin Gallat.....	11
Kalsiyum Fosfat	12
Tapsigargin	13
YÖNTEMLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	14
MTT ile Mitokondriyel Süksinat dehidrojenaz enzim	

Ölçümü	14
Nötral Kırmızı (NR) ile Lizozomal Enzimlerin	
Ölçümü	16
Sulforodamin-B Ölçümü (SRB)	16
DNA ve RNA' nın Akridin oranj ile Floresan	
Boyanması	16
GEREÇLER	17
Kimyasallar ve Çözeltiler	17
Malzemeler	17
Cihazlar	18
YÖNTEMLER	18
Hücrelerin Stoktan Çıkartılması	18
Hücrelerin Tripsinlenmesi	18
Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması	18
MTT Ölçümü	19
Neutral Red Up-take Sitotoksosite Ölçümü	19
Sülforodamin B Ölçümü (SRB)	19
Akridin oranj ile Floresan DNA ve RNA Boyanması	20
Biyostatiksel Yöntem	20
BULGULAR VE TARTIŞMA	21
Kersetin Sonuçları	21
<i>Kersetinin MTT Sonuçları</i>	27
<i>Kersetinin NR Sonuçları</i>	27
<i>Kersetinin SRB Sonuçları</i>	27
<i>Kersetinin Akridin Oranj Sonuçları</i>	28
Epigallokateşin Galat Sonuçları	29
<i>EGCG'ın MTT Sonuçları</i>	35
<i>EGCG'ın NR Sonuçları</i>	35
<i>EGCG'ın SRB Sonuçları</i>	35
<i>EGCG'ın Akridin Oranj Sonuçları</i>	36
TARTIŞMA	36
KAYNAKLAR	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Apoptoz ve Nekroz	5
Şekil 2 Apoptozun Genel Görünümü	7
Şekil 3 Kersetinin Kimyasal Formülü	11
Şekil 4 EGCG'ın Moleküler Yapısı	12
Şekil 5 Çay Polifenollerinin Kanserdeki Etkileri	12
Şekil 6 Tapsigargin'in Moleküler Yapısı	14
Şekil 7 Hücre İçi Kalsiyum Sinyalizasyonu	14
Şekil 8 Krebs Siklusu ve Süksinat Dehidrojenaz Enzimi	15
Şekil 9 Kersetinin C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin MTT Sonuçlarının Grafikleri	21
Şekil 10 Kersetinin C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin NR Sonuçlarının Grafikleri	22
Şekil 11 Kersetinin C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin SRB Sonuçlarının Grafikleri	23
Şekil 12 Kersetin Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyaması Sonucu Floresan Mikroskobunda Elde Edilen Görüntüleri	24
Şekil 13 Kersetin ile CP Kombinasyonu Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyaması Sonucu Floresan Mikroskobunda Elde Edilen Görüntüleri	25
Şekil 14 Kersetin ile TG Kombinasyonu Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyaması Sonucu Floresan Mikroskobunda Elde Edilen Görüntüleri	26
Şekil 15 EGCG'ın C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin MTT Sonuçlarının Grafikleri	29
Şekil 16 EGCG'ın C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin NR Sonuçlarının Grafikleri	30
Şekil 17 EGCG'ın C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin SRB Sonuçlarının Grafikleri	31
Şekil 18 EGCG Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile	

	Boyaması Sonucu Floresan Mikroskobunda Elde Edilen Görüntüleri	32
Şekil 19	EGCG ile CP Kombinasyonu Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyaması Sonucu Floresan Mikroskobunda Elde Edilen Görüntüleri	33
Şekil 20	EGCG ile TG Kombinasyonu Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyaması Sonucu Floresan Mikroskobunda Elde Edilen Görüntüleri	34
Şekil 21	Kaspazlara Bağımlı Olmayan Hücre Ölüm Mekanizması	38

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Anaplastik astrositoma
AIDS	: Acquired Immunodeficiency Syndrome (Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu)
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4izoksazolpropiyonik asid
AO	: Akridin oranj
CO ₂	: Karbondioksit
CP	: Kalsiyum fosfat
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGCG	: Epigallokateşin gallat
ER	: Endoplazmik retikulum
FCS	: Fetal sığır serumu
GBM	: Çoklu formu beyin hücresi
Hsp	: Isı şoku proteinleri
IARC	: Uluslararası kanser araştırma kurumu
IL	: İnterlökin
IP3	: İnozitol trifosfat
M	: Mitoz
MMP	: Matriks metalloproteazlar
NR	: Nötral kırmızı
PBHRF	: Prasanta banerji homeopatik araştırma vakfı
PBS	: Fosfat tuz tamponu
PG	: Prostaglandinler
PLA2	: Fosfolipaz A ₂
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Radyoterapi
S	: Sentez
SERCA	: Sarko/endoplazmik retikulum
SPSS	: Sosyal ve sayısal istatistik programı

SRB : Sulforodamin-B
TG : Tapsigargin
WHO : Dünya sağlık örgütü

GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, proliferasyon yeteneği yüksek olan somatik hücrelerde görülen genetik bir hastalıktır (Liotta ve Liu, 2001). Tedavisi ve tanısı birçok uzmanlık dallarının işbirliğini gerektirmektedir. Tüm dünya nüfusunu etkileyen kanser, uzun yıllardır en çok araştırılan bir hastalık olmasına karşın radikal bir tedavisi bulunamamış ölümcül hastalıktır. Ölüm nedeni olarak, dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan kanser her yaşta gelişebilen, çeşitli organ ve dokularda fonksiyon ve yapı bozukluğuna neden olan önemli bir hastalıktır (Murray ve ark., 1998). Boveri'nin modern paradigmasına göre kontrolsüz hücre proliferasyonu olan kanseri somatik hücrelerdeki mutasyonlar etkilemektedir (Qumsiyeh ve Li, 2001). Kanserinin ayrıntılı pek çok tanımı vardır. Bu tanımlardan en kolay olanı, kanserinin kontrolsüz büyüme ve anormal hücre yayılımı ile karakterize bir hastalık grubu olduğudur. Eğer yayılım kontrol edilemezse, hastalık ölümle sonuçlanabilir. Coğrafi değişkenlik kanser tiplerinde de farklılıklar gösteriyor. Örneğin mide kanseri Japonya'da, göğüs kanseri Amerika'da yüksek oranlarda gözlenmektedir (Russell, 2004). Ölüm oranlarında erkeklerde ilk sırayı akciğer (2002 yılında 89 000 ölü), prostat (30 000 ölü) ve kolon (28 000 ölü) kanseri, kadınlarda ise akciğer (60 000 ölü), meme (40 000 ölü) ve kolon (29 000 ölü) kanseri yer alıyor (Russell, 2004).

Kanserinin ölümle sonuçlanan ve ekonomik kayıplara neden olan bir hastalık olması sebebiyle Türkiye için önceliği ve öneminin rakamlarla ortaya konulması son derece önemlidir. Türkiye'de yıllık kanser insidensi yüz binde 150 olarak tahmin edilmiş ve her yıl 90 000 -100 000 dolayında yeni kanser olgusunun görüleceği düşünülmektedir (Kayaalp, 1998). Kanser vakalarındaki artmanın nedenleri; yetersiz hijyenik şartlar, yetersiz beslenme, çevre kirliliği, stres, kimyasal maddelerin kullanımındaki artış, radyoaktif maddelerin bilinçsiz kullanımı, bölgenin jeolojik yapısı, kanser tanı yöntemlerinin gelişmesi ve halkın bilinçlenmesi ile açıklanabilir. Kanser vakalarının bölgelere göre dağılımlarında Ege bölgesi ilk sırada (%22), İç Anadolu Bölgesi ikinci sırada (%18), Doğu Anadolu Bölgesi üçüncü sırada (%14), ve Karadeniz, Akdeniz, Marmara bölgeleri dördüncü sırada (%13) yer almaktadır (Kaya ve Bölükbaş, 2003). Ülkemizde sigarayla ilişkili kanserler artarken, gelişmiş ülkelerde beslenme ve genetik faktörlerle ilişkili kanserlerin artmakta olması; Türkiye'de kanser korunmasındaki en önemli hedefin sigara olduğunu göstermektedir (Yarış ve ark., 2003).

Kanser bir seri genetik hasarın birikimi ile çevresel etmenlerin bağımsız ya da işbirliği sonucu ortaya çıkmaktadır. Kanserdeki ilerleme genetik bilgilerdeki değişimlerin birikmesiyle oluşur. Genlerdeki bu değişim sonucu tümörün invazyon ve metastazı gerekli görülür (Liotta ve Liu, 2001). İnsan kanserlerine yol açan değişimlerin hedeflediği başlıca kanser genleri, özellikleri itibarıyla onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak sınıflandırılabilir. Tümör baskılayıcı genler normal hücrelerin kanserli hücre haline dönüşmesini engelleyen genlerdir. Genetik hasar olarak isimlendirdiğimiz mutasyonlardan bazıları, hücre çoğalmasının kontrolünü etkilerken, diğerleri tümör hücrelerinin buldukları noktalardan taşınmasını ve uzak mesafede yaşamalarını veya tümörün büyümesi için gerekli olan anjiyojenik işlemleri uyarmaktadırlar. Sonuç olarak kanser hastalığı hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir (Klug ve Cummings, 2000). Bağ dokusu en çok tümörün oluştuğu dokudur. Kanser hastalığının klinik çehresi gelişmekte olan tedavi yöntemlerini de dikkate almamız gerekirse şu planı içermektedir. (1)

neoplazmanın kendine özgü dokusal yapısı, (2) tümörün derecesi ve organ dokusunun ilgisinin kapsamı, (3) kanser tiplerinin biyolojik karakteristiği ve nedensel etkenleri. Kanserde erken tanı çok önemlidir. Kanser insidensinin yüksek olması dışında terapide görülen problemlerle de önem kazanmaktadır. Kemoterapide amaç hastanın normal hücrelerine zarar vermeksizin tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak ve mümkünse onları yok etmektir.

Kanser ile ilgili gelişmelerde amaç, kanserin normal hücrelere göre farklı özelliklerinin aydınlatılması ve bu özellikleri dikkate alarak normal hücrelerde istenmeyen etkiler oluşturmayacak yani sadece kanser dokusuna selektif olacak terapiler geliştirilmesidir. Sonuç olarak kanser tedavisinde daha etkili ve iyi ilaçlara şiddetle gereksinim vardır. Çünkü kanser hastalığı henüz radikal tedavisi olmayan bir hastalıktır. Bu çalışmada amaç, homeopatik olarak beyin tümörlerinin tedavisinde Ruta ekstresine destek olarak verilen kalsiyum fosfatın, etkisini hücresel düzeyde görebilmektir. Bu çalışmada Ruta ekstresinde en bol bulunan fenolik olan rutin (kersetin-3-rutinozid) öncü maddesi olan kersetinin benzer etki gösterip göstermediği de araştırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca rutin ve kersetin östrojenik etkileri olan fenolik maddelerdir, bununla birlikte epigallokateşin gallat anti-östrojenik çalışan bir fenoliktir. Bu çalışmada, zıt yönde çalışan aynı gruba dahil iki doğal maddenin proliferasyon ve hücre ölümü üzerine olan etkilerinde, hücre dışından alınan kalsiyumun (CP kombinasyonları), storlardan çekilen kalsiyumun (TG kombinasyonları) önemi araştırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca elde edilen bulgular ile sitoplazmada kalsiyum miktarındaki artış ile hücrede ölüm mekanizmalarının değiştiği gösterilmek istenmiştir.

KAYNAK BİLGİSİ

Kanserli Hücre Biyolojisi

Kanser, hücrelerin sürekli olarak çoğalması ile karakterize bir düzen bozukluğudur. Bu durum, sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu gerçekleşir. Bu hücreler invazyon yaparlar ve organizmanın organlarını hasara uğrattırır. Kanser hücreleri kaynaklandıkları hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki, sonuçta hücreler devamlı birikir. Bu dengesizlik (aşırı hücre birikimi), hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından dolayıdır.

Kanserli hücreler normal hücrelerden en önemli iki karakteristik özelliği ile farklılık gösterirler. Hücrelerin büyümesi ile dokuları istila etmesi yani invazyon ve metastaz ile farklı bölgelerde kolonize olması. İnvazyon bütün neoplazmaların bir özelliği olan kontrolsüz çoğalmadır. Kanserli hücreler sınırsız çoğalma, yerel dokuları işgal, vücudun diğer bölümlerine yayılma ve metastaz oluşturma yeteneklerine bağlı olarak 3 gruba ayrılmaktadır.

1.Benign Tümörler: Herhangi bir dokudan köken alabilen bölgesel tümörlerdir, ancak uzak bölgelere yayılma özelliği yoktur.

2.In-situ Tümörler: Kanser hücrelerinin morfolojik görüntülerine sahiptirler, fakat epitelyal tabakada kalırlar, bazal hücre zarına veya destek dokuya geçemezler (Franks ve Teich, 1998).

3.Malign Tümörler: Büyüebilmeleri için kan akımıyla sağlanan besinlere ihtiyaç duyarlar ve kan damarlarının tümör içinde büyümesini uyaran proteinler üretirler. Anjiogenez ile oluşan yeni kan damarları düzensiz bir şekilde tümör içinde yayılırlar. Kanser hücreleri bu damarlarla ikincil tümörlerin oluşacağı uzak organlara taşınırlar, yani vücudun diğer bölgelerine metastaz yaparlar (Hu ve ark.,1993).

Kanserli hücreler köken aldığı doku ve hücre tipine göre isimlendirilir. İnsanda oluşan kanserlerin %90'ı epitelyal hücrelerin fiziksel ve kimyasal hasarlara uğraması sonucu meydana gelmektedir (Alberts ve ark., 1994).

Kanser cinsel hücre hastalığı olmayıp, tek bir somatik hücre hastalığıdır. DNA düzeyinde intirinsik hatalar nedeniyle ortaya çıkar veya karsinogene maruz kalma ile indüklenir. Yenilenebilen dokularda hücre ölümü ve yeni hücrelerin üretimi (turnover) söz konusu olduğundan kanser riski vardır. Yenilenemeyen hücrelerin "turnover"ı düşüktür, bu hücrelerde yenilenme olmadığından kanser oluşumu mümkün değildir. "Turnover" oranı düşük olan hepatosit (karaciğer) gibi hücrelerde hasarlar veya cerrahi girişimler sonucu oluşan yaralanmalarda kanser oluşumu çok nadir görülür. Bağırsak, kemik dokusu gibi hücreler hızlı "turnover"a sahip olduğu için sürekli hücre üretilir ve bu çoğalma değişikliği ile farklılaşma farklı hücre tipleri tarafından kontrol ediliyor. Kanser hücrelerinde differansiasyon (farklılaşma) yoktur. Kök (stem) hücreleri sadece bir defa bölünür ve iki yavru hücre oluşur. Sonraki bölünmeler yeni hücrelerde olur. Kanser hücrelerinde onkogen ve tümör supresör genleri bozulur. Böylece hücre sürekli bölünme özelliği kazanır. Kültürdeki hücrelerin çoğu yüzeye tutunarak çoğalırlar yani adherent hücrelerdir, ancak bazı transform ya da neoplastik hücreler kültürde süspansiyon halde de yaşamlarını devam ettirebilirler. Hücreleri kültürde ele aldığımız zaman teorik olarak hücre belli bir zaman içerisinde iki yavru hücre oluşturarak bölünür. Oluşan iki yeni hücre tekrar bölünme geçirir ve bu teorikte 2^n formülü ile sonsuza dek devam eder, ancak bu bölünme pratikte farklıdır. Tüm hücreler aynı anda bölünmez, bazıları bölünürken, diğer bir kısmı bölünmeyi tamamlamış olabilir, durgun hücreler olabilir veya farklı etki altında kalan hücreler ölebilir ve bu sebeple kültürdeki popülasyon idealden farklıdır. Bu olay ekspanensiyel büyüme olarak tanımlanır. Kültürdeki hücrelerin ekspanensiyel olarak çoğalma veya diğer bir deyişle hücrelerin bir siklusunun tamamlanması, kitlenin iki katına çıkması (doubling time) olarak kabul edilir. Bu süre ve bununla ters orantılı olan çoğalma fraksiyonu kanser kinetiği açısından klinik anlamda da oldukça önemli parametrelerdir.

$$\text{Proliferasyon Oranı} = \frac{\text{Kontrol grubundaki hücrelerin iki katına çıkma zamanı}}{\text{Deney grubundaki hücrelerin iki katına çıkma zamanı}}$$

Ekspanensiyel popülasyondan dolayı siklusu etkileyecek olan ilaçlar bu tip hücrelerde ideal büyüme ve çoğalma profiline uymadığından problem olabiliyor. Günümüzde kullanılan kanser ilaçlarının büyük bir kısmı hücre siklusunu etkiliyor, yani sadece siklusun belli dönemlerindeki hücreleri etkiliyor. İlaçların kullanım amaçlarını tam olarak anlayabilmek için hücre siklusu kinetiğini bilmek gereklidir.

Hücre Siklusu

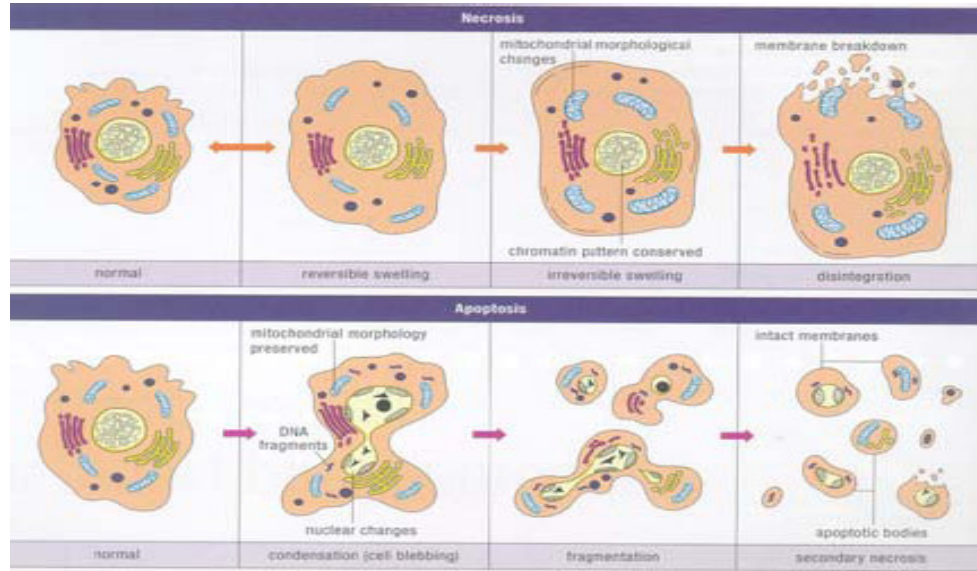
Hücre bölünme mekanizması, bölünen hücrelerin tamamen aynı olması ve evrim boyunca hücrelerin genetik özelliklerinin korunması esasına dayanır. Hücre bölünme süreci, hücrelerin içeriklerini ve özellikle de kromozomlarını doğru bir şekilde duplike etmeyi garanti eder. İki yavru hücre ortaya çıkarmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık hücre döngüsü olarak tanımlanır. Hücre bölünmesinde, protein kinazlar tarafından regüle edilen nükleer DNA sentezinin ve ardından mitozun başlaması olayları kritik öneme sahiptir. Ayrıca, hücre siklusunun çeşitli fazları spesifik bir protein olan siklinler tarafından aktive edildiği de bilinmektedir. Hücre döngüsü, diğer bir adıyla hücre siklusu geleneksel olarak iki aşamaya ayrılır: **1.İnterfaz** ve **2.Mitoz** (M fazı olarak da bilinir). Tüm dokularda mitoz ile interfaz arasında hücre yenilenmede gelişen bu değişiklikler hücre siklusunu oluşturur. İnterfaz kendi içinde 3 safhaya bölünür: **G₁** (sentez öncesi), **S** (DNA sentezi) ve **G₂** (post-DNA duplikasyonu sonrası). İnterfazın en belirgin olayı **S** fazında gerçekleşir, burada DNA'nın esas kromozomal komponentleri ve DNA iki katına çıkar. Bu safhanın radioaktif DNA öncülleri ile işaretlenmesi (örn: H³ timidine) daha sonra ise biyokimyasal ve radiotografik metotlarla iz takibi ile gösterilmesi ve analiz edilmesi mümkündür. **S** fazı, **G₁** fazı adı verilen bir aralığın ardından gelir. **G₁** fazında RNA ve protein sentezi gerçekleşir ve bölünme sonucu oluşan hücrenin tekrar DNA sentezine başlayacağı zaman için kullanılır. Bu fazda kalan ve bölünmeyen hücreler **G₀** fazına geçerler, **G₀** fazındaki hücreler “durgun (quiscent) hücre” olarak isimlendirilir ve hücre günlerce, aylarca, hatta yıllarca kalacağı bir dinlenme dönemine girer. Mitozdan önce **G₂** fazı gelir ki, burada hücre mitozla başlamadan önce DNA'nın iki katına çıkarıldığından emin olmak ister, DNA replikasyonunun doğruluğu onaylanır ve hatalar düzeltilir. Hücre bundan sonra **M** yani mitoz fazına geçer. **G₁** ve **G₂** fazlarının diğer bir önemi de mitoz öncesi ve sonrası hücreye büyüme zamanı kazandırmalarıdır. Hücre bölünmesine hazırlık aşamasında hücre kütlelerinin iki katına çıkarılması için hücrenin büyümesi gerekir. **M** (Mitoz) fazı sırasında replike edilen kromozomlar ayrılır ve mitoz ile ayrılan iki yeni çekirdekte paketlenir ve sitoplazma sitokinler tarafından iki kardeş hücreye bölünür. Mitoz fazı dinamik ve devamlıdır, kolay anlaşılması için profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhalarına bölünür. Profaz, nükleus kromatininin giderek spiralleşmesi ile karakterize edilir. Metafazda nükleus zarı ve nükleolus kaybolur, kromozomlar kutuplara göç ederler. Anafazda 2n kromozom sayısı 4n'e çıkar ve kardeş kromatidlerden biri hücrenin bir kutbuna, diğeri öteki kutba doğru hareket eder. Telofaz safhasında kutuplara çekilen kromozomlar iki yavru hücre oluştururlar (Abraham ve Kierszenbaum, 2006; Alberts ve ark., 1994; Bozkurt, 2000; Johnson, 1990; Junqueira ve ark., 1993).

Çoğalma kapasitesine sahip hücreler normal olarak belli kontrol noktalarında dururlar. Bunların en önemlileri, ilki DNA sentezinden hemen önce, yani hücre S fazına girmeden hemen önce ve ikincisi mitozdan hemen öncedir. Bu histolojik olarak dinlenme periyotları, olasılıkla siklin bağımlı kinazların ve tümör supressor proteinlerin aktivitelerinin azalmasıyla gerçekleşir. Gerçekte, bu fazdaki hücreler hücre siklusunun bir sonraki fazına girecek proteinleri sentezlediklerinden biyokimyasal olarak aktiftirler. Bu geçiş dönemlerinde yani kontrol noktalarında, varsa genetik defektler düzeltilir. Sonuç olarak, hücre siklus boyunca ilerlerken iki kontrol noktasında durur ve kontrol edilmiş olur (Kastan ve Skapek, 2001)

Apoptoz ve Kanser

Apoptoz (programlı hücre ölümü) ve nekroz memeli hücrelerini ölüme götüren iki önemli olaydır. Normal fizyolojik şartlarda, hasarlı veya yaşlı hücreler, apoptoz olarak adlandırılan, genetik olarak düzenlenen bir hücre ölüm programıyla kendi kendilerini öldürür, yani apoptoz; gelişim, homeostaz ve patojenezde önemli rol oynayan hücre intihar mekanizmasıdır (Hu ve ark., 2001).

Apoptoz organizmada doğru bir şekilde işlemelidir. Ölmesi gereken hücrelerimiz zamanında ve gerekli sayıda ölmelidir. Bir şekilde hızlanmış veya yavaşlamış bir apoptoz patolojiktir (http-1). Programdaki bozukluğun neden olduğu aşırı hücre artışı kanser ve otoimmün hastalıklara, hücre azalışı ise AIDS ve nörodejenaratif hastalıklara neden olmaktadır. Apoptozun özellikle embriyonun gelişim ve farklılaşma işlemi de rolünün vazgeçilmez olduğu bilinmektedir (Krauss, 2001). Bunun yanı sıra bağışıklık sisteminde sitotoksik T lenfositleri tarafından virüs enfeksiyonlu hücrelerin ve otoreaktif B veya T lenfosit hücrelerinin eliminasyonu da apoptozis ile gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Clermont ve ark., 2003). Apoptozun diğer bir fonksiyonu hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin yıkımını sağlamasıdır. Bu tip hücreler mutasyon birikimine uğramadan ve bir tümör hücresine dönüşmeden önce apoptotik program ile öldürülmektedirler (Krauss, 2001).



Şekil 1. Apoptoz ve Nekroz (http-1)

Hücre ölüm şekli olan apoptoz ve nekroz mekanizmaları arasında belirgin farklar olduğu ilk kez Kerr ve arkadaşları (1972) tarafından anlaşılmıştır. Nekroz, akut hasarda görülen, fizyolojik olmayan bir durumdur. Nekrotik hücrelerde şişme, sitoplazma organellerinin dağılması, hücre membranının bozulması ve patlaması karakteristik özelliklerdir. Dokunun nekroza verdiği cevap ise inflamasyon oluşumu tarzındadır. (Dive ve ark., 1992). Apoptoza giden hücreler büzülür, hücreler arası bağlantılarını kaybeder, yoğunlaşır, kromatin parçalanır ve küçük apoptotik cisimler oluşturmak üzere yıkılır. Apoptotik cisimler makrofajlar tarafından fagosite edilir, bu nedenle inflamasyon görülmez.

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir.

Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir (Wyllie, 1980).

Apoptozun genetik ve moleküler mekanizmaları 1980'lerin sonunda bir nematod solucanı olan *Caenorhabditis elegans*'da, tam olarak 131 hücrenin öldürülüp 959 tanesinin kalmasıyla ortaya çıkarıldı (Korsmeyer ve Zinkel, 2001). Burada, apoptozda birbirini izleyen dört basamak vardır.

1. Hücre dışı ve hücre içi faktörlerin uyardığı hücre ölümü için hücrenin programlanması.

2. Kaspazlar (Sistein aspartik asit-özgün proteaz) olarak adlandırılan hücre içi proteazların aktivasyonu ile hücre ölümü ya da idamı.

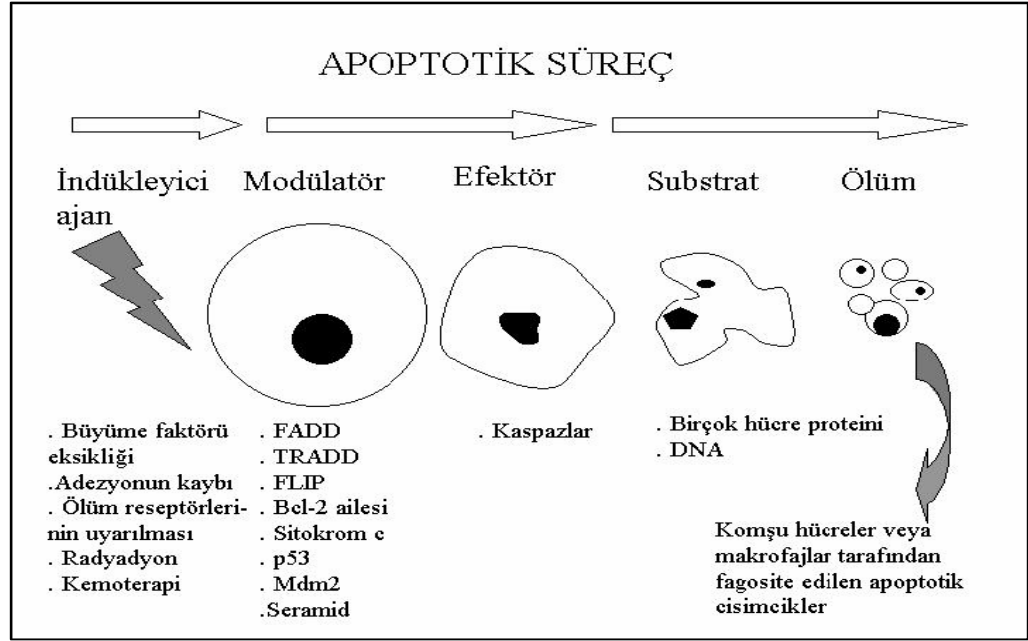
3. Makrofajlar tarafından apoptotik cisimlerin fagositozu.

4. Apoptotik cisimlerin lizozomal yıkılması.

Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Hücrede inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerinin aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Apoptozda hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler olarak bilinirler.

Apoptoz mekanizması çok sayıda ve çeşitte modülatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli Ca^{+2} girişi gerçekleşir. Buna rağmen hücreye Ca^{+2} girişi apoptozun gerçekleşmesi için her zaman gerekli değildir. Hücre kültürü çalışmaları çeşitli uyarılara karşı apoptotik yanıtı p53'ün indüklediğini ve bcl-2'nin baskıladığını açıkça göstermektedir (Pan ve ark., 1997; Korsmeyer ve Zinkel, 2001). Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozu indükleyici etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik apoptozu baskılayıcı etkiye sahiptir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom C salınmasının baskılar. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Apoptotik süreçte kritik, geri dönülemez aşama mitokondrinin aktivasyonudur. Apoptozu başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür (Korsmeyer ve Zinkel, 2001; Alles ve ark., 1991).

Apoptoz, yargı (commitment) ve infaz (execution) fazlarından oluşur. Yargı fazı hücrenin uyarılara kendi kendisini imha etmesinin sağlayacak yanıtlar oluşturması, bu işlemde ölüme kadar olan aşamalar da infaz fazını oluşturur. Apoptoz, nakil edilen hücre reddinde, bir seri otoimmün hastalıkta, nörodejenerasyonda, kalp hastalığında ve kanserde (lemfoproliferatif hastalık) görülür. Ancak bazı tümör hücrelerinin apoptotik yeteneklerini kaybettiği de bilinen bir gerçektir (Karp, 1999). Apoptozun düzenlenmesinde ve devamında görev alan gen ürünleri, hastalığın seyrinde, tanı ve tedavide olası hedeflerdir.



Şekil 2. Apoptozun Genel Görünümü (<http-1>)

BEYİN TÜMÖRLERİ

Beyin tümörleri, beyin içinde büyüyen tümörlerdir ve tüm hastalıklar içinde en dramatik prognozu olanlardan birini oluşturmaktadır. Beyin tümörleri, nöbet ve baş ağrısı dışında belirgin olmayan kognitif değişiklikler ve kişilik değişikliklerine yol açabilirler (Oğuz ve ark, 2005). Amerika’da her yıl yaklaşık 17.000 beyin tümörü ve sinir sistemi kanseri gözlenmektedir, ayrıca tüm kansere bağlı ölümlerin ise %2’si primer beyin tümörlerinden kaynaklanmaktadır. (Russell, 2004). Modern beyin tümör cerrahisi 1884’de Rickman Godlee tarafından İngiltere’de yapılan operasyon ile başlamıştır (Kaye ve Laws, 2001). Günümüzde beyin tümörlerinin sınıflandırması hemen hemen patolojiye dayanmaktadır. Beyin tümörlerinin bugünkü sınıflamasının temelini Virchow atmıştır. Virchow 1860’da beynin hücrelerarası matriksi olarak nörogliaı tarif etmiş, yine tümörlerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri arasında bağlantı kurulmasını sağlamış ve “glioma” tarifini de ilk kez yapmıştır. Bailey ve Cushing 1926 yılında gliomaların bir sınıflamasını yaptılar, ancak bu sınıflama karmaşıklığı dolayısı ile geniş bir kabul görmedi. 1993’de WHO (*World Health Organisation*) tümörlerin sınıflandırmasını yayınladı (Kleihues ve ark., 1993). Bugün için en sık kullanılan sistem ise 2000 yılında yeniden gözden geçirilerek düzenlemeler yapılan 1993’deki WHO sınıflandırmasıdır (Kleihues ve ark., 2000) En temel intra-axial beyin tümörleri olan gliomalar astrositleri, oligodendrogliomaları ve ependimal tümörleri içerir. Medulloblastomalar, diğer seyrek nöroektodermal tümörler ve temel CNS limfomalar daha az yaygın olanlardır (Russell, 2004). Tüm bu tümörler beyin dokusunu istila etmeye eğilimlidirler ve hiç biri cerrahi yolla tam olarak kesilip alınamaz. Gliomaların en yaygın olan Astrositik tümörler benign’den malign’e doğru IV evrede sınıflandırılıyor (Kleihues ve ark., 2000).

Pilositik Astrositoma (Evre I): Bu tümör düşük evre glial tümörlerin çok sık bir varyantıdır ve tipik olarak çocuk ve genç yaştaki erişkinleri etkiler. Çocuklarda çok yaygın olan son derece düşük dereceli fokal tümörlerdir ve

bunlar çoğu kez tam cerrahiyle kesilip alınarak iyileştirilebilirler. Çocukluk çağı beyin tümörlerinin ise %15'ini teşkil eder. Pilositik astrositomalar orta hat yapılarında yerleşim gösterirler. Pilositik astrositomalarda malign dejenerasyon beklenmez ve rekürrens olduğunda histolojik tip her zaman aynıdır.

Fibriller Astrositoma (Evre II): Evre II tümörler astrositomaların yaklaşık olarak %10-15'ini oluştururlar. Genellikle daha genç yaşları etkilerler ve ortalama etkilenen hastaların yaşları 35 dolayındadır. Evre II tümörlerin gelişmesinde fazla zamana ihtiyaç duyulur, genellikle yıllar ile ölçülebilen bir periyot içinde gelişir ve çoğunlukla histolojik çehre oluşturuyor. Fibriller tümörler daha sert lastik kıvamındadır. Fibriller astrositomalar değişken miktarda gliofibriller matriks içerirler.

Glioblastoma Multiforme (GBM) ve Anaplastik Astrositoma (AA) (Evre III ve IV): Glioblastoma Multiforme erişkin yaş grubundaki en sık primer beyin tümörüdür. Primer beyin tümörlerinin dağılımı büyük oranda yaşla ilintilidir. Glioblastoma ve anaplastik astrositoma çok geniş bir şekilde beyin içine sokulmaya eğilimli, hızla yayılan ve beyni yıkıma uğratan dağınık tümörlerdir ve insidensleri 14 yaş altında 100.000'de 0.2-0.5 iken, 45 yaş üzerinde ise 100.000'de 4-5' çıkmaktadır. Aynı şekilde anaplastik astrositomaların yaş ile yerleşim alanları da değişkenlik göstermektedir. Glioblastoma için ortalama yaş 60 dolayında iken, anaplastik astrositomada ortalama yaş 50 dolayındadır. GBM ve AA erkeklerde kadınlara göre, beyaz ırkta da siyah ırka göre bir miktar daha sık görülür. Yapılan çalışmalarda ortaya atılan hipotezler göre düşük grade astrositomalardan basamak basamak GBM'e ilerleyiş kromozom 10 ve 17'de yerleşim gösteren supresör genlerin kademeli kayıplarından ileri gelmektedir. Bu kayıplar tümör büyümesini ve heterojenitesini artıran dominant onkojenlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. GBM ve AA glial hücrelerden kaynaklanan malign astrositik tümörlerdir ve genellikle serebral hemisferlerin derin beyaz maddesinin de yerleşirler. Tüm gliomaların tedavisi sık sık cerrahi işlem, radioterapi ve kemoterapi gerektirir. GBM ve AA tedavisinde tek başına cerrahi ile semptom kontrolü ve sağkalım mümkün olmamaktadır. Prospektif çalışmalar göstermiştir ki radyoterapi (RT) sağkalım üzerine önemli derecede katkı sağlar. Adjuvan kemoterapinin RT ile uygulandığında, yaşam süresi üzerine katkılarını gösteren çalışmalar vardır (Altınbaş ve ark., 2003).

KANSER HÜCRELERİNİN ÖNEMLİ ÖZELLİKLERİ

Klonal orijin: Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğar. Baz kanserler birden fazla sayıda malign klonlardan doğar. Bu klonlar, ya bir saha hasarı (dokunun birden fazla sayıda hücresi karsinojene maruz kalmasıyla) ya da bazı genlerdeki kalıtsal defektler sonucu oluşurlar.

İmmortalite: Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler (çoğalırlar) ve bitmez tükenmez miktarda hücre oluştururlar. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken, çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat kanser hücrelerinde ve stem hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim normal olarak hücreler diferansiye olurken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe azalır. Tamamıyla diferansiye olmuş bir hücre istirahat "senescent" durumuna girer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölür. Oysa birçok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuçta, telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır (immortal kalır).

Genetik instabilite: Bu durum, DNA tamirindeki ve DNA “mismatche”lerini tanımadaki defektlerden dolayıdır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açar. Kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt veren klonlar oluştururlar. Bu klonların, ayrıca yabancı ortamlarda yaşama yeteneği de gittikçe artar ve böylece metastaz yaparlar.

Kontakt inhibisyonun ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı: Kültür ortamında büyüyen normal hücreler hücrelerin normalde yapıştığı substratuma yapışamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde (monolayer) doldurduklarında (konfluent hale geldiklerinde) da bölünme özelliklerini kaybederler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını (nütrientleri) ihtiva etse bile bölünmezler. Kanser hücreleri ise, yarı katı bir besiyerinde substratuma yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye (büyümeye) devam edebilirler. Hatta hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşsa bile büyüme devam edebilirler.

Proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak devamlı artışı: Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyüme devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler. Birçok hayvan türünün de bu şekilde davranması ilginçtir.

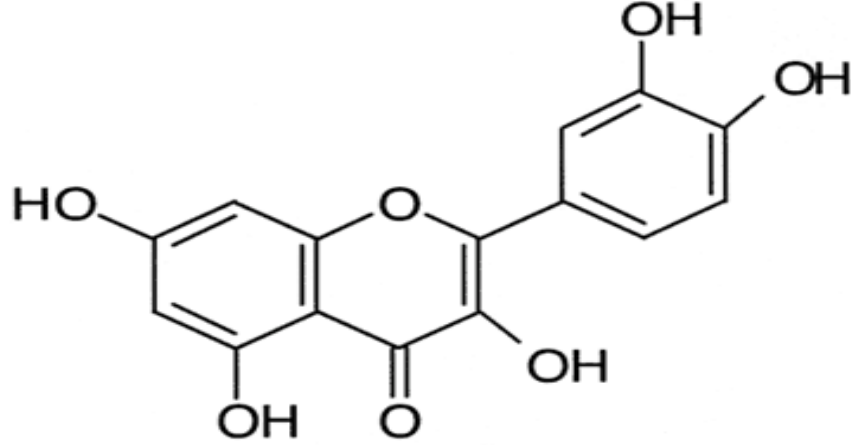
Anjiogenez: Anjiogenez mevcut kan damarlarından yeni damarların oluşumu şeklinde açıklanabilir. Vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilir. Birkaç milimetrenin üzerinde tümör büyümesi anjiogeneze bağlıdır. Kan desteği olmayan kanser kolonileri çap olarak 1 mm’den daha fazla büyüyemezler. Kan akımı sağlandıktan sonra, hücre ölüm hızı azalır ve tümör hızla büyür. Yeni kan damarlarının oluşumu anjiogenez adlanır. Anjiogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstrasellüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiogeneze rol oynar. Anjiogenez tümörlerin yayılmasında yani metastazda önemli rol oynar (Konukoğlu ve Turhan, 2005; Carmeliet, 2003).

Metastaz: Benign tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir, sadece malign hücrelerde görülür. Habis tümörler yalnızca buldukları doku ve organa zarar vermeye kalmazlar, yakınlarındaki organ ve dokulara da yayılabilir ve zarar verebilirler. Ayrıca kanserli hücreler buldukları bölgelerden kan ya da lenf damarları yoluyla bedenin başka bölgelerine taşınabilir, orada yerleşebilir. İşte kanserli hücrelerin buldukları doku dışında doğrudan ya da kan-lenf damarlarıyla başka bölgelere sıçramalarına “metastaz” (yayılma) denir (Stetler-Stevenson ve Kleiner, 2001). Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücre proteinlerinin kaybı ya da anormalliklerinden, hücreler arası interaksiyonun bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metalloproteaz gibi bazı enzimlerle (kollejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir. Sorumlu proteinler keşfedildikçe ve onların mekanizmaları aydınlatıldıkça metastatik süreç daha iyi anlaşılacaktır.

ÇALIŞMADA KULLANILAN TEST MADDELERİ

Kersetin (Quercetin, QUE):

Kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) günlük diyetimizde yer alan yenilebilir sebze ve meyvelerde en yaygın olarak bulunan bioflavonoiddir. Biyolojik etkileri sebebiyle ilaç olma potansiyeli olan ve çok sayıda bilimsel çalışmaya konu olan doğal bir maddedir. Ancak 1970'li yıllarda, AMES testi ile, mutajenik olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte yapılan *in vitro* çalışmalarda bulgular kersetinin mutajenik değil antimutajenik olduğunu göstermektedir. Ulusal Toksikoloji Programı (*National Toxicology Program*) tarafından yapılan bazı *in vivo* testlerde ise kersetinin F344 sıçanları üzerine karsinojenik etkileri gözlemlenmiştir. Ancak yapılan *in vivo* çalışmaların büyük çoğunluğu, kersetinin karsinojenik olmadığı yönündedir. IARC (*International Agency for Research on Cancer*), 1969 yılından itibaren karsinojenik risk taşıyan kimyasalları değerlendirme altına almaktadır. IARC, 1999 yılında, kersetinin insanlar için karsinojenik olmadığı sonucuna varmıştır. Kersetin, Amerika ve Avrupa'da ticari olarak satılmakta ve devam eden klinik çalışmalarda rapor edilen yararlı etkileri artmaktadır (Okamoto, 2005). Kersetin Hsp'lerin (Heat shock proteins, ısı şoku proteinleri) ekspresyonunu (özellikle Hsp70), inhibe ederek tümör hücreleri üzerine apoptotik etki gösterir (Pawlikowska-Pawlega ve ark., 2001). C6 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, ısı şoku sonucu, kersetinin sitosolde Ca^{+2} birikimine sebep olduğu ve ısı stresinin inhibe edilmesinde, GTP-bağlayıcı proteinlerin, fosfolipaz C (PLC) aktivitesi, inozitol trifosfat üretiminin ya da reseptörlerinin rol oynadığı savunulmuştur (Kagaya ve ark., 2000). Kersetinin fosfolipaz A₂ (PLA₂) ve lipoksijenaz yollarını, oksidatif strese inhibe ettiği, ancak ısı stresinde inhibe etmediği gösterilmiştir (Gossiau ve Rensing, 2000). Beyinde nörotoksikite ve patogeneze sebep olan aşırı nitrik oksit üretiminin, kersetinin de aralarında olduğu, besinlerde bulunan bazı kimyasal maddelerle engellenebileceği C6 hücreleri ile gösterilmiştir (Soliman ve Mazzio, 1998).

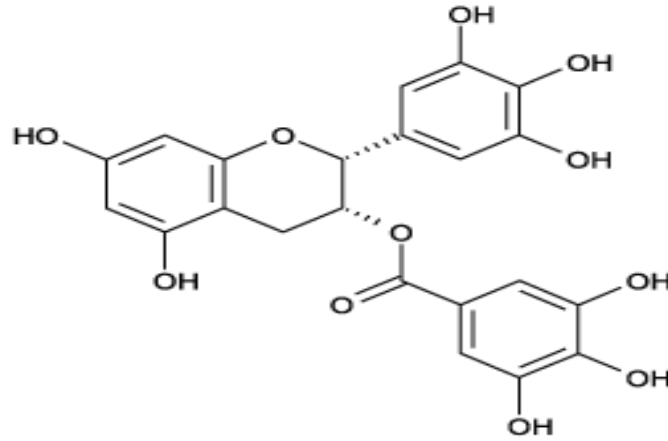


Şekil 3. Kersetinin Kimyasal Formülü (<http-2>)

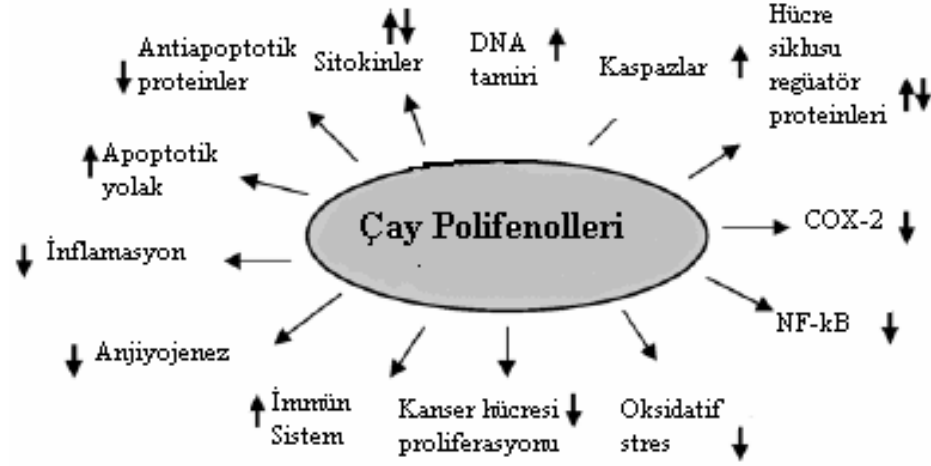
Epigallokateşin Gallat (EGCG):

Çay, dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecektir. EGCG, yeşil çayda var olan polifenoliklerden en bol bulunan kateşindir. Yeşil çayda bulunan diğer

kateşinler, epikateşin, epikateşin galat ve epigallokateşindir. Yeşil çayda bulunan polifenollerin, özellikle EGCG'nin antikarsinojenik etkileri, çeşitli hayvan ve hücre kültürü deneyleri ile gösterilmiştir. EGCG, serbest oksijen radikallerini süpürücü etkileri yanında, glutasyon peroksidaz, gama glutamilsistein sentaz, kuinon redüktaz, hemoksijenaz enzimlerini düzenleyerek de antioksidan etki göstermektedir. Sigaraya spesifik nitrozaminlerin oluşturduğu DNA hasarını ve sitotoksiteyi engellemektedir. UVB ile indüklenen ERK1/2 fosforilasyonunu inhibe ederek de kemopreventif etkiye sahip olduğu da çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir. Siklin bağımlı kinazları modüle eder, TNF- α , prostaglandinler (özellikle PGE2) ve interlökin (IL) gibi proinflamatuvar faktörlerin overekspresyonunu inhibe ederek tümör oluşum mekanizmalarını bozar. Bazı kanser türlerinde siklooksijenaz-2'nin (COX-2) overekspresyonu vardır ve EGCG bu ekspresyonu da inhibe etmektedir. Tümör invazyonunda önem taşıyan MMP-2 ve MMP-9'un aktivitelerini de azaltması ile EGCG kanser tedavisi ve kanserden korunma için ilaç olarak ümit verici görülmektedir (Na ve Surh, 2006; Katiyar ve ark., 2006). Ca^{+2} hücre içi haberci gibi davranarak, hücre büyümesi ve ölümü gibi fonksiyonları regüle eder. EGCG'nin hipokampal nöronlarda, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4izoksazolpropiyonik asid (AMPA) tarafından indüklenen intraselüler Ca^{+2} artışını inhibe ettiği, ancak fizyolojik konsantrasyonlardaki miktarında herhangi bir değişime sebep olmadığı da çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Bununla birlikte, EGCG'nin platelet kaynaklı büyüme faktörü'nün (PDGF) b-reseptörüne bağlanması ile oluşan intraselüler Ca^{+2} artışını da inhibe ettiği gösterilmiştir. U87 insan astrostoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada EGCG'nin hücreye dışarıdan kalsiyum geçişini arttırması yanı sıra, PLC aktivasyonu ve inozitoltrifosfat yolağı ile de storlardan sitoplazmaya kalsiyum akışını arttırdığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2004). U-373, U-87 ve C6 glioblastoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada EGCG'nin apoptotik etkileri ve bu etkilerde insülin benzeri büyüme faktörü-I'in (IGF-I) etkili olduğu savunulmuştur (Yokoyama ve ark., 2001).



Sekil 4. EGCG'nin Moleküler Yapısı (<http-3>)



Şekil 5. Çay Polifenollerinin Kanserdeki Etkileri (Katiyar ve ark., 2006)

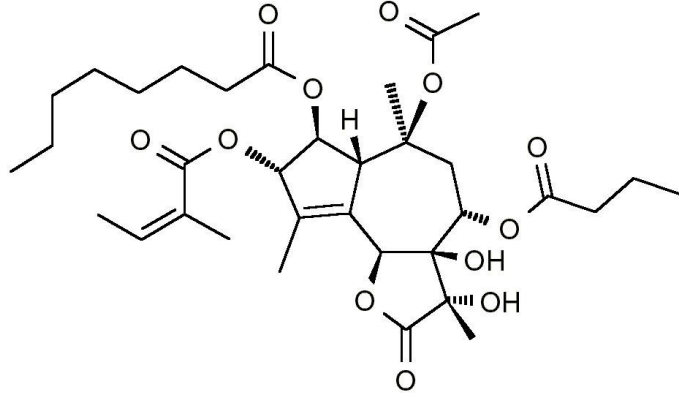
Kalsiyum Fosfat (Calcarea phosphorica, $Ca_3(PO_4)_2$, CP):

Kalsiyum fosfat, homeopatik ilaç olarak yaygın olarak kullanılmasına rağmen kanser üzerine etkilerine ilişkin fazla bilimsel yayın bulunmamaktadır (Rajkumar ve ark., 2006). Ancak Prasanta Banerji Homeopatik Araştırma Vakfı'nda (PBHRF) yürütülmekte olan klinik çalışmalarda hastaya beyin tümörlerini tedavi etmek amacı ile verilen homeopatik Ruta ekstresi yanında kullanılan CP sonucu elde edilen MR sonuçlarında beyin tümörlü hastaların 6 yıldan fazla yaşadığı ve glioblastoma multiforme (GBM)'li hastalarda tümör kitlesinin kalsifiye olduğu ve 6 ayda bir yapılan takipler sonucunda büyüme olmadığı gözlenmiştir. Bu konuda yaptıkları iki bilimsel çalışma ile de bu yöntemin sonuçları bilimsel olarak gösterilmiştir (Banerji ve Banerji, 2001; Pathak ve ark., 2003). 2000 yılında Himpens ve Vereecke tarafından yapılan ve Almanca olarak yayınlanan bir çalışmada, hücre içi ve dışında alınan kalsiyumun, hücre içinde fosforilasyon ve sinyal iletimi ve hücreler arası iletişimde farklı etkileri olduğu gösterilmiştir (Himpens ve Vereecke, 2000). Ca^{2+} sinyalleri hücre fonksiyonları ve yaşamı için çok önemli olmakla beraber, diğer taraftan, intraselüler Ca^{2+} , un aşırı artışı ya da düzeninin bozulması, hücre ölümünü sağlayacak mekanizmaların aktive olmasına ya da artmasına sebep olabilir. Ca^{2+} ,un hücrenin içine ya da dışına akışı arasındaki denge bozuklukları, intraselüler Ca^{2+} ,un aşırı artmasına ve iskemik nöronların ya da kardiyomyositlerin ölümünün başlamasına sebep olduğu savunulmaktadır. Ca^{2+} ,un apoptosis ve nekroz ile ölüme direkt olarak ölüm sinyallerini başlattığı düşünülmekle beraber, direkt olarak proteazlar, fosfolipazlar ve nükleazlar gibi katabolik enzimleri aktive ederek hücre ölümüne ve doku hasarına sebep olduğu gösterilmiştir (Berliocchi ve ark., 2005; Mason, 1999). Nicholls ve Chalmers tarafından yapılan çalışmalarda Ca^{2+} ,un hücre içinde çalışması için fosfat iyonunun önemi ve sıçan beyninde mitokondriyal kalsiyum taşınımı ve depolanması için fosfat iyonunun önemi çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Nicholls ve Chalmers, 2004, Chalmers ve Nicholls, 2003).

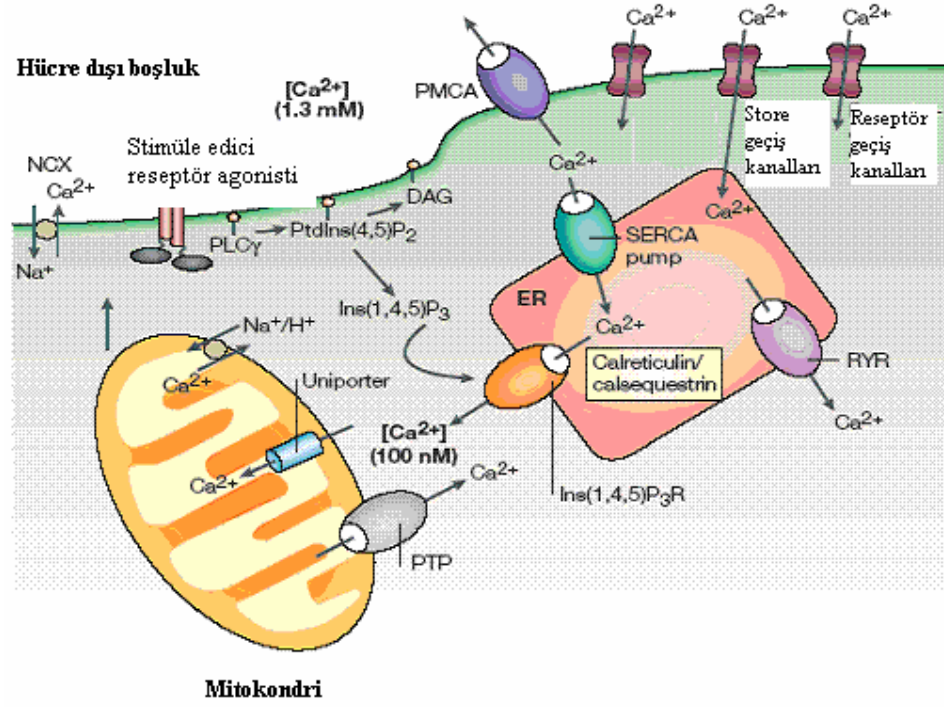
Tapsigargin (TG)

Tapsigargin, *Thapsia garganica*'dan elde edilen ve intraselüler Ca^{2+} transport ATPazların spesifik inhibitörü olan bir tetrasiklik seskiterpen

laktondur. Tapsigargin, SERCA olarak bilinen sarko/endoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz enzimlerinin spesifik inhibitörü olup bu enzimlere sıkıca bağlanır. Tapsigargin, endoplazmik retikulumdan (ER), sitoplazmaya kalsiyum pompalayan sistemi bloke eder, inozitol trifosfat (IP3)'a bağımlı çalışan ER kalsiyum kanallarını açar ve plazma zarı kalsiyum kanallarını açarak sitoplazmaya kalsiyum geçişini arttıran tümör tetikleyici bir ajandır (Delpino ve Castelli, 2002). SERCA izoformları sadece kas hücrelerinde eksitasyon ve kontraksiyondan değil, diğer tüm hücrelerde, proteinlerin fosforilasyon-defosforilasyonları, gen transkripsiyonu, hücrelerin proteolizleri ve apoptozis gibi olayları düzenleyen hücre içi kalsiyum sinyal iletimini düzenleyen mekanizmadır. Kalp yetmezliği gibi bazı patolojik olaylarda SERCA'da defektler olduğu gösterilmiştir. Kalp yetmezliğinde SERCA'daki defektin çok önemli bir patogenetik faktör olduğu bildirilmiştir (Inesi ve ark, 2005). Yapılan bir çalışmada, tapsigarginin, araşidonik asid salınımını arttırdığı ve bu olayı sitoplazmik Ca^{2+} 'a bağımlı fosfolipaz A2'yi (PLA2) aktive ederek gösterdiği savunulmuştur (Levine 2005).



Şekil 6. Tapsigargin'in Moleküler Yapısı (<http-4>)



Şekil 7. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalizasyonu (<http-5>)

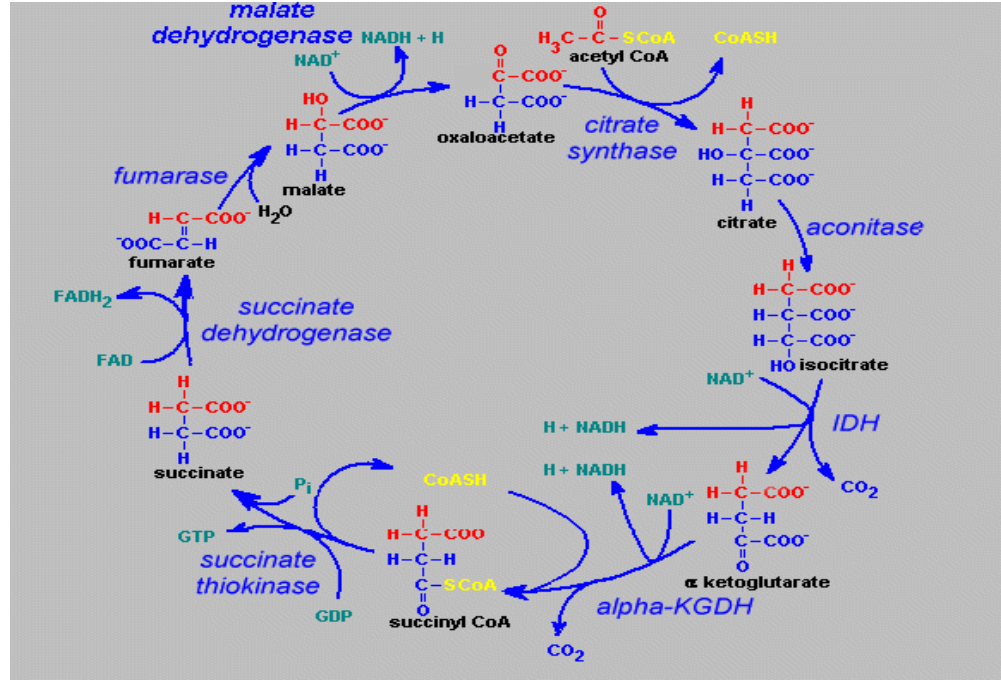
YÖNTEMLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) ile Mitokondriyal Süksinat dehidrojenaz enzim ölçümü

MTT hücre proliferasyon ölçümü hücre proliferasyonunu, canlılığını ve sitotoksisiyeyi ölçmekte kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Holst-Hansen ve Brünner, 1998). Bu tekniğin mitokondriyal enzim sistemleri tarafından katalize edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayandığı ve hücre büyümesi ve ksenobiyotik sitotoksitesini yansıttığı bildirilmiştir.

Yaşayan hücreler bazı vital boyalar kullanılarak boyanabilmektedir, ancak yıkama basamakları hem süreyi uzatmakta, hem de hata payını arttırmaktadır. ELISA cihazı (çok kuyucuklu plaka okuyucu) çok miktarda örneği, yüksek oranda doğrulukla okuyabilir, böylece kullanılan renk reaksiyonunu yaşayan hücre sayısı olarak değerlendirebilme imkanı sağlar. Bu tür kolorimetrik ölçümlerde ideal olan renksiz substratlar kullanarak yaşayan hücrelerde renkli ürünler elde etmektir. Tetrazolyum tuzları bu amaçla kullanılan, substrat olarak renksiz, yaşayan hücrelerin aktif mitokondrilerinde renkli ürünler veren maddelerdir. MTT bu amaçla kullanılan bir tetrazolyum tuzudur ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Formazan tuzları organik solventlerde (DMSO, izopropanol gibi) kolayca çözünürler. Solventte çözünen materyalin optik dansitesi, çözülmüş olan boyanın konsantrasyonunun verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçülen değer direkt olarak kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini verir, bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (Mosmann, 1983; Denizot ve Lang, 1986; Carmichael ve ark, 1987). Bu yöntem hızlı kolay ve çalışma basamaklarının az olması ve 96 kuyucuklu plaka

ile çalışma imkanı olması açısından hızlı kolay ve çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren bir testtir (Reile ve ark., 1990; Kueng ve ark., 1989; Senaratne ve ark. 2000).



Şekil 8. Krebs Siklusu ve Süksinat Dehidrojenaz Enzimi

Süksinat dehidrojenaz, Krebs siklusunun mitokondri zarında olan tek enzimidir ve süksinatı fumarata katalizler. Krebs siklusunun diğer tüm enzimleri solubl fazdadır. Yapısal analogu olan malonat, süksinat dehidrojenazın kompetitif inhibitörüdür (Voet ve Voet, 1995; Alberts ve ark, 1994).

Nötral Kırmızı (NR) ile Lizozomal Enzimlerin Ölçümü:

Nötral kırmızısı (neutral red, toluylene red, Basic Red 5, or C.I. 50040) ile boyama tekniği hücre kültürlerinde yaygın olarak kullanılan vital bir tekniktir ve Borenfreund (2000) tarafından tanımlanmıştır. Lizozomlar tarafından katyonik NR'in uptake'ine dayanır. Supravital bir boya olan neutral red up-take zayıf katyonik bir boyadır ve noniyonik difüzyonla hücre membranından penetre olarak lizozomlarda akümüle olur ve lizozomal matriksin anyonik bölgelerine bağlanır. Hücre yüzeyinde veya lizozomal membranda meydana gelen değişiklikler lizozomal hassaslığa ve diğer irreversibl değişmelere önderlik ederler. Ksenobiyotiklerin aktivasyonu ile meydana gelen bu değişimler NR'in bağlanmasında veya up-take'inde azalmaya sebep olur. Bu nedenle yaşayan- sağlıklı, hasarlı-ölü hücreler boyayı almaları farklı olur ki, bu da yöntemin temelini oluşturmaktadır. (Horakova ve ark., 2001; Shen, 1998; Xie ve ark., 1999).

Sulforodamin-B Ölçümü (SRB):

Sulforodamin-B ölçümü, MTT, NR gibi hücre kültürlerinde sitotoksitenin ölçülmesi için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir, ancak MTT ve NR gibi vital bir yöntem değildir. Süspansiyon ya da adherent hücre kültürlerinde total protein miktarını ölçmek için Skehan ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş, ekonomik ve ilaçlarla oluşan sitotoksite ölçümleri için kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Ulusal Kanser Enstitüsü'nün tarama çalışmalarında ve yeni anti-kanser ilaç çalışmaları için elverişli bir yöntem olarak öngörülmüştür. Lowry ve Bradford yöntemlerine alternatif olarak önerilen bir yöntemdir (Skehan ve ark., 1990).

DNA ve RNA (Ribonükleik asit)'nın Akridin Oranj ile Floresan Boyanması

Nükleer kromatinler hücre siklusu boyunca yoğunlaşmaya başlarlar. Mitozda maksimum yoğunlaşma gözlenirken S fazına girdiğinde yoğunlaşma azalmaya başlar. Bu yöntem ile nükleik asitler (DNA-yeşil ve RNA-turuncu) floresan olarak boyanır (Kasten, 1981). Etidyum, akridin oranj, proflavin gibi (planar aromatic cation) maddeler DNA'nın iki zinciri arasında birikir ve U.V. lambası ışığında serbest boyadan çok fazla floresans gösterir, deney bu esas göz önünde tutularak uygulanmaktadır. DNA miktarına bağlı olarak floresans miktarı da değişmektedir (Celis, 1998).

GEREÇLER

Kimyasallar ve Çözeltiler

Akridin oranj (Sigma)

Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)

Dimetilsülfoksit -DMSO (Sigma, Merck)

Fetal Sığır Serum (FCS, Biological Industries)

Formaldehit (Merck)

Fosfat Tuz Tamponu-A (Phosphate Buffer Saline, PBS-A)

Glasiyel Asetik asit (Sigma)

Ham'ın F12 Besiyeri (Ham's F12 Medium, F12)

Hank's Balans Tuz Solüsyonu (Sigma)

Kalsiyum Fosfat $Ca_2(PO_4)_2$ (Sigma)

Kalsiyum klorür- $CaCl_2$ (Merck)

Kersetin (sigma)

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

Neutral Red (Sigma)

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (Sigma)

Sodyum bikarbonat (Merck)
Tripsin-EDTA Solüsyonu (Biological Industries)
Tapsigargin (Serva)
Tris baz (Sigma)
Trikloroasetik asit (Merck)

Malzemeler

Otoklavlanabilir cam şişe (Isolab)
96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP)
25 ve 75 cm²'lik kültür şişeleri (TPP)
15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpü (TPP)
1, 2, 5 10 ve 25 ml'lik cam pipet (Isolab)
5, 10 ve 25 ml'lik tek kullanımlık pipet (Serological Pipette)
Neubauer lamı (Iso-lab)
0,5-10, 10-100, 20-200 ve 100-1000 µl'lik mikropipetler ve steril uçları (Eppendorf),
300 µl'lik 12 kanallı mikropipet ve uçları (Eppendorf)
Adımlı pipet ve enjektör tipi uçları (Eppendorf)

Cihazlar

Steril Kabin (Holten)
Karbondiyoksit inkübatörü (Heraeus)
Soğutmalı santrifüj (Heraeus)
İnverted mikroskop (Olympus)
İmmüno-floresan mikroskop ve fotoğraf ataçmanı (Olympus)
ELISA cihazı (Bio-Tek)
Otoklav (Hirayama)
Kuru hava sterilizatörü (Heraeus)

YÖNTEMLER

Hücrelerin Stoktan Çıkarılması

196 °C'de sıvı azot tankında bulunan hücre süspansiyon stoklarını içeren hücre kültürü tüpü (cryovial), sıvı hale gelince, besiyeri içine alınarak, 1200 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar dökülerek, hücreler yeni besiyeri içinde dağıtılmış ve yeni kültür şişelerine koyularak 37 °C'de, %95 bağıl nem içeren CO₂ inkübatöründe kültüre alınmıştır. Hücrelerin yetiştirilmesinde %2.5 FCS içeren DMEM:F-12 besiyeri kullanılmıştır.

Hücrelerin Tripsinlenmesi

C6 hücreleri, deneyler için yeterli sayıya eriştiklerinde tripsinlenerek toplanmıştır. Tripsin, 100 ml için, 10 ml 10 × Puck's Saline A (PSA) tampon çözeltisi, 0,5 ml %7,5 sodyum bikarbonat çözeltisi, 10 ml 10X Tripsin-EDTA çözeltisi ve 79,5 ml steril distile su, steril şartlarda karıştırılarak hazırlanmıştır.

Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması

Neubauer lamı ile sayılan hücreler, ml'de 50 000 hücre olacak şekilde hazırlanmıştır. MTT, NR ve SRB testleri için 96 kuyucuklu plakalara 0.1 ml hücre süspansiyonu (5 000 hücre) ekilmiştir. Hücreler yapışmaları için 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda hücrelerin üzerlerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılmıştır. Üzerlerine test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilmiştir.

Kersetin'in 1-10-25-50 ve 100 µM konsantrasyonları, Epigallokateşin gallatın 0.1-1-10-25 ve 50 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda önerilen şekilde DMSO'nun besiyeri içindeki final konsantrasyonu % 0.1'i geçmeyecek şekilde maddeler 1 ml içine 1 µl DMSO'da verilmiş ve Kersetin'in final konsantrasyonları 1-10-25-50 ve 100 µM ve Epigallokateşin galatın final konsantrasyonları 0.1-1-10-25 ve 50 µM olarak sağlanmıştır. Kalsiyum fosfat 25 µM olarak suda, taspigargin 1 µM olarak DMSO içinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

Test maddelerini içeren besiyerleri, 96 kuyucuklu plakalardaki hücrelerin üzerine ilave edilerek, karbondioksit inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. 24-48-72 ve 96 saatler sonunda hücrelere testler uygulanmıştır.

MTT Ölçümü

MTT 5 mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözündürülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonu stok solüsyondan 1 kısım stok solüsyon ve 9 kısım besiyeri karıştırılarak taze hazırlanmıştır (0.5 mg/ml MTT) (bir plaka için 10 ml). 96 kuyucuklu plakadaki hücreler üzerine, her bir kuyucuğa 0.1 ml MTT çalışma solüsyonu ilave edilerek karbondioksit inkübatöründe 3-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda plakalar alınarak, besiyerleri uzaklaştırılmış ve 0.1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur (Mosmann, 1983; Denizot ve Lang, 1986; Holst-Hansen ve Brünner, 1998; Tedone ve ark., 1996; Alley ve ark., 1988; Horakova ve ark., 2001; Reile ve ark., 1990).

Neutral Red Up-take Sitotoksite Ölçümü

Test maddeleri ile gerekli süre bekletilen hücreler alınarak, besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler 37°C'ye getirilerek PBS ile yıkanmıştır. NR'ın %0.4'lük stok solüsyonu 1:100 oranında besiyeri ile karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlanmış ve her bir kuyucuğa 0.1 ml ilave edilerek 37°C 'de 3-4 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda boya solüsyonu uzaklaştırılarak taze hazırlanmış formaldehit-kalsiyum klorür fiksatif/yıkama solüsyonundan (10 ml %10 kalsiyum klorür, 1.3 ml formaldehit, 89 ml distile su) 100'er ml ilave edilerek yıkanmış ve solüsyon dökülerek, plakalar ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde bir gün bekletilerek kurutulmuş ve asetik asit-etanol (1 ml

glasiyel asetik asit, 99 ml %50 etanol) solüsyonu her bir kuyucuğa 0.1 ml ilave edilerek 30 dakika oda ısısında bekletilmiş ve çalkalayıcıda çalkalanarak boya homojen hale getirilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutuldu (Horakova ve ark., 2001; Shen, 1998; Xie, 1999).

Sülforodamin-B Ölçümü (SRB)

Hücreler %50 trikloroasetik asit solüsyonunda 1 saat, +4°C'de fikse edilmiş ve oda ısısında 30 dakika %0.4'lük SRB solüsyonu ile boyanmıştır. Fazla boyaları uzaklaştırmak için %1 asetik asit çözeltisi ile plakalar dört defa yıkanmış ve hava ile kurutulmaya bırakılmıştır. 10 µM hazırlanan TRIS baz çözeltisinde çözündürülen SRB, 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. 1 gram Tapsigargin (MW: 650,75 g/mol) DMSO'da çözünmüştür.

Akridin Oranj ile Floresan DNA ve RNA Boyaması

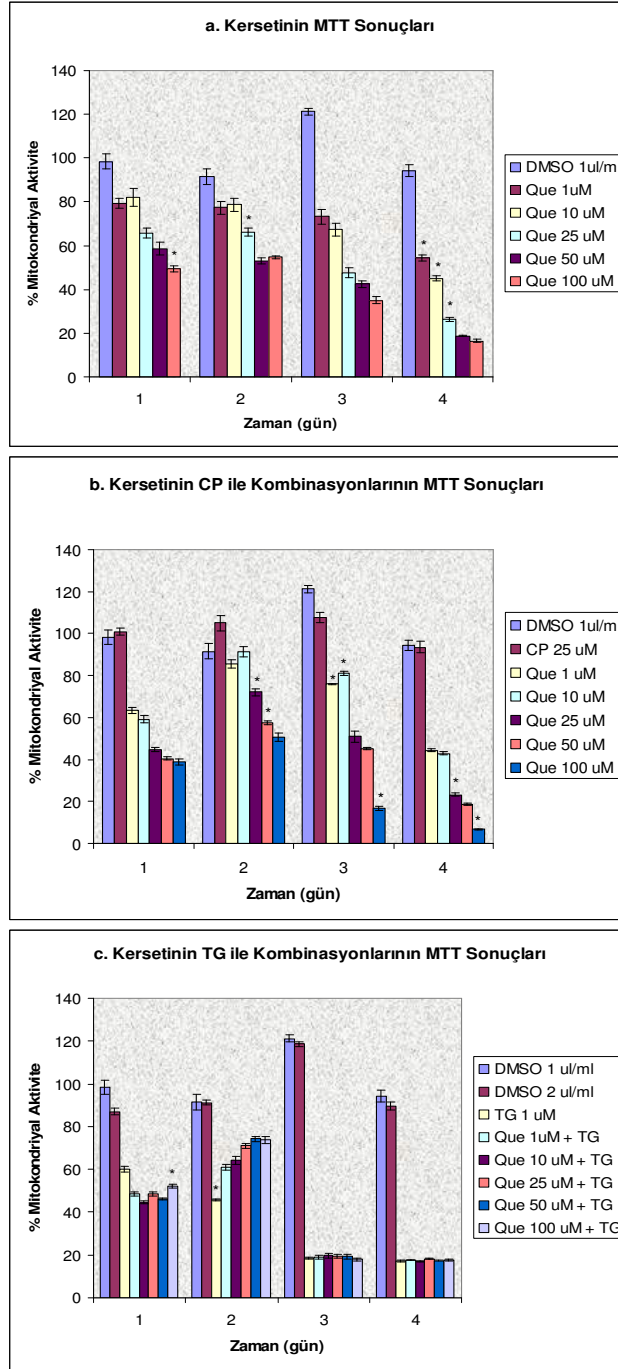
Lameller üzerine ekilen hücreler test maddeleri ile 24 saat muamele edildikten sonra, 2 kez 2 dakika PBS ile yıkanmıştır. 5 dakika % 70 etanol ile fikse edilen hücreler 5 defa distile su ile yıkanmıştır. 2 dakika PBS'de ve oda ısısında 15 dakika bekletilerek, akridin oranj çalışma çözeltisi ile boyanmıştır. Boya kurutma kağıdının üzerine lamellerin dik tutulması ile uzaklaştırılmış ve 4 kez PBS ile yıkanmıştır. Lamellere bir damla PBS damlatılmış ve lamellar üzerlerine kapatılarak etrafları şeffaf tırnak cilası ile sabitlenerek floresan mikroskopunda incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir (Celis, 1998; Kasten,1981).

Biyoistatistiksel Yöntem

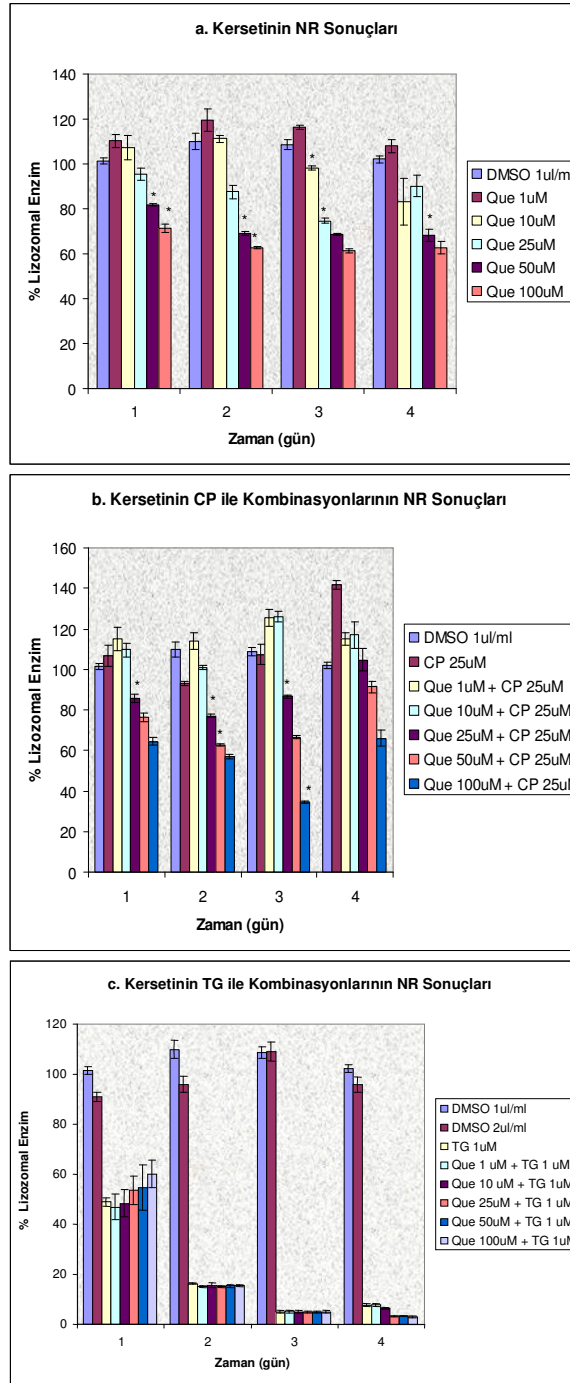
Testler 4 kez uygulanmış, optik dansite olarak elde edilen değerler, kontrole göre % değerlere dönüştürüldükten sonra, SPSS (Statistic Program for Social and Science) yazılım programında, one-way ANOVA testi ve *post-hoc* olarak da Tukey testi uygulanmış, anlamlılık değerleri olarak da $p < 0,005$ kabul edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

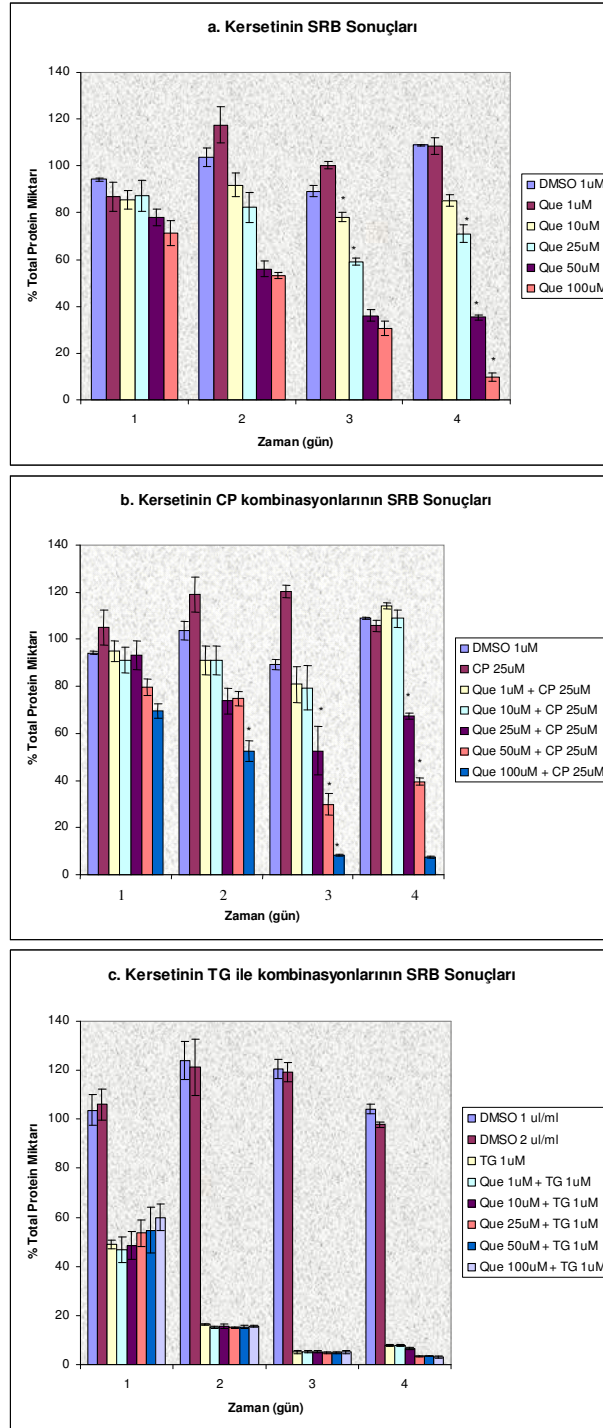
Kersetin Sonuçları



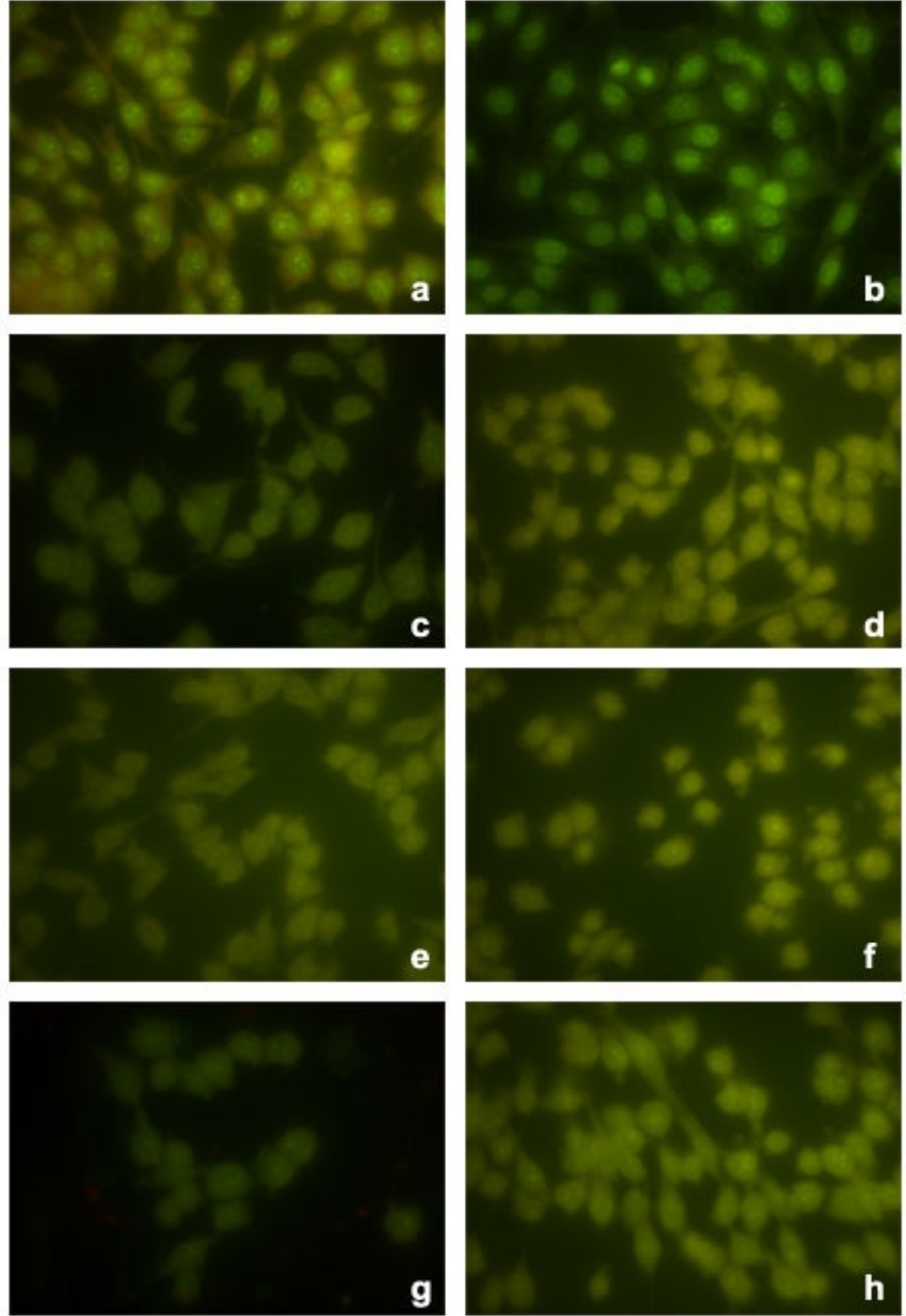
Şekil 9. Kersetinin C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin MTT Sonuçlarının Grafikleri: a-Kersetin, b-Kersetinin Kalsiyum Fosfat ile Kombinasyonu, c-Kersetinin Tapsigargin ile Kombinasyonu. (*) Kontrol ve Dozlar Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,005$, Ortalama Değer \pm Standart Hata (n=4)



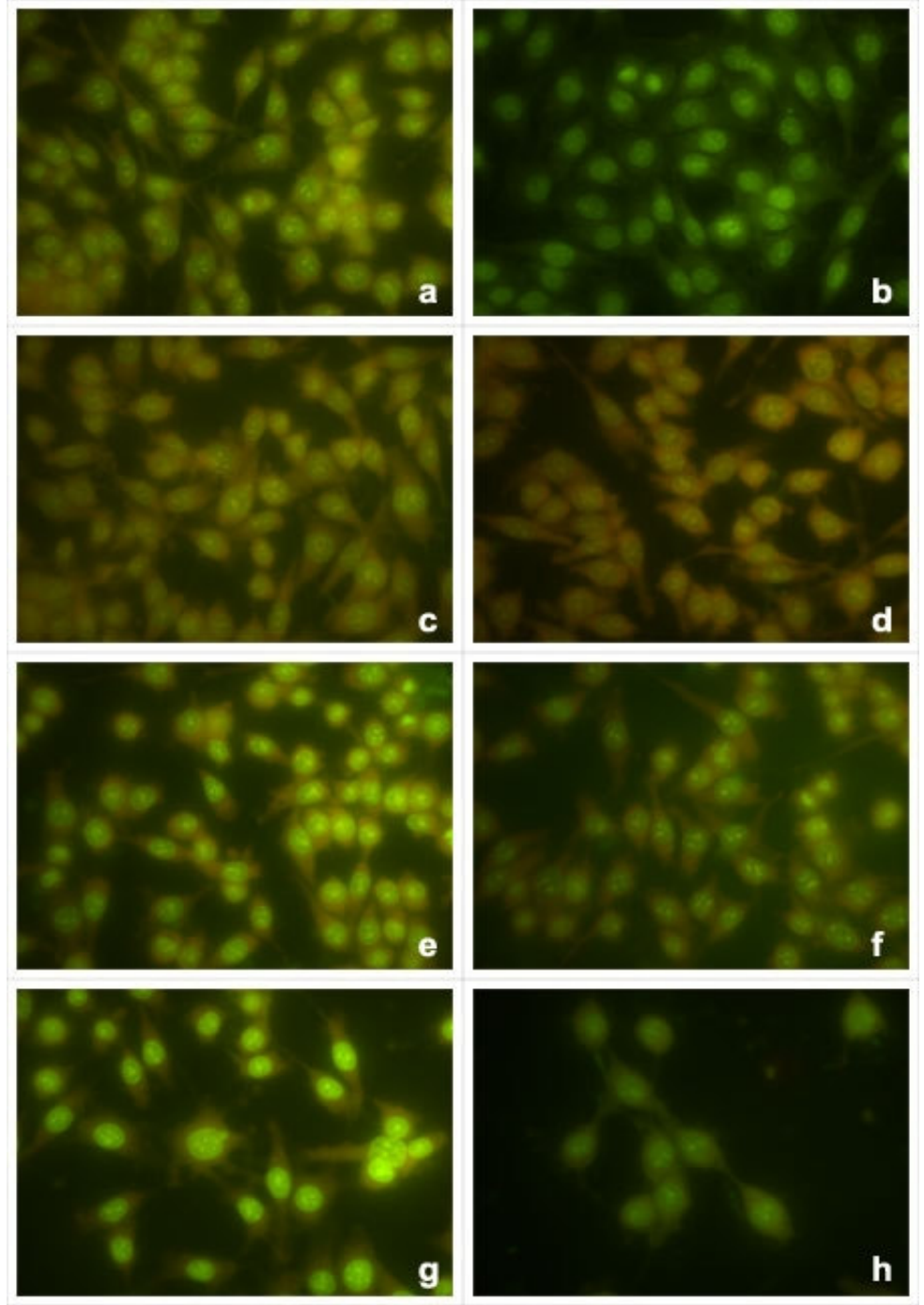
Şekil 10. Kersetinin C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin NR Sonuçlarının Grafikleri: a-Kersetin, b-Kersetinin Kalsiyum Fosfat ile Kombinasyonu, c-Kersetinin Tapsigargin ile Kombinasyonu. (*) Kontrol ve Dozlara Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,005$, Ortalama Değer \pm Standart Hata (n=4)



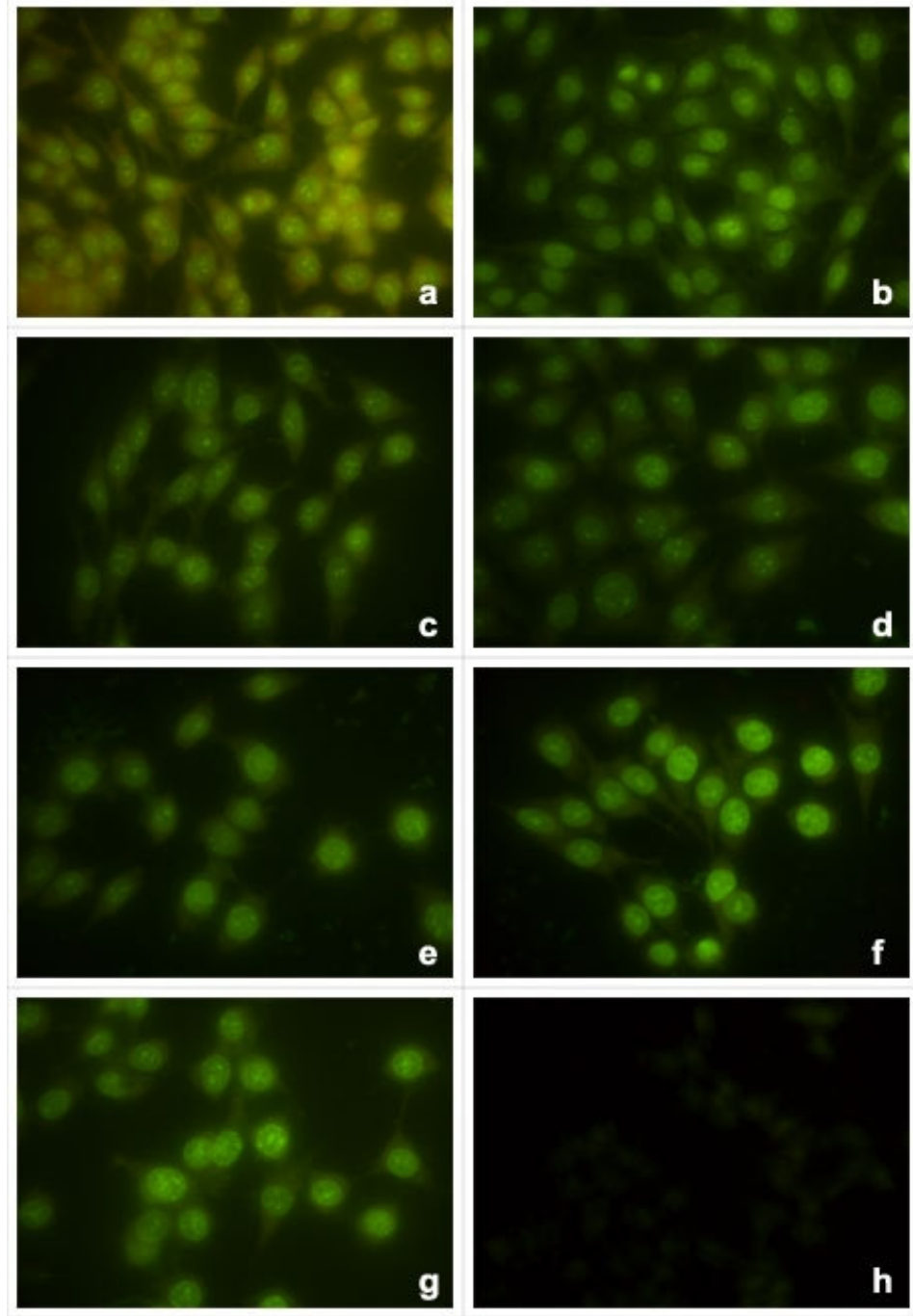
Şekil 11. Kersetinin C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin SRB Sonuçlarının Grafikleri: a-Kersetin, b-Kersetinin Kalsiyum Fosfat ile Kombinasyonu, c-Kersetinin Tapsigargin ile Kombinasyonu. (*) Kontrol ve Dozlara Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,005$, Ortalama Değer \pm Standart Hata (n=4)



Şekil 12. Kersetin Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyanması Sonucu Floresan Mikroskobunda Elde Edilen Görüntüleri. a-Kontrol, b-DMSO 1µl, c-1 µM, d-10 µM, e-25 µM, f-50 µM, g-100 µM, h-DMSO 2µl



Şekil 13. Keratin ile CP Kombinasyonu Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyanması Sonucu Floresan Mikroskopunda Elde Edilen Görüntüleri. a-Kontrol, b-DMSO 1 μ l, c-25 μ M CP, d-1 μ M + 25 μ M CP, e-10 μ M + 25 μ M CP, f-25 μ M + 25 μ M CP, g-50 μ M + 25 μ M CP, h-100 μ M + 25 μ M CP



Şekil 14. Kersetin ile Tapsigargin Kombinasyonu Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyanması Sonucu Floresan Mikroskopunda Elde Edilen Görüntüleri. a-Kontrol, b-DMSO 1µl, c-1 µM TG, d-1 µM + 1 µM TG, e-10 µM + 1 µM TG, f-25 µM + 1 µM TG, g-50 µM + 1 µM TG, h-100 µM + 1 µM TG

Kersetinin MTT Sonuçları

Kersetinin C6 hücreleri üzerine tek başına uygulanması ile, mitokondriyal aktivitede doza ve zamana bağımlı bir azalma gözlenmiştir. Etki 4. günde de devam etmektedir ve mitokondriyal aktivitede, kontrole göre, en düşük doz olan 1µM konsantrasyona ile 4. gün sonunda %54.3675, 100 µM konsantrasyon ile de %16.5175 olan değerler elde edilmiştir (**Şekil 9a**).

Kersetinin CP ile kombinasyonu ile 1µM konsantrasyonda 4. gün elde edilen değer %44.3825, 100 µM konsantrasyon ile elde edilen değer ise %6.7275'tir (**Şekil 9b**). CP'nin tek başına uygulanması ile elde edilen değer ise kontrole eşdeğerdir. Kersetinin CP ile kombine olarak uygulanması ile kersetinin etkisi artmıştır.

Kersetinin TG ile kombinasyonlarında 2. gün TG'in mitokondriyal aktivite üzerine etkisi, kersetin tarafından doza bağımlı olarak önlenmiştir, ancak 3. ve 4. günlerde, tüm kersetin dozlarının TG ile kombinasyonları, mitokondriyal aktivitede TG'in tek başına verilmesi ile aynı oranda (%17) azalmaya sebep olmuştur (**Şekil 9c**).

Kersetinin NR Sonuçları

Kersetinin, C6 hücreleri üzerine tek başına uygulanması ile, lizozomal enzimlerde doza ve zamana bağımlı bir azalma gözlenmiştir. Ancak bu etki, 3. gün sonunda en yüksek doz olan 100 µM ile ancak %61.165 gibi bir değere düşmüştür, 4. gün ise mitokondriyal aktivitede azalma gözlenmemiş ve değerler 3. güne benzer şekilde kalmıştır (**Şekil 10a**).

Kersetinin CP ile kombinasyonu ile 100 µM doz uygulanan hücrelerde, lizozomal enzimler 3. gün %34.4675 'e düşmüştür (**Şekil 10b**). CP'nin tek başına uygulanması ile elde edilen değerler kontrole eşdeğer bulunmuştur.

Kersetinin TG ile kombinasyonlarında 1. gün TG'in lizozomal enzimler üzerine etkisi, kersetin tarafından doza bağımlı olarak önlenmiştir, ancak 2. günde %17 ve TG'e eşdeğer, 4. günde ise kersetinin TG ile kombinasyonlarında, kersetin TG'in etkisini potansiyalize etmiştir ve lizozomal enzim aktivitesi %3'e düşmüştür (**Şekil 10c**).

Kersetinin SRB Sonuçları

Kersetinin, C6 hücreleri üzerine tek başına uygulanması ile 1 µM konsantrasyonda 2. gün, çözücü kontrolü olarak uygulanan DMSO grubuna göre, total protein miktarında artma tespit edilmiştir. Ancak 10 µM ve üzeri konsantrasyonlarda gözlenen etki doza ve zaman bağımlı olarak azalma şeklindedir ve 4. gün sonunda en yüksek konsantrasyon ile total protein miktarı %9.8275'e düşmüştür (**Şekil 11a**).

Kersetinin CP ile kombinasyon sonuçlarında 3. güne kadar konsantrasyon ve üzeri dozlarda doza ve zamana bağımlı etki elde edilmiştir. Ancak 4. günde, 25 µM ve üzeri konsantrasyonlar ile elde edilen değerler 3. güne göre azalma şeklindeyken, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda elde edilen değerler kontrole ve CP'nin tek başına uygulanması ile elde edilen değerler ile eşdeğer bulunmuştur (**Şekil 11b**).

Kersetinin TG ile kombinasyonlarında, NR sonuçları ile benzer bir grafik elde edilmiştir. Kersetin ilk gün TG'in etkisini az bir oranda doza

bağımlı olarak azaltırken, 2. günden itibaren TG'in tek başına uygulanması ile elde edilen değerlere eşdeğer sonuçlar elde edilmiş ve ortalama olarak total protein miktarı 2. gün %15'e, 3 ve 4. gün %5'e düşmüştür (**Şekil 11c**).

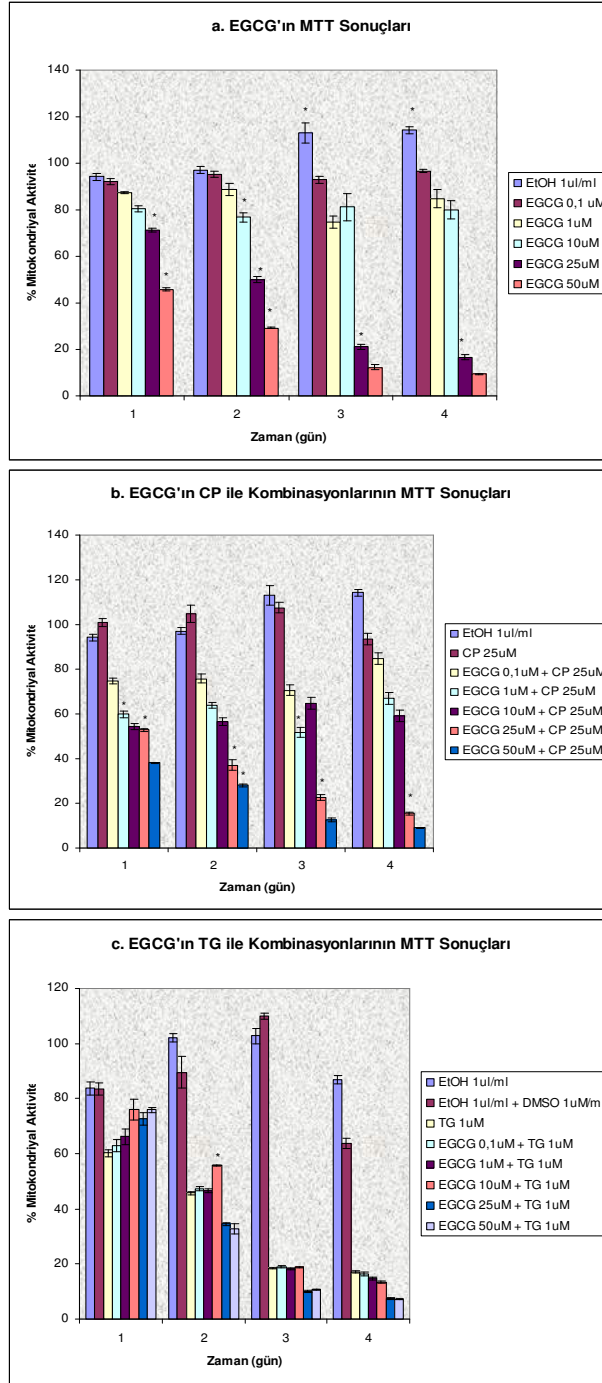
Kersetinin Akridin Oranj Sonuçları

1 μM konsantrasyonda kersetin uygulanması ile, kontrolde sitoplazmada kırmızı renk ile gözlenen protein sentezi gözlenememekte ve hücreler uzantılarını kaybetmiş görünmektedir. Artan konsantrasyonla beraber hücreler sitoplazmalarını kaybetmekte ve hücre yüzeyinde tomurcuklanma (blebbing) oluştuğu ve artan dozla birlikte hücre sayılarında azalma olduğu görülmüştür (**Şekil 12**).

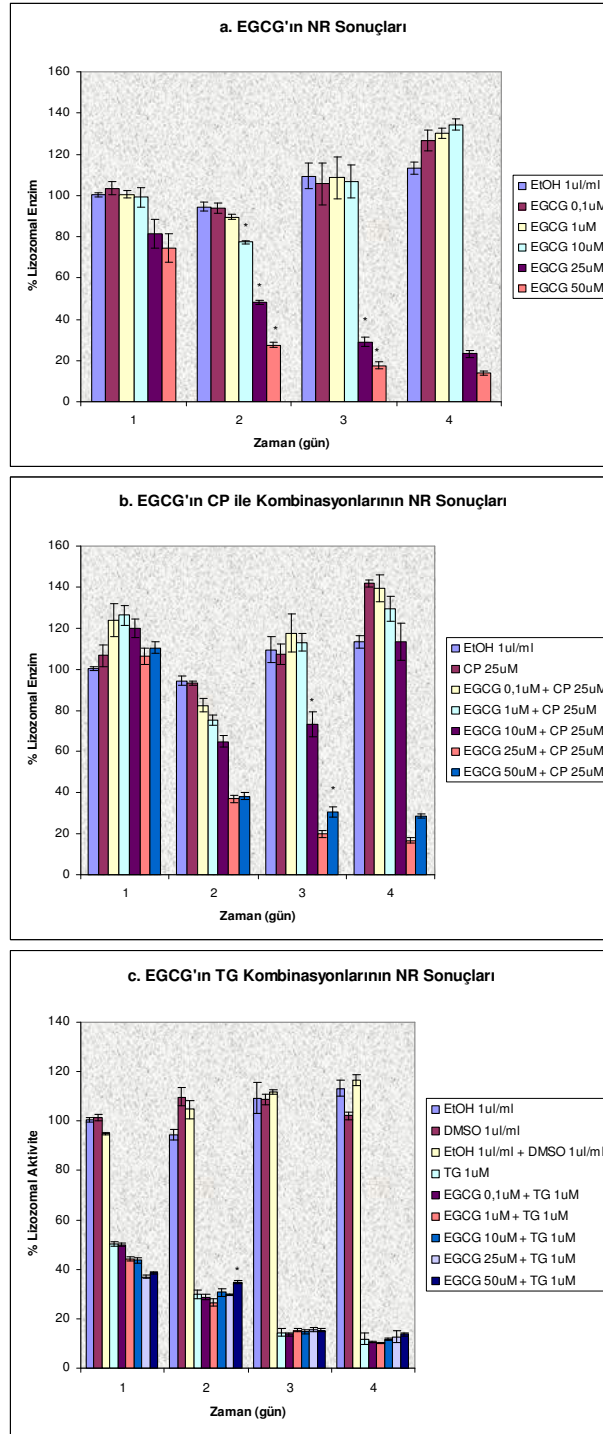
Kersetinin CP ile kombinasyonlarında, sitoplazmada kırmızı renk ile gözlenen protein sentezinin arttığı, ancak artan doz ile birlikte, çekirdeklerin de daha parlak görüldüğü ve dendiritik hücre görüntüsü taşıyan hücrelerin oranının artması ile birlikte, hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir. Mitoza giren hücreler ve prometafazik görüntüler elde edilmiştir. Buna rağmen, proliferasyon beklenirken zamana bağlı olarak hücre sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 13**).

Kersetin TG kombinasyonlarında ise hücre çekirdeğinin membranında düzensizleşme ve parlaklık olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 25 ve 50 μM dozda uygulanan kersetin, hücre çekirdeğindeki parlaklığın artmasını belirgin olarak etkilemiştir. Kersetinin 100 μM konsantrasyonunun TG ile kombinasyonunda ise hücrelerin tamamen öldüğü gözlenmiştir (**Şekil 14**).

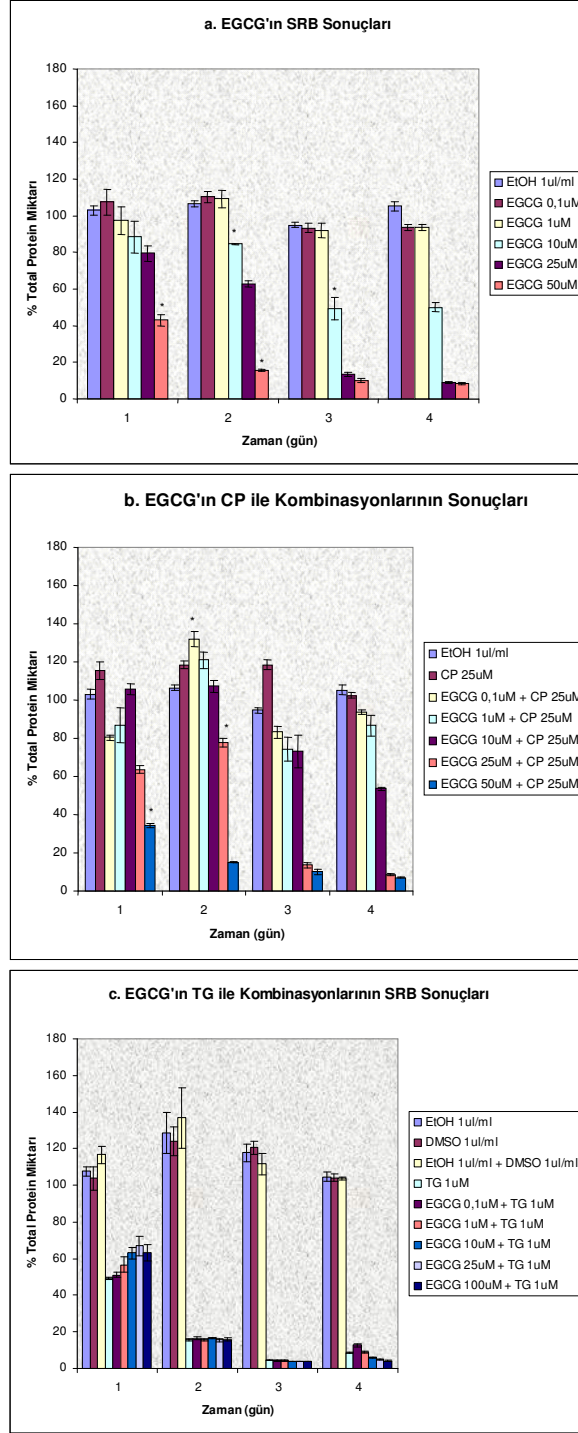
Epigallokateşin Gallat Sonuçları



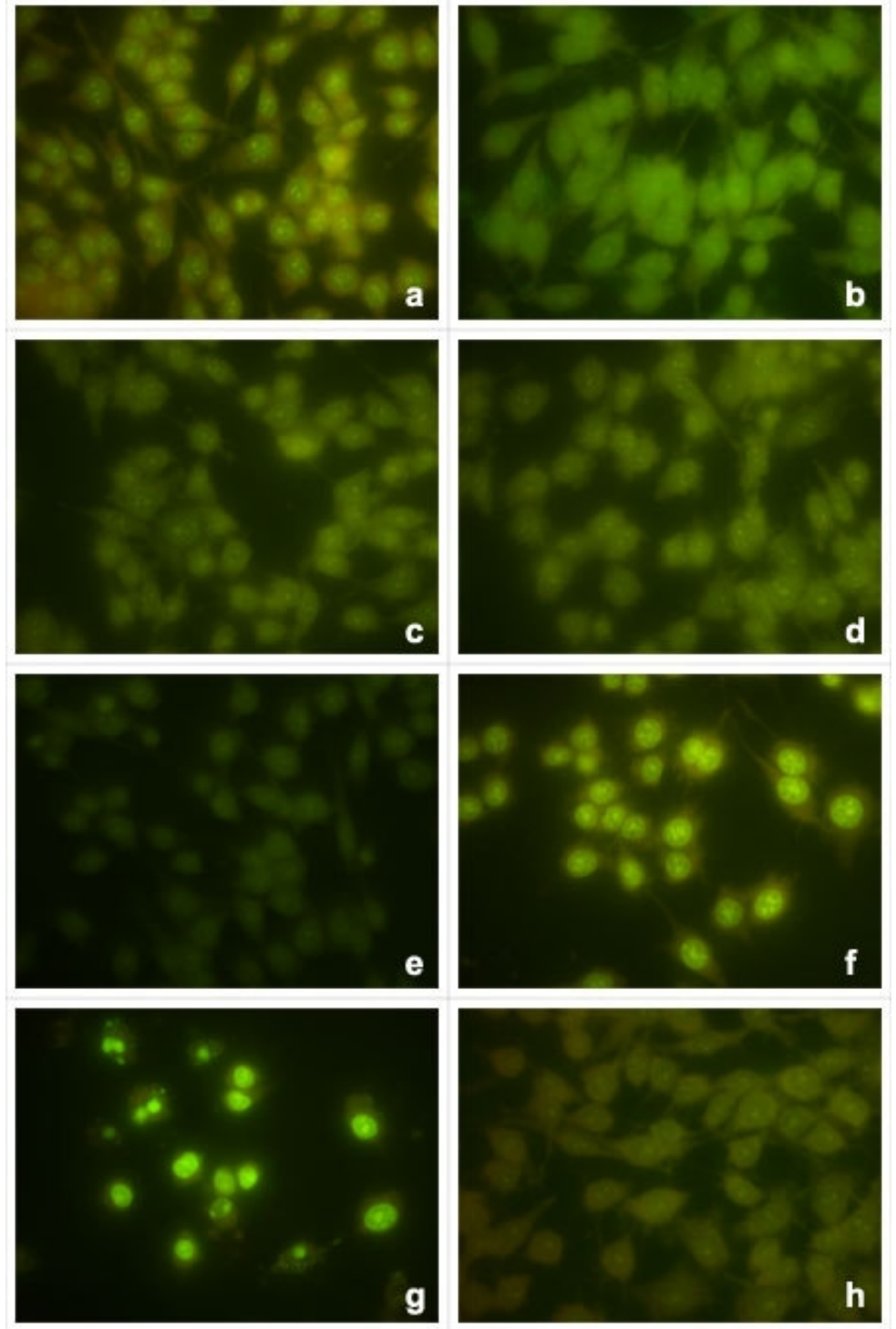
Şekil 15. EGCG'in C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin MTT Sonuçlarının Grafikleri: a-EGCG, b-EGCG'in Kalsiyum Fosfat ile Kombinasyonu, c-EGCG'in Tapsigargin ile Kombinasyonu. (*) Kontrolle ve Dozlara Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,005$, Ortalama Değer \pm Standart Hata (n=4)



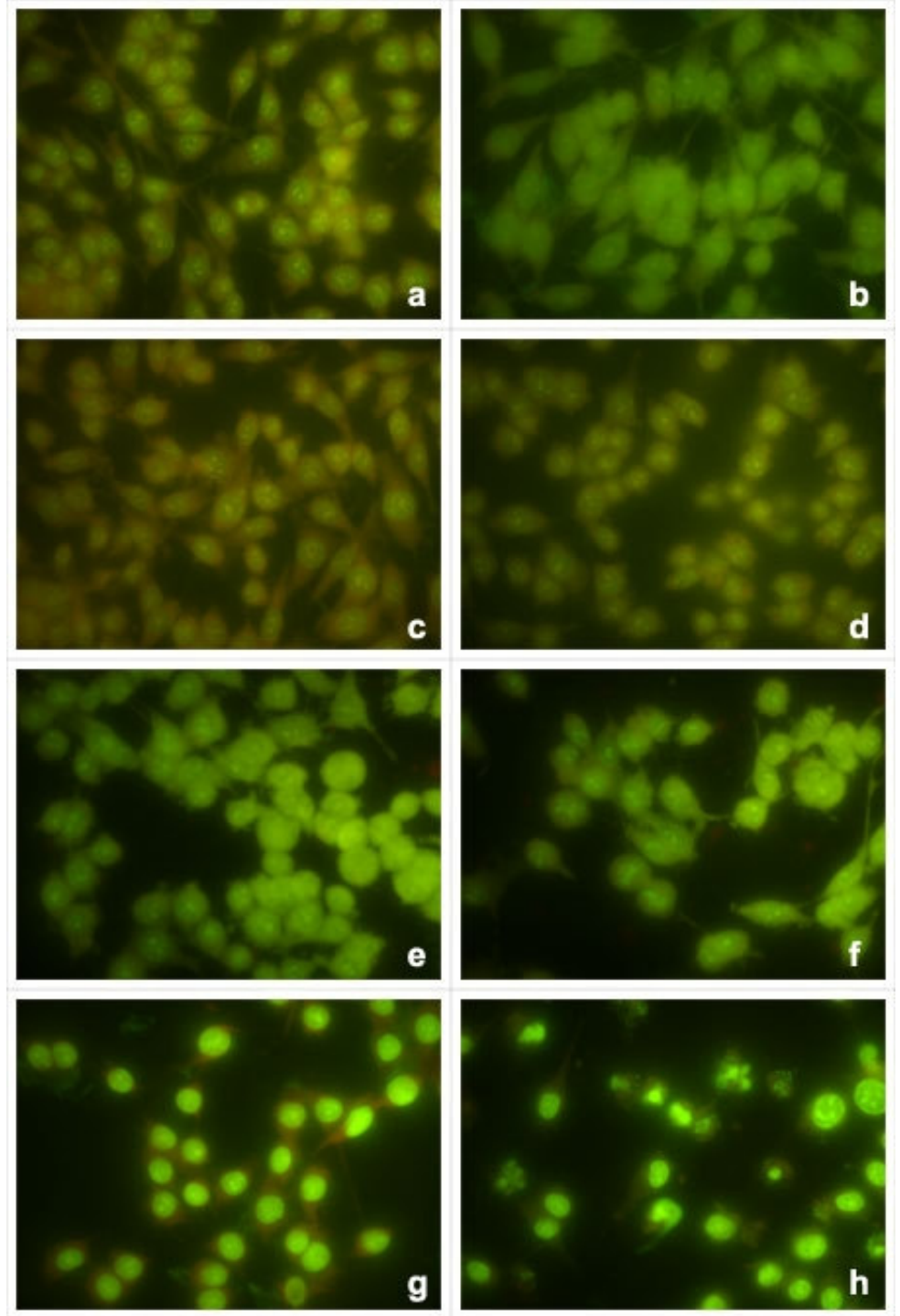
Şekil 16. EGCG'in C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin NR Sonuçlarının Grafikleri: a-EGCG, b-EGCG'in Kalsiyum Fosfat ile Kombinasyonu, c-EGCG'in Tapsigargin ile Kombinasyonu. (*) Kontrol ve Dozlara Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,005$, Ortalama Değer \pm Standart Hata (n=4)



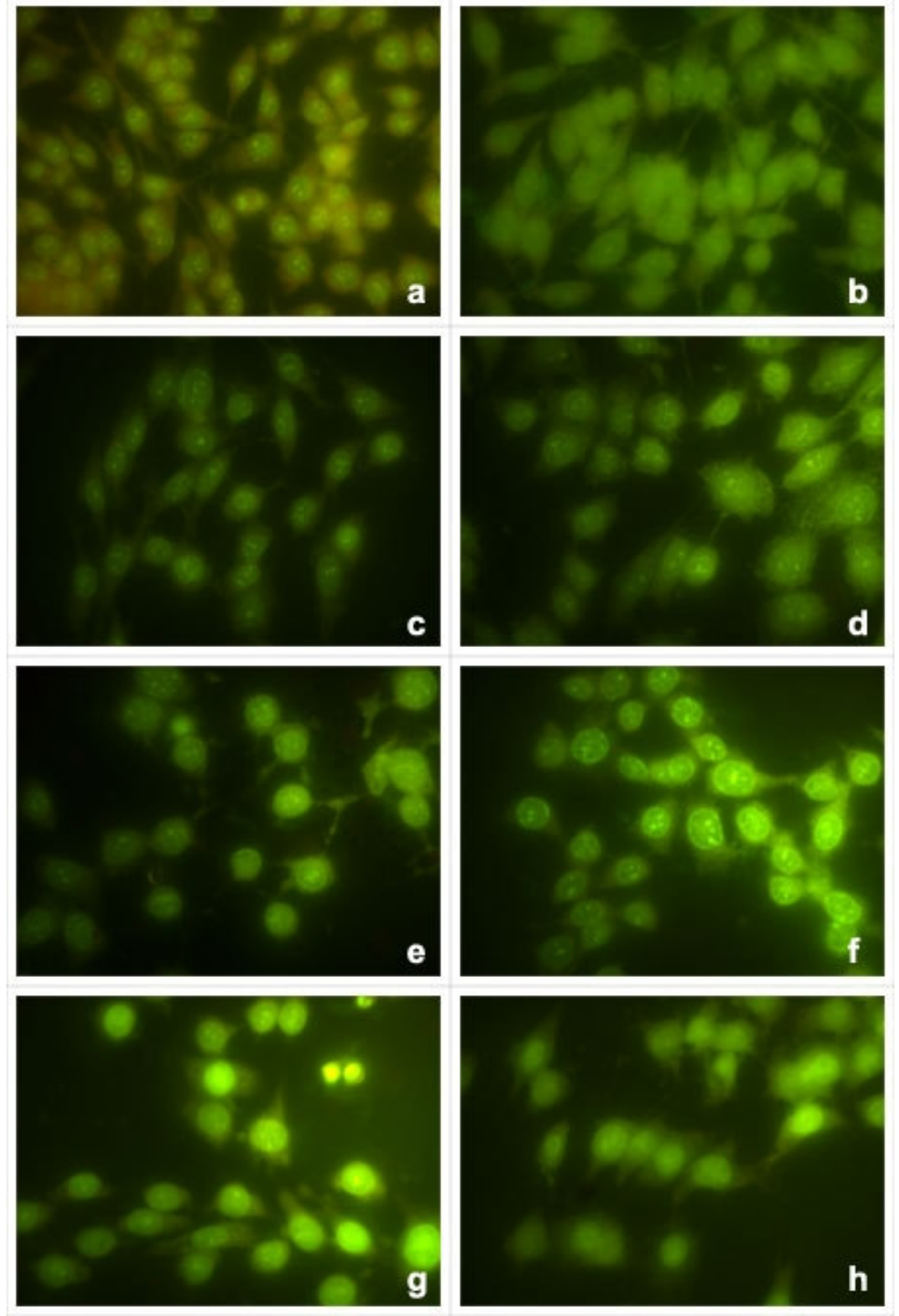
Şekil 17. EGCG'nin C6 Hücreleri Üzerine Etkilerinin SRB Sonuçlarının Grafikleri: a-EGCG, b-EGCG'nin Kalsiyum Fosfat ile Kombinasyonu, c-EGCG'nin Tapsigargin ile Kombinasyonu. (*) Kontrol ve Dozlara Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,005$, Ortalama Değer \pm Standart Hata (n=4)



Şekil 18. EGCG Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyanması Sonucu Floresan Mikroskobunda Elde Edilen Görüntüleri. a-Kontrol, b-Etanol, c-0.1 μ M, d-1 μ M, e-10 μ M, f-25 μ M, g-50 μ M, h-DMSO + Etanol



Şekil 19. EGCG ile CP Kombinasyonu Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyanması Sonucu Floresan Mikroskopunda Elde Edilen Görüntüleri. a-Kontrol, b-Etanol, c-25 μ M CP, d-0,1 μ M + 25 μ M CP, e-1 μ M + 25 μ M CP, f-10 μ M + 25 μ M CP, g-25 μ M + 25 μ M CP, h-50 μ M + 25 μ M CP



Şekil 20. EGCG ile TG Kombinasyonu Uygulanan C6 Hücrelerinin Akridin Oranj ile Boyanması Sonucu Floresan Mikroskobunda Elde Edilen Görüntüleri. a-Kontrol, b-Etanol, c-1 μM TG, d-0,1 μM + 1 μM TG, e-1 μM + 1 μM TG, f-10 μM + 1 μM TG, g-25 μM + 1 μM TG, h-50 μM + 1 μM TG

EGCG'in MTT Sonuçları

C6 hücreleri üzerine uygulanan EGCG, mitokondriyal aktivitede doza ve zamana bağımlı olarak azalmaya sebep olmuştur. EGCG için çözücü olarak kullanılan etanol mitokondriyal aktivitede artışa sebep olmuştur ve EGCG bu artışı da antagonize ederek mitokondriyal aktiviteyi kontrole göre 4. gün sonunda en yüksek doz ile %9.4475'e düşürmüştür (**Şekil 15a**).

EGCG'in CP ile kombinasyonlarında, EGCG'in tek başına verilmesinde elde edilen değerlere yakın, ancak EGCG'in CP ile kombinasyonlarında, EGCG'in tek başına uygulanması ile elde edilen değerlerde hafifçe daha düşük ancak istatistiksel açıdan anlamlı değerler elde edilmiştir (**Şekil 15b**).

EGCG'in TG ile kombinasyonlarında, ilk gün TG'in etkisini azaltarak mitokondriyal etkiyi arttırmış, ancak 3. ve 4. günlerde TG'in etkisini potansiyalize etmiştir (**Şekil 15c**).

EGCG'in NR Sonuçları

EGCG'in düşük konsantrasyonları, lizozomal enzim aktivitesi üzerine önemli bir etki göstermezken, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında doza ve zamana bağımlı etkiler elde edilmiştir (**Şekil 16a**).

EGCG'in CP ile kombinasyonlarında, ilk gün lizozomal enzimlerde artışa sebep olmuştur. 2. gün grafiğinde etki doza bağımlı gözlenirken, 3 ve 4. günlerde, düşük dozlarda lizozomal enzimlerde artış, yüksek dozlarda azalma gözlenmiştir (**Şekil 16b**).

EGCG'in TG ile kombinasyonlarında ilk gün, EGCG TG'in etkisini hafifçe arttırmakla birlikte diğer günlerde, EGCG'in tüm dozlarının TG ile kombinasyonları, TG'in tek başına verilmesi ile elde edilen değerler ile benzer değerler göstererek, lizozomal enzimleri, 4. gün sonunda yaklaşık %12'ye düşürmüştür (**Şekil 16c**).

EGCG'in SRB Sonuçları

EGCG C6 hücreleri üzerine tek başına uygulandığında, total protein miktarı üzerine doza ve zamana bağlı etkiler göstermiştir ve 4. gün sonunda 100 μM ile %4.1675 gibi çok küçük bir değere ulaşmıştır (**Şekil 17a**).

EGCG'in CP ile kombinasyonlarında, 0.1 μM konsantrasyonda total protein miktarında, kontrole ve CP'ye göre hafifçe bir artma gözlenmiştir, ancak 3 ve 4. günlerde doza bağımlı etkiler gözlenmiştir (**Şekil 17b**).

EGCG'in TG ile kombinasyonlarında ilk gün, EGCG TG'in total protein miktarı üzerine gösterdiği etkiyi antagonize ederek, total protein miktarında artmaya sebep olmuştur. 2. gün EGCG'in TG ile tüm kombinasyonları TG'in tek başına verilmesi ile elde edilen değer ile aynı sonuçlar verirken, 3 ve 4. günde EGCG TG'in etkisini hafifçe arttırmıştır (**Şekil 17c**).

EGCG'in Akridin Oranj Sonuçları

EGCG uygulanan C6 hücrelerinde, 0.1 ve 1 μM konsantrasyonların uygulandığı hücrelerin görüntülerinde, hücrelerde tomurcuklanma (blebbing) açıkça izlenmektedir. 50 ve 100 μM EGCG uygulanan hücrelerde ise çekirdekte DNA parlak görülmekte ve 100 μM konsantrasyonda hücrelerin parçalanmakta olduğu görülmüştür. Artan dozlarla hücre sitoplazmasında büzülme meydana gelmiştir (**Şekil 18**).

EGCG'ın CP ile uygulanması ile EGCG'ın tek başına verilmesinde benzer görüntüler elde edilmesine rağmen, sitoplazmada kırmızı renk açıkça görülmüştür (**Şekil 19c**). Bu da protein sentezinin devam ettiğini göstermektedir.

TG uygulanan hücrelerde, hücrelerin sadece kontrole göre uzantılarını kaybettiği görülmekle birlikte, EGCG ile TG kombinasyonlarında 0.1 μM konsantrasyonda hücre sitoplazması ağsı şekilde görülmekte, ancak EGCG'ın tek başına verildiğinde görülen tomurcuklanma ise görülmemiştir. Artan dozlarda, hücre sitoplazmasının küçüldüğü ancak hücre uzantılarının korunduğu saptanmıştır. EGCG'ın 1 ve 10 μM konsantrasyonunun TG ile kombinasyon görüntüsünde, DNA parçacıklarının çekirdeğin membranına yakın bölgelerde çerçeve şeklini aldığı görülmüştür. 25 ve 50 μM konsantrasyonda EGCG ve 1 μM TG uygulanan hücrelerde ise çekirdekte, parlaklık ile birlikte bulanıklık izlenmiş, çekirdeklerin görüntüsü net olarak görülmemiştir (**Şekil 20**).

TARTIŞMA

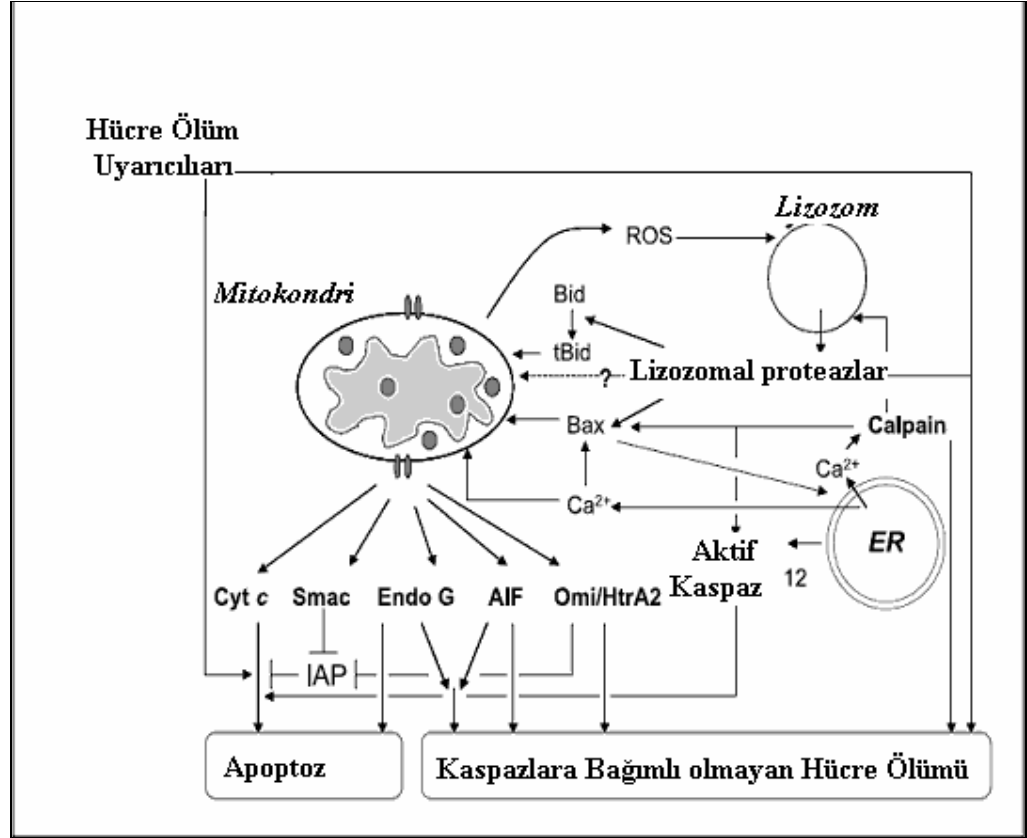
Kersetinin tek başına uygulanması ile hücrelerde ve çeşitli kanser hücreleri üzerine gözlenen apoptotik etkileri (Kim ve Lee, 2006; Brisdelli ve ark., 2006; Granado-Serrano ve ark., 2006) yaptığımız çalışmada C6 hücrelerinde de gözlenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da kersetinin U138MG glioma hücreleri için antiproliferatif olduğu gösterilmiştir (Braganhol ve ark., 2006). C6 hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada ise bizim bulgularımıza ters şekilde kersetinin, kimyasal anoksi ve hidrojen peroksit varlığında antioksidan mekanizmalara bağımlı ve bağımsız olarak antiapoptotik olduğu savunulmuştur, ancak bu çalışmada sadece 25 ve 50 μM konsantrasyonlar kullanıldığı için bu bulguların sağlıklı olduğu düşünülmemektedir (Chen ve ark., 2006). Ayrıca çalışma koşullarının farklılığı da farklı sonuçlara ulaşılmasına sebep olmuş olabilir, zira Chen ve arkadaşları çalışmalarında kersetini hidrojen peroksit ve kimyasal anoksik madde ile birlikte uygulamışlardır. Akridin oranj sonuçlarımızda kersetinin C6 hücreleri üzerine apoptotik etkileri, hücrelerin uzantılarını kaybetmeleri, tomurcuklanma ve büzülme olarak açıkça görülmektedir (**Şekil 12**). MTT ve SRB sonuçlarında da kersetinin etkisinin doza ve zamana bağlı olduğu ve C6 glioblastoma multiforme hücreleri üzerine sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir (**Şekil 9a; 11a**).

Kersetinin, kalsiyum fosfat ile kombinasyonlarında, MTT, NR ve SRB sonuçlarında kalsiyum fosfatın kersetinin etkisini potansiyalize ettiği gözlenmiştir (**Şekil 9b; 10b; 11b**). Ancak akridin oranj sonuçlarından elde ettiğimiz görüntülerde, kersetinin CP ile kombinasyonlarında hücre sayılarının artan dozla birlikte azaldığı ancak apoptozda gözlenen tomurcuklanma ve büzülme gibi belirtiler olmadığı, sitoplazmada protein sentezinin devam ettiği gözlenmiştir (**Şekil 13**). Bu hücrelerde kalsifikasyon olarak yorumlanmaktadır.

Bir derlemede kalsifikasyon mekanizmaları ile apoptotik mekanizmaların aynı olduğu ve yeni terapötik stratejiler için hücrelerde mineralizasyonun önemli olduğu ve romatizmal hastalıklar ve kanser tedavisinde kullanılabileceği vurgulanmıştır (Kirsch 2006). Çalışmamıza benzer şekilde yapılan bir başka çalışmada 2-kloro-adenozinin, astrositoma hücre siklusunu fosforilasyon ile aktive ederek ve G2/M fazında durdurarak apoptotik etkili olduğunu göstermiştir (Ceruti ve ark., 2000; Devipriya ve ark., 2006). Ancak AO sonuçlarından elde edilen görüntülerde mekanizmanın apoptozis olmadığı, kersetin ve CP kombinasyonunun hücreleri farklı bir şekilde ölüme götürdüğü tespit edilmiştir, görüntülerde prometafazik görüntülerin elde edilmesi bu ölüm şeklinin mitotik hücre ölümü olduğunu düşündürmektedir (Gao ve Scott, 2002). Ayrıca, kersetinin CP ile kombinasyonlarında, genotoksisitenin bir göstergesi olan mikronükleuslar da gözlenmiştir (**Şekil 13**).

Kersetinin TG ile kombinasyonlarında, ilk gün kersetin TG'in sitotoksik etkisini azaltmıştır, ilk gün gözlenen bu etkiden kersetinin antioksidan mekanizmalar üzerine olan antioksidan etkileri sorumlu olabilir (Chen ve ark., 1990). Ancak 2. günden sonra kersetinin TG ile kombinasyonları TG'in tek başına uygulanması ile elde edilen değerlere yakın değerler elde edilmiştir (**Şekil 9c; 10c; 11c**). Kersetinin TG ile kombinasyonlarının görüntülerinde hücre çekirdeklerinin daha parlak görüldüğü (DNA fragmentasyonu ve kromatin kondensasyonu) gözlenmiştir. Ancak görüntülerin, kersetinin tek başına uygulanması ile meydana gelen apoptotik görüntülerden farklı olarak apoptotik olmadığı da gözlenmiştir. Özellikle 50 μM kersetin ile TG kombinasyonunun görüntülerinde hücre çekirdeğinde parlaklıktan kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu olduğu sonucuna varılmıştır (**Şekil 14**). Görüntülerin apoptotik olmaması ile de endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya kalsiyum çıkışına bağlı olarak gösterilen kaspazlara bağımlı olmayan hücre ölümünü düşündürmektedir (**Şekil 21**).

EGCG'nin tek başına uygulanması ile mitokondriyal aktivite ve total protein miktarında doza ve zaman bağımlı azalmalar gözlenmiştir. Ancak lizozomal enzim miktarında 1, 10 ve 25 μM konsantrasyonlarda kontrole göre hafifçe artış gözlenmiştir (**Şekil 15a; 17a**). Lizozomal enzimlerde gözlenen bu artıştan EGCG'nin antioksidan mekanizmalar üzerine gösterdiği etki sorumlu olabilir (**Şekil 16a**) (Nagle ve ark., 2006). Akridin oranj görüntülerinde EGCG'nin C6 hücreleri üzerine apoptotik etkileri gözlenmektedir. Düşük dozlarda tomurcuklanma ve büzülme gözlenirken, ara dozlarda kormatin kondensasyonuna bağlı olarak çekirdekte parlaklık artmıştır ve yüksek dozlarda, apoptozisin son basamağında gözlenen hücre fragmentasyonu gözlenmektedir (**Şekil 18**). EGCG'nin daha önce yapılan çalışmalarda, çeşitli kanser türleri üzerine apoptotik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Na ve Surh, 2006).



Şekil 21. Kaspazlara Bağımlı Olmayan Hücre Ölüm Mekanizması (Broker ve ark., 2005)

EGCG'ın CP ile kombinasyonlarının MTT, NR ve SRB testleri ile doza ve zamana bağımlı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 15b; 16b; 17b). AO görüntülerinde EGCG'ın CP ile kombinasyonlarında, EGCG'ın tek başına uygulanması ile görülen apoptotik görüntülerin benzerleri elde edilmiştir. Bu sebeple dışarıdan CP verilmesinin EGCG'ın etki mekanizmasının kersetinde olduğu gibi değiştirmedeği gözlenmiştir. Bu sebeple EGCG'ın apoptotik etkilerinin güçlü olduğu ve CP ile değişmediği sonucuna varılmıştır (Şekil19).

EGCG'ın TG ile kombinasyonlarında, mitokondriyal aktivite ve total protein sentezi üzerine TG'in etkisini ilk günde azalttığı, lizozomal enzimler üzerine TG'in azaltıcı etkisini güçlendirdiği gözlenmiştir (Şekil 15c; 16c; 17c). EGCG'ın TG ile kombinasyonlarında kersetinin TG ile kombinasyonlarına benzer görüntüler elde edildiğinden, yine endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya kalsiyum çıkışına bağlı olarak gösterilen kaspazlara bağımlı olmayan hücre ölümünü düşündürmektedir (Şekil 20) (Broker ve ark., 2005).

Sonuç olarak, kersetinin CP ya da TG ile kombinasyonları C6 hücrelerinin ölüm şeklini değiştirmekte ve dışarıdan verilen CP protein fosforilasyonunu sağlarken, kalsiyum kalsifikasyonu stimüle etmektedir ve bu ortamda bulunan kersetin, hücreleri mitotik hücre ölümüne götürmektedir. Bu sonuç homeopatik olarak rutin uygulanması ile elde edilen tedavi edici etkiyi açıklayabilmektedir.

EGCG ise dışarıdan verince CP'den etkilenmemekte ve CP varlığında da apoptotik etki göstermektedir. Ancak TG ile apoptotik etki mekanizması önlenmekte ve kaspazlara bağımlı olmayan hücre ölümü ile hücreleri öldürdüğü düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abraham, L., Kierszenbaum, MD., Histoloji ve Hücre Biyolojisi; Patolojiye Giriş, Demir, R.(Çev. Edt.), Palme Yayıncılık, Ankara, 40-45; 90, 2006.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing Inc., NewYork, 214-223, 1994.

Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbottu, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M. R., Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, Cancer Research, 48, 589-601 (1988).

Alles, A., Alley, K., Barrett, JC., et al., Apoptosis: A general comment. FASEB J; 5: 2127-2128, (1991).

Altınbaş, M., Özkan, M., Cihan, Y., Kaplan, B., Yüksek grade'li Astrositom ve Glioblastoma Multiforme hastalarında adjuvan radyoterapi ve fotemustine uygulanması., XV Ulusal Kanser Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Kemer, Antalya, 23-27 Nisan, (2003).

Bailey, P., Cushing, H., A Classification of Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis, Philadelphia; JB Lippincott; 146-167, 1926.

Banerji, P., Banerji, P., Intracranial cysticercosis: an effective treatment with alternative medicines. In Vivo. 15: 181-4, (2001).

Berliocchi, L., Bano, D., Nicotera, P., Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Dec 29; 360(1464): 2255-8. (Derginin adı: Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences), (2005).

Borenfreund, E., Laboratory Animal Research Center, The Rockefeller University 1230 New York Avenue, New York, NY 10021-6399, USA, (2000).

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

Braganhol, E., Zamin, LL., Canedo, AD., Horn, F., Tamajusuku, AS., Wink MR., Salbego, C., Battastini, AM., Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. Anticancer Drugs. Jul; 17(6): 663-71, (2006).

Brisdelli, F., Coccia, C., Cinque, B., Cifone, MG., Bozzi, A., Induction of apoptosis by quercetin: different response of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells. *Mol Cell Biochem.* 2006 Sep 13; (Basimda).

Broker, LE., Kruyt, FA., Giaccone, G.; Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*, 11(9), 3155-62, (2005).

Carmeliet, P., Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.*; 9: 653-660, (2003).

Carmichael, J., Degraff, W., Minna, J.D., Mitchell, J.B., Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Research*, 47, 936-942 (1987).

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

Ceruti, S., Franceschi, C., Barbieri, D., Malorni, W., Camurri, A., Giammarioli, AM., Ambrosini, A., Racagni, G., Cattabeni, F., Abbracchio, MP., Apoptosis induced by 2-chloro-adenosine and 2-chloro-2'-deoxy-adenosine in a human astrocytoma cell line: differential mechanisms and possible clinical relevance. *J Neurosci Res*, 60(3), 388-400 (2000).

Chalmers, S., Nicholls, DG., The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria, *J Biol Chem.*, 23; 278(21): 19062-70. Epub Mar 26, (2003).

Chen, TJ., Jeng, JY., Lin, CW., Wu, CY., Chen, YC., Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology*, Jun 1; 223(1-2): 113-26. Epub Mar 22, (2006).

Chen, YT., Zheng, RL., Jia, ZJ., Ju, Y., Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 9(1): 19-21 (1990).

Clermont, F., Adam, E., Dumont, J. E. and Robaye, B., Survival Pathways Regulating the Apoptosis Induced by Tumour Necrosis Factor-alpha in Primary Cultured bovine Endothelial Cells, *Cellular Signalling*, 15 (5), 539-546 (2003).

Delpino, A., Castelli, M., The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation, *Bioscience Reports* 22: 407-20 (2002).

Denizot, F., Lang, R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *Journal of Immunological Methods* 89: 271-77 (1986).

Devipriya, S., Vani, G., Ramamurthy, N., Shyamaladevi, CS., Regulation of intracellular calcium levels and urokinase activity in MDA MB 231 cells by quercetin, *Chemotherapy*; 52(2): 60-5. Epub Feb 3, (2006).

Dive, C., Gregory, C. D., Phipps, D. J., Evans, D. L., Milner, A. E., Wyllie, A. H., Analyses and Discrimination of necrosis and Apoptosis (Programmed Cell Death) by Multiparameter Flow Cytometry, *Biochimica et Biophysica*, 1133, 275-285 (1992).

Franks, L. M., Teich, N. M., Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, 3rd ed., Oxford University Press, New York, 1998.

Gao, S., Scott, R.E., P2P-R protein overexpression restricts mitotic progression at prometaphase and promotes mitotic apoptosis, *J Cell Physiol.* Nov; 193(2): 199-207 (2002).

Gossiau, A., Rensing, L., Induction of Hsp68 by oxidative stress involves the lipoxygenase pathway in C6 rat glioma cells, *Brain Research* 864: 114-23 (2000).

Granado-Serrano, AB., Martin, MA., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2), *J Nutr.*; 136(11): 2715-21 (2006).

Himpens, B., Vereecke, J., Intra- and intercellular Ca⁽²⁺⁾-signal transduction, *Verh K Acad Geneesk Belg.*, 62: 501-63 (2000).

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

Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M., Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine* 30: 650-64 (2001).

http-1 Apoptozis Ders notları, <http://www20.uludag.edu.tr/~eulukaya> (2006).

http-2 http://pbi-ibp.nrc-cnrc.gc.ca/en/bulletin/2003issue1/images/page4_04.gif (2006).

http-3 <http://www.axxora.com/files/formula/ALX-270-263.gif> (2006).

http-4 <http://www.lclabs.com/PROFILE/S-Z/T-32500.JPG> (2006).

http-5 <http://www.um.es/grupo-cirrosis/death%20cell%20and%20calcium.gif> (2006).

Hu, DE., Hori, Y., Fan, TP., İnterleukin-8 stimulates angiogenesis in rats, *Inflammation* ; 17: 135-143 (1993).

Hu, R., Zhai, Q., Liu, W., Liu, X., An Insight into the Mechanism of Cytotoxicity of Ricin to Hepatoma Cell: Roles of Bcl-2 Family Proteins, Caspases, Ca²⁺ - Dependent Proteases and Protein Kinase C, *Journal of cellular Biochemistry*, 81, 583-593 (2001).

Inesi, G., Hua, S., Xu, C., Ma, H., Seth, M., Prasad, A.M., Sumbilla, C., Studies of Ca²⁺ ATPase (SERCA) inhibition, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 37: 365-368 (2005).

Johnson, E. K., I. Bölüm, *Histology and Cell Biology*, 2nd Edition, Williams and Wilkins, Pennsylvania, pp: 59-60, 1990.

Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., *Basic Histology* , 7th Edt., A Lange medical book; Editör: Aytekin, Y., ve Solakoğlu, S., Barış Kitabevi, İstanbul, 30-78 (72), 1993.

Kagaya, A., Okada, A., Jitsuiki, H., Tawara, Y., Inagaki, M., Takebayashi, M., Saeki, T., Nishida, A., Nakata, Y., Yamawaki, S., Effect of heat stress on serotonin-2A receptor-mediated intracellular calcium mobilization in rat C6 glioma cells, *Journal of Neural Transmission* 107: 919-29 (2000).

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

Kastan, M. B., Skapek, S. X., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Edt: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Amerika Birleşik Devletleri, 91-109 (2001).

Kasten, F.H., Staining Procedures, Edt: Clark, G., Chepter 3 Methods for flourescence microscopy, Williams & Wilkins, 57-58 (1981).

Katıyar, S., Elmets, C.A., Katıyar, S.K., Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. Journal of Nutritional Biochemistry (Manuscript) Ekim, (2006).

Kaya, N., Bölükbaş, N., İstatistiksel yönüyle kanser, XV Ulusal Kanser Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Kemer, Antalya, 23-27 Nisan, (2003).

Kayaalp, S. O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 376 -411, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 1998.

Kaye, HA., Laws, ER., Historical perspective. In: Kaye HA., Laws ER.(ed). Brain tumors 2nd edn. Churchill Livingstone: 3-8 (2001).

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R., Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with wide-ranging Implication in Tissue Kinetics, Br. J. Cancer, 26, 239-257 (1972).

Kim, YH, Lee, YJ., TRAIL apoptosis is enhanced by quercetin through Akt dephosphorylation. J Cell Biochem. 2006 Oct 9; (Basımda).

Kim, SY., Ahn, BH., Kim, J., Bae, YS., Kwak, JY., Min, G., Kwon, TK., Chang, JS., Lee, YH., Yoon, SH., Min, DS., Phospholipase C, protein kinase C, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, and redox state are involved in epigallocatechin gallate-induced phospholipase D activation in human astrogloma cells, Eur J Biochem. Sep; 271(17): 3470-80 (2004).

Kirsch, T., Determinants of pathological mineralization. Curr Opin Rheumatol, 18(2): 174-80 (2006).

Kliehues, P., Cavenee, WK., WHO Classification of Tumors, Pathology and Genetics of tumors of the Nervous System. International Agency for Research on Cancer., Lyon, 2000.

Kliehues, P., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., WHO International Histological Classification of Tumors. In: Histological typing of tumors of the Central Nervous System. 2nd edn. New York: Springer-Verlag, 1993.

Klug, S. W., Cummings, M. R., Concepts of Genetics, 6th Edition, Printice Hall, Oxford, 2000.

Konukoğlu, D., Turhan S. M., Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis, *Cerrahpaşa J. Med*, 36: 42-48 (2005).

Korsmeyer, J. S., Zinkel, S. S., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Edt: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Amerika Birleşik Devletleri, 111-121 (2001).

Krauss, G., Biochemistry and Signal Transduction and Regulation, Wileyvch, Germany, (2001).

Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U., Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analitical Biochemistry* 182: 16-19 (1989).

Levine, L., Tetrandrine and thapsigargin release arachidonic acid from cells in culture and stimulate prostacyclin production in rat liver cells, but may do so by different pathways. *BMC Pharmacology* 5-12 (2005).

Liotta, L. A., Liu E. T., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Edt: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Amerika Birleşik Devletleri, s: 17-29 (2001).

Mason, R.P., Calcium channel bolckers, apoptosis and cancer, Is there a biologic relationship?, 34: 1857-1866 (1999).

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

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. and Rodwell, V. W., Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul, 1998.

Na, H.K., Surh, YJ., Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. *Mol. Nutr. Food Res.* Feb; 50(2): 152-9 (2006).

Nagle, DG., Ferreira, D., Zhou, YD., Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives, *Phytochemistry*. 2006 Sep;67(17): 1849-55, Epub (2006).

Nicholls, D.G., Chalmers, S., The integration of mitochondrial calcium transport and storage, *J Bioenerg Biomembr.*, 36: 277-81 (2004).

Oğuz, N., İlnem, C., Yener, F., Beyin Tümörlerin Neden olduğu psikiyatrik Tablolar: İki Olgu Sunumu, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 15: 18-21 (2005).

Okamoto, T., Safety of quercetin for clinical application. *International Journal of Molecular Medicine* 16: 275-8 (2005).

Pan, H., Yin, C., Van Dyke, T., Apoptosis and Cancer Mechanisms, *Cancer Surveys* 29: 305-327 (1997).

Pathak, S., Multani, A.S., Banerji, P., Banerji, P., Ruta 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: A novel treatment for human brain cancer, *International Journal of Oncology*, 23: 975-82 (2003).

Pawlikowska-Pawlega, B., Jakubowicz-Gil, J., Rzmowska, J., Gawron, A., The effects of quercetin on apoptosis and necrosis induction in human colon adenocarcinoma cell line LS180., *Folia Histochemistry and Cytobiology* 39: 217-218 (2001).

Qumsiyeh, M. B. and Li, P., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Edt: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Amerika Birleşik Devletleri, 77-89 (2001).

Rajkumar, R., Srivastava, S.K., Yadav, M.C., Varshney, V.P., Varshney. J.P., Kumar, H., Effect of a homeopathic complex on oestrus induction hormonal profile in an oestrus cows, *Homeopathy*, 95:131-5 (2006).

Reile, H., Birnbock, H., Bernhardt, G., Spruss, T., Schonenberger, H., Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture, *Analytical Biochemistry* 187: 262-267 (1990).

Russell, L.F., *Cecil textbook of medicine / Cecil*; edited by Goldman, L., Ausiello, D. – 22nd ed. – Philadelphia, Pa. : Saunders, (2004).

Senaratne, S.G., Pirianov, G., Mansi, J.L., Arnett, T.R., Colston, K.W., Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines, *British Journal of Cancer* 82; 1459-1468 (2000).

Shen, Y., In vitro cytotoxicity of BTEX Metabolites in HeLa cells, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34; 229-234 (1998).

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82; 1107-1112 (1990).

Soliman, K.F., Mazzio, E.A., In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds, *Proc Soc Exp Biol Med.*, 218; 390-397 (1998).

Stetler-Stevenson, W. G., Kleiner, Jr. D. E., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Edt: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Amerika Birleşik Devletleri, s: 123-135 (2001).

Tedone, T., Correale, M., Paradiso, A., Reshkin, S. J., Differential responsiveness of proliferation and cytokeratin release to stripped serum and oestrogen in the human breast cancer cell line, MCF-7. *European Journal of Cancer* 32A; 849-856 (1996).

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

Wyllie, A. H., Glucocorticoid-induced Thymocyte Apoptosis in Associated with Endogenous Endonuclease Activation, *Nature*, 284 (5756), 555-556 (1980).

Xie, S. P., Pirianovi, G., Colston, K. W., Vitamin D analogues suppress IGF-1 signalling and promote apoptosis in breast cancer cells, *European Journal of Cancer* 35: 1717-1723 (1999).

Yarış, F., Dikici, M. F., Özoran, Y., Çobanoğlu, Ü., Türkiye’de ve gelişmiş ülkelerde sigarayla ilişkili kanserlerin sıklıkları var mı?, XV Ulusal Kanser Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Kemer, Antalya, 23-27 Nisan, (2003).

Yokoyama S., Hirano H., Wakimaru N., Sarker KP., Kuratsu J., Inhibitory effect of epigallocatechin-gallate on brain tumor cell lines in vitro, *Neuro-oncol.*, 3(1): 22-28 (2001).