

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KERSETİN'İN MALİGNANT
MEZOTELYOMA HÜCRE DÖNGÜSÜ VE
HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİSİ

Banu BAŞARA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2006

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KERSETİN'İN MALİGNANT
MEZOTELYOMA HÜCRE DÖNGÜSÜ ve
HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİSİ

Banu BAŞARA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr. Asuman D. ZERGEROĞLU

GEBZE
2006

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: Kersetin'in Malignant Mezotelyoma Hücre Döngüsü ve Hücre Ölümüne Etkisi

YAZAR ADI: Banu BAŞARA

Çalışmamızda, besin kaynaklı bir bileşik olan kersetinin tek ve kemoterapide yaygın olarak kullanılan cisplatin ile kombinasyonu, mezotelyoma hücre hatlarının (SPC111 ve SPC212) proliferasyonuna, döngüsüne, ölümüne etkileri, doza ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır. Kersetin'in; 0-100 μ M, cisplatinin; 0-50 μ g/ml'lik dozları ve kombinasyonlarının 0-96. saatlerdeki etkisi incelenmiştir.

Hücre proliferasyon analizlerinde, kersetin SPC111 hücre hattında 50 μ M'ın altındaki dozlarda hücre proliferasyonunu indüklediği, 50 ve 100 μ M'lık dozlarında yavaşlattığı, SPC212 hücre hattında 10, 50 ve 100 μ M dozlarında zamana ve doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu engellediği gözlenmiştir. Cisplatin'in 5, 10 ve 50 μ g/ml'lik dozlarda, her iki hücre hattında zamana ve doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu yavaşlatıcı ve/veya durdurucu etki gösterdiği belirlenmiştir. 5 μ g/ml Cis+50 μ M Qu ve 10 μ g/ml Cis+50 μ M Qu kombinasyonlarının her iki hücre hattında 72. saatte proliferasyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Hücre döngüsü analizlerinde, 100 μ M'lık kersetin dozu SPC111 hücre hattında 48. saatte S fazı bloğuna neden olurken ve aynı etkiyi SPC212 hücre hatlarında 50 ve 100 μ M'lık dozlarda göstermiştir. Cisplatin'in 5 ve 10 μ g/ml tek doz uygulamalarında her iki hücre 24. saatte S fazında, 48. saatten sonra G2/M geçişinde tutuklanmışlardır. 50 μ g/ml'lik cisplatin dozu hücrelerin her ikisini de 24 ve 48. saatlerde S fazında tutuklarken, 72. saatte bu durumun SPC111 hücrelerinde devam ettiği, ancak SPC212 hücre hatlarında 72. saatte G2/M geçişinde bir birikime neden olduğu gözlenmiştir. 5 μ g/ml Cis+50 μ M Qu birlikteliğinin her iki hücre hattı içinde hücre döngüsü üzerindeki en etkili doz olduğu belirlenmiştir. tek dozlardan farklı olarak hücrelerin 48 saat boyunca S fazında tutuklandıkları gözlenmiştir. Apoptoz DNA ladderling yöntemi ile değerlendirilmiş, zamana ve doza bağlı olarak her iki hücre hattında tipik fragmentlenme gözlenmemiştir.

Yaptığımız deneylerde kersetinin SPC111 hücrelerinde bifazik etkisi olduğu yani düşük dozlarda indükleyici, yüksek dozlarda ise inhibe edici olduğunu tespit edilmiştir. SPC212 hücre hatlarının kersetin ve cisplatine SPC111 hücre hatlarından daha duyarlı olduğu, kersetin-cisplatin kombinasyonunun zamana ve doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: The Effects of Quercetin on Malignant Mesothelioma

Cell Cycle and Death

AUTHOR: Banu BAŞARA

In our work we investigated the effects of a food originated compound quercetin alone or in combination with a chemotherapeutic agent cisplatin on proliferative and apoptotic properties of mesothelioma cell lines SPC111 and SPC212 on dosage and time dependent manner. The effects of quercetin at 10–100 μ M and cisplatin at 0–50 μ g/ml were investigated at time intervals between 0–96 hours.

In cell proliferation assays using SPC111 cell lines, quercetin stimulated cellular proliferation below 50 μ M range whereas reduced growth rate was observed at 50 and 100 μ M, however, In SPC212 cell lines proliferation was inhibited at 10, 50 and 100 μ M concentrations in dosage and time dependent manner. In both cell lines cisplatin at 5, 10 and 100 μ M concentrations demonstrated either stationary or inhibitory effect on cellular proliferation depending on the drug dosage. In both cell lines cell proliferation was inhibited at 72 hour at 5 μ g/ml cisplatin plus 50 μ g/ml quercetin and 10 μ g/ml cisplatin plus 50 μ g/ml quercetin combinations. In cell cycle analyses 100 μ M quercetin caused S phase blockage in SPC111 cells at 48 hour while the same effect was observed at 50 and 100 μ M drug concentrations in SPC212 cells. At 5 and 10 μ g/ml single dosage applications of cisplatin both cell lines were arrested at S phase at 24 hour and G2/M transition after 48 hour. Cisplatin 50 μ g/ml caused S phase cell cycle arrest at 24 and 48 hours in both cell lines and proceeded until 72 hour as like for SPC111 cells while SPC212 cells were accumulated at G2/M transition at 72 hour. 5 μ g/ml cisplatin plus 50 μ M quercetin combinations was found to be most effective concentrations effective on cell cycle for both cell lines. Unlike from single dosage applications cells were arrested at S phase for 48 hour. In this study apoptotic affects were evaluated by DNA laddering procedure and typical laddering pattern were not observed for the two cell lines on a dosage and time dependent manner.

Our experiments demonstrated biphasic effects of quercetin on SPC111 cell lines, in other words at low dosages, quercetin stimulates cellular proliferation while at high dosages it has inhibitory effect. SPC212 cell lines were shown to be more sensitive to quercetin and cisplatin treatment than SPC111 cells and combination of quercetin and cisplatin inhibits cellular proliferation on a time and dosage dependent manner.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren, desteğini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesi, çalışmalarımın yönlendirilmesinde bilgi ve önerilerinden faydalandığım, GYTE Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Asuman D. ZERGEROĞLU'na,

Tez çalışmamda kullandığım hücreleri sağlayan, laboratuvar çalışmalarım süresince beni yönlendiren ve sonuçlarımın değerlendirilmesinde katkısı olan GYTE Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Nil SAYDAN'a,

Çalışmamda yararlandığım flow sitometri cihazının kullanımında her türlü imkanı sağlayan; sonuçlarının değerlendirilmesinde bilgilerini esirgemeyen; her zaman sevecen ve güler yüzlü olan Dr. Gülderen D. YANIKKAYA'ya ve cihaz kullanımında bana yardımcı olan İstanbul CENTRO çalışanlarına,

Üniversiteden bu yana bilgileriyle beni yönlendiren, bilgilendiren, yüksek lisans yapmamda bana destek olan, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tabiri caizse 'Hayat Hocam' Av. Yusuf BEYAZIT'a,

Üniversiteden bu yana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, evini benimle paylaşan sevgili ablam SMM Dilek BAŞARA'ya ve bu zamana kadar verdikleri her türlü destek için aileme,

Tez çalışmam süresince çalışmalarımı sürdürmemde yardımlarını, her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım Araş. Gör. Erşan CİĞERİM ve çalışmalarım sırasında dostluk ve dayanışmaları için tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KANSER	4
2.1. Onkogen ve Protoonkogenler	7
2.1.1. <i>Ras Ailesi</i>	7
2.1.2. <i>Myc Ailesi</i>	8
2.2. Tümör Baskılayıcı Genler	9
2.2.1. <i>p53 Geni</i>	9
2.2.2. <i>Retinoblastoma Geni (RB)</i>	12
3. HÜCRE ÖLÜMÜ	14
3.1. Nekroz	14
3.2. Apoptoz	14
4. HÜCRE DÖNGÜSÜ	18
4.1. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi	19
4.1.1. <i>Hücre Döngüsünün Kontrol Noktaları</i>	20
4.1.1.1. G1/S Kontrol Noktası	20
4.1.1.2. G2/M Kontrol Noktası	21
4.1.1.3. Mitotik İğ Kontrol Noktası	23
5. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZLERİ	25
5.1. Flow Sitometri	25
5.2. Flow Sitometride DNA Analizi	27
5.2.1. <i>Flow Sitometrik DNA Analizinde Problemler</i>	27
5.2.2. <i>Flow Sitometride DNA Çalışması</i>	27
6. FLAVONOİDLER	29

6.1. Kersetin	31
7. PLATİNYUM BİLEŞİKLERİ	34
7.1. Cisplatin	34
8. MEZOTELYOMA	38
8.1. Mezotelyoma Tipleri	38
8.1.1. <i>Plevral Mezotelyoma</i>	38
8.1.2. <i>Peritoneal Mezotelyoma</i>	39
8.1.3. <i>Benign Mezotelyoma</i>	39
8.1.4. <i>Perikardiyal Mezotelyoma</i>	40
8.2. Mezotelyoma İçin Risk Faktörleri	40
8.2.1. <i>Asbest</i>	40
8.2.2. <i>Zeolit</i>	41
8.2.3. <i>Radyasyon</i>	42
8.2.4. <i>Simian Virüs 40</i>	42
8.3. Epidemiyoloji	43
8.4. Oluşum Mekanizması ve Karsinogenez	45
8.5. Tedavi	48
8.5.1. <i>Cerrahi Müdahale</i>	48
8.5.2. <i>Kemoterapi</i>	48
8.5.3. <i>Radyoterapi</i>	51
8.5.4. <i>İmmünoterapi</i>	51
8.5.5. <i>Gen Terapi</i>	52
8.5.6. <i>Fotodinamik Terapi</i>	52
9. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	53
10. MATERYAL ve YÖNTEM	55
10.1. Materyal	55
10.1.1. <i>Kimyasal Maddeler</i>	55
10.1.2. <i>Cihaz ve Diğer Malzemeler</i>	55
10.1.3. <i>Kullanılan Solüsyonlar</i>	56
10.2. Yöntem	59
10.2.1. <i>Hücre Kültürleri</i>	59
10.2.1.1. <i>Alt Kültürleme</i>	60
10.2.1.2. <i>Hücre Stoklama ve Dondurulmuş Hücrelerin</i>	

Çözülmesi	61
10.2.1.3. Hücre Sayımı	61
10.2.2. <i>Hücre Büyüme Eğrisi</i>	62
10.2.2.1. Tripın Mavisi Boyama Yöntemi ile Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi	62
10.2.2.2. MTS Deneyi ile Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi	62
10.2.3. <i>Hücrelerin Morfolojik İncelenmesi</i>	62
10.2.4. <i>Hücre Proliferasyon Analizi</i>	63
10.2.4.1. MTS	63
10.2.5. <i>Hücre Döngüsü Analizi</i>	63
10.2.5.1. Kesretin ve Cisplatin Uygulaması	63
10.2.5.2. Hücrelerin Fikse Edilmesi	64
10.2.5.3. Hücrelerin Boyanması	64
10.2.5.4. Döngünün Belirlenmesi	64
10.3. Apoptozis Tayini	64
10.3.1. <i>DNA Laddering</i>	65
11. BULGULAR	66
11.1. Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi	66
11.1.1. <i>Tripın Mavisi Boyama Yöntemi</i>	66
11.1.2. <i>MTS İndirgenme Yöntemi</i>	67
11.2. Kesretinin Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	68
11.3. Cisplatinin Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	72
11.4. Kesretin ve Cisplatin Kombinasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	74
11.5. Kesretinin Hücre Döngüsüne Etkisinin İncelenmesi	78
11.6. Cisplatinin Hücre Döngüsüne Etkisinin İncelenmesi	80
11.7. Kesretin ve Cisplatin Kombinasyonunun Hücre Döngüsüne Etkisinin İncelenmesi	82
11.8. Kesretin, Cisplatin ve Kombinasyonlarının Hücre Ölümüne Etkisinin İncelenmesi	86
12. TARTIŞMA VE SONUÇ	88
KAYNAKLAR	93

ÖZGEÇMİŞ

127

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

8-OH-G:	8-hidroksi guanin
ATM:	Ataxia telangiectasia
BCG:	Bacille Calmete Guerin
C:	Sitozin
Ca⁺²:	Kalsiyum
CDI:	Cyclin dependent kinase inhibitor
CDK:	Cyclin dependent kinase
CEA:	Carcino embriyonic antijen
Cis-DDP:	Cis-diamminedichloroplatinum
CT:	Göğüs tomografisi
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü
EKG:	Ekokardiyografi
EPP:	Ekstra plevral pnömonektomi
Et-Br:	Ethidium-bromide
FACS:	Fluorescence activated cell sorter
FADD:	Fas ile ilişkili hücre ölüm zinciri
FALS:	Forward angle light scatter
FasL:	Fas ligant
FBS:	Fetal bovine serum
FITC:	Fluoresceinisothiocyanate
GDP:	Güanozin difosfat
GJIC:	Gap junctional inter-cellular communication
GTPase:	Güanozin trifosfat
HMG:	High mobility group
HSVtk:	Herpes simpleks timidin kinaz
IGF-1:	İnsülin yapısına benzeyen büyüme faktörü 1
KCl:	Potasyum klorür
LOH:	Heterozigotluğun kaybı

MM:	Malignant Mezotelyoma
MPF:	M-phase/maturation promoting factor
MPM:	Malignant Plevral Mezotelyoma
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit
MTX:	Methotrexate
NaCl:	Sodyum klorür
NaHCO₃:	Sodyum bikarbonat
P/D:	Pleurectomy/Decortication
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polinükleotid zincir reaksiyonu
PDGF:	Plateletlerden türevlenmiş büyüme faktörü
PDT:	Fotodinamik terapi
PE:	Phycocerytrin
PI:	Propidium iodide
PMTs:	Photo multiply tubes
PTEN:	Phosphate and tensin homologue mutated on chromosome ten
RALS:	Right angle light scatter
RB:	Retinoblastoma
RNA:	Ribonükleik asit
ROS:	Reaktif oksijen türleri
Rt-PCR:	Revers transkriptaz-polinükleotid zincir reaksiyonu
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SV40:	Simian Virüs 40
TBE:	Tris borat-EDTA
TE:	Tris-EDTA
TNF:	Tümör nekrozis faktör
U.V.:	Ultraviole
UDP:	Urasil difosfat
WHO:	Dünya Sağlık Organizasyonu
WT-1:	Wilms tümör baskılayıcı geni

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Karsinogenezin aşamaları ve karsinojenik etkinin derecesi	5
2.2. Mutant K-Ras Yolu	8
2.3. p53 ve hücre döngüsü	11
2.4. p53 ve apoptozis	12
3.1. Apoptoz ve nekroz arasındaki morfolojik farklılıklar	17
4.1. Hücre döğüsünün bölümleri	18
5.1. DNA histogramı	28
6.1. Flavonoidlerin kimyasal yapıları	30
6.2. Kersetin'in kimyasal yapısı	32
7.1. Cisplatin'in izoformları	34
7.2. Cisplatin'in hücredeki hedefleri	35
7.3. DNA baz çiftleri ve pürinlerin N7 atomu	36
7.4. DNA baz çiftleri cisplatin pürin bazları (adenin, guanin)'nın N7 atomuyla etkileşimi	36
8.1. Mezotelyoma ölüm oranları	44
10.1. SPC111 hücrelerinin morfolojik genel görünüşü	60
10.2. SPC212 hücrelerinin morfolojik genel görünüşü	60
11.1. SPC111 ve SPC212 hücre hatları için hücre sayımlarının zamana bağımlı artışı	66
11.2. Metabolik olarak aktif hücrelerin absorbands değerlerinin zamana bağımlı olarak artışı	67
11.3. Kersetin ve cisplatinin SPC111 hücreleri üzerine morfolojik etkisi	69
11.4. Kersetin ve cisplatinin SPC212 hücreleri üzerine morfolojik etkisi	70
11.5. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarında 0-10µM kersetin dozlarının zamana bağımlı etkisi	71
11.6. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarında kersetin ve cisplatinin doza ve zamana bağımlı etkisi	73
11.7. SPC111 hücre hatlarında 1µg/ml Cis, 10µg/ml Cis, 50µM Qu ve kombinasyon uygulamaları	75

11.8. SPC212 hücre hatlarında 1µg/ml Cis, 10µg/ml Cis, 50µM Qu ve kombinasyon uygulamaları	76
11.9. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarında 5µg/ml Cis, 50µM Qu ve 5µg/ml Cis+50µM Qu kombinasyon uygulamaları	77
11.10. Kersetin'in 100 µM'lık dozunun SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne, zamana bağımlı etkisi	79
11.11. Cisplatin'in 50 µg/ml'lik dozunun SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne, zamana bağımlı etkisi	81
11.12. 1µg/ml Cis, 10µg/ml Cis ve 50µM Qu'nun tek ve kombinasyonlarının SPC111 hücre hatlarının hücre döngüsüne zamana bağımlı etkisi	83
11.13. 1µg/ml Cis, 10µg/ml Cis ve 50µM Qu'nun tek ve kombinasyonlarının SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne, zamana bağımlı etkisi	84
11.14. 5µg/ml Cis ve 50µM Qu'nun tek ve kombinasyonlarının SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne, zamana bağımlı etkisi	85
11.15. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarının 24 saatlik DNA ladderling profilleri	86
11.16. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarının 48 saatlik DNA ladderling profilleri	87
11.17. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarının 72 saatlik DNA ladderling profilleri	87

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
6.1. Flavonoidlerin alt sınıfları ve besinsel kaynakları	29
8.1. Doğada bulunan asbest türleri	41
8.2. Malignant Mezotelyomada bazı antineoplastik ajanların aktivitesi	49
8.3. Mezotelyomada tedavisinde kullanılan kombinasyon kemoterapi ajanları	50

1. GİRİŞ

Malignant mezotelyoma (MM) akciğer (plevra) (%90), abdominal organlar [periton (%6-10)] ve kalp (perikard) boşluklarının düzensiz fibroelastik bağ dokusunun sağlamlaştırdığı yüzeysel mezotelyum tabakasından (seröz yüzeyinden) köken alan bir kanser çeşididir (<http://www.mesothelioma-tr.org/saglik/mezotanim.php>, 2006, Mezotelyoma Ulusal Kurulu).

İlk kez 1960 yılında, Wagner ve arkadaşları tarafından Güney Afrika'da asbest teması ile bağlantılı olarak oluşabileceği bildirilmiştir (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006, Mesothelioma Information).

Batı ülkelerinde, asbest madenlerinde çalışanlar veya bu madenlerin çevresinde yaşayanlarda çevresel temas sonucu gelişen mezotelyoma; Türkiye, Kıbrıs, Yunanistan, Yeni Kaledonya, Afganistan, Korsika, Bulgaristan gibi ülkelerde asbest ile karışmış beyaz toprağın ev işlerinde kullanılması ile ikincil temas sonucunda da gelişmektedir (<http://www.mesothelioma-tr.org/saglik.php>, 2006, Mezotelyoma Ulusal Kurulu).

MM vakaları her geçen gün gittikçe artmaktadır. Sağ-kalım süresi, ortaya çıkışından sonra ortalama 9-12 aydır (Armstrong *et al.*, 1984; Leigh and Robinson, 2001). Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) raporlarına göre mezotelyoma oranları farklı ülkelerde cinsiyet ve yaşanan bölgeye bağlı olarak büyük farklılıklar göstermektedir (De Klerk and Musk, 2002; Berry *et al.*, 2004). Hemen hemen tüm ülkelerde erkeklerin mezotelyomaya yakalanma oranı kadınlardan çok daha yüksek iken endüstriyelmiş ülkelerdeki mezotelyoma oranı; asbestos kullanımı ve üretimine bağlı olarak, endüstriyelşmemiş ülkelerdekinden çok daha yüksektir (De Klerk and Musk, 2002).

Besinlerin temel işlevi organizmanın metabolik gereksinimleri için gerekli maddeleri sağlamaktır. Besinler metabolik aktivitemiz için gerekli makro ve mikro besleyicilerle birlikte sağlığımız üzerinde olumlu etkileri olan bileşenleri de içermektedir (American Dietetic Association, 1995; Haschke *et al.*, 2001). Son

yıllarda ki bilimsel çalışmalar diyet ve hastalıklar arasındaki ilişkiyi net bir şekilde ortaya koymuştur. Epidemiyolojik çalışmalar diyetin kronik hastalıkların önlenmesindeki rolüne işaret etmektedir (http://www.thelondonfreepress.com/HealthDOC/nutrition_article-dec.html, 2005, Functional foods). Beslenme alışkanlıklarının daha fazla meyve, sebze ve tahıl tüketecek şekilde değiştirilmesi kronik hastalıkların önlenmesinde etkin ve pratik bir yaklaşımdır (Steinmetz and Potter, 1996). Böylesi bir yaklaşımla Amerika'daki kanserli vaka sayısının üçte bir oranında azaltılabileceği vurgulanmaktadır. Tedaviden çok önleyici yaklaşımların üstün tutulduğu ise bilinen bir gerçektir (Liu, 2003).

Son yıllarda bazı besinlerin “doğal” yollardan hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin bilimsel olarak ortaya konulması, sağlığımızın korunmasında beslenme desteğinin önemini arttırmıştır. Bu nedenle, fonksiyonel besinler, nutrasötikler (nutraceuticals) ve doğal sağlık ürünleri daha fazla tüketilir hale gelmiştir (Coşkun, 2005). Flavonoidler, bitkisel kaynaklı besinlerde doğal olarak bulunan ve 4000'den fazla çeşidi olan, polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidler, yenen meyve ve sebzelerde bol olarak bulunmaktadır. Günlük tüketilen miktarının birkaç yüz miligram olduğu tahmin edilmektedir (Hollman and Katan, 1999). Flavonoidleri içeren bitkisel ilaçlar tüm Dünya'da özellikle Çin'de kullanılmaktadır (Di Carlo *et al.*, 1999; Samuelsen, 2000). Çeşitli çalışmalarda flavonoidlerin çoğunun tümör hücrelerini inhibe ettikleri belirtilmiştir (Caltagirone *et al.*, 2000; Miyagi *et al.*, 2000).

Kersetin (3, 3', 4', 5,7- pentahidroksiflavon), birçok bitki ve bitkisel besin kaynaklarında yaygın olarak bulunan bir bioflavonoidtir (Graefe *et al.*, 1999). Sık tüketilen yiyeceklerin çoğunda; elma, soğan, çay, kiraz ve çilek gibi yumuşak kabuklu meyveler, lahana, brokoli gibi yeşil yapraklı sebzelerde, çoğu tohumda, yemişlerde, çiçekler, kabuklar ve yapraklarda; *Ginkgo biloba*, *hypericum perforatum* (St. John's Wort), *Sambucus canadensis* (Elder) gibi tıbbi bitkilerin çoğunda bulunmaktadır (http://www.thorne.com/pdf/journal/3-2/quercetin_monograph.pdf, 2006, Alternative medicine review).

Kersetin'in; anti-kanser, antiviral, antitrombotik, antiiskemik, anti-inflamatuar, anti-alerjik olduğu, arterosklerozisi ve koroner kalp hastalıklarını önleyici etkisinin

olduğu, sellüler immüneyi stimule ettiği de belirtilmiştir (Gryglewski *et al.*, 1987; Deschner *et al.*, 1991; Hertog *et al.*, 1993; Formica and Regelson, 1995).

Cisplatin, [cis-DDP, *cis*-diamminedichloroplatinum (II)] antineoplastik ilaçların en yaygın ve en etkili olanlarından biridir. 20 yıldan fazla süredir klinikte kullanılan ilaç birçok malign tümöre, özellikle testis ve ovaryum kanserine karşı etki göstermektedir (Fram, 1992).

Çalışmamızda, besin kaynaklı bir bileşik olan kersetinin hücre proliferasyonuna, hücre döngüsüne ve apoptoza etkileri ile kemoterapide yaygın olarak kullanılan bir terapötik ajan olan cisplatin kombinasyonunun mezotelyoma hücrelerine etkisi incelenmiştir.

2. KANSER

Kanser, hücrelerin anormal ve kontrolsüz büyümesi ile karakterize edilen bir hastalıktır. Tarihte ilk tanımlamasını Hippocrates meme kanseri ile yapmıştır (Encyclopaedia Britannica, 2001). Yunanca “karkinos” teriminden türetilen latince karşılığı olan “kanser” terimi, ilk kez Galen tarafından kullanılmıştır. Kanser oluşumu, karsinogenez olarak adlandırılan çok basamaklı bir olaydır (Trueba, 2004). Karsinogenez için bir çok teori geliştirilmiştir. Bu teorilerden en eski olanda, kanser “ hücre farklılaşma hastalığı” veya “kök hücre hastalığı” olarak tanımlanır. Yani kanserin “tek hücre kökenli” olduğu ifade edilmektedir (Trosko and Ruch, 2002). “Neoplazia” terimi ise çoğunlukla yeni bir doku veya hücre büyümesi olarak tarif edilir. Neoplazia benign (iyi huylu) veya malignant (kötü huylu) olarak tanımlanır. Benign neoplazia; normal doku içinde saldırgan bir büyüme göstermeyen, yavaş gelişen, vücudun diğer bölgelerine yayılmayan ve fibröz kapsül ile çevrili yeni oluşumlardır. Malignant neoplazia; farklılaşma yeteneğini kaybetmiş anaplastik hücrelerden oluşan, hızlı büyüyen ve vücudun diğer bölgelerine yayılan (metastaz yapan) saldırgan tümörlerdir (Artner, 2001).

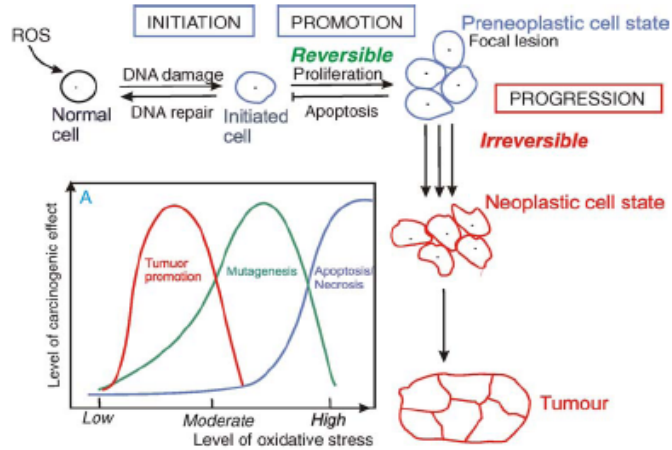
Kanser oluşumuna dış faktörler (kimyasallar, radyasyon ve enfekte edici organizmalar) ve iç faktörler (kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, immün durumlar ile metabolizma kaynaklı mutasyonlar) neden olur (American Cancer Society, 2003).

Kanserin indüklenmesi iki anahtar mekanizma ile açıklanır. Birincisi, genotoksik olmayan karsinojenler etkisiyle artan DNA sentezi ve mitoz nedeniyle bölünen hücrelerde tamir mekanizması hataları sonucunda mutasyonların ortaya çıkmasıdır. Başlangıçtaki neoplastik hücrede oluşan bu mutasyonlar, neoplastik hücreleri oluşturmak üzere klonal olarak artar (Trush and Kensler, 1991; Guyton and Kensler, 1993). Diğer mekanizma ise, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulmasıdır. DNA hasarı çok büyükse, apoptoz yoluyla bu hücreler ortadan kaldırılır (Hengartner, 2000). Hücre proliferasyonunda, DNA sentezini kontrol eden *p53* geni kritik rol oynar (Oren, 2003); *p53* geni mutasyona uğramış bazların elimine edilmesini, hücre hasarı çok büyükse de hücrenin apoptoza gönderilmesini tetikler. Kontrolsüz apoptoz ise sağlıklı hücrelerin de yıkımına neden

olacağından organizma için zararlıdır (Hussain *et al.*, 2003). Bu nedenle, anti-apoptotik (bcl-2) ve pro-apoptotik (*p53* gibi) faktörlerin kontrolü önemlidir. Kanserin yarısından fazlasında *p53* geninde mutasyon bulunmaktadır (Valko *et al.*, 2006).

Moleküler biyoloji çalışmaları aktive edilen onkogenlerin ya da inaktive edilen tümör baskılayıcı genlerin, başlatıcı kök hücrenin klonal olarak artmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Birçok deney, onkogenler tarafından aktive edilen tümör hücrelerinde GJIC (gap junctional intercellular communication)'da fonksiyon kaybı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, aktive edilmiş onkogenler ve GJIC arasında, onkogenlerce etkilenen bir sinyal iletim yoluna bağlı olan, fonksiyonel bir ilişki olduğuna işaret eder (Valko *et al.*, 2006).

Kanser gelişimi, başlama-yükselme-gelişme (initiation-promotion-progression) aşamalarından oluşur (Şekil. 2.1.) (Klaunig and Kamendulis, 2004).



Şekil 2.1. Karsinogenezin aşamaları ve karsinojenik etkinin derecesi (Valko *et al.*, 2006).

Başlangıç aşaması için DNA'da ölümcül olmayan bir mutasyonun bulunması ve bu hasarı takiben, hasarın kalıcı hale gelmesi için [8-OH-G (8-hidroksi guanin)

hasarı gibi] en az bir kez DNA sentezinin gerçekleşmiş olması gerekir. Bölünmekte olan hücreler herhangi bir nedenle hasara uğrarsa, hücre döngüsü; G1, S ya da G2 kontrol noktalarında geçici bir süre için durur ve hasar tamir edilir, hasar tamirinin ardından hücre bölünmeye devam eder. Oksidatif DNA hasarı reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından (Fenton tipi reaksiyonlar tarafından üretilen hidroksil radikalleri ya da diğer türler) oluşturulur. Malignant tümörler üzerinde yapılan çalışmalar, tümör büyüklüğü ile DNA'daki 8-OH-G miktarı arasında ilişki olduğunu göstermiştir; 8-OH-G hasarı transformasyonun benign ya da malignant olacağını belirlemektedir (Loft and Poulsen, 1996). Ayrıca stress nedeniyle hücre içi Ca^{+2} stoklarından salınan ve hücre içine dışardan giren Ca^{+2} , kanserin, “başlangıç” aşamasında etkilidir (Dreher and Junod, 1996).

Yükselme aşaması ise başlatıcı hücrelerin, hücre proliferasyonunun indüklenmesi ve/veya programlanmış hücre ölümünün inhibisyonu ile çoğalmasdır. Bu durum tanımlanabilir bir fokal lezyon (sınırları belli) yaratır. Bu aşamada, devam eden tümör yükseltme sinyalleri gerektirir, bu nedenle geri dönüşümü mümkündür (Loft and Poulsen, 1996). Pek çok tümör yükselticisi, hücresel antioksidant savunma sistemlerini (katalaz, glutatyon gibi) inhibe eder. Yüksek düzeydeki oksidatif stress sitotoksik olduğundan, proliferasyonu durdurur, apoptoz veya nekrozu indükler. Düşük düzeydeki oksidatif stres ise, yükselme aşamasında, hücre bölünmesini uyarır ve böylelikle tümör büyümesini destekler. Bu durumda, tümör gelişmesinin en önemli etkeninin, bu aşamada üretilen ROS'la ilgili olduğu söylenebilir (Dreher and Junod, 1996).

Gelişme, karsinogenezde son aşamadır (Klaunig and Kamendulis, 2004). Bu aşamada, hücreleri preneoplastik aşamadan, neoplastik aşamaya götürecek hücresel ve moleküler değişiklikler görülür. Gelişme aşaması geri dönüşümsüzdür; biriken genetik hasarlar, hücrenin iyi huylu (benign) halden kötü huylu (malignant) hale geçişine neden olur. Bu aşama, genetik kararsızlık ve kromozom yapı ve bütünlüğünün bozulması ile karakterize edilir (Valko *et al.*, 2006).

2.1. Onkogen ve Proto-onkogenler

Kanser gelişiminde onkogenlerin rolünün olabileceği ilk kez 1969'da Huebner ve Tadora tarafından ileri sürülmüştür (Tchia *et al.*, 1991). Onkogenler, proto-onkogen denen normal hücre genlerinden gelişir. Proto-onkogenlerin kodlanmış protein ürünleri çoğunlukla hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu genler mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel düzenlenmenin bozulması ile aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olur. Aktive olan proto-onkogenlere onkogen, protein ürünlerine ise onkoprotein adı verilir.

Proto-onkogenler; hücre içi sinyal iletilicileri, nükleer transkripsiyon faktörleri, hücre siklusunu kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörleri olmak üzere beş kategoriye ayrılabilir.

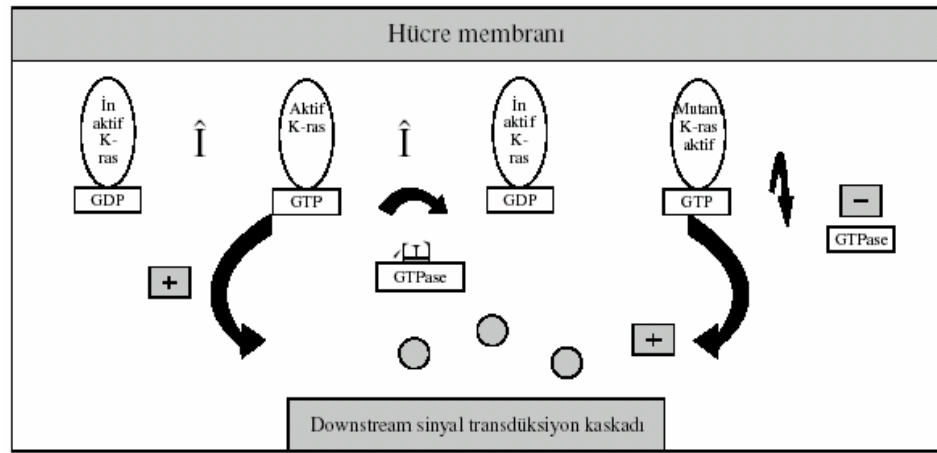
Onkogenin yapısal bir bölgesinde değişiklik sonucu farklı fonksiyon gören bir protein sentezlenir. Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşur ve en sık *ras* onkogen ailesinde görülür. Diğer bir mekanizma da, genin ekspresyonunu regüle eden bölgede oluşan değişiklik sonucunda genin, yapısal olarak normal olmasına karşın sürekli olarak uyarılma sonucu ürününün aşırı miktarda üretilmesi durumudur. Kromozom translokasyonlarında ise kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir. Genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatör bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır. Gen amplifikasyonu sonucu hücre içindeki DNA miktarı artar. *Myc* geni buna bir örnek oluşturur (Roth, 1994).

2.1.1. *Ras Ailesi*

Ras ailesi, H-ras, K-ras ve N-ras gibi birçok üyeden oluşmaktadır. *Ras* geninde, nokta mutasyonları kanser gelişiminde rol oynar (Groeger *et al.*, 1997). Embriyogenezde, yara iyileşmesinde ve mitozun arttığı durumlarda da *ras* ekspresyonu görülür. Ras proteinleri, membranda bulunan Guanozin trifosfat (GTPase) aktivitesine sahiptir ve hücre membranından nükleusa sinyal iletimi ile

hücre büyümesinde önemli rol oynarlar (Lecture, 1996; Spivack *et al.*, 1997; Fong *et al.*, 1999).

Ras proteininin normal hücredeki görevi; uyarıcı sinyallerin olduğu durumlarda Guanozin trifosfat (GTP)'a bağlanıp aktif hale geçerek, bu sinyalleri nukleusa iletmektedir. Bu sinyal iletimi sona erdiğinde de GTP molekülünün guanozin trifosfataz enzimi aracılığıyla hidrolize olması sonucu Guanozin difosfat (GDP) proteinine bağlı inaktif formu oluşur (Şekil 2.2.). Mutant ras proteininde guanozin trifosfataz aktivitesi inhibe edildiğinden, gen ürünleri kontrolsüz olarak üretilir (Mabry, 1998; Jacobson, 1999; Fong and Minna, 2002).



Şekil 2.2. Mutant K-Ras Yolu (Fong and Minna, 2002'den uyarlanmıştır).

H-ras, *K-ras* ve *N-ras* genleri, 12, 13 ve 61. kodonlarda kodlanır. *K-ras* mutasyonu, en sık 12. kodonda görülür. Bu kodonlardaki mutasyonlar, *ras* ailesinin guanozin trifosfataz aktivitesini değiştirebilir ve bunun sonucu olarak sürekli sinyal aktiviteleri ortaya çıkar. Sinyal kaskadında oluşan bu mitojenik uyarılar, malignan transformasyona neden olur (Mabry, 1998; Fong *et al.*, 1999; Jacobson, 1999).

2.1.2. *Myc* Ailesi

Myc genleri, DNA'ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlar. Bu proteinler hücre proliferasyon ve farklılaşmasında etkilidirler ve DNA sentezinin başlamasında rol alırlar. Klonlandıkları kültürler ve elde edilme şartlarına göre bu genler, *c-myc*, *N-myc* ve *L-myc*'den oluşur (Mabry, 1998). Bu gen sıklıkla amplifikasyon ve

transkripsiyonal düzenlenmenin bozulması ile onkogen halini alır. *c-myc* amplifikasyonu olan hücrelerde büyüme faktörü gereksinimi azalır, hücre döngüsünde G1 fazı kısalır ve bunun sonucunda proliferasyon oluşur. *c-myc* tümör büyüme hızında artış ve sağ-kalımda azalma ile ilişkilidir (Groeger *et al.*, 1997; Mabry, 1998; Fong *et al.*, 1999).

2.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler dolaylı olarak ve/veya doğrudan hücre bölünmesini denetlerler; mutasyonlar neticesinde bu etkilerini yitirirlerse, hücre proliferasyonunda artış gözlenebilir (Fearon, 1998; Park, 1998). Ancak bu durumun ortaya çıkabilmesi için bir tümör baskılayıcı geninin her iki allelinin de etkilenmesi gerekir. Bu olay Knudson'un 1971 yılında hereditör retinoblastoma'ya ilişkin istatistiksel gözlemlere dayanarak ortaya attığı "iki vuruş hipotezi" ile açıklanmıştır. Sonraki yıllarda moleküler çalışmaların da gösterdiği gibi onkogenez sırasında bir tümör baskılayıcı geninin önce bir daha sonra da ikinci alleli nokta mutasyonu, gen delesyonu ya da *imprinting* gibi mekanizmalarla inaktive olmaktadır (Knudson, 1971). Tümör baskılayıcı genler arasında en çok incelenmiş ve her geçen gün yeni bir işlevi olduğu anlaşılan gen, genomun gardiyanı, *p53* tümör baskılayıcı genidir.

2.2.1. *p53* Geni

p53 geninin ürünü olan *p53* proteini, 393 amino asit uzunluğunda 50-55 kDa molekül ağırlığında nüklear bir transaktivatör proteindir. 17. kromozomun 17p13.1 konumunda bulunmaktadır (Yukishige *et al.*, 1991; Kensei *et al.*, 1997). Bir transkripsiyon faktörü olan *p53* proteini; *p21*, *MDM2*, *GADD45*, siklin G, *Bax* gibi birçok hedef genin transkripsiyonel aktivasyonunda ya da baskılanmasında rol almaktadır. Transkripsiyonel etkisini gösterebilmesi için spesifik DNA dizilerine bağlanmaktadır. Proteinin DNA'ya bağlanan bu bölgeleri genin 4-8. eksonları tarafından kodlanmaktadır. Tümörlerde görülen mutasyonlar da özellikle bu bölgede yoğunlaşmaktadır (Levine, 1997).

Normal şartlarda *p53* proteini hücre içinde inaktif halde, düşük yoğunlukta ve yarı ömrü kısa olarak bulunmakta ve stabilizasyonunun düzenlenmesinde *MDM2*

adlı bir protein rol oynamaktadır: MDM2, *p53* geninin amino ucuna bağlanarak transkripsiyonel etkinliğini baskılamakta, *proteasom* adlı komplekslere yönlendirilerek degradasyonu (proteoliz) sağlamaktadır (Giaccia and Kastan, 1998). *p53* proteini ise *MDM2* geninin transkripsiyonunu aktive etmektedir (Ryan *et al.*, 2001). Birçok “stres” faktörü *p53* proteininin hücre içi yoğunluğunu arttırarak ve üç boyutlu yapısını değiştirilerek aktive etmektedir. Bu stres faktörleri başlıca iki grupta toplanmaktadır: DNA hasarı ve genotoksisite göstermeyen etkiler.

(i) DNA hasarı: İyonize ışınların ve ultraviyolenin yol açtığı DNA hasarı Cdk1 (cyclin dependent kinase) ve Cdk2’yi uyarır. Bu enzimler *p53* proteinin amino ucunu fosforilleyerek MDM2 ile etkileşimini engellemektedirler. DNA hasarının tanınmasında Ataxia-telangiectasia hastalığından sorumlu genin kodladığı ATM (ataxia telangiectasia mutated) proteini de rol oynamaktadır. ATM’nin de *p53* proteinini fosforilleyebilme özelliği vardır (Canman *et al.*, 1998). Bu bulgu, fosforilasyonun *p53* aktivasyonunda önemli bir mekanizma olduğunu göstermektedir (Giaccia and Kastan, 1998).

(ii) Genotoksisite göstermeyen etkiler: Bunlar arasında hipoksi, ribonükleotid depleasyonu, viral proteinler ve onkogen aktivitede artış sayılabilir.

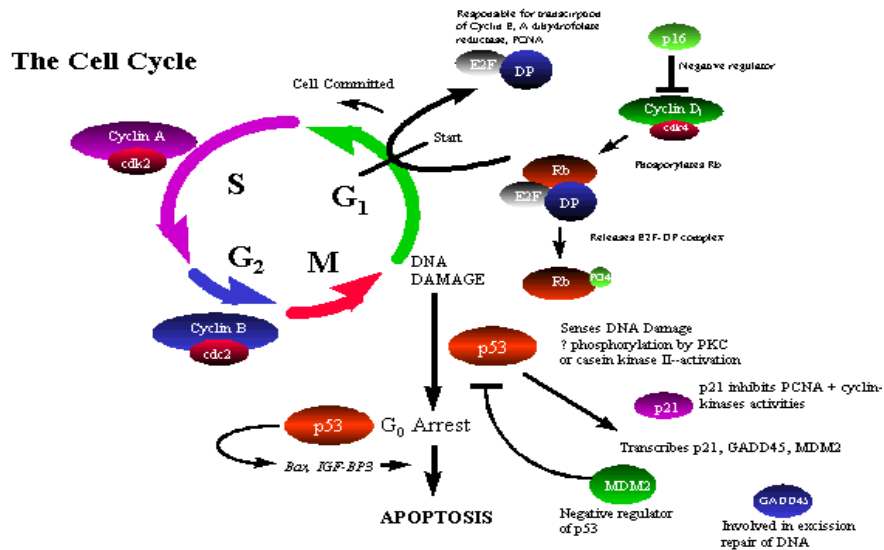
Hipoksi. Bir tümörün büyümesi ile damarlanması (anjiyogenez) aynı hızda olmadığından, çoğu kez tümörün orta bölgesinde iyi kanlanamayan hipoksik bir bölge ortaya çıkmaktadır. Hipoksinin uyardığı *p53* aktivitesinin ise tümör hücrelerini apoptosise yönlendirdiği gösterilmiştir (Levine, 1997).

Ribonükleotid depleasyonu: DNA sentezi için ribonükleosit trifosfatlar gerekli olduğundan bunların azalması halinde, *p53* aktive olmakta ve hücre döngüsü durdurulmaktadır (Linke *et al.*, 1996).

Viral proteinler: Adenovirüs E1A ve papillomavirüs E7 proteinlerinin *p53* üzerinden apoptozisi başlattığı gösterilmiştir (Levine, 1997). Ebstein-Barr virusü genomu tarafından kodlanan “ZEBRA” proteini de *p53*’ü aktive edebilmektedir. Bu etkinin onkogenik virüslerin replikasyonunu kontrol altında tuttuğu bildirilmiştir (Dreyfus, 2000).

Onkogen aktivitede artış: Artmış onkogenik aktivitenin uyardığı $p14^{ARF}$ adlı bir başka tümör baskılayıcı proteini, MDM2'ye bağlanarak onu etkisizleştirmekte ve p53 proteinini aktive etmektedir (Kamijo *et al.*, 1998).

p53 proteini hücre döngüsünün G1'den S fazına ve G2'den M fazına geçişteki kontrol noktalarında etkilidir (Şekil 2.3.). DNA hasarının uyardığı p53 proteini, p21 (Waf1) proteinini aktive etmekte ve p21 proteini böylece siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanarak siklusu G1 evresinde durdurmaktadır (El-Deiry *et al.*, 1993). p53, DNA tamirini başlatan bir protein olan GADD45'in de transkripsiyonunu uyarmaktadır (Chin *et al.*, 1997). Bütün bunlar, p53'ün p21 aracılığı ile döngüyü duraklatırken, GADD45 aracılığı ile de DNA tamirini sağladığını göstermektedir (Kastan *et al.*, 1992). Daha önce de ifade edildiği gibi, $p14^{ARF}$ geninin herhangi bir mekanizma ile inaktivasyona uğraması, $p14^{ARF}$ 'nin MDM2 üzerindeki baskısının kalkmasına ve p53 proteininin yıkımının artmasına neden olabilir. Bu durum hücre döngüsü üzerindeki kontrolün kaybı anlamına gelmektedir (Rocco and Sidransky, 2001).

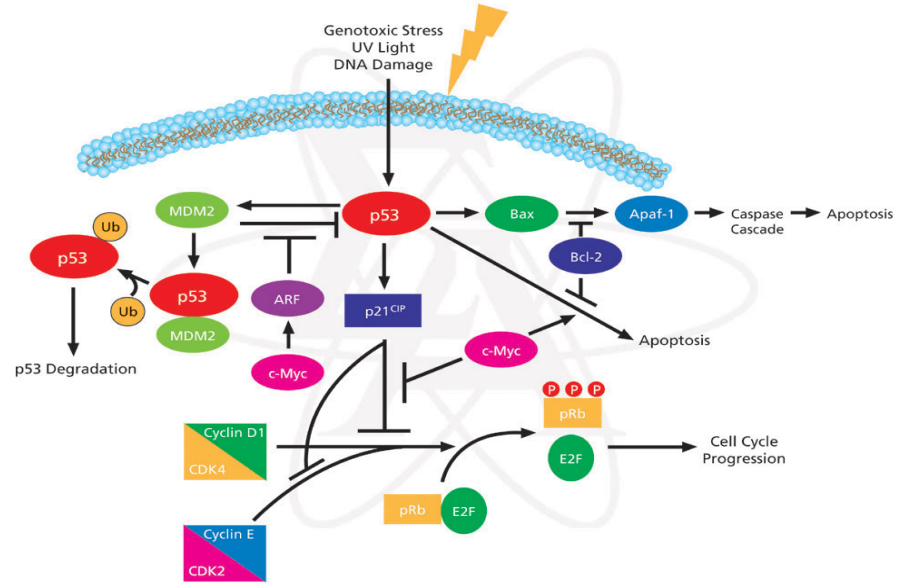


Şekil 2.3. p53 ve hücre döngüsü.

(http://www.humphath.com/.../p53_pathway_cell_cycle.gif, 2006)

p53 apoptozisin uyarılmasına neden olmaktadır (Şekil 2.4.). DNA hasarından sonra aktive olan p53 proteini, dış mitokondrial membrandaki Bax adlı proapoptotik proteininin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Bax ise CD95 transkripsiyonunu

uyarabilmekte, mitokondri'den sitokrom-C salınmasına ve apoptotik sürecin başlamasına sebep olmaktadır. (Zörnig *et al.*, 2001)



Şekil 2.4. p53 ve apoptozis

(http://www.sigmaaldrich.com/.../p53_sig_pathway.gif, 2006)

p53 hücre içinde DNA tamiri, hücre döngüsünün duraklatılması ve apoptozisin uyarılması gibi birçok işlevi üstlenmiş çok yönlü bir protein olarak özetlenebilir. Bu işlevler esas olarak genomun korunması ve onkogenezin önlenmesi ile ilgili görünmektedir. İnsan tümörlerinde mutasyona en çok uğrayan gen olan *p53*'ün çeşitli yöntemlerle hücre içi fonksiyonunun “restore” edilmesine yönelik deneysel ve klinik çalışmalar bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre; genel olarak bu uygulamaların hastalar üzerinde belirgin bir toksik etkisi olmadığı, ancak henüz hastalarda iyileşme sağlanamadığı gözlenmiştir (Hemminki, 2001).

2.2.2. Retinoblastoma Geni (*Rb*)

Retinoblastoma geni (*Rb*) tanımlanan ilk tümör baskılayıcı gendir. 13. kromozomda 13q14 bölgesinde bulunan *Rb* geni, 928 aminoasit büyüklüğünde ve 110 kDa molekül ağırlığında bir çekirdek fosfoproteinini kodlamaktadır. *Rb* proteini en az 10 serin ve treonin artığından fosforile edilmektedir. Regülasyonu, fosforilasyon ve defosforilasyon ile gerçekleştirilmektedir (Robert, 1991).

Rb geninin normal fonksiyonu retina ana hücrelerinin çoğalmasını engellemektir. Bu genin yalnızca bir kopyası bölünme kontrolünü gerçekleştirebilmek için yeterli olmaktadır. *Rb* geninin her iki kopyasının kaybı ise bölünme bloğunun ortadan kalkmasına neden olarak tümör oluşmasını tetiklemektedir. *Rb* geninin her iki allelinin inaktivasyonu tüm retinablastoma hastalarında tespit edilmiş ve ayrıca akciğer, meme, prostat gibi çok sayıda kanserde görülmüştür (Knudson, 1978).

Rb geninde gerçekleşen değişiklikler, ekspresyon kaybı ya da kusurlu bir protein yapımı ile sonuçlanır. *Rb* geni hücre döngüsünü regüle eden bir fosfoprotein kodlamaktadır. Bu protein, hiper ve hipofosforile durumları ile hücre siklusunu düzenlemektedir. Hücre döngüsünün G1 fazında hipofosforile iken G1'den S'ye geçişte hızla fosforile olur, S fazında fosforile kalır. G2 ve M'nin çoğu kısmında ve M-G1 dönüşümünden önce ise hipofosforile duruma geçer (Moberg *et al.*, 1996).

pRb ve hücresel E2F transkripsiyon faktörü arasında adenovirus E2 uyarıcısının regülasyon yeteneği aracılığı ile yapılan bir çalışmada, Rb proteini ile transkripsiyon faktörleri olarak bilinen iki protein arasındaki fiziksel etkileşim gösterilmiştir. E2F birçok konak hücre uyarıcısına bağlanarak bunların aktivitesini regüle etmektedir. E2F aktivitesi hücrede mitojenlere yanıt olarak arttığından E2F'nin myc proteininin pilot hücrenin mutajen uyarımlı büyüme programının düzenlenmesinden sorumlu olduğu sanılmaktadır (Hiebert, 1993).

3. HÜCRE ÖLÜMÜ

Ökaryotik hücrelerde şimdiye kadar morfolojik ve biyokimyasal analizlerle ayırt edilmiş iki tip hücre ölümü belirlenmiştir, bunlar patolojik hücre ölümleri (nekroz) ve fizyolojik “programlanmış” hücre ölümleri (apoptozis)’dir (Wyllie *et al.*, 1980).

3.1. Nekroz

Nekroz patolojik bir nedenden dolayı hücrenin zarar görerek, kendi katılımı olmaksızın meydana gelen hücre ölümleridir. Nekroz hücre enerji kaynaklarında bir azalmayı, hücresel çözünmeyi ve bunları izleyen içsel homeostasis’in yıkımını içerir. Nekrozda hücreler genellikle hacim olarak genişler ve parçalanarak dağılırlar (Wyllie *et al.*, 1980).

3.2. Apoptoz

Apoptoz, hücrelerarası ilişkiler açısından gereksinim duyulmayan aynı zamanda fonksiyonları bozulmuş hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlanmış bir şekilde ölmesidir. Literatürde hücre ölümüyle ilgili ilk bilgilere, 1920 yılında ışık mikroskobu ile yeni boya yöntemlerinin keşfinin bir sonucu olarak nekrozun tanımlanması çalışmalarında rastlanmaktadır. Bunu takiben 1972 yılında Kerr tarafından iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan farklı bir hücre ölümü gösterilmiş ve buna da ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen ‘apoptoz’ adı verilmiştir (Cohen, 1998).

Apoptoz, ayrıca embriyolojik ve erişkin doku gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynamakta, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin kurulmasını sağlamaktadır. Örneğin; kemik iliğinden sürekli hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir (Cooper, 1994). Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması,

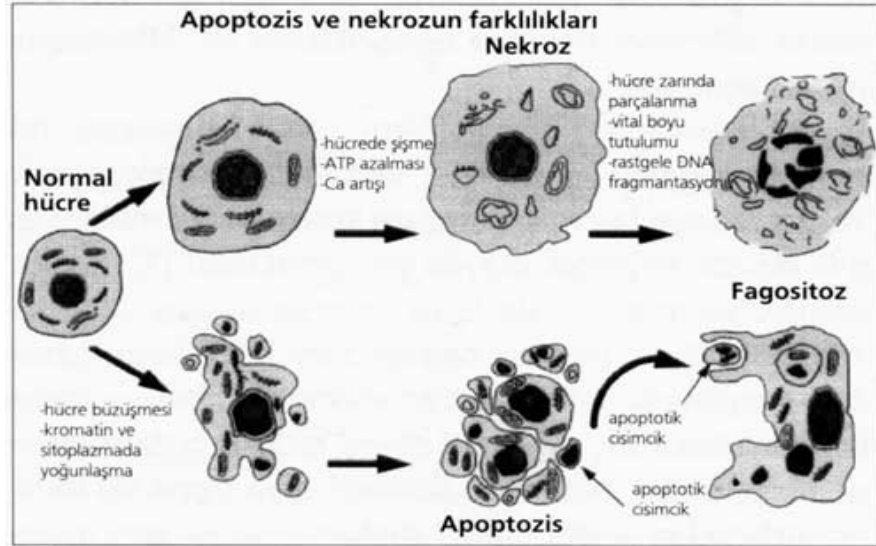
organizmada hasar görmüş veya tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesi ve akut hücre hasarı durumunda da programlanmış hücre ölümü devreye girmektedir. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi önemlidir (Cooper, 1994; Perkins and Stern, 1997). Virüsle enfekte hücreler ve hasarlı DNA'ların apoptozis yolu ile ortadan kaldırılması buna iyi bir örnektir (Cooper, 1994; Nagata, 1997). Apoptoz, doku gelişimi esnasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde örneğin; böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun yok edilmesi; memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasında çok sayıda üretilen nöronun %50'den fazlasının ortadan kaldırılmasını sağlar (Cooper, 1994).

Apoptozun hızının yavaşladığı veya arttığı durumlarda çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Viral bir enfeksiyon sırasında, normal şartlarda virüsler enfekte ettikleri hücelere kendi proteinlerini sentezletirler ve hücrenin kendisi için gerekli olan proteinlerin yapımını durdururlar. Bu nedenle virüsle enfekte olmuş hücrede apoptozis indüklenerek hücre ölümü gerçekleştirilir. Bununla beraber bazı virüsler (Ebstein-Barr virüs-EBV veya insan papilloma virüsü-HPV), enfekte ettikleri hücrenin apoptoza gitmesini baskılayan yollar geliştirmişlerdir. Thompson 1995 yılında, Ebstein-Barr virüsünün, apoptozis sinyalini kontrol eden regülatörlerden biri olan Bcl-2'ye benzer moleküller enfekte ettiği hücrenin kendi Bcl-2 üretimini indükleyen moleküller üreterek apoptozisi durdurduğunu bildirmiştir. Ayrıca Perkins ve Stern 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada, Papilloma virüsünün güçlü bir apoptozis indükleyicisi olan *p53* genini etkisizleştirdiğini, virüslerin bu etkileri sonucunda da bazı hematolojik kanserlerin gelişimine neden olduklarını bildirmişlerdir. Malignant hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz ve aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignansinin gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptoza gidemeyen ve beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisi ile malignant hücelere dönüşme potansiyeli taşımaktadır (Saikumar *et al.*, 1999).

Apoptoz, hücre dışı ve hücresel düzeyde oluşan çeşitli sinyaller yoluyla uyarılmaktadır (Thompson, 1995). Hücresel düzeyde etkili temel fizyolojik aktivatörler, Fas ligant (FasL) ve tümör nekrozis faktör (TNF) olarak bilinen

proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlere bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşmektedir (Lewin, 1997). Bunun dışında apoptozis; viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler ve radyasyon gibi bazı faktörlerle de başlatılabilmektedir. Ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan *p53* geni ve reaktif oksijen radikalleri (mitokondri, plazma membranı ve genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak) apoptozisi tetikleyebilmektedir.

Apoptoz, fizyolojik ve patolojik şartlarda meydana geldiği için klasik hücre ölüm şekli olan nekrozdan oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu iki hücre ölüm şeklinin farkları incelendiğinde; fizyolojik bir ölüm şekli olmaması nedeniyle nekroz sırasında hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişmekte, apoptozda ise tam tersine hücre büzülmemektedir. Nekrozda, kromatinin modeli yaklaşık olarak normal hücredeki görüntüye benzerdir, ancak apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanmış (kromatin agregasyonu) ve yoğunlaşmıştır (kromatin kondensasyonu) (Cooper, 1994; Thompson, 1995; Behnia *et al.*, 2000). Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içi materyal hücre dışına çıkar. Buna karşın, apoptotik hücre membranı bir bütün halindedir ve üzerinde küçük cepçikler bulunmaktadır. Nekrotik hücre, daha sonra lizise uğrar ancak apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler, membran ile çevrilidir ve değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içermektedir (Cooper, 1994). Nekrozda hücre içeriği dış ortama bırakıldığında inflamasyon (iltahaplanma) reaksiyonu uyarılır (Thompson, 1995). Apoptotik hücre ya da cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden iltahaplanma oluşmaz (Şekil 3.1.) (Thompson, 1995; Behnia *et al.*, 2000). Hücre DNA'sının nükleozomlar arası bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanması apoptozisin belirgin özelliğidir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru yer değiştirmesidir (fosfatidilserin translokasyonu). Bu değişim, apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlamaktadır (Behnia *et al.*, 2000).



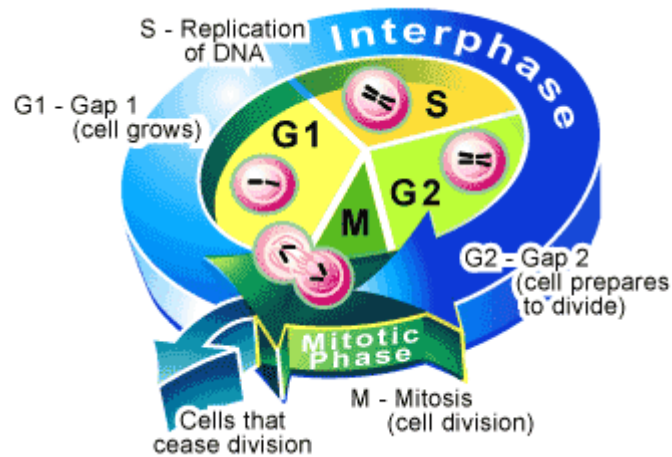
Şekil 3.1. Apoptoz ve nekroz arasındaki morfolojik farklılıklar (Cotran *et al.*, 1999'dan uyarlanmıştır.)

Apoptoz, aktif enerji gerektiren bir süreçtir ve bu esnada çeşitli genlerin kodladığı bazı proteinler hücre içinde aktif veya inaktif hale gelirler (Park *et al.*, 1997; Saikumar *et al.*, 1999). Apoptoz, bcl-2 grubu dimerize proteinler tarafından kontrol edilir. Bazı antiapoptotik (bcl-2, bcl-xl) ve pro-apoptotik (bax, bad) proteinler bu grupta yer almaktadır. “Bcl2/Bax” oranı “ölüm anahtarı” olarak değerlendirilmektedir. Apoptozla ilgili diğer önemli bir protein de *p53* gen ürünüdür. İnsan *p53* tumor baskılayıcı geninin sentezlettiği bir fosfoprotein olan p53 proteini, doğrudan DNA'ya bağlanabilmekte ve değişik hücresel veya viral proteinlerle ilişkiye girebilmektedir. Aberant hücre büyümesi ve hücre bölünmesini azaltıcı önemli görevleri olan bu onko-supresör gen, DNA hasarı ile aktive olur ve apoptoz başlatabilir. Ölüm reseptörü olarak adlandırılan bir membran proteini olan Fas antijeni, apoptozun diğer bir kilit noktasını oluşturmaktadır. Fas antijeninin hücre yüzeyinde ilgili ligandına bağlanması ile intra-sitoplazmik FADD (Fas ile ilişkili hücre ölümü zinciri) kompleksi oluştuğu gösterilmiştir (Park *et al.*, 1997). Fas antijeni, inaktif halde miyositlerde ve aterosklerotik plaklarda bulunmaktadır. Apoptoz sırasında DNA fragmentasyonunu sağlayan proteolitik enzim ailesine kaspazlar adı verilmektedir (Park *et al.*, 1997; Saikumar *et al.*, 1999). Yapılarında sistein içeren bu enzimler tüm hücrelerde inaktif pro-enzim halinde bulunurlar. Ölüm sinyalini başlatan enzimler olarak da kabul edilen kaspazlara karşı çeşitli virüslerde kaspaz inhibitörleri saptanmıştır.

4. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Hücre döngüsü ya da hücre siklusu; çoğalmak üzere uyarılmış ökaryotik hücrede gerçekleşen ve bir dizi biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir siklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar.

Bir hücre döngüsü, fazların işleyiş sırasına göre; G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. G1 ve G2 kısaltmaları “Gap” (ara, boşluk) sözcüğünden gelmektedir. S, DNA sentezi (replikasyonu), M ise mitozis anlamına gelmektedir. G0 fazı ise normalde hücre siklusu içinde yer almayan ve döngüyü tamamladıktan sonra siklusa çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır. Hücreler bölünme uyarısı aldıkları zaman bu fazdan ayrılıp G1 fazına yani döngünün ilk fazına girmiş olurlar (Şekil 4.1.). G1 fazında; RNA ve protein sentezleri gerçekleştirilerek hücre DNA sentezine hazırlanır; S fazında DNA sentezlenir, G2 fazında ise DNA sentezi tamamlanmış ve kromozomlar kendini eşlemeye başlamıştır, çekirdek zarının parçalanması ile bu faz sona erer ve hücre mitozis hazır hale gelir. Bu üç fazda tamamlayan hücre mitozis girer.



Şekil 4.1. Hücre döngüsünün bölümleri (<http://www.scq.ubc.ca/?p=248>, 2006).

Hücreyi bölünmeye sevkeden sinyaller (örneğin, büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler) çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyalini aldığında sinyal ileti kaskadı

“signal transduction cascade” adı verilen bir ileti mekanizması (MAP Kinaz, Protein Kinaz C ve/veya JAK/STAT yolları vb.) devreye girer. Bu ileti mekanizması transkripsiyonu, hücre döngüsünü veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller ya da nukleusa ulaşıp (STAT’da olduğu gibi) doğrudan transkripsiyonu düzenler. Böylelikle hücre döngüye sokularak bölünmeye (mitoza) sevk edilmiş olur (Kolch, 2000).

4.1. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

Hücre döngüsü, döngüye özgü bir takım proteinler olan siklin (cyc), siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (Cdk) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilmektedir (Hunt and Murray, 1993; Nurse and Hartwell, 1998).

Protein kinazlar, sikline bağlı olduklarında aktif hale geçerek, hedef proteinin yapısındaki serin, treonin veya tirozin aminoasitlerine fosfat grubu bağlayarak aktivitesini değiştirirler. Böylelikle Cdk-cyc kompleksi hedef proteinleri fosforilleyerek hücre siklusunun kontrolünü sağlamaktadır. Aktif hale geçen protein görevini tamamladıktan sonra protein fosfataz enzimi ile defosforile edilerek kendisindeki fosfor ayrılır ve böylece inaktif hale geçer (Hunt and Murray, 1993).

Memeli hücrelerinde her bir kontrol noktası için farklı Cdk molekülleri vardır. Yüksek yapılı canlılarda ve insan hücrelerinde A, B, C, D, E, ve F olmak üzere 6 tip siklin olduğu belirlenmiştir. Cyc A ve B mitotik siklinlerdir. Cyc A, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz sırasında yıkılır. Cyc A, Cdk 2 ile kompleks yapar ve bu kompleksin DNA replikasyonunda direkt rolünün olduğu düşünülmektedir. Siklin B ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve G₂ fazından M fazına geçerken sentezi maksimal düzeye erişir, ardından anafazda yıkılır. Cyc B, Cdk 1 ile etkileşime girer ve bu kompleks MPF (M-phase/maturation promoting factor) olarak da bilinir. Cyc B’nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozdan çıkar ve G₁’e tekrar geri döner. D tip (D1, 2, 3) siklinler başlama siklinleri olarak adlandırılırlar ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak ifade edilir. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Hangi tip cyc D’nin eksprese edileceği doku tipine özgüdür. Örneğin;

T lenfositler daha ziyade D3 (bir miktar da D2) tipini eksprese ederler. D tip siklinler Cdk 4 ve Cdk 6'yı regüle ederler. Cyc E, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır. Cyc E, Cdk 2'yi regüle eder (Teruyuki *et al.*, 1998). CDI'lar (p15, p16, p18, p19, p21, p27 ve p57) ise siklinler, Cdk'ların kendisi ya da cyc-Cdk komplekslerine bağlanarak, Cdk'ların aktivitelerini inhibe ederler. Siklinlerin seviyeleri transkripsiyon düzeyinde regüle edilir. Yıkımları ise “ubiquitin” metabolik yoluyla sağlanır (Todd *et al.*, 2002).

4.1.1. Hücre Döngüsünün Kontrol Noktaları

Hücre döngüsünde oluşan bir hasarda, yeni faza geçmeden önce bir önceki fazdan gelen hata tamir edilmeden döngüye devam edilmez. Bu nedenle döngü; G1'den S fazına, G2'den M fazına ve mitozda metafazdan anafaza geçişte kontrol edilir (Hartwell and Weinert, 1988-1989). Radyasyon veya bir toksine (staurosporin gibi) maruz kalmayla oluşan DNA hasarı hücre döngüsü kontrol noktalarını aktive eder ve G1'den S fazına ve G2'den M fazına geçişi ve mitozu girişte DNA kırıklarına sahip hücrelerde yapısal olarak anormal kromozomların ayrımı önlenir. DNA hasarı, DNA replikasyonunu inhibe eder. Replike olamamış DNA içeren hücrelerin, kinaz kompleklerinin inaktivasyonu yüzünden, mitozu girişleri önlenir. Mitotik spindle (iğ) kontrol noktasında ise, tüm kromozom kinetokorları mikrotübüllere tutulana kadar metafazdan anafaza geçiş başlatılmaz (Kearns and Liu, 2001).

4.1.1.1. G1/S Kontrol Noktası

Hücreler S fazına girmek için G1'de aktif olan farklı siklinler içerir. Bu siklinlerin çoğu G0 da sentezlenmezler. G1'de Cdk-cyc kompleksleri, DNA sentezi ve replikasyonu için gerekli genleri teşvik eden transkripsiyon faktörlerini aktive ederler. Lektinler, büyüme faktörleri, otokrin stimülasyon veya bazı intrasellüler yollardaki (Ras yolu gibi) mutasyonlarıyla oluşan mitojenik stimülasyon hücrelerin tekrar G0'dan G1'e girmesini teşvik eder (Hanahan and Weinberg, 2001).

Dinlenme fazındaki hücrelerde cyc D başlangıçta düşük orandadır. G0'da büyüme faktörü stimülasyonu, cyc D sentezini takiben cyc E'nin birikimine neden olur. Büyüme faktörü stimülasyonunun yokluğunda cyc D seviyesi hızla düşer (Cheng *et al.*, 1998).

G1/S geçişinde büyüme faktörü stimülasyonuna cevap olarak cyc D birikir. Cyc D Cdk inhibitörü (CKI) p16 ile inaktive edilir. Cyc D birikimi, aktif cyc D-cdk 4 (veya cdk 6) kompleksinin oluşumu ile sonuçlanır. Cyc D, Cdk 4 ve bunların aktif komplekslerinin birikimi p16'nın inhibe edici rolünü baskılar ve retinoblastoma (Rb) tümör baskılayıcı geninin fosforilasyonuna neden olur (Weinberg, 1995). *Rb* geninin fosforilasyonu G1/S fazı geçişinde kritik öneme sahiptir. Hipofosforile *Rb* histon deasetilaz enzimine (HDAC) bağlanır ve E2F transkripsiyon faktörü inaktive olur (Zhang *et al.*, 1999). *Rb* fosforilasyonu E2F transkripsiyon faktörünü aktive eder ve S fazın başlaması ve ilerlemesi için temel genlerin trans-aktivasyonuna neden olur. G1 cyc E-Cdk 2 kompleksleri iki sentrozom arasında bulunan mikrotübülleri organize eden merkezin (MTOC) duplikasyonunu aktive eder (Kearns and Liu, 2001).

DNA hasarı durumunda p53 proteini post-translasyonel olarak stabilize edilir ve cdk inhibitörü p21^{cip1}'i transkripsiyonel olarak aktive eder (Harper *et al.*, 1993). Cdk inhibitörü p21^{cip1} geniş bir spesifikliğe sahiptir ve cdk 4 ile kompleks oluşturduğunda cyc D'yi inhibe eder. Cyc D-Cdk 4 kompleksinin inaktivasyonu nedeni ile RB'nin fosforilasyonunu gerçekleştiremez ve E2F inaktif kalır, buda döngünün geç G1 fazında durdurulmasına neden olur (Kearns and Liu, 2001).

4.1.1.2. G2/M Kontrol Noktası

Hücre siklusunda DNA sentezini ve replikasyonunu takiben G2 fazı başlar. Mitoza giriş ise cyc B-Cdk 1 kompleksinin aktivitesinin artmasıyla teşvik edilir (Pines, 1999). MPF aktivitesinin regülasyonu birkaç aşamada olur. Regülasyonun birinci aşamasında cyc B vardır. Cyc B sentezi geç S fazında ve M fazı boyunca yapılır. Mitoz tamamlandığında cyc B seviyesi hızla düşerek, aktif MPF kompleks oluşumu ve hücre bölünmesinin ikinci bölümünü önler. Cyc B seviyesi sitoplazma ve

nükleus arasında aktif transport ile düzenlenir. Cyc B interfaz (G1, S ve G2) boyunca hücrelerin sitoplazması içinde vardır. Mitozun profazı başlayana kadar cyc B nükleustan sitoplazmaya aktif olarak transfer edilir. Mitoz başladığında cyc B Cdk 1'e bağlanır ve aktif MPF kompleksi oluşur. MPF aktivitesi fosforilasyon ile gerçekleşir. MPF'nin cdk 1 alt ünitesinin ikinci kez fosforilasyonu cyc B-Cdk 1 kompleksini inaktive edecektir. Nüklear bir protein kinaz olan Wee1 MPF kompleksini nukleusta inaktive ederek, prematüre mitozu önler (Heald, 1993). Wee1 Cdk1'in ATP bağlanan bölgesini fosforilayarak MPF'yi inaktive eder. Protein kinaz Myt 1 de inhibe edici fosforilasyona neden olur (Liu, 1997). Myt 1 Cdk 1'i fosforilayarak interfaz boyunca cyc B ile bağlanmasını düzenler. Protein fosfotaz cdc25 (b ve c) Cdk 1 alt ünitesini defosforilayarak MPF'nin inhibe edici fosforilasyonunu tersine çevirir (Draetta and Eckstein, 1997). Bu defosforilasyon mitozu giriş için hız limiti olarak görülür. Cdc25b proteini G2 boyunca birikir ve ilk MPF aktivasyonunda kritik rol oynar. Cdc25c protein seviyesi hücre döngüsünün tüm fazlarında sabittir ve interfaz boyunca sitoplazma ve nükleus arasında hareket eder. G2/M geçişinde cdc25 nükleusta birikir ve MPF kompleksini aktive ederek mitozun başlamasına neden olur. Replike olmamış DNA içeren hücrelerde MPF kompleksinin inaktivasyonu nedeni ile bu hücrelerin mitozu girişleri önlenir (Kearns and Liu, 2001).

DNA hasarını takiben, Cdk1 inhibisyonu G2 bloklanması için gereklidir (Furnari *et al.*, 1997). DNA hasarı cdc25c'yi fosforilayan, protein kinaz chk1 ve 2'nin aktivasyonu neden olur. Fosforillenmiş cdc25, 14-3-3 proteinlerine bağlanır ve nukleustan sitoplazmaya taşınır. Cdc25c eğer nükleusta ise, cyc B-Cdk 1 kompleksini aktive eder. Bunu da Cdk 1'de wee1 in neden olduğu inhibe edici fosforilasyonu kaldırmayla yapar. Ancak, nükleusta cyc B-Cdk 1 kompleksini aktive eden cdc25c miktarı yetersiz ise G2 blok aktive olur. p53'de G2/M geçişinde rol oynayabilir (Molinari, 2000). DNA hasarı olduğunda p53 14-3-3 proteinini transkripsiyonel olarak aktive eder. 14-3-3 proteini fosforillenmiş cdc25c'ye bağlanır ve sitoplazmadaki kompleksi ayırır, böylece mitozu geçişe hazırlık için aktif cyc B-Cdk 1 kompleksi azaltılır (Kearns and Liu, 2001).

4.1.1.3. Mitotik İğ Kontrol Noktası

Mitozun metafazdan anafaza geçişi mitotik iğ kontrol noktası ile düzenlenir (Cahill *et al.*, 1998 ve 1999; Ouyang *et al.*, 1998). Mitotik iğ kontrol noktası kinetokorlara (sentromerde) yapışan mikrotübülleri görüntüler. Kinetokor surveillance, anafazın başlaması için kardeş kromatidlerin sabit bipolar iğe yapışmasını sağlayan mekanizmadır. Kinetokor surveillance türler arasında korunmuştur ve kromozomların doğru olarak ayrılmasını sağlar. Sentrozomlardan mikrotübül oluşumu ve iğ oluşumu aktif cyc B-Cdk 1 kompleks (MPF)'i ile teşvik edilir. Mitotik siklinlerin degradasyonunu takiben anafaz başlar. Mitotik siklinler ubiquitin'lenir ve proteosomal degradasyona uğrar. Yüksek MPF aktivitesi, poly ubiquitin'lenmiş mitotik siklinlerin oluşumunda rol oynar. Mitotik siklinlerin degradasyonu MPF'yi inaktive eder ve mitozun normal olarak tamamlanması için gereklidir (Kearns and Liu, 2001).

Mitotik iğ kontrol noktasının en önemli fonksiyonu, vaktinden önce kardeş kromatidlerin ayrılmasını önlemektir. Mitotik iğ kontrol noktasının düzenlenmesinde birkaç gen rol oynar. MAD1L1, MAD2, MAD2L1, MAD2B, BUB1, BUBR1, BUB3, TTK, MPS ve CDC20 genlerinin hücre siklusunda rol oynadığı bilinmektedir. BUB ve MAD gen ürünleri kinetokor surveillance ve anafaz düzenlenmesi için gereklidir. MAD proteinleri kromozomların doğru olarak ayrılmasında rol oynar. Mayada MAD2'nin fazla ekspresyonu tahminen mitotik iğ kontrol noktasının aktivasyonu ile metafazda tutuklanmaya neden olur (He *et al.*, 1997). BUB gen ürünleri mitotik progresyonda rol oynamakta ve inaktivasyonları anöploidiye sebep olabilmektedir (Ouyang *et al.*, 1998). Mitotik iğ kontrol noktalarının tamamen kayıp olması durumunda *Drosophila melanogaster* (Basu, 1999), *C. Elegans* (Kitagawa and Rose, 1999) ve farelerde (Dobles *et al.*, 2000) embriyonik lethality ile sonuçlanır. DNA replikasyonunu takiben kardeş kromatidler kohezin olarak adlandırılan protein kompleksine yapışırlar (Waizenegger *et al.*, 2000). İğ kontrol noktası anafaz promoting kompleksi (APC) düzenler. CDC20p APC yi aktive eder ve Pds1p yi ubiquitin yolu ile degrade eder. Pds1p'nin degradasyonu durumunda Esp1 aktive olur, böylece kardeş kromatidler anafaz boyunca kutuplara göç eder. Bağlanamayan kinetokorların olması durumunda MAD

proteinleri, CDC20p ile etkileşerek APC aktivasyonunu inhibe eder. Bu inaktivasyon Pds1p'nin degradasyonunu bloke eder, buda inaktif Esp1 ve kromatid kohesinlerinin korunması ile sonuçlanır. BUB proteinleri anafazda mikrotübüllerin kinetokorlara yapışmasında rol oynar. BUB1, BUB3'ü fosforiller (Roberts *et al.*, 1994), hayli korunmuştur, kinetokorlarda lokalizedir, profaz boyunca senromerde bulunur ve mikrotübül yapışmasını takiben kaybolur. Mutant BUB genleri tüm kinetokorlarda kararsız mikrotübül yapışmasına ve mitotik iğ kontrol noktasının aktivasyonuna neden olur (Kearns and Liu, 2001).

5. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZLERİ

5.1. *Flow Sitometri*

Flow sitometri, süspansiyon hücrelerin bir akış kanalı boyunca geçerken tek tek deteksiyonu ve/veya ayrışımını sağlayan bir cihazdır (Mendelsohn, 1980). Flow sitometri bazen floresan ile aktive edilmiş hücre sınıflandırıcısı (Fluorescence Activated Cell Sorter-FACS) olarak da isimlendirilir (Owens and Loken, 1995). 1934 yılında Moldaven isimli bir araştırmacının ‘akım boyunca kan hücrelerinin sayımı’ tekniğini geliştirmesi ile başlamıştır.

Flow sitometri; heterojen hücre süspansiyonlarının tanımlanması, tek hücre seviyesinde analiz imkanı, hücre içi ve yüzey antijenlerinin saptanması, total DNA içeriği, kromozomlardaki DNA içeriği, total hücre proteini, enzim aktivitesi ve lokalizasyonu, H_2O_2 üretimi ve hücre sınıflandırma gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Muirhead, 1987).

Flow sitometri birçok sistemin birleşmesinden oluşmuştur. Bunlar; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi, ışık kaynağı (lazer), sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik ve elektrik sinyal), bilgisayar (data toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) ve ayırma mekanizmasıdır. Süspansiyon halindeki hücreleri cihaza vermeden önce lazer, bilgisayar ve elektronik sistemler devreye sokulur. Polistren kaplı partiküllerle lazer ayarı yapılır. Bu aletin kalibrasyonunu sağlar. Standart ve kontrollerin verilmesi ile de örneğin kalibrasyonu yapılır. Daha sonra çalışılacak popülasyon monitörde işaretlenir, histogramların ayarı yapılır ve örnek alete verilir (Riley *et al.*, 1989, Darzynkiewicz, 2000). Süspansiyon halindeki işaretli hücreler ve partiküller (mikroorganizmalar, kromozomlar, ve hücreler) hava basıncı ile sheat fluid içinden geçirilir. Sheat fluid içindeki sıvının akışı çok hızlı olduğundan yüksek bir basınç oluşturulur ve bu basınç ile hücreler cam veya kuartzdan yapılmış (flow chamber) akış kabineye gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı, hücrelerin tek bir sıra halinde geçişini sağlar ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak; argon iyonu, kripton, helyum-

kadmiyum, helyum-neon veya daha yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları kullanılır. İşaretlemede kullanılan problemler lazer kaynağıyla aktive olduklarından ışın yayarlar ve bu sayede dedekte edilebilirler. Genellikle lazer kaynağı olarak argon iyonu kullanılır ve Florescein izotiyosiyanat (**F**luorescein **i**sothiocyana**t**e-FITC), Propidyum İyodid (**P**ropidium **I**odide-PI), Etidyum-Bromid (**E**thidium-Bromide), Akridin Oranj (**A**cridine orange), fikoeritrin (**P**hycoerythrin-PE)'in 488 nm'de aktivasyonu sağlanır. Bu problemlerin emisyonları farklıdır. DNA'ya bağlanmış flokrom, lazer ışığı ile aktiflenir ve bu enerji ile ışın yayar. Bu yayılan ışının yoğunluğuna göre hücre boyutu, içyapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi edinilir. Aktiflenme sonucu açığa çıkan floresan fotodiodlarda toplanır, foton sayısını çoğaltan tüpler (Photo Multiply Tubes) ile elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve sonuçlar bilgisayara iletilir (Fuller, 1980).

Flow sitometride 4 fotodedektör vardır; önden saçılımı gösteren (Forward Angle Light Scatter-FALS), yandan saçılımı gösteren (Right Angle Light Scatter-RALS), yeşil floresan ve kırmızı floresan. FALS, önden saçılımı sağlar ve hücre boyutunu gösterir. RALS ise, yandan saçılımı sağlar ve iç yapıyı yani granülariteyi gösterir (Cram *et al.*, 1993).

FALS/RALS histogramı ile hücre süspansiyonundaki farklı popülasyonlar birbirinden ayrılabilir. Örneğin; periferik kanda lenfositler büyüklük bakımından küçüktür ve az granülarite gösterirler, monositler orta büyüklükte ve orta granülarite gösterirken, granülositler ise hem büyüklük hem de granülarite açısından diğerlerinden daha büyük ve daha fazla granülariteye sahiptirler (Pinkel and Stovel, 1983).

Çok parametrelili analizlerde 2 veya daha fazla renkli immünfloresan kullanılır. Genellikle iki renkli, yeşil floresan veren FITC ve kırmızı floresan veren PE kullanılmaktadır. Farklı floresan işaretli antikorların kullanılması iki farklı parametrenin tayinine olanak sağlar. Örneğin; CD4⁺ (yardımcı T lenfositleri) ve CD8⁺ (sitotoksik T lenfositleri) lenfositler bu yöntemle kolay ve doğru bir şekilde belirlenebilirler (Hiebert and Sweet, 1983).

5.2. Flow Sitometride DNA Analizi

DNA analizi flow sitometrinin en eski kullanım alanlarından biridir. Son yıllarda onkoloji alanındaki kullanımı daha da büyük önem kazanmıştır. Flow sitometri, tümör antijenlerine karşı gittikçe çoğalan antikorların uygulanmasında ideal bir araçtır. Buna ek olarak flow sitometride prognostik olarak DNA içeriğinin ve proliferatif aktivitenin ölçülmesi mümkündür. Flow sitometride DNA analizi gerek hastalara uygulanan tedavinin geçerliliğini, gerekse tedaviye cevap alınıp alınmadığı hakkında bilgi sağlamaktadır (Gray, 1986).

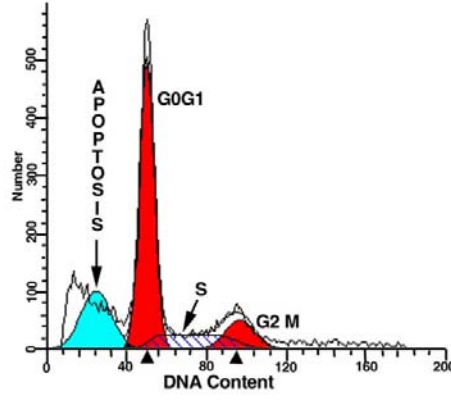
5.2.1. Flow Sitometrik DNA Analizinde Problar

DNA boyalarının en önemli özelliği ‘stoichiometric’ olmalarıdır. Bu özellik bağlanan prob sayısının bağlandığı DNA molekül sayısına eşit olması olarak özetlenebilir. Propidyum iyodid (PI) ve etidyum bromid çift sarmal nükleik asitler arasına girmekte, fakat bu bağlanma işlemi gerçekleşirken çift sarmal RNA’ya da bağlanmaktadır. Benzimid grubu problar arasında Hoechst 33342 boyası, DNA’da A-T zengin bölgelere bağlanma göstermektedir. Antibiyotik grubunda bulunan boyalardan mitramisin ve kromamisin ise, DNA’da G-C zengin bölgelere bağlanır. Flow sitometride kullanılan bir başka boya da akridin oranj’dır. Bu boya da çift sarmal DNA arasına girmektedir. Yukarıda belirtilen boyalardan en çok kullanılanı PI’dır. PI’nın 488 nm’de eksite olması, bu boyanın pek çok flow sitometri cihazında kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (Fried, 1976).

5.2.2. Flow Sitometride DNA Çalışması

Flow sitometride DNA analizi taze ve fikse dokularda hatta parafin bloklardaki dokular içinde yapılabilir. Bu çalışmalar yapılırken şu aşamalar takip edilir; öncelikle tek hücre süspansiyonu haline getirilmiş hücrelerde, hücre membranı ve sitoplazmasının ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu işlem için uygun deterjanlar kullanılır. Bu aşamayı takiben DNA boyasının RNA’ya bağlanmasını engellemek amacıyla örnek hücreler ribonükleaz ile işleme tabi tutularak RNA parçalanır ve daha sonra da DNA, belirtilen boyalardan biri ile boyanır. Flow sitometride DNA analizi

yapılırken iki tür bilgiye erişilmektedir: G_0 ve G_1 fazında bulunan hücrelerin ortalama DNA içeriği ve hücre siklusundaki her fazda bulunan hücre sayısı (Şekil.5.1.) (Herbert, 1989).



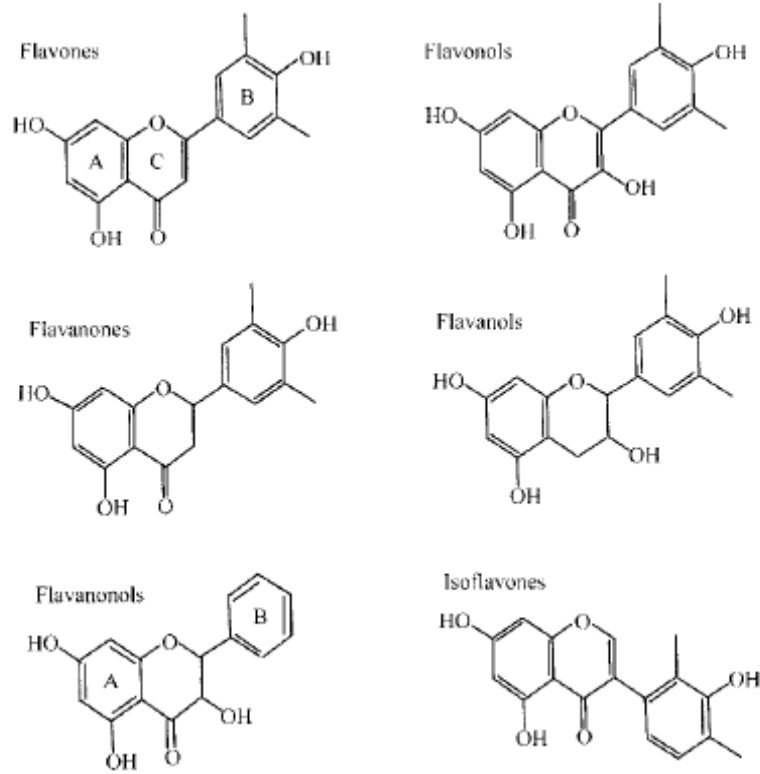
Şekil 5.1. DNA Histogramı (Herbert, 1989)

6. FLAVONOİDLER

Flavonoidler, bitkisel kaynaklı besinlerde doğal olarak bulunan ve 4000'den fazla çeşidi olan, polifenolik bileşiklerdir (Tablo 6.1.). Ortak bir fenilbenzopiron (C6-C3-C6) yapısına sahiptirler, doymuşluk düzeyine ve merkezi piron halkasının açılmasına göre sınıflandırılırlar. Şekil 6.1.'de gösterildiği gibi flavonlar, flavanoller, isoflavonlar, flavonoller, flavanonlar ve flavanonoller'den oluşurlar (Middleton and Kandaswami, 1986; Harbone and Williams, 2000).

Tablo 6.1. Flavonoidlerin alt sınıfları ve besinsel kaynakları (Ren *et al.*, 2003)

Flavonoid alt grupları	Flavonoidler	Temel besin kaynakları
Flavonoller	Kaempferol, myricetin, quercetin, rutin	Soğan, kiraz, elma, brokoli, lahana, domates, böğürtlen, çay, kırmızı şarap, karabuğday
Flavonlar	Apigenin, chrysin, luteolin	Maydonoz, kekik
İsoflavonlar	Daidzein, genistein, glycitein, formononetin	Soya fasülyesi, baklagiller
Flavanoller	Catechin, galocatechin	Elma, çay
Flavanonlar	Eriodictyol, hesperitin, naringenin	Portakal, greyfurt
Flavanonoller	Taxifolin	Limon, narenciye



Şekil 6.1. Flavonoidlerin kimyasal yapıları (Ren *et al.*, 2003)

Flavonoidler, yenen meyve ve sebzelerde bol olarak bulunmaktadır. Günlük tüketilen miktarının birkaç yüz miligram olduğu tahmin edilmektedir (Hollman ve Katan, 1999). Flavonoidlerin birçok tıbbi bitkide de bulunduğu belirtilmiştir. Flavonoidleri içeren bitkisel ilaçlar tüm Dünya’da özellikle Çin’de kullanılmaktadır (Di Carlo *et al.*, 1999; Samuelsen, 2000).

Flavonoidlerin karsinogenezi inhibe ettikleri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (Caltagirone *et al.*, 2000; Miyagi *et al.*, 2000). Flavonoidlerin hücre döngüsünün ilerlemesini durdurduğu belirtilmiştir (Ren *et al.*, 2003). Bunu anahtar regülatörler olan Cdk’ların aktivitesini ve düzenlenmesini değiştirerek yaptıkları belirtilmiştir (Senderowicz, 1999 and Senderowicz, 2001). Flavonoidlerin bazı kanser hücre hatlarında apoptozise neden olduğu; DNA topoizomeraaz I/II aktivitesinin inhibisyonunu (Markovits *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1999; Bailly, 2000; Sukardiman *et al.*, 2000), reaktif oksijen türlerini (ROS) azalttığı (Lee *et al.*, 2002), ısıya duyarlı proteinlerin gen seviyesinde anlatımını düzenlediği belirtilmiştir (Rong *et al.*, 2000). Bunlara ek olarak, sinyal iletim yollarını modüle ettikleri (Yin *et al.*,

1999), kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonu ile sitokrom C salınımına neden oldukları (Wang, 1999), Bcl-2 ve Bcl-X_L gen seviyesinde anlatımının aşağı düzenlenmesine (down regulation), Bax ve Bad ekspresyonunun, nüklear transkripsiyon faktörü kappab (NF-kappab)'nin gen seviyesinde anlatımının teşvik edilmesine, endonükleazın aktive edilmesi ve Mcl-1 proteininin baskılanmasına neden oldukları bildirilmiştir (Konig *et al.*, 1997; Iwashita *et al.*, 2000; Wenzel *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002).

Flavonoidlerin, karsinojenlerin yapısını ve metabolizmasını düzenlediği ve böylece kanseri önlemeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Wattenberg, 1992; Carrol *et al.*, 1998). Flavonoidlerin, faz I metabolize edici enzimlerle etkileştikleri, CYP1A1 ve CYP1A2 gibi P450 izoenzimlerinin aktivitesini inhibe ettikleri çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Tsyrov *et al.*, 1994; Lahiri-Chatterjee *et al.*, 1999; Le Marchand *et al.*, 2000). Karsinojenlerin aktive olarak hücresel hasarın teşvik edilmesine neden oldukları, flavonoidlerin ise hücrede oluşan hasara karşı koruyucu bir role sahip oldukları düşünülmektedir (Ren *et al.*, 2003). Aynı zamanda glutatyon-S-transferaz, kuinon redüktaz ve UDP-glukoronil transferaz gibi faz II metabolize edici enzimleri teşvik ederek (Bu-Abbas *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998) karsinojenlerin detoksifikasyonunu hızlandırdığı belirtilmiştir (Ren *et al.*, 2003).

Birçok flavonoidin normal insan hücrelerine toksik etkisi bulunmamasına rağmen, kültüre edilmiş insan kanser hücre hatlarının pek çoğunun da hücre bölünmesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Hirano *et al.*, 1994; Kawaii *et al.*, 1999; Kuntz *et al.*, 1999; Wenzel *et al.*, 2000; Pouget *et al.*, 2001). Anti-proliferatif etkinin moleküler mekanizması da tümör oluşumuna neden olan prooksidan oluşum sürecinin baskılanması ile olduğu belirtilmiştir. Prooksidan enzimler çeşitli tümör başlatıcılar tarafından aktive edilmekte, flavonoidler ise bu enzimleri inhibe etmektedir. Özellikle ksantin oksidaz (Chang *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 1995), COX veya LOX (Markovits *et al.*, 1989; Iwashita *et al.*, 2000; Mutoh *et al.*, 2000).

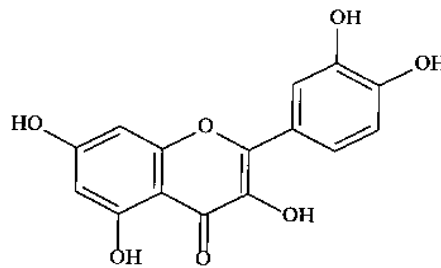
Diğer taraftan flavonoidler, farklılaşma (Kim *et al.*, 2000; Mata-Greenwood *et al.*, 2001), antioksidatif aktivite (Kandaswami and Middleton, 1994), damarlaşma sürecinin (anjyogenez) baskılanması (Paper, 1998) ve çoklu ilaç (multidrug)

direncinin düzenlenmesi gibi birçok mekanizmada etkilidir (Kioka *et al.*, 1992; Shapiro *et al.*, 1997; Di Pietro *et al.*, 1999).

6.1. Kersetin

Kersetin (3, 3', 4', 5,7- pentahidroksiflavon) (Şekil 2.13.), birçok bitki ve bitkisel besin kaynaklarında yaygın olarak bulunan bir bioflavonoidtir. (Graefe *et al.*, 1999). Sık tüketilen yiyeceklerin çoğunda; elma, soğan, çay, kiraz ve çilek gibi yumuşak kabuklu meyveler, lahana, brokoli gibi yeşil yapraklı sebzelerde, çoğu tohumda, yemişlerde, çiçekler, kabuklar ve yapraklarda hatta medikal bitkiler; *Ginkgo biloba*, *hypericum perforatum* (St. John's Wort), *Sambucus canadensis* (Elder)'de ve pek çoğunda bulunmaktadır (http://www.thorne.com/pdf/journal/3-2/quercetin_monograph.pdf, 2006, Alternative medicine review).

Tüm flavonoidler, hidroksil (OH) gruplarının bağlandığı 3 halkalı molekül yapısına sahiptir (Şekil 6.2.). Flavonoidler besinlerde glikozit formunda bulunurlar. Yani, merkez halkaya bağlanmış bir şeker (rhamnose, glukoz, galaktoz) molekülüne sahiptirler. Kersetin; rutin, quercetin, isoquercetin ve hyperoside gibi bir aglikondur, yani glikozit formdadır. Kersetin hariç bu moleküllerin hepsi aynı yapıya sahiptir; kersetin'in C halkasındaki hidroksil grubu bu moleküllerde, spesifik bir şeker molekülü ile yer değiştirmiş olarak bulunur (Cody, 1986 and 1988).



Şekil 6.2. Kersetin'in kimyasal yapısı

(http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/que_0219.shtml, 2006)

Kersetin insan dietinde bol olarak bulunmaktadır. Amerika’da günlük besinle alınan kersetin’in 25 mg olduğu tahmin edilmektedir (NTP Technical Report, 1991). Antioksidan özellikleri fenolik bileşiklerin reaktivitesinden kaynaklanmaktadır. Bu yolla serbest radikal türlerini daha az reaktif olan fenoksi radikallere dönüştürmektedirler (Davis *et al.*, 2000).

Kersetin’in hücre büyümesini (Duthie *et al.*, 1997), glikolizisi (Nass-Arden and Breitbart, 1990), laktat dehidrogenaz salınımını (Volk *et al.*, 1997), nitrik oksit üretimini (Soliman and Mazzio, 1998), mRNA indüklenmesini bloke eden metallothionein’i (Conklin *et al.*, 1998) ve makromolekül sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir (Huang *et al.*, 1997).

Kersetin, hücre döngüsünü uygulanan hücrenin tipine bağlı olarak kontrol noktalarında durdurarak (Wei *et al.*, 1994; Hosokawa *et al.*, 1992) ve apoptozisi indükleyerek (Choi *et al.*, 2001; Iwao and Tsukamoto, 1999) malignant tümör hücrelerinin büyümesini inhibe edebilmektedir. Lösemi hücreleri (Kang and Liang, 1997), meme kanseri (Choi *et al.*, 2001), kolon adenokarsinoması (Salucci *et al.*, 2002), prostat kanseri (Kobayashi *et al.*, 2002) ve endometriyal kanser (Kaneuchi *et al.*, 2003) gibi insan kanserlerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Reseptör kinazlar, protein kinaz C, siklin-bağımlı kinazlar (Cdk) ve MEK-ERK sinyal iletim yoluyla etkileşebilmektedir (Ferriola *et al.*, 1989; Casagrande and Darbon 2001; Nguyen *et al.*, 2004).

Kersetin güçlü bir mutajendir (Bjeldanes and Chang, 1977). DNA’ya bağlandığında tek zincir kırıklarına (Fazal *et al.*, 1990), DNA da yeniden düzenlenmelere (Suzuki *et al.*, 1991) ve kromozomal hasara neden olabilmektedir (Ishidate *et al.*, 1988).

Kersetin’in biyolojik etkilerinin; anti-kanser, anti-viral, anti-trombotik, anti-iskemik, anti-inflamatuar, anti-alerjik olduğu, arterosklerozisi ve koroner kalp hastalıklarını önleyici bir etkisinin olduğu, sellüler immüniteyi stimule ettiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Gryglewski *et al.*, 1987; Deschner *et al.*, 1991; Hertog *et al.*, 1993; Formica and Regelson, 1995;).

7. PLATİNYUM BİLEŞİKLERİ

7.1. Cisplatin

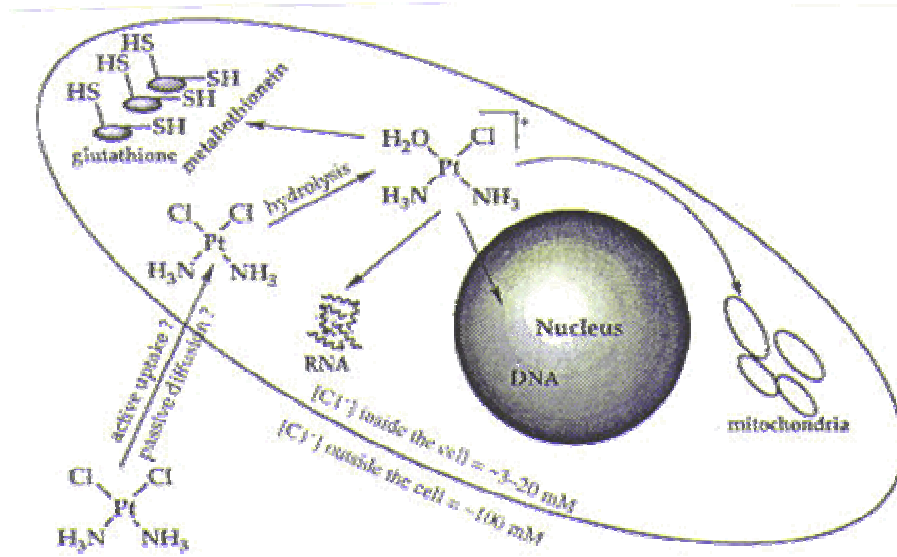
Cisplatin, 20 yıldan fazla zamandır klinikte kullanılan [cis-DDP, *cis*-diamminedichloroplatinum (II)] antineoplastik ilaçların en yaygın ve en etkili olanlarından biridir. Birçok tümöre, özellikle testis ve ovaryum kanserine karşı etki göstermektedir (Fram, 1992). Rosenberg 1968’de keşfettiği bu bileşiğin güçlü bir antiproliferatif ajan olduğunu göstermiştir. Cisplatin’in yapısı ilk olarak 1893’de Alfred Werner tarafından belirlenmiştir. Cisplatin merkezde bir platin atomu, çevresinde iki klorid atomu ve iki amonyum molükülünden oluşmaktadır. *Cis* ve *trans* olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır (Şekil 7.1.).



Şekil 7.1. Cisplatin’in izoformları (Pil *et al.*, 1997).

Cisplatin bifonksiyonel alkileyici ajanlara benzemektedir Kovalent olarak DNA’ya bağlanmakta ve DNA’nın fonksiyonunu bozmakta (Chabner *et al.*, 2001) ve hücreye pasif difüzyon veya aktif transportla alınmaktadır (Pil *et al.*, 1997). Cisplatin hücreye girdikten sonra klorid ligantları su molekülleri ile yer değiştirerek (Go and Adjel, 1999; Nieto, 2003) DNA’da nükleofilik bölgelerle etkileşen pozitif yüklü platinyum komplekslerinin oluşumuna neden olur (McEvoy, 2004). Bu platinyum kompleksleri DNA bazlarına kovalent olarak bağlanarak DNA’da iplik içi ve iplikler arası çapraz bağlanmalarla DNA, RNA ve protein sentezini önlemektedirler (Chabner *et al.*, 2001). Şekil 7.2.’de özetlendiği gibi cisplatinin hücre içinde birçok hedefi vardır: DNA, RNA, metallothionein ve glutatyon gibi sülfür içeren enzimler ile mitokondri sayılabilir. Mitokondrideki DNA’ya etkisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte mitokondriyal DNA’daki hasarın hücre ölümüne katkıda

bulunduğu düşünülmektedir. Sülfür içeren enzimler ile etkileşiminin ise hücrenin cisplatin'e direnci ile ilgili olduğu sanılmaktadır (Pil *et al.*, 1997).

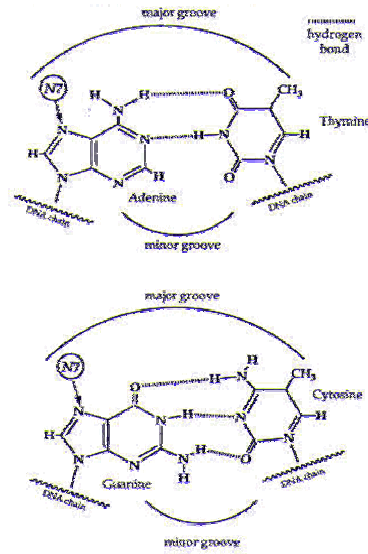


Şekil 7.2. Cisplatin'in hücredeki hedefleri (Pil *et al.*, 1997).

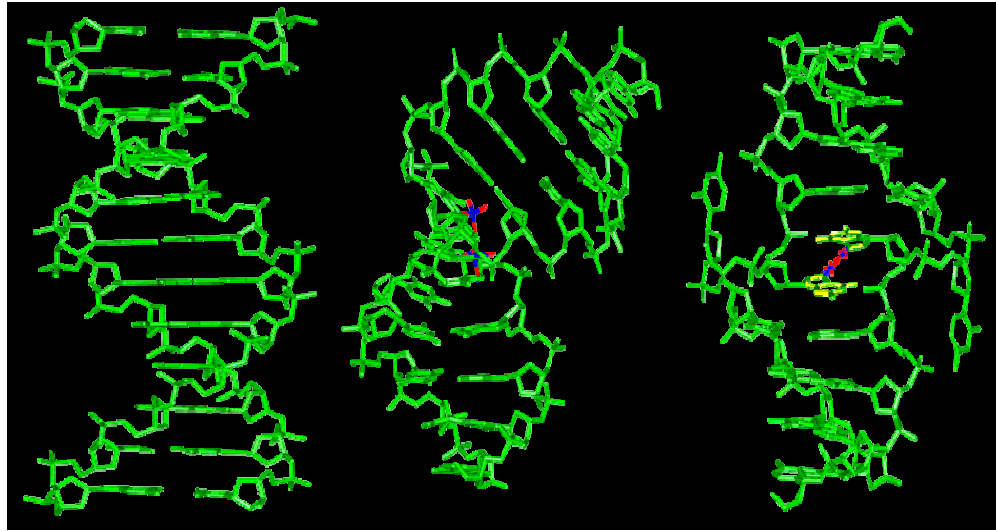
Cisplatin-RNA etkileşiminin iki sebepten ötürü önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Hasar görmüş RNA molekülünün, yeni sentezlenmiş bir molekül ile yer değiştirebiliyor olması cisplatin'in RNA sentezini etkilemediğini göstermektedir. Cisplatinin lethal dozu *in vitro*'da kanser hücrelerine verildiğinde RNA molekülünün sadece küçük bir bölümü (%1 ile %10'u) hasar görmektedir (Pil *et al.*, 1997).

Cisplatin-DNA etkileşimi, cisplatinin DNA baz çiftlerinin nitrojen atomları (özellikle pürinlerin N7 atomları) ile etkileşmesiyle gerçekleşir. Bu nitrojen atomları zincirin dışında kalan ve diğer bazlar ile hidrojen bağı yapmayan atomlardır (Şekil 7.3. ve 7.4.). DNA-cisplatin komplekslerinin veya addukt'larının birçok tipi bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi, cisplatinin klorin ligandlarının DNA iplikçğinde bulunan komşu pürin bazındaki nitrojen atomları ile yer değiştirmesi sonucu oluşan, 1,2-iplik arası (intrastrand) addukt'ıdır. Bu addukt'lar ile ilişkili olan en yaygın pürin bazı guanindir. Addukt oluşumu pürinlerin yapılarının bozulmasına ve DNA heliksinde bükülmelere neden olmaktadır. Geometrisi nedeni ile *trans*-DDP 1,2-iplik arası adduct'lar oluşturamadığından dolayı, kanser hücrelerine etki edememektedir. Ayrıca cisplatinin DNA'ya bağlanmasının DNA tamir

mekanizmalarını, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu etkilediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Pil *et al.*, 1997).



Şekil 7.3. DNA Baz çiftleri ve Pürinlerin N7 atomu (Pil *et al.*, 1997)



Şekil 7.4. DNA baz çiftleri cisplatin pürin bazları (adenin, guanin)'nın N7 atomuyla etkileşimi. Jamieson and Lippard, *Chem Rev*, 99, 2467 (1999); Coste, *et al*, *Nuc Acids Res*, 27, 1837 (1999).

Cisplatin'in sitotoksik etkisinin kesip-çıkarma tamir sisteminin hatasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hücre DNA hasarı, bu hasarı tanıyan proteinlerle belirlemektedir. Bu proteinlerin tümü yüksek değişkenlik gösteren grup (HMG)

olarak isimlendirilen genel bir parçaya sahiptir ve bu sınıftaki proteinler HMG-domain proteinleri olarak adlandırılırlar. Cisplatin'e karşı HMG-domain proteinleri kodlayan genlerden yoksun hücrelerin bu genleri içeren genlerden daha az duyarlı olduğu bulunmuştur. HMG-domain proteinlerin bu özelliğinin (cisplatinin sitotoksik etkisinde) önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Pil *et al.*, 1997).

Cisplatin, ileri evre mesane karsinomu, adrenal korteks karsinomu, kafa- boyun karsinomu, meme kanseri ve akciğer kanserinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında, cisplatinin T hücre aktivitesinin inhibisyonu sonucu immünbaskılayıcı etkisinin olduğu bilinmektedir (Kouchi *et al.*, 1996; Sfakakis *et al.*, 1996; Riesbeck, 1999).

8. MEZOTELYOMA

Malignant mezotelyoma (MM) akciğer (plevra) (% 90), abdominal organlar [periton (% 6-10)] ve kalp (perikard) boşluklarının düzensiz fibroelastik bağ dokusunun sağlamlaştırdığı yüzeysel mezotelyum tabakasından (seröz yüzey) köken alan bir tümördür. Nadir olarak testiste tunika vaginalisden de gelişebilmektedir (<http://www.mesothelioma-tr.org/saglik/mezotanim.php>, 2006, Mezotelyoma Ulusal Kurulu). Histolojik olarak MM; epiteloid, sarkomatoid ve bifazik olmak üzere üç tipten oluşur. Mezotelyomaların % 50-70'i birinci; % 7-20'si ikinci; % 20-35'i üçüncü tiptedir ve tümünün tedavi seçenekleri aynıdır (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006).

8.1. Mezotelyoma Tipleri

Mezotelyoma; plevral, peritonal, bening ve perikardiyal olmak üzere dört tipte sınıflandırılır.

8.1.1. *Plevral Mezotelyoma*

Plevral mezotelyoma göğüs boşluğu içinde bazende akciğer de görülen mezotelyomadır. Herhangi bir organa metastaz edebilir. Bilinen en genel semptomu göğüste sürekli ağrıdır (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006, Mesothelioma Information). Plevral efüzyon, hastaların % 95'inde vardır. Sonrasında tümör büyümesi genellikle plevral boşluğun tamamen yok olması ve akciğeri kaplamasıyla sonuçlanır. Öksürük, kilo kaybı ve ateş genel belirtidir (Chahinian, 1978). Hastalığın ilerlemesini gösteren tek test göğüs tomografisi (CT-scan)'dir (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006). Ortalama sağ-kalım semptomların görülmesinden sonra yaklaşık 10-17 ay iken teşhisten sonra 9-13 aydır (Chahinian *et al.*, 1982; Hillerdal, 1982; Ruffie *et al.*, 1989).

8.1.2. *Peritoneal Mezotelyoma*

Peritoneal mezotelyoma karın boşluğunu kapsayan ve karaciğer, dalak veya bağırsağa doğru ilerleyen bir hastalıktır. Plevral mezotelyomada olduğu gibi ağrı genel şikayetlerden biridir. Abdominal boşlukta sıvı biriktiği için abdomen genişlemiş olarak görünmektedir (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006, Mesothelioma Information). Hastalarda kusma, mide bulantısı, bağırsak blokajı, abdominal ve pelvik kütleleri, ayaklarda ödem, ateş, hernia (fitik), hidrosel (skrotumda su toplaması) olabilmektedir. Laparotomi (karın yarma ameliyatı) veya peritoneoskopi ile direkt biopsi en iyi diagnostik prosedür olmaktadır. Ultrasonografi veya CT, sıvı ve tümör kütlelerini görüntülemek ve hastalığın seyrini takip etmek için kullanılmaktadır (Yeh and Chahinian, 1980). Ortalama sağ kalım semptomların görülmesinden itibaren yaklaşık 10 ay ve teşhisten sonra 7 aydır (Chahinian *et al.*, 1982).

8.1.3. *Benign Mezotelyoma*

Benign mezotelyoma'lar genellikle asbestle ilişkilendirilmemektedir. Plevranın fibröz tümörü bir neoplazmadır ve benign fibröz plevral mezotelyoma'lara işaret etmektedir. Viseral ve parietal plevranın fibröz tümörleri asbest ile ilişkili değildir. Plevral efüzyon (akıntı) istisnadır. Çok nadir olarak malignant form görülmesine rağmen çoğu benign'dir. Hiponatremia, hipoglisemi ve anti-diüretik hormonun anormal salgılanmasına neden olabilmektedir (Chahinian, 1978). Mikroskopik olarak bu tümörler değişken bir kollajen matrix ile sınırlandırılmış fibromalardır (Belani *et al.*, 1999). Çoğu hasta cerrahi müdahale ile idare edilebilmekte ancak, kist büyüklüğünü kontrol altına almak ve lokal semptomları rahatlatmak için kullanılan hormonal tedavinin yeniden kist oluşumu riskini arttırdığı rapor edilmiştir (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006, Mesothelioma Information).

8.1.4. Perikardiyal Mezotelyoma

Perikardiyum mezotelyoması çok nadir görünen bir kardiyak kanseridir. Yüksek derecede ölümcüldür. Kütle genellikle ekokardiyografi (EKG) ile geç aşamada fark edilmektedir (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006, Mesothelioma Information). Radikal ameliyat sadece bir yere lokalize olmuş mezotelyomanın tedavisinde kullanılabilmektedir. İlerlemiş perikardiyal mezotelyomanın tedavisi genellikle geçici bir çaredir. Çünkü; tümör radyoterapi ve kemoterapiye direçlidir. Ortalama sağ kalım, semptomların görülmesinden sonra 6 aydır (<http://www.cancer.gov/publucation>, 2006). Ovaryum ve scrotum (testis torbası) mezotelyoması da literatürde rapor edilmiştir.

8.2. Mezotelyoma İçin Risk Faktörleri

Mezotelyoma'ya neden olan risk faktörleri arasında; asbest, zeolit, radyasyon ve Simian virüs 40'ı sayılmaktadır (Stermann and Albelda, 2005).

8.2.1. Asbest

Asbest, ısıya, sürtünme ve alkali ortama karşı dayanıklı, yüksek gerilme direncine sahip, lifsel, esnek (kolay bükülüp şekil verilebilen) ve ticari önemi olan bir silikat mineralidir. Endüstride “amyant” olarak da bilinen asbestin dünyada sanılandan çok daha geniş kullanım alanı mevcuttur: Isıtma boruları, izolasyon, su borusu kaplamaları, seramik musluk tutturucuları, zemin duvar ve tavanlarda yangın emniyeti için, kanalizasyon boruları, otomobil ve motosiklet fren balatalarında, binalarda çelik yapı üyeleri için yangın emniyetinde vb. gibi bir çok alanda kullanılmaktadır (Şenyiğit ve ark., 2004).

Doğada farklı özelliklere sahip 2 grup asbest bulunmaktadır; serpantin ve amphibol (Ross, 1981; Gaines *et al.*, 1997; Hartgerink *et al.*, 2001). Bunlar tablo 8.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 8.1. Doğada bulunan asbest türleri (Şenyiğit ve ark., 2004)

1.Serpantin asbest	2.Amphibol asbest
Krizotil: $Mg [(OH)_4 Si_2 O_5]_2$ (Beyaz asbest)	Krozidolit: $Na_2Fe_5 [(OH) Si_4 O_{11}]_2$ (Mavi asbest)
	Amozit: $MgFe_6 [(OH) Si_4 O_{11}]_2$ (Kahverengi asbest)
	Antofilit: $(Mg, Fe)_7 [(OH) Si_4 O_{11}]_2$
	Aktinolit: $Ca_2 (Mg, Fe)_5 [(OH) Si_4 O_{11}]_2$
	Tremolit: $Ca_2 (Mg, Fe)_5 [(OH) Si_4 O_{11}]_2$

Tabloda belirtilen 6 asbest tipinden krizotil, krozidolit ve amozit ticari olarak geniş kullanım alanına sahiptir (Şenyiğit ve ark., 2004). Beyaz asbest endüstride kullanılan asbest türü olup, diğer asbest türlerinin çıkarılması ve kullanılması yasaklanmıştır. Malignant Plevral Mezotelyoma (MPM) ile en çok ilişkili olan asbest türü “amphibole” grubu asbesttir (<http://www.mesothelioma-tr.org/saglik.php>, 2006, Mezotelyoma Ulusal Kurulu).

Asbestin çevresel veya mesleki olarak solunması, pulmoner fibrosis (asbestosis), akciğer kanseri, plevra veya peritonda mezotelyoma ve plevral değişikliklere (kalınlaşma, plak, effüzyon) yol açmaktadır (Baris *et al.*, 1979, Niklinski *et al.*, 2004).

Türkiye'de asbestle muamele çevresel olup, Orta ve Güneydoğu Anadolu'da önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Türkiye'de ayrıca Kapadokya bölgesinde 3 köyde (Tuzköy, Karain ve Sarıhıdır köylerinde) diğer asbest olmayan bir mineralin MPM'ye neden olduğu bulunmuştur. Bu mineral fibröz "zeolite" (erionit) olarak adlandırılmaktadır (<http://www.mesothelioma-tr.org/saglik.php>, 2006).

8.2.2. Zeolit

Erionit olarak da bilinen bu mineral kimyasal olarak asbest ile ilişkilidir. İki asır boyunca volkanik kayaların yapısında yer alan ve mineral gözüyle bakılan zeolit'ler, 1950'den sonra saptanmaya başlanmış ve hemen hemen tüm kıtalarda

yaygın olduğu görülmüştür (<http://www.enlimining.net>, 2004). Değişik ülkelerde 1960'lı yıllardan sonra ticari olarak üretilip pazarlanmaya başlayan zeolit'ler, ülkemizde ilk defa 1971 yılında tespit edilmiştir. Araştırma grupları tarafından belirlenen doğal zeolit minerali sayısı 40 olarak bildirilmiştir. Bunların içinde en bilinenleri; analsim, şabazit, klinoptilolit, eriyonit, ferrierite, heulandite, mordenit, stilbit ve filipsittir (Doğan, 2003).

Türkiye'nin Anadolu bölgesinin topraklarında yaygındır (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006). Zeolit en güçlü karsinojen olarak kabul edilmekte olup, Kapadokya yöresindeki köylerde evlerin yapıldığı tuf kayaları ile evlerin dayanağı ve kiler olarak kullanılan mağaraların duvarlarında bulunmuştur (<http://www.mesothelioma-tr.org/saglik.php>, 2006).

8.2.3. Radyasyon

Thorium dioksidi maruz kalımı takiben, çok az da olsa, plevral ve peritoneal mezotelyomanın geliştiği rapor edilmiştir. Bu materyal geçmişte belirli X-ray testleri için kullanılmaktaydı ancak kansere neden olduğu belirtildiği için birkaç yıldır kullanılmamaktadır (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006).

8.2.4. Simian Virus 40 (SV40)

Poliyoma virüsleri küçük çift iplikçikli DNA virüsleridir. Tümör baskılayıcı genleri bloklayan SV40, insan ve kemirgen hücreleri için potansiyel bir onkogenik virüsdür. İnsanlar, SV40'nin doğal konakları değildir. Ancak, 1955 ve 1963 yılları arasında kontamine olmuş polio aşılarının insanlara verilmesi ile insanlar SV40 ile enfekte olduğu belirtilmiştir (Melnick and Stingbaugh, 1962).

SV40 DNA dizisi beyin ve kemik tümörleri, lenfomalar ve MM'da bulunmaktadır (Bergsagel *et al.*, 1992). SV40 MM'ye neden olmada kofaktör olarak gösterilmektedir (Shivapurkar *et al.*, 1999, Gazdar and Carbone, 2003). SV40 enfeksiyonu insan hücre hatlarında yarı geçirgendir ve insan mezotelyomalarının

%60'ı SV40 DNA'sı içermektedir (Testa *et al.*, 1998, Bocchetta *et al.*, 2000). Mikrodiseksiyon deneylerine göre, SV40'ın malignant hücrede ve bazen de reaktif mezoteliyal hücrelerde olduğu bulunmuştur. Ancak normal komşu dokular veya akciğer kanserlerinde tespit edilmemiştir (Shivapurkar *et al.*, 1999). Sonuç olarak, mezotelyomanın patogeneğinde SV40'ın herhangi bir rolünün olup olmadığı açık değildir ve tam olarak kanıtlanmamıştır (Robinson *et al.*, 2005).

8.3. Epidemiyoloji

MM dünya çapında öldürücü bir hastalıktır. İlk kez 1960 yılında, Wagner ve arkadaşları tarafından Güney Afrika'da asbest teması ile bağlantılı olarak oluşabileceği bildirilmiş (Wagner *et al.*, 1960) ve asbest teması ile mezotelyoma oluşması arasındaki ilişki daha sonra birçok çalışmada gösterilmiştir (http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006, Mesothelioma Information).

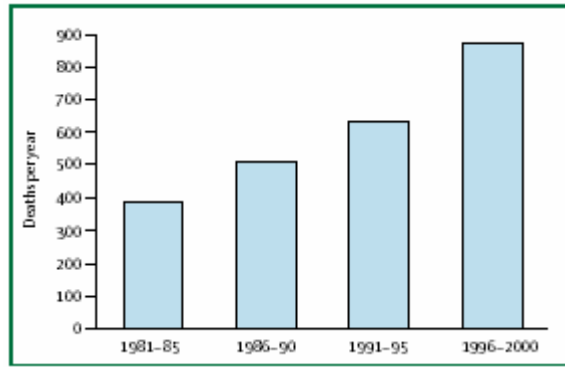
Asbest bulunduran bölgelerde yaşayanlarda her 100 ölümden birinden asbest sorumlu iken asbest bulundurmeyen bölgelerde bu oran 10.000'de 1 ölüme kadar düşmektedir (McDonald, 1985). İngiltere'de yapılan bir çalışmada, mesleki ortamda asbeste maruz kalmanın tüm mezotelyoma olgularının %90'ını oluşturduğu bildirilmiştir (Yates *et al.*, 1997). Çalıştıkları ortamda asbeste maruz kalan her 10 işçiden birinin mezotelyomaya yakalanarak hayatını kaybettiği bildirilmiştir (Peto *et al.*, 1982).

Batı ülkelerinde, asbest madenlerinde çalışanlar veya bu madenlerin çevresinde yaşayanlarda çevresel temas sonucu gelişen mezotelyoma; Türkiye, Kıbrıs, Yunanistan, Yeni Kaledonya, Afganistan, Korsika, Bulgaristan gibi ülkelerde asbest ile karışmış toprağın (beyaz toprak) ev işlerinde (domestik kullanım) kullanılması ile ikincil temas sonucunda gelişmektedir (<http://www.mesothelioma-tr.org/saglik.php>, 2006, Mezotelyoma Ulusal Kurulu).

Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) raporlarına (De Klerk and Musk, 2002; Berry *et al.*, 2004) göre mezotelyoma oranları farklı ülkelerde cinsiyet ve yaşanan

bölgeye göre büyük farklılıklar göstermektedir. Hemen hemen tüm ülkelerde erkeklerin oranı kadınlardan çok daha yüksek iken endüstriyelleşmiş ülkelerdeki oran; asbestos kullanımı ve üretimine bağlı olarak, endüstriyelleşmemiş olanlardan çok daha yüksektir(De Klerk and Musk, 2002).

İkinci Dünya Savaşından sonraki yıllarda endüstriyelleşme ile birlikte asbestos ve çeşitlerine olan talebin artması mezotelyomanın giderek yaygınlaşmasına neden olmuştur (De Klerk and Musk, 2002). 1981-2000 yılları arasında mezotelyomadan ölüm oranları Şekil 8.1.'de gösterilmektedir. Bu yaygınlık birden bire oluşmamıştır, çünkü maruz kalma ve hastalığın oluşması arasında uzun bir inkübasyon periyodu vardır. İnkübasyon periyodu 15 yıl civarında tanımlansa da bu oluşum tipik olarak 30 yıldan daha uzundur (Berry *et al.*, 2004).



Şekil 8.1. Mezotelyoma Ölüm Oranları. [UK Health and Safety Executive. (<http://www.hse.gov.uk/statistics/causdis/area8100.pdf>, 2006)]

MM belirgin olarak 2 ayrı yaş aralığında görülmektedir: Özellikle İç Anadolu bölgesinde olduğu gibi doğumundan itibaren erionit lifleri olan bölgelerde 20-30 yaşları arasında hastalık ortaya çıkmakta, mesleki olarak asbest liflerine maruz kalanlarda en az 20-30 yıllık oluşum süresi gözlenmektedir ve ancak 60'lı yaşlarda hastalık saptanmaktadır (<http://www.goguscerrahisi.com/mak/Mak032.html>, 2006).

8.4. Oluşum Mekanizması ve Karsinogenez

Mezotelyomanın oluşum mekanizması ile ilgili çalışmalar, daha çok asbestle ilgili olarak yapılmıştır. Bu etmene ilişkin ortaya çıkarılan mekanizmaların diğer etmenlere bağlı olan mezotelyomlarda da benzer olduğuna dair bulgular yayınlanmıştır(<http://www.goguscerrahisi.com/mak/Mak032.html>, 2006).

Asbest'in kanser için bir başlatıcı ve/veya bir yükseltici (promotör) olduğu düşünülmektedir (Barrett *et al.*, 1989). Tümör-başlatıcı model, asbest ve sigara içenler arasındaki sinerjik etki ve akciğer kanserini açıklayan iyi bir modeldir. Asbeste maruz kalmayan ve sigara içmeyenlerle, asbeste maruz kalan sigara içmeyenler karşılaştırıldığında; asbeste maruz kalanlarda akciğer kanserinden ölüm oranı 5 kat daha fazla iken; asbeste maruz kalmayan ve sigara içenlerde 11 kat, asbeste maruz kalan ve sigara içenlerde ise bu kanserden ölüm oranı 53 kat daha fazladır (Selikof and Hammond, 1979). Benzer bir etki trake epitel hücrelerinin çeşitli dozlarda polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve asbeste maruz bırakılmasıyla deneysel olarak da gösterilmiştir. Bununla beraber bu değişiklikleri asbest tek başına da gerçekleştirebilmektedir. Asbeste maruz kalan ve sigara içenlerden çok daha az oranda olmasına rağmen asbeste maruz kalan ve sigara içmeyenlerde de akciğer kanseri görülür (Barrett *et al.*, 1989).

Hedef dokularda asbestin promotör etkisinin yarattığı diğer değişiklikler; hiperplazi, metaplazi, DNA sentezi ve artmış serbest oksijen radikalleri üretimidir. Ayrıca diaçilgliserol'ün aktivasyonu, protein kinaz C ve ornitin dekarboksilaz'ın klasik tümör promotörlerinin (forbol ester gibi) benzer bir yol izlediği gösterilmiştir (Marsh and Mossman, 1988; Barrett *et al.*, 1989; Mossman *et al.*, 1990).

Asbest bilinen diğer karsinogenlerle etkileşmeden de insanlarda mezotelyoma oluşturabilmektedir. Asbestin, kemirgenlerin trake veya sölomik boşluklarında (plevra, periton ve perikard boşluğu) mezotelyoma oluşturduğu gösterilmiştir (Jaurand *et al.*, 1987; Barrett *et al.*, 1989; Mossman and Gee, 1989). Asbest tamamen mutajenik olmamasına rağmen kültürde normal memeli hücrelerinin büyüme özelliklerinde, fiberin büyüklüğüne bağlı olarak, transformasyon, ölümsüzlük ve

kromozomal mutasyonlar (anöploidi) gibi kalıtsal değişikliklere neden olabilir (Barrett *et al.*, 1989; Mossman *et al.*, 1990). Bu değişiklikler asbest fiberlerinin hücrenin mitotik prosesine fiziksel olarak müdahale etmesi veya aktif oksijen türlerinin oluşması gibi mekanizmalarla olur (Mossman *et al.*, 1990). Normal insan mezoteliyal hücrelerinin asbest fiberlerini fagosite ettikleri ve *in vitro* da asbest sitotoksitesine mezotelyoma hücreleri normal insan bronşiyal epitel hücrelerinden 10 kat, fibroblastlardan ise 100 kat daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Lechner *et al.*, 1985).

In vitro da asbeste maruz kalımı takiben, mezoteliyal hücreler klonal orijini belirtici kromozomal hatalar göstermektedir (Lechner *et al.*, 1985). Örneğin; DNA iplik kırıkları (Jaurand *et al.*, 1986; Libbus *et al.*, 1989). İnsan mezotelyomalarının karyotipik analizlerinde, 1, 2, 3, 6, 7, 9, 11 ve 22. kromozomları kapsayan anormallikler gözlenmiştir (Gibas *et al.*, 1986; Popescu *et al.*, 1988; Barrett *et al.*, 1989; Mossman *et al.*, 1990). Rastgele olmayan genel değişiklikler; kromozom 3'ün kısa kolunun p14 ile 21 bölgeleri arasının delesyonudur (Popescu *et al.*, 1988). Bu bulgu akciğer kanserinde de delesyonlar ve kromozom 3'ün kısa kolunun heterozigotluğunu kaybetmesinin gösterilmiş olmasından ötürü ilgi çekicidir (Whang-Peng, 1989). Mezotelyoma hastalarında kromozomal hatalar ve akciğeri etkileyen asbest fiberinin ağırlığı arasında önemli bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca hayatta kalım ve kromozom 7'nin kısa kolunun kopya sayıları arasında önemli bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Tiainen *et al.*, 1989).

Normal insan mezoteliyal hücrelerinin asbeste maruz bırakılmasının mezotelyoma oluşumuna neden olduğu *in vitro* çalışmalarda belirtilmiştir (Lechner *et al.*, 1985; Mossman *et al.*, 1990). SV40 içeren bir plazmid ile hücreleri transfekte ederek oluşturulan malignant tranformasyon sonucunda, hücrelere ölümsüzlük kazandırıldığı; EJ-*ras* (p21 *ras*'ın GTP-bağlı izoformu) geni ile transfekte edildiğinde ise tümör oluştuğu gözlenmiştir (Reddel *et al.*, 1989). Bununla beraber asbeste maruz kalım tümör oluşumu için yeterli olmamıştır. Bunun nedeni, *in vivo*'yu etkileyen durum ve etkileşimlerin *in vitro* da gerçekleştirilmesinin zor olmasıdır (Kufe *et al.*, 2003).

İnsan mezotelyoma hücrelerinde transforme edici genler tespit edilmiş (Lamb *et al.*, 1988; Barrett *et al.*, 1989) fakat bu genlerin, asbestin neden olduğu Syrian hamster tümör hücre hatlarının % 50'sinde aktive edilmiş olduğu bulunan, *ras* gen ailesi (Barrett *et al.*, 1989) veya *myc*, *myb*, *neu*, ve *fos* onkogenleri ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (Foulke *et al.*, 1991). 17. kromozomun kısa koluna lokalize olmuş *p53* geni için heterozigotluğun kaybı (Lost of heterozygoty-LOH), dört mezotelyoma hücre hattının üçünde gözlenmiştir (Cote *et al.*, 1991). Diğer bir çalışmada ise, MM'lı 17 hastadan alınan 20 hücre hattında, *p53* anormallikleri sadece 3 hücre hattında bulunmuştur (Metcalf *et al.*, 1992). Wilms tümör baskılayıcı geni (*WT-1*) transkriptlerinin normal insan mezoteliyal hücrelerinde ve 7 insan mezotelyoma hücre hattının 7'sinde de eksprese edildiği bulunmuştur (Walker *et al.*, 1994). Diğer bir tümör baskılayıcı gen olan *p16*'daki değişikliklerin mezotelyoma hücre hatlarının % 85'inde ve öncelikli tümör türlerinin % 22'sinde homolog delesyonlar olduğu tanımlanmıştır (Cheng *et al.*, 1994). Asbest fiberleri, kromozomal DNA ile ilişkili olan, plazmid DNA'ları gibi eksojen nükleik asitlere bağlanarak hücreleri transfekte edebilmekte ve bu suretle gen ekspresyonunu değiştirebilmektedir (Apel *et al.*, 1988).

Mezotelyoma'nın oluşması ve hücre bölünmesinde büyüme faktörlerinin rolü hakkındaki bilgiler her geçen gün artmaktadır. Özellikle, platelerlerden türevlenmiş büyüme faktörlerinin (PDGF) rolü vurgulanmaktadır. Mezotelyoma hücreleri, normal insan mezoteliyal hücrelerinden daha fazla oranda PDGF- α ve PDGF- β zincirlerine ait gen anlatımına aracılık eden mRNA'yı kodlar. Bu durum transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) için de aynıdır. Ayrıca PDGF- α 'nın gen düzeyinde anlatımı PDGF- β 'dan daha düşüktür. Buda PDGF'nin mezotelyoma için otokrin bir büyüme faktörü olduğunu gösterir. PDGF- α ve PDGF- β nin genleri (*c-sis*; PDGF- β geni ile hemen hemen aynı olan) 7. kromozomun p21 ile p22 ve 22q13.1'ine lokalize olmuştur. Bu kromozomların görünen anormallikleri mezotelyomada kararlı değildir. (Gerwin *et al.*, 1987; Versnel *et al.*, 1988). Bu bulgular mezotelyoma hastalarında genel olarak gözlenen kandaki platelet sayısının artması durumunu (trombositoz'u) açıklamaktadır (Chahinian *et al.*, 1982 and 1984; Ruffie *et al.*, 1989). Yapılan çalışmalarda mezotelyoma hücre hatlarında epidermal büyüme faktörü (EGF)'nün ekspresyonunun artmamış olduğu görülmüştür (Gabrielson *et al.*, 1987). Normal

insan mezoteliyal ve insan mezotelyoma hücre hatlarının her ikisinde de insülinin yapısına benzeyen büyüme faktörü-1'in (IGF-1), IGF-bağlayıcı protein 3 ve IGF-1 reseptör mRNA'sına ait genin anlatım yaptığı gösterilmiştir. Bu durum da; IGF-1'in otokrin bir büyüme faktörü olduğunu ispat etmektedir (Lee *et al.*, 1993).

8.5. Tedavi

MM'nin tedavisi; cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, gen terapi ve fotodinamik terapi ile yapılmaktadır.

8.5.1. Cerrahi Müdahale

MPM'in cerrahi müdahalesinde üç prosedür kullanılmaktadır: plörodez (göğüs boşluğu plevra arasında sıvı birikimini önlemek için kimyasal irritasyon veya cerrahi travma ile iki tabakanın birleştirilmesi (<http://www.tipterimleri.com/ara.asp>, 2006))'li thorascopy, pleuroctemy/decortication (P/D; bir organın dışını kaplayan zarın veya organın bir kısmının çıkarılması (<http://www.tipterimleri.com/ara.asp>, 2006)), ekstraplevral pneumonectomy (EPP; cerrahi müdahale ile akciğerin birinin alınması (<http://www.tipterimleri.com/ara.asp>, 2006)) (Pistolesi and Rusthoven, 2005).

8.5.2. Kemoterapi

Mezotelyoma için 20 yılı aşkın bir zamandır standart bir kemoterapi rejimi kurulamamıştır (Stermann and Albelda, 2005). Mezotelyoma çoğu kemoterapötik ajana dirençlidir. Bunun multidrug direnç proteini (MRP)'nin ve P-glikoproteine nazaran γ -glutamilsistein sentetaz'ın aşırı ekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Ogretmen *et al.*, 1998). En fazla test edilen ajanlar; antrasiklinler (doxorubicin , epirubicin), platin analogları (cisplatin, carboplatin) (Kufe *et al.*, 2003) ve antifolatlar (yüksek doz methotrexate, MTX) dır (Baas, 2005). Tablo 8.2.'de tek ajanlı kemoterapi cevap oranları verilmiştir (Baas, 2002).

Tablo 8.2. Malignant Mezotelyomada Bazı Antineoplastik Ajanların Aktivitesi
(Pistolesi and Rusthoven, 2004)

İlaç	Hasta Sayısı	% Cevap Oranı	Kaynaklar
Doxorubicin	51	14	Lerner <i>et al.</i> , 1983
Epirubicin	21	5	Magri <i>et al.</i> , 1991
Mitomycin C	19	21	Bajorin <i>et al.</i> , 1987
Cisplatin			
Her 21 günde bir	35	14	Zidar <i>et al.</i> , 1988
Haftalık	14	36	Planting <i>et al.</i> , 1994
Carboplatin	31	16	Raghavan <i>et al.</i> , 1990
5-fluorouracil	20	4	Harvey <i>et al.</i> , 1984
Methotrexate	60	37	Solheim <i>et al.</i> , 1992
Paclitaxel	25	0	Meerbeek <i>et al.</i> , 1996
Docetaxel	30	10	Vorobiof <i>et al.</i> , 2002
Vinorelbin	29	24	Steele <i>et al.</i> , 2000
Gemcitabine	27	7	Meerbeek <i>et al.</i> , 1999
Ifosfamide	26	4	Andersen <i>et al.</i> , 1999
Temozolomide	27	4	Meerbeek <i>et al.</i> , 2002
Pemetrexed	64	16	Scogliotti <i>et al.</i> , 2003

Tek ajan ile gerçekleştirilen kemoterapi de çok az oranda tam cevap gözlenmiştir, genelde tek ajan cevap oranları % 20'den azdır (Lerner *et al.*, 1983; Magri *et al.*, 1991; Baas *et al.*, 2000; Kosty *et al.*, 2001). Ortalama hayatta kalma genellikle tedaviden sonra 6 ile 9 ay arasında rapor edilmiştir (Kufe *et al.*, 2003). Tek ajanlı kemoterapi çalışmaları kombinasyon kemoterapi için temel teşkil etmektedir (Baas, 2005).

Kombinasyon kemoterapi rejimleri MPM de (Tablo 8.3.) yaygın olarak değerlendirilmiştir (Baas, 2002). Bu rejimlerin çoğu antrasiklin, platin veya her ikisi temellidir. Çok az istisna ile cevap oranları $\leq$ % 20 dir ve ortalama hayatta kalma 6 ile 12 ay arasındadır (Pistolesi and Rusthoven, 2005).

Tablo 8.3. Mezotelyomada Çalışılan Önemli Kombinasyon Kemoterapi Ajanları (Pistolesi and Rusthoven , 2004)

İlaç	Hasta Sayısı	%Cevap Oranı	Ort. Hayatta Kalma Süresi (Ay)
Anthracycline temelli kombinasyonlar			
Doxorubicin-cyclophosphamide	36	11	8
Doxorubicin-cisplatin	59	19	8.8,10
Doxorubicin- cisplatin-mitomycin C	24	21	11
Epirubicin-interleukin-2	21	5	MD
Platin temelli kombinasyonlar			
Cisplatin-irinotecan	15	27	7
Cisplatin-vinblastine	20	25	5-19*
Cisplatin-mitomycin C	35	26	7.7
Cisplatin-mitomycin C-etoposide-fluorouracil	45	38	16
	25	24	9.5 ^ψ
Cisplatin (haftalık)-etoposide	21	48	10
Cisplatin-gemcitabine (her 4 gün)	32	15	10
Cisplatin-gemcitabine (her 3 gün)	456	41	12.1
Cisplatin-pemetrexed	27	32	14.8
Carboplatin-pemetrexed			

MD: Mevcut değil.

* Tüm grup için ortalama hayatta kalım zamanı mevcut değil.

ψ Yaklaşık

Kombinasyonda kullanılan diğer ajanlar ile oluşturulan aktivite raporları yüksek oranda değişkendir. Örneğin; cevap oranları gemcitabine ve cisplatin kombinasyonunda % 48 oranında rapor edilmiştir (Bryne *et al.*, 1999). Ancak benzer dizayn edilen bir denemede gemcitabine'in daha yüksek dozu ile yapılan duplike denemede cevap oranı sadece % 16 bulunmuştur (Van Haarst *et al.*, 2002).

Kemoterapi ajanlarının kombinasyon halinde kullanımının, tek ilaç tedavisine göre de üstünlüğü gösterilememiştir. Bir faz II çalışmada, cisplatin+doksorubisin'e yanıt % 13 iken, cisplatin+mitomisin'e yanıt % 28 olarak bildirilmiştir, ancak, iki

ayrı tedavi rejiminin verildiği gruplar arasında anlamlı bir hayatta kalım farkı bulunamamıştır (Chahnian et al., 1993) Daha yeni bir tedavi uygulaması ile, Byrne ve çalışma arkadaşları, bir faz II çalışmada, 21 hastada cisplatin ve gemesitabin'e yanıtı % 48 olarak bulmuşlardır (Byrne et al.,1999). Daha etkili olabilecek yeni ilaçlar ile, hem tek başına kullanım, hem de, cerrahi tedavi öncesi ve sonrası kullanımlar için çalışmalar sürdürülmektedir. Anti-angiogenik (yeni damarlanmaları önleyen) tedaviler de çalışma aşamalarında (http: // www. goguscerrahisi. com/ mak/ Mak032. html, 2006).

Sonuç olarak, daha yeni ve eski ajanların kombinasyonları test edilmesine rağmen, şu anki pazarlanan ajanlar ile mezotelyomanın tedavisi yetersiz kalmaktadır (Pistolesi and Rusthoven, 2005).

8.5.3. Radyoterapi

Lokal ameliyat sonrası radyoterapi yara bölgesindeki tümör hücrelerinin kaynağını kurutmada etkilidir (Baldini, 2004). Son zamanlarda geliştirilen ve muhtemelen en başarılı olan teknik; yoğunluğu modüle edilmiş radyoterapidir. Bu teknik, mezotelyomalı hastalarda EPP'den sonra uygulanmaktadır, radyasyon alanları ameliyat boyunca yerleştirilen markırlarla belirlenmektedir. EPP ile yoğunluğu modüle edilmiş radyoterapinin birlikte kullanımı, lokal hastalığı kontrol etmekte büyük oranda başarı sağlamıştır (Ahamad *et al.*, 2003).

8.5.4. İmmünoterapi

İnterferonlar, mezotelyomada, hem diferansiyasyonu kolaylaştıran hem de anti-proliferatif etkileri olduğu bilinen maddelerdir. Yapılan bir çalışmada, İnterferon- γ verilen 89 hastadan 8'inde tam yanıt, 9'unda parsiyel (kısmi) yanıt saptanmış, tüm yanıt oranı %20 olarak bulunmuştur. I. Evre hastalarında bu yanıt oranı %45 olarak bulunmuştur (Boutin et al., 1994). IL-2 tabanlı immünoterapiler ise, yoğun olarak araştırılan immünoterapi protokolleridir. Bu konuda yapılan en geniş araştırma Astoul ve çalışma arkadaşları tarafından 22 hastada intraplevral IL-2 kullanımının sonuçlarını bildiren çalışmadır. Bu çalışmada, 11 hastada kısmi, 1 olguda tam yanıt

saptanmıştır. 2 yıllık sağkalım %58, 3 yıllık sağkalım ise %41 gibi oldukça yüksek oranlarda bildirilmiştir (Astoul et al., 1998).

8.5.5. *Gen Terapi*

MM'da genel olarak kabul gören bir tedavi standardı halen yoktur. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları kendi başına yetersiz sonuçlar vermiştir. Kombine tedaviler ise ancak genç yaş, sınırlı hastalık ve epitelyal tip hücre yapısına sahip olan hastalarda sağkalıma katkı sağlamaktadır. Mezotelyomada birçok gen tedavi yaklaşımının faz çalışmaları yapılmaktadır. Ancak gen tedavisinin kendi içindeki zorlukların yanında, bu tümörün doku yapısından kaynaklanan dezavantajlara rağmen, hastalığın yerleşim ve gelişim seyrine göre tümöre kolay ulaşılması şansı ve uzak metastazının az olmasından dolayı, mezotelyomada gen tedavisinin uygulanması yönünde önemli avantajlar da vardır. MM hastalarında klasik tedaviyle yalnızca küçük bir hasta grubunda sonuç alındığı düşünülürse bu hastalık için yeni tedavilerin bulunması ihtiyacı kaçınılmaz olarak açıktır. MM'nin çevre koşulları nedeniyle ülkemizde sık görülmesinden dolayı da yeni tedavi yöntemlerinin araştırılması önem taşımaktadır (Özvaran, 2004).

8.5.6. *Fotodinamik Terapi*

Kanser tedavisi için PDT'nin ilk aşamasında, bir ışığa hassas ajan kan dolaşımına enjekte edilmektedir. Bu ajan vücutta ki tüm hücreler tarafından absorbe edilmekte, ancak kanser hücrelerinde normal hücrelerden daha fazla kalmaktadır. Enjeksiyonu takiben yaklaşık 24 ile 72 saat sonra kanser hücreleri ajanı tutarken, normal hücreler bırakmaktadır (Dolmans *et al.*, 2003). Tümör ışığa maruz bırakıldığında tümörde ki fotosensitizer ışığı absorblar ve yakında ki kanser hücrelerini yıkan aktif oksijen türleri üretmektedir. Fotosensitizer tümörde kan damarlarına da zarar verebilmekte ve böylelikle kanser hücrelerinin besin gereksinimini önlemiş olmaktadır. PDT, immün sistemi aktive edebilmektedir (Wilson, 2002; Dolmans *et al.*, 2003; Vrouenraets *et al.*, 2003). PDT ile mezotelyomanın intrakaviter tedavisi ilacın plevra ve abdomene verilmesiyle gerçekleştirilmektedir. MM'da sitoredüksiyona neden olduğu bulunmuş ancak, henüz etkileyici bir uzun dönem cevabıyla karşılaşılmamıştır (Robinson and Lake, 2005).

9. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Meme kanseri hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, kersetin'in (248 μ M) mutant p53 proteininin ekspresyonunu aşağı düzenlediği, daha az konsantrasyonlarda biraz daha az düşüş olduğu belirtilmiştir (Avila *et al.*,1994). p53 ekspresyonunun inhibisyonu hücreleri G2/M fazında durdurduğu, aşağı düzenlemenin normal p53 genine sahip hücrelerde çok daha az olduğu belirtilmiştir (Avila *et al.*,1996).

G1 kontrol noktası hücresel proliferasyonun kontrolü için önemli noktalardan biridir ve p53 geni tarafından kontrol edilmektedir. Kersetin'in 70 μ M konsantrasyonunun lösemi T-hücrelerini hücre döngüsünün geç G1 fazında durdurduğu bildirilmiştir (Yoshida *et al.*,1992). Aynı durum kersetin ile muamele edilen gastrik kanser hücrelerinde de gözlenmiştir (Yoshida *et al.*,1990).

Tirozin kinazlar hücre membranında ya da yanında lokalize olmuş proteinlerdir ve nükleusa büyüme sinyallerinin transdüksiyonu ile ilişkilidirler. İlerlemiş kanserli hastalarda kersetin'in (60-170mg/m²) damar içine verilimi 11 hastanın 9'unda ve 1 saatte lenfosit tirozin kinazlarının inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Ferry *et al.*,1996). Bu sonuç *in vitro* da non-malignant hücreler ve sıçan meme tümör hücreleri ile yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır (Yokoo and Kitamura, 1997; Levy *et al.*,1984).

Kersetin'in (10 μ M) kültüre edilmiş kolon kanser hücre hatlarında p21-ras onkogeninin ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Ranelletti *et al.*,1999). Ras genindeki mutasyonlar genellikle hücresel GTPaz'ı bozarak DNA replikasyonu için gerekli sinyalin sürekli aktivasyonuna neden olmaktadır. Ras proto-onkogenindeki mutasyonlar özellikle kolon kanserlerinde %50'den fazla oranda bulunmaktadır (DeVita *et al.*,1997).

Kersetin uygulamalarının kolon kanseri hücrelerinde büyümeyi önleyici ve apoptozis mekanizmaları ile ilgili çalışmalarında, Akt (protein kinaz B), ErbB2, ErbB3'ün ekspresyonu ve Akt'nin fosforilasyonunu negatif olarak etkileyip etkilemediği, Bcl-2, Bax, PARP (poly-ADP-riboz polimeraz) ve Kaspaz 3'ün

ekspresyonu üzerinde etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Hücreler 72 saat boyunca kersetin'e maruz bırakıldığında *Bcl-2* seviyesinde doza bağlı bir azalma olduğu, Bax seviyesinde ise bir değişimin olmadığı gözlenmiştir. Kersetin konsantrasyonu arttıkça parçalanmış kaspaz 3'ün 17 ve 19 kDa'luk parçalarında artış gözlenirken, 32 kDa'luk parçalanmamış kaspaz 3'de azalma olduğu ve PARP'ın proteolitik parçalanmasını uyardığı belirlenmiştir. Bu çalışmalar ışığında kersetin'in *Bcl-2* seviyesini düşürerek apoptozise neden olduğu, Akt yolunu inhibe ederek kolon kanser hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiği düşünülmektedir (Kim *et al.*).

İnsan ovaryum karsinoma hücreleri OV2008 ile yapılan bir çalışmada bu hücre hattına iki farklı cisplatin dozu; 1µg/ml ve 3µg/ml, 1 saat süre ile uygulanmış ve hücre döngüsüne etkisi gözlenmiştir. Cisplatin dozundan bağımsız olarak hücrelerde 48. saatte G1 fazında azalma, G2 ve S fazında ise artışa neden olduğu bildirilmiştir. 48. saatten sonra G2 fazında azalmanın gözlemlendiği, ancak S faz popülasyonunun 96. saate kadar yüksek kaldığı belirtilmiştir (Niknafs and Hosseini Shirazi, 2002).

Hipofaringeal kanser hücreleri olan PNUH-12 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada ise cisplatin, 5-fluorouracil (5-FU) ve radyasyonun p53 proteininin ekspresyonuna, hücre döngüsüne ve apoptozise etkisi gözlenmiştir. PNUH-12 hücreleri cisplatin, 5-FU ve radyasyon ile muamele edilmiştir. Cisplatin ve 5-FU ile muameleden sonra p53 proteininin ekspresyonunun arttığı, ancak radyasyon uygulaması sonucunda artmadığı gözlenmiştir. Cisplatin ile muameleden sonra yapılan flow sitometrik inceleme sonucunda S fazında artış olduğu görülmüştür. Sonuç olarak cisplatin'in PNUH-12 hücre hatlarında p53 bağımlı apoptozis ve p21 bağımlı S fazı tutuklanmasına neden olduğu bildirilmiştir (Lee *et al.*, 2005).

Ayrıca ovaryum ve endometrial kanser hücre hatları ile yapılan cisplatin çalışmasında kersetin (0.01-10µM) ilavesinin cisplatinin sitotoksik etkisinin 15-30 kat artmasına neden olduğu (Scambia *et al.*, 1992), bununla birlikte kersetinin (10-100µM) *in vitro* da normal renal tübül hücrelerini cisplatinin sitotoksik etkisinden koruduğu belirtilmiştir (Kuhlman *et al.*, 1998).

10. MATERYAL ve YÖNTEM

10.1. Materyal

10.1.1. Kimyasal Maddeler

RPMI-1640 (Gibco, 13018-031), Foetal Bovine Serum (Gibco, 10108-165), PBS Dulbecco's (Gibco, 14190-094), Penisilin/Streptomisin (Gibco, 15140-122), Trypsin-EDTA (10X) (Sigma, T4049), Dimetil sülfoksit (Sigma, D5879), Trypan blue solution (%0,4) (Sigma, T8154), Cell titer 96 A Queous one Solution Assay (MTS Kit) (Promega, G3558B), Sodyum bikarbonat (Sigma, S8875), Sodyum klorür (Sigma, S3014), Sodyum asetat (Sigma, S2889), Ribonükleaz A (Sigma, R4875), Kersetin (Sigma, Q0125), Cisplatin (Sigma, P4394), D-glikoz (Merck, 108337), Phenol red (Merck, 107241), Agaroz (Sigma, A9539), Bromophenol blue (Sigma, B0126), Et-Br (Sigma, E7637), Gliserol (Sigma, G5516), Potasyum klorür (Sigma, P5405), Proteinase K (Sigma, P2308), SDS (Sigma, L3771), Trizma base (Sigma, T6066), Triton X-100 (Sigma, T8787), PI (Sigma, P4170).

10.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler

CO₂ inkübatörü (Thermo Forma), Işık mikroskobu (Nicon Inverted Microscope), Sıcak su banyosu (Mettler), Mikro pipetör (2-200µl) (Gilson, Eppendorf), Multi pipetör (200µl) (Gilson), Elisa Reader (ELx800, Universal Microplate Reader, BIO-TEK INS.), Santrifüj (Beckman coulter microfuge 18, Nüve NF 800), Santrifüj (+4°C, Biofuge 15 R Heraeus), Laminar akımlı kabin (Heraeus), Otoklav (Hirayama, Hiclive, HVE-50), Flow Sitometri cihazı (Beckman Coulter Epics XL-MCL), Agaroz jel yürütme ünitesi (Bio-Rad), Spektrometre (Bio-Rad Smart Spec 3000), Buzdolabı (+4°C , -20°C ve -80°C derin dondurucu), Sıvı azot tankı (Union Carbide), Manyetik karıştırıcı (Ikamag RH), Vorteks (IKA), Pipet tabancası (Gilson), Steril tek kullanımlık polistren kaplar (Nunc); [ELISA plakları (96 kuyucuklu), Kültür kapları (25cm², 75cm²), Santrifüj tüpleri (15ml ve 50ml), Dondurma tüpleri, Petri kapları], Thoma lamı (Neubauer), Enjektör (5-20cc) (Set),

Cam pipet (Iso-Lab), 0,2µm filtre (Schleicher&Schuell), Ependorf tüp (1,5ml) (VWR).

10.1.3. Kullanılan Solüsyonlar

1) 10X RPMI-1640: 15,8 gr RPMI-1640, 90 ml steril distile su içinde çözülerek toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

2) 10X NaHCO₃: 2,43 gr NaHCO₃, 90 ml steril distile suda çözülerek toplam hacim steril distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

3) Besiyeri: 50 ml FBS (Fetal Bovine Serum), 50 ml 10X RPMI-1640¹, 50 ml 10X NaHCO₃ (Sodyum bikarbonat)² ve 5 ml Penisilin-Streptomisin steril distile su eklenerek hacim 500 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 7,2-7,4'e %9,2'lik NaHCO₃ veya 1N HCl⁸ ile ayarlanmıştır ve +4°C'de saklanmıştır.

4) 1X Stok Medyum: 5 ml DMSO, 45 ml FBS'ye eklenerek % 10'luk stok medyum yapılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

5) Puck's Saline A Solüsyonu: 0,4 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,5 gr D-Glikoz, 0,5 ml Fenol kırmızısı (% 0,5'lik solüsyon) steril distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilmiş ve pH 7,2'ye ayarlanmıştır ve +4°C'de saklanmıştır.

6) 1X Tripsin-EDTA Solüsyonu: 45 ml Puck's saline A solüsyonuna⁵, 5 ml 10X Tripsin-EDTA solüsyonundan eklenerek % 9,2'lik NaHCO₃⁷ veya 1N HCl⁸ ile pH 7,4'e ayarlanmıştır ve +4°C'de saklanmıştır.

7) % 9,2'lik NaHCO₃: 9,2 gr NaHCO₃ 90 ml steril distile suda çözülerek toplam hacim steril distile su eklenerek 100ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

8) 1 N HCl: 8,28 ml % 37'lik HCl'ye, 91,72 ml steril distile su eklenerek 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

9) Serumsuz Besiyeri Hazırlanması: 50 ml 10X RPMI-1640¹, 50 ml 10X NaHCO₃², 5 ml Pen/Strep (100 ünite/ml'lik, 395 ml steril distile suya eklenerek pH 7,2-7,4'e ayarlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

10) Kersetin: 33,8mg Kersetin, 1 ml DMSO'da çözülerek 100mM stok hazırlanmış ve serumsuz besiyeri⁹ ile son konsantrasyon 1mM olacak şekilde dilüsyon yapılarak stoklanmıştır ve -20°C'de saklanmıştır.

11) Cisplatin: 3mg Cisplatin, 1 ml DMSO'da çözülerek 10mM stok hazırlanmış ve serumsuz besiyeri⁹ ile son konsantrasyon 1mM olacak şekilde dilüsyon yapılmıştır. Stok ve dilüsyonlar -20°C'de saklanmıştır.

12) 1X PBS (Phosphate Buffered Saline): 137mM NaCl, 1,47mM KH₂PO₄, 8,26mM NaH₂PO₄, 500 ml steril distile suda hazırlanmıştır. 0,1M'lık NaHCO₃ ile pH 7,3'e ayarlanarak, 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek küçük hacimlerde -20°C'de saklanmıştır.

13) Triton X-100 (% 0,1'lik) Hazırlanması: 50 µl Triton X-100, 49,95 ml PBS¹²'e eklenerek +4°C'de saklanmıştır.

14) Propidium Iodide (PI) Hazırlanması: 1mg PI, 1 ml steril distile suda çözülerek, ışık almayacak şekilde +4°C'de saklanmıştır.

15) Ethanol (% 70'lik) Hazırlanması: 70 ml ethanole 30 ml steril distile su eklenmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

16) Boyama Solüsyonu: 10 ml % 0,1'lik Triton X-100¹³'e, 200 µl PI¹⁴ ve 200 µl RNase eklenerek bekletilmeden kullanılmıştır.

17) 1X RNase Sulandırma Çözeltisi: 10mM Tris-HCl¹⁸, pH .5 ve 15mM NaCl steril distile suda hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ile RNase'ı 1 ml'de 540 ünite olacak şekilde sulandırılmış, ışık almayan ortamda -20°C'de saklanmıştır.

18) 1M Tris: 1M Tris- HCl steril distile su ile hazırlanarak 0,1M NaHCO₃ ile pH 8'e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

19) 0,5M EDTA: 0,5M EDTA steril su ile hazırlanarak, 0,1M NaHCO₃ ile pH 8'e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

20) 1M EDTA: 1M EDTA steril su ile hazırlanarak, 0,1M NaHCO₃ ile pH 8'e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

21) % 10 SDS: 346,7mM SDS steril distile su ile hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

22) 1X DNA Liziz Tamponu: 10mM Tris-HCl, pH 8, 0,1mM EDTA pH 8 ve 173,38mM SDS²¹ steril distile su ile hazırlanarak ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

23) 1X Sodyum Asetat: 3M Sodyum asetat (NaAc) steril distile su ile hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

24) 1X TE: 10mM Tris-HCl, pH 8 ve 1mM EDTA²⁰ pH 8 steril distile su ile hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

25) 5X TBE: 445mM Tris-Borat, 445mM Borik asit ve 0,5M EDTA¹⁹ pH 8 steril distile su ile hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

26) DNA Yükleme Tamponu: 1:1 oranında 1X TBE ile 1M Gliserol karıştırılarak hazırlanan karışıma 0,3mM Bromo fenol mavisi eklenmiş ve ışık almayan ortamda, oda sıcaklığında saklanmıştır.

27) Agar (% 1'lik): 0,9 gr Agar 1X TBE ile 100 ml'e tamamlanarak, mikrodalga fırında eritilmiş ve kalıba dökülmeden önce 10 µl Et-Br eklenmiştir.

10.2. Yöntem

Bu kısımda çalışmamızda kullandığımız tripan mavisi ve MTS deneyi ile hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi, hücre proliferasyon analizleri, hücre döngüsü analizleri ve apoptozis tayin yöntemleri anlatılmıştır.

10.2.1. *Hücre Kültürleri*

Kersetin ve Cisplatinin mezotelyoma hücrelerinin hücre döngüsüne etkilerinin incelenmesi amacıyla SPC111 ve SPC212 hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler, İsviçre Fribourg Üniversitesi, Histoloji-Embriyoloji Enstitüsünden Dr. Nil Saydan aracılığıyla sağlanmıştır.

SPC111 ve SPC212 hücre hatları, heterojen fenotipe sahiptir, adherent ve monolayer olarak büyürler. Flow sitometride iki ana pik (2c ve 4c) ile diploid (2c) DNA içeriği gösterirler. Bu hücre hatlarından SPC111'ler; % 5.2 iri polinüklear, % 2.6 küçük sferikal, % 90.4 epiteliyal poligonal, % 1.8 epiteloid star biçimlidirler. SPC111 hücre hatlarının çoğu homojen tipte ve normal plevral hücrelere benzer. Bu hücreler kompakt görünümde ve epiteliyal poligonal morfolojinin karakteristiği ile kümelenmeye eğilimlidirler. Bu fenotip oldukça kalıcıdır ve hareketleri çok kısıtlıdır (Şekil 10.1.). SPC212 hücre hatları; % 7.74 fibroblast benzeri, % 2.11 iri polinüklear, % 3.52 küçük sferikal ve % 86.61 epiteloid star biçimlidirler. Bir veya birkaç psödopod ile seyrek monolayer olarak büyürler (Şekil 10.2.) (Saydan *et al.*, 2001).



Şekil 10.1. SPC111 hücrelerinin morfolojik genel görünüşü. 10x10 büyütme.



Şekil 10.2. SPC212 hücrelerinin genel görünüşü. 10x10 büyütme.

10.2.1.1. Alt Kültürleme

Bir önceki kültürdeki hücrelerin 1/3'ü kadar hücre yaklaşık 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde 25 cm² veya 75 cm² lik flasklara ekilerek, büyüme ortamı; % 10 FBS (Fetal Bovine Serum), % 2,43 NaHCO₃, % 1 Penisilin/Streptomisin olan ve % 5 CO₂, % 95 hava verilerek 37°C'de CO₂ inkübatöründe büyütülmüştür.

Hücrelerin pasajlanması için 1X Tripsin-EDTA ile hücreler kaldırılmış, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve taze besiyerine alınıp flaslara aktararak pasajları yapılmıştır. Pasajlar 3 günde 1 yapılmıştır.

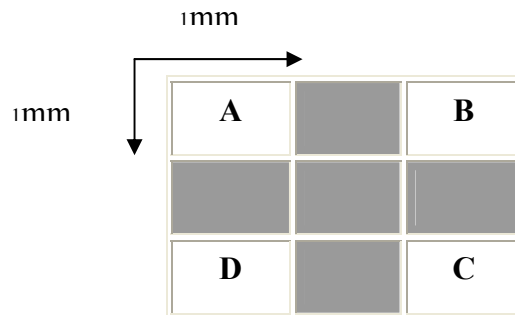
10.2.1.2. Hücre Stoklama ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

9.2.1.1.'inci bölümde bahsedildiği gibi tripsinlenen hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra % 10 DMSO (Dimetil sülfoksit) içeren serum ile süspanse edilerek 1,5 ml'lik kriyo tüplere alınmış ve -80°C'de bir gece bırakıldıktan sonra sıvı azot tankına aktarılmıştır.

Sıvı azotta depolanan hücreler 37°C'de hızlı şekilde çözülmüş daha sonra RPMI-1640 besiyeri ilave edilerek 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Oluşan pellet RPMI-1640 ile tekrar süspanse edilerek 25 cm²'lik flaslara alınmıştır.

10.2.1.3. Hücre Sayımı

Hücreler alt kültürlenme için kaldırıldığında hücre süspanسیونundan 20 µl alınarak 20 µl tripan mavisi ile karıştırılmış ve thoma lamına aktarılmıştır. Sayım thoma laminanın alt ve üst odacıklarında bulunan her çeyrek dairede ki 3'lü çizgi ile ayrılmış 16 küçük karede (A,B,C,D) bulunan hücreler sayılmış ve bunların ortalaması alınmıştır.



Toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$T = O \times S \times H \times 10^4$ formülü ile hesaplanmıştır.

T: Süspansiyondaki toplam hücre sayısı (hücre/ml)

O: Thoma lamında sayılan ve ortalamaları alınan hücre sayısı

S: Sulandırma katsayısı

H: Toplam hacim (ml)

10.2.2. Hücre Büyüme Eğrisi

Hücre büyüme eğrisi iki farklı yöntem ile hesaplanmıştır ve grafikler Microsoft Excel programı kullanılarak çizilmiştir.

10.2.2.1. Tripan Mavisi Boyama Yöntemi ile Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

SPC111 ve SPC212 hücreleri, 20 cm²'lik petrilere 1x10⁴ ve 1x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde tripan mavisi kullanılarak 9.2.1.3.'üncü bölümde anlatıldığı gibi hücre sayımı yapılarak hesaplanmıştır.

10.2.2.2. MTS Deneyi ile Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

Her bir büyüme deneyi için, 100 µl'de 1x10³ hücre olacak şekilde yedi ayrı 96 kuyucuklu plağa iki kopya olarak ekilm yapılmıştır. Birbirini izleyen 7 gün süresince hücre büyümesi izlenmiştir. Her kuyucuğa 20 µl MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt) bileşiği eklenerek 2 saat inkübasyondan sonra Elisa okuyucusunda okuma yapılmış ve ortalamalar hesaplanmıştır. Üçüncü gün hücrelerin besiyeri çekilerek taze besiyeri eklenmiştir.

10.2.3. Hücrelerin Morfolojik İncelenmesi

SPC111 ve SPC212 hücre hatlarına kersetin, cisplatin ve kombinasyonlarının etkisini gözlemek amacı ile 96 kuyucuklu plate'e 100 µl'de 1x10³ hücre olacak şekilde ekim yapılmış, 24 saat sonra madde eklenmiş ve 24, 48, 72. saatlerde mikroskop altında 10x4'lük büyütmede hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

10.2.4. Hücre Proliferasyon Analizi

Hücre proliferasyon analizi, MTS boya indirgeme yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

10.2.4.1. MTS

Hücre proliferasyon oranını ölçmek için Cell titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kiti (Promega) kullanılmıştır. Bu deneyde, canlı ve aktif hücreler tarafından tetrazolium bileşiği metabolize edilir ve renkli bir ürün olan formazan oluşur. Bu renk değişimi, Elisa mikropalak okuyucu ile 490 nm dalga boyunda absorbans ile ölçülmüştür.

Her proliferasyon deneyi için, 100 µl'de 1×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa ikişer kopya olarak ekilmiştir. Beş gün boyunca her kuyucuğa 20 µl MTS bileşiği eklenerek 2 saat inkübasyondan sonra elisa reader'da okuma yapılmıştır. Her örnek için çift kuyucukların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmış, tüm deneyler en az 3 kez tekrar edilmiş ve Microsoft Excel programı kullanılarak grafikler çizilmiştir.

10.2.5. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizleri PI uygulanarak, flow sitometri de yapılmış ve Multicycle programı kullanılarak sonuçlar histogram şeklinde alınmıştır.

10.2.5.1. Kersetin ve Cisplatin Uygulaması

SPC111 ve SPC212 hücreleri 20 cm²'lik plastik petrilere, her bir petride 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra ortama adaptasyonu sağlanmıştır. Kersetin, Cisplatin ve/veya kombinasyonları çeşitli dozlarda eklendikten sonra, hücreler 24, 48 ve 72. saatlerde fiksasyona tabi tutularak madde etkileri doz ve zamana bağımlı olarak incelenmiştir.

10.2.5.2. Hücrelerin Fikse Edilmesi

Hücreler daha önce bahsedildiği gibi 1X tripsin ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra besiyeri vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 37°C’de ısıtılan 1X PBS’den 2’şer ml eklenmiş ve hafifçe çalkalandıktan sonra 1000 rpm’de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Yıkama işleminden sonra PBS uzaklaştırılmıştır. Her bir tüpe 0,5 ml PBS eklenerek hücreler pipetlenmiş ve ayrılması sağlanmıştır. Üzerlerine 4,5 ml soğuk % 70’lik etanol eklenerek hücreler fikse edildikten sonra hafifçe çalkalanarak daha sonra kullanılmak üzere buzdolabının -20°C bölmesine kaldırılmıştır.

10.2.5.3. Hücrelerin Boyanması

Fikse edilen hücreler 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı kısım uzaklaştırılıp oda sıcaklığında 2ml 1X PBS eklenmiştir. 60 saniye bekletilen hücreler 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek PBS uzaklaştırılmıştır. Hücrelere taze hazırlanmış Triton X-100, RNase ve PI karışımından 1’er ml eklenmiş ve hücreler süspanse edildikten sonra 600 µl’si alınarak FACS’da okunmak üzere başka tüplere alınmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek hücrelerin boyanması sağlanmıştır.

10.2.5.4. Döngünün Belirlenmesi

Boyanan hücrelerinin hücre döngüsü, nüklear DNA için PI sitokimyasal reaksiyonu kullanılarak flow sitometri ile analiz edilmiştir. Her hücre için nüklear DNA içeriği flow sitometri (Beckman Coulter)’de ölçülmüştür. Sonuçlar Multicycle DNA dizi analizi programında histogram olarak belirlenmiş ve yüzdeleri hesaplanmıştır.

10.3. Apoptoz Tayini

Apoptoz tayini DNA laddering yöntemi ile belirlenmiştir.

10.3.1. DNA Laddering

SPC111 ve SPC212 hücrelerine kersetin, cisplatin ve/veya kombinasyonlarının apoptotik etkisinin incelenmesi amacıyla DNA laddering metodu kullanılmıştır.

SPC111 ve SPC212 hücreleri 20 cm²'lik plastik petrilere, her petride 1x10⁶ hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve bir gün sonra kersetin, cisplatin ve/veya kombinasyonları çeşitli dozlarda eklenmiştir. 24, 48 ve 72. saatte hücreler tripsin ile kaldırılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve besiyeri vakumla çekilerek uzaklaştırıldıktan sonra 1'er ml soğuk PBS eklenen hücreler 1000 rpm'de 5 dakika ve +4°C'de tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edilmiş ve üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüplere yani pelete 4.4µg/ml RNase içeren 500µl soğuk DNA lizis tamponu ile süspanse edilen hücreler ependorf tüplere alınarak 37°C'de 1 saat bekletilmiştir. Bir saatin sonunda her bir tüpe final konsantrasyon 0.13µg/ml olacak şekilde 7µl Proteinaz K eklenip 50°C'de 2 saat bekletilmiştir. İki saat sonra içerisinde hücreler, DNA lizis tamponu, RNase ve Proteinaz K bulunan her bir ependorf tüpüne 700µl soğuk Fenol kloroform eklenerek 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant pipet ile yeni bir ependorf tüpe alınmıştır. Daha sonra bu işlem 500µl Fenol kloroform ile tekrar edilmiştir. İşlem sonunda elde edilen süpernatantın üzerine hacmin iki katı soğuk absolüt etanol ve bunun üzerine toplam hacmin 1/10'i kadar NaAc ilave edilen tüpler 15-20 dakika -80°C'de bekletildikten sonra 13.000 rpm'de +4°C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda pellet halde bulunan DNA'ya zarar verilmeden süpernatant uzaklaştırılmış ve üzerine 1ml oda sıcaklığın da bulunan % 70'lik etanol eklenerek +4°C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırılmıştır. 20-30 dakika bekletilerek kurutulan DNA'ya 60µl 1X TE (Tris-EDTA) eklenerek çözülmüş DNA -20°C'de saklanmıştır. DNA miktarı spektrofotometre kullanılarak 260 nm absorbans da okunmuştur; okunan değer X 50 [DNA sabiti (1A₂₆₀: 50 µg/ml)] X 50 (dilüsyon katsayısı: 1/50)/1000 formülü kullanılarak hesaplanmıştır. 2µg DNA, DNA yürütme tamponu ile karıştırılarak, 1X TBE ile hazırlanmış % 1'lik agarozda, 70 V/cm akım ile 1,5-2 saat yürütülmüş ve jel U.V altında görüntülenmiştir.

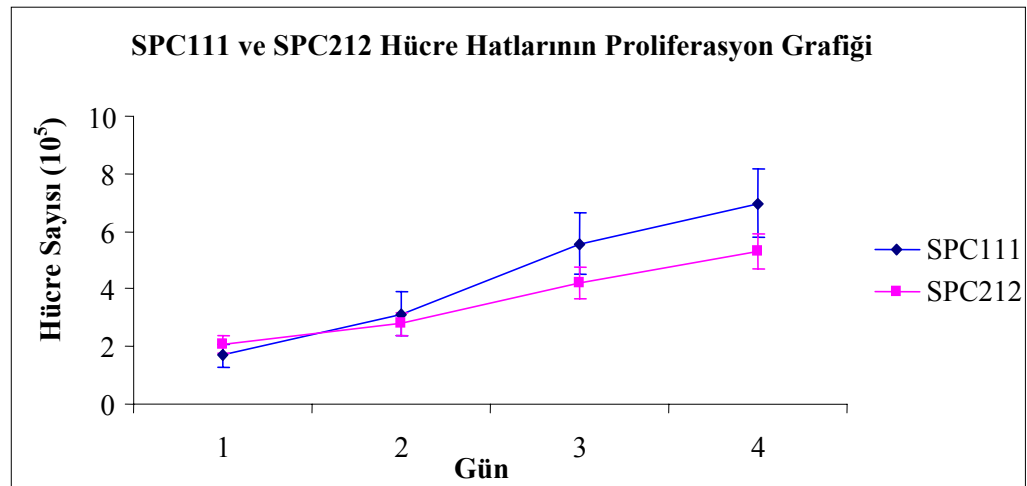
11. BULGULAR

11.1. Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının büyüme eğrileri tripan mavisi boyama ve MTS deneyleriyle belirlenmiştir. 20 cm²'lik plastik petriler ve 96 kuyucuklu plak kullanılmıştır. Petrilere 1×10^5 hücre/petri, plak kuyularına ise 1×10^4 hücre/ml, olacak şekilde ekim yapılmıştır.

11.1.1. Tripan Mavisi Boyama Yöntemi

Hücre hatları tripan mavisi boyama yöntemi kullanarak büyüme eğrileri 4 gün boyunca izlenmiştir. Materyal ve yöntem 10.2.1.3.'de anlatıldığı gibi hücre sayımları yapılmıştır. Şekil 11.1.'de SPC111 ve SPC212 tripan mavisi yöntemi ile oluşturulan hücre büyüme grafikleri gösterilmiştir. Deneyler en az üç kere tekrar edilmiş, sonuçların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak grafikler Microsoft Excel programında çizilmiştir.

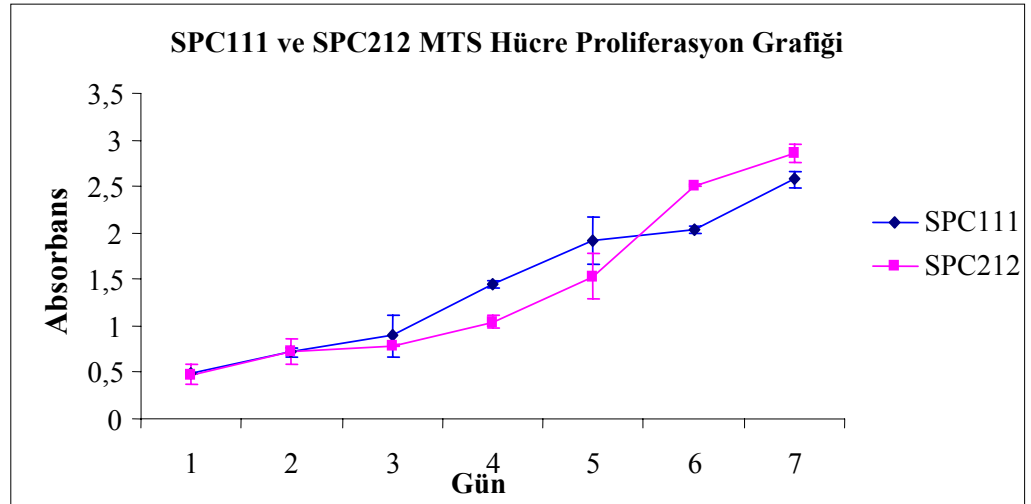


Şekil 11.1. SPC111 ve SPC212 hücre hatları için hücre sayımlarının zamana bağımlı artışı gösterilmiştir.

11.1.2. MTS İndirgenme Yöntemi

SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının büyümeleri daha sonra MTS boya indirgeme tekniği ile 7 gün boyunca izlenmiştir. Materyal ve yöntem'in 10.2.2.2. kısmında bahsedildiği şekilde deneyler yapılmıştır. Hücrelerin besiyerleri her 3 günde bir yenilenmiştir.

Şekil 11.1. ile Şekil 11.2'de gösterildiği gibi farklı yöntemlerde de hücre grafikleri benzerlik göstermektedir.



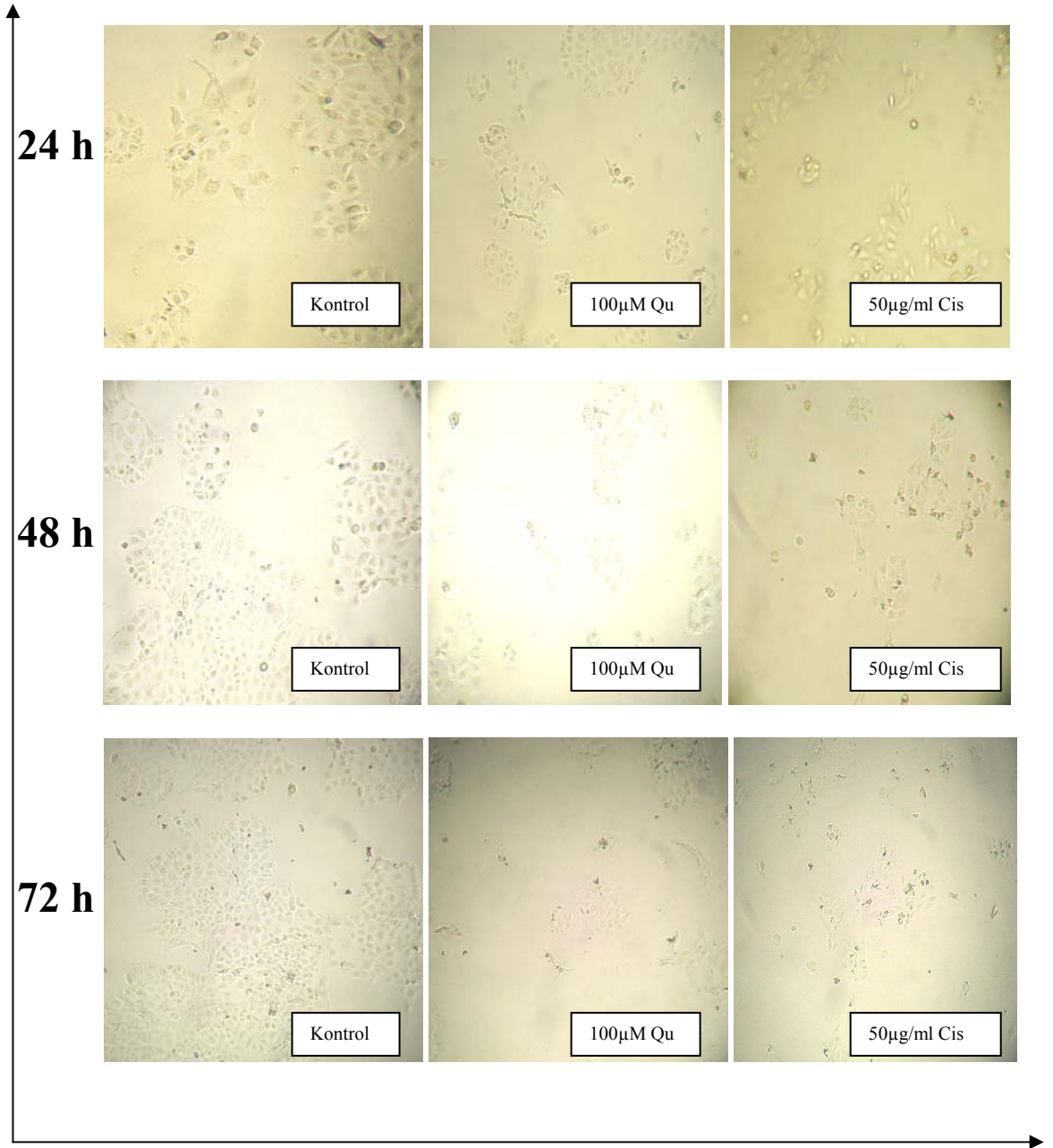
Şekil 11.2. Metabolik olarak aktif hücrelerin absorbans değerlerinin zamana bağımlı olarak artışı gösterilmiştir.

11.2. Kerstinin Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

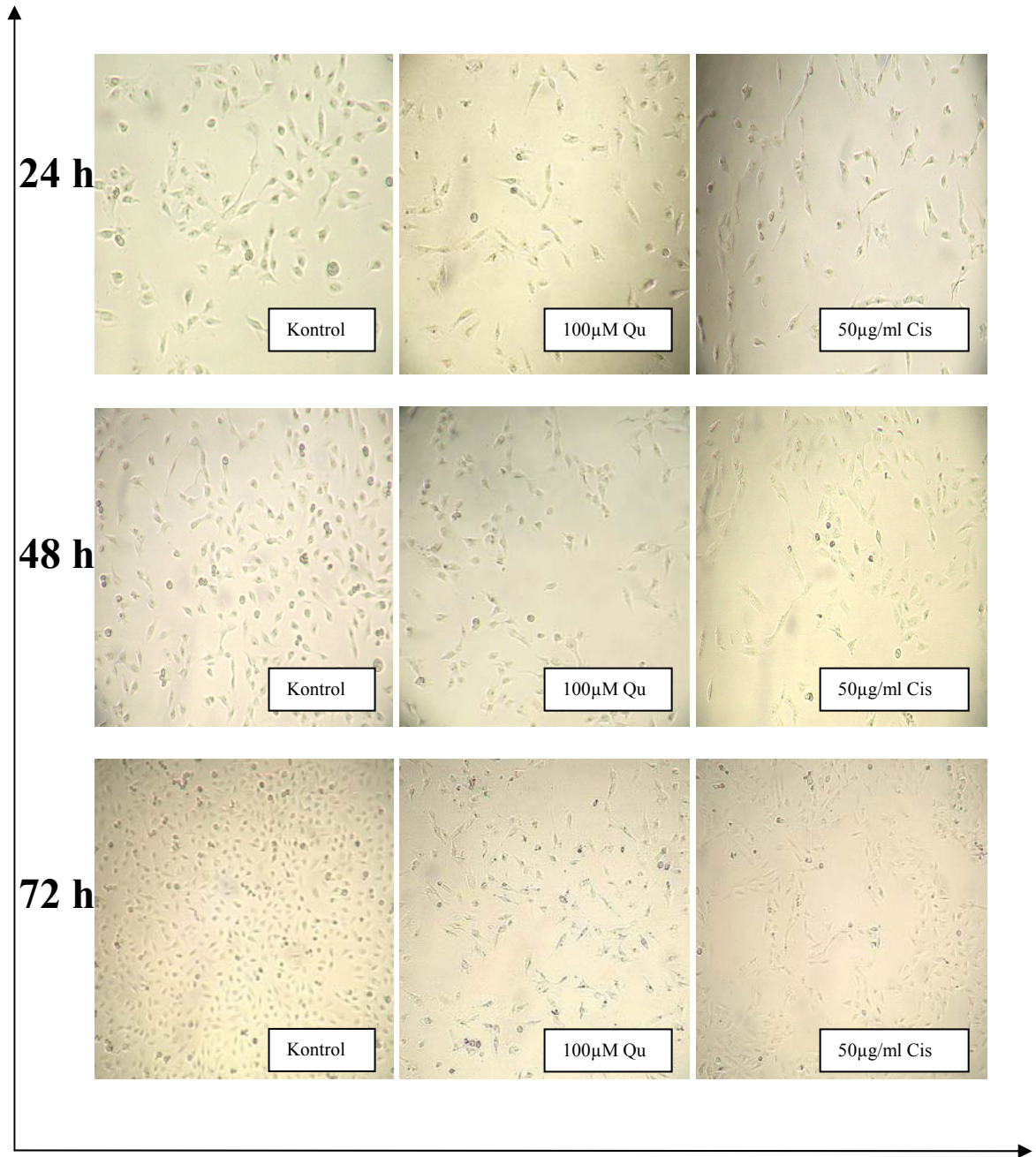
SPC111 ve SPC212 hücre hatlarında kersetinin etkisini doza ve zamana bağlı olarak belirlemek için 96 kuyucuklu plak'ların her bir kuyusuna 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde çiftli ekim yapılmış ve 24 saat lag periyodundan sonra 0-100 μ M dozlarda kersetin (Qu) eklenmiştir. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde MTS kiti eklenmiş ve absorbans ölçümleri yapılmıştır.

İlk olarak kersetinin 0-10 μ M'lık dozları uygulanarak 4 gün boyunca SPC111 ve SPC212 hücre hatları üzerine etkileri izlenmiştir. Şekil 11.5a'da görüldüğü gibi kersetin 10 μ M ve altındaki dozlarda SPC111 hücre hatlarında hücre proliferasyonunu zamana bağımlı indüklerken, SPC212 hücre hatlarında kersetin 0-10 μ M dozlarda kontrolle karşılaştırıldığında hücreler üzerinde fark edilir bir etki göstermemiştir. Bununla beraber 96. saaten itibaren SPC212 hücrelerinde 10 μ M konsantrasyonda hücre proliferasyonunda az da olsa bir yavaşlama olmuştur. Kersetin'in 50 μ M doz uygulamasında her iki hücre proliferasyonunu 72. saaten sonra yavaşlatmıştır. Kersetin SPC111 ve SPC212 hücrelerinde 100 μ M dozda fark edilir bir etki göstermiş ve hücre proliferasyonunu sırasıyla 24 ve 48. saaten itibaren yavaşlatmıştır (Şekil 11.6. a ve b). Kersetin SPC212 hücrelerini SPC111 hücrelerinden daha kısa zamanda ve daha düşük dozlarda etkilemektedir. Bu durum SPC212 hücrelerinin kersetine daha duyarlı olduğunu işaret eder.

Bu deneylerin takibinde, her iki hücre morfolojik olarak ilaç muamelesinden sonra incelenmiştir. Hücreler önce 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş, 24 saat sonra kersetin ve cisplatin ile muamele edilmiş ve morfolojik olarak ışık mikroskobu altında Nikon P1 dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanmıştır. 10x4 büyütme de incelenmiştir. Şekil 11.3. ve 11.4.'de görüldüğü gibi SPC111 ve SPC212 hücre sayısı 100 μ M kersetin konsantrasyonunda zamana bağımlı olarak azalmaya başlamıştır.

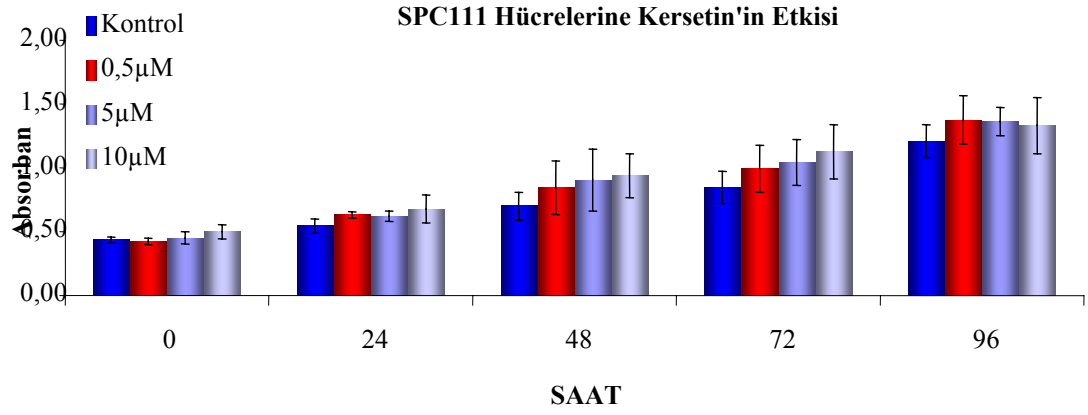


Şekil 11.3. Kersetin ve cisplatinin SPC111 hücreleri üzerine morfolojik etkisi ışık mikroskobu altında 10x4 büyütme de görüntülenmiştir.

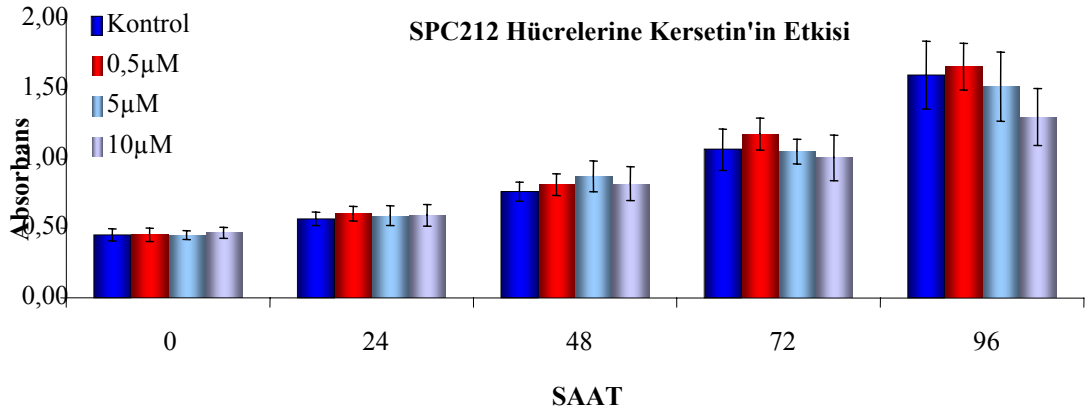


Şekil 11.4. Kersetin ve cisplatinin SPC212 hücreleri üzerine morfolojik etkisi ışık mikroskobu altında 10x4 büyütme de görüntülenmiştir.

(a)



(b)



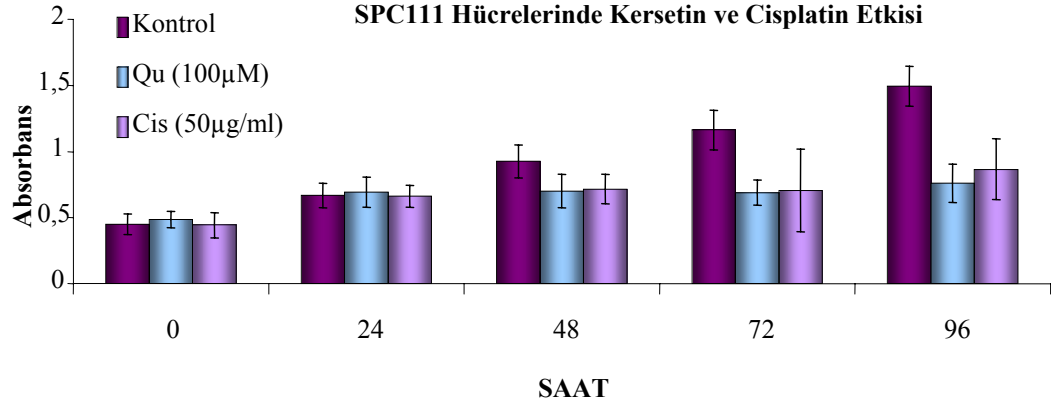
Şekil 11.5. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarında 0-10µM kersetin dozlarının zamana bağımlı etkisi görülmektedir.

11.3. Cisplatinin Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

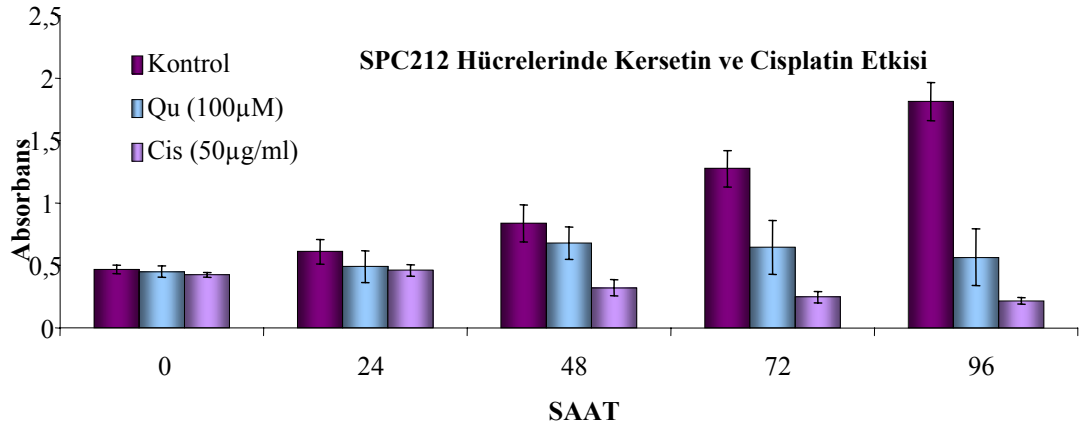
SPC111 ve SPC212 hücre hatlarına kersetin-cisplatin kombinasyonu uygulamasından önce cisplatinin tek başına etkisi doza ve zamana bağlı olarak incelenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi hücre ekiminden 24 saat sonra 0-50µg/ml dozlarda cisplatin (Cis) eklenmiştir. İlaç muamelesini izleyen 4 gün boyunca hücreler üzerindeki etkiler izlenerek, çift olarak yapılan en az 3 bağımsız deney sonucunun ortalamaları alınarak standart sapmaları hesaplanmıştır.

Cisplatin'in her iki hücre üzerine etkisi 5µg/ml dozdan itibaren gözlenmeye başlamaktadır. 5 ve 10µg/ml'lik doz uygulamalarında proliferasyon 72. saatten itibaren yavaşlamaktadır (Şekil 11.7. b, 11.8. b ve 11.9. a,b). Şekil 11.6. a'da görüldüğü gibi SPC111 hücre hattında cisplatinin uygulanan en yüksek dozu olan 50µg/ml'lik konsantrasyon 48. saatten itibaren proliferasyonu duraklatırken, SPC212 hücre hattında da cisplatinin etkisi 24. saatten itibaren başlamıştır (Şekil 11.6. b). Kontrol ve kersetin uygulamaları ile cisplatin karşılaştırıldığında SPC111 hücre hattında 50µg/ml'lik cisplatin ve 100µM'lık yüksek kersetin dozu benzer etkiyi gösterirken, 48. saatten sonra SPC212 hücre proliferasyonunda cisplatinin 50µg/ml'lik dozunun kersetinin 100µM'lık dozundan daha etkili olarak inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 11.6. a ve b).

(a)



(b)



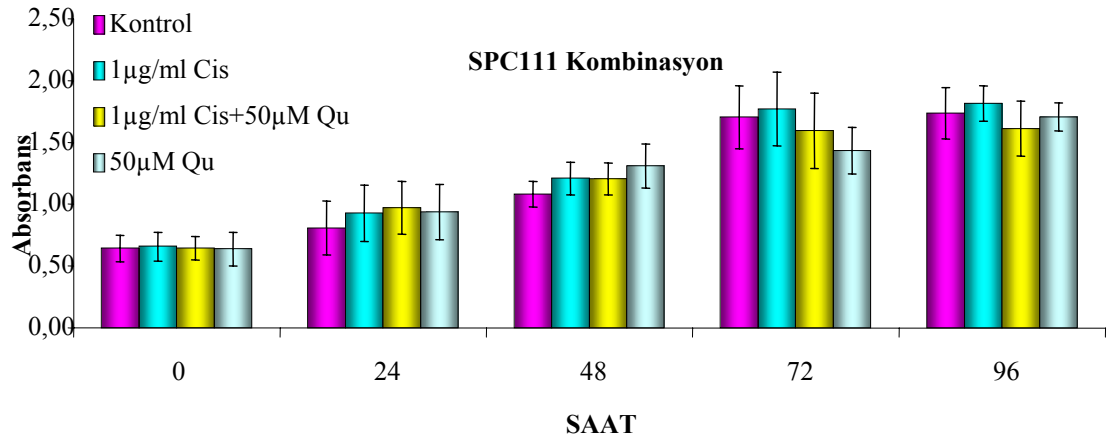
Şekil 11.6. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarında kersetin ve cisplatinin doza ve zamana bağımlı etkisi görülmektedir.

11.4. Kersetin ve Cisplatin Kombinasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

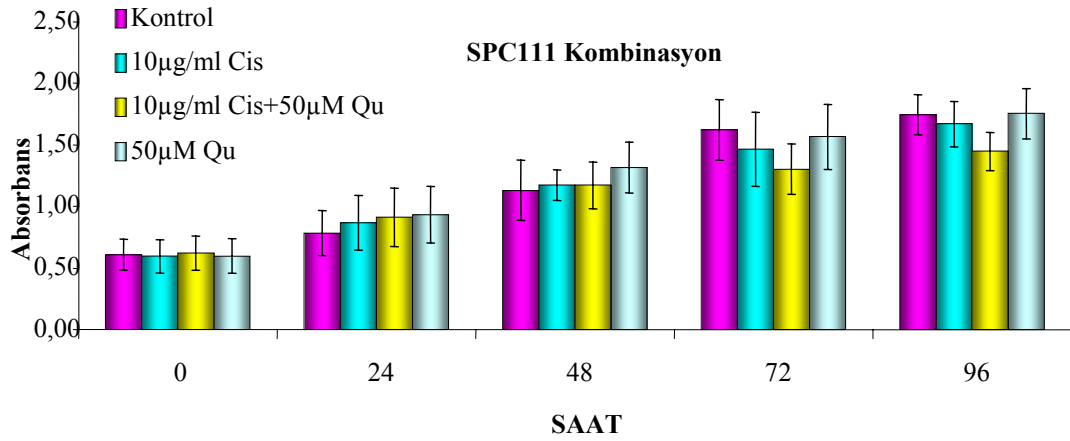
Tek doz uygulamalarının takibinde 50µM kersetin ile 1, 5, 10µg/ml cisplatin dozlarının kombinasyonlarının etkisi zamana bağlı olarak incelenmiştir. Her iki hücre tipinde de 1µg/ml Cis+1µM Qu, 1µg/ml Cis+5µM Qu, 1µg/ml Cis+10µM Qu dozları denenmiş fakat etki gözlenmemiştir. Her iki hücrede 1µg/ml Cis, 50µM Qu'in tek ve kombine uygulamalarında 72. saate kadar belirgin bir fark gözlenmemektedir (Şekil 11.7. a). Bununla beraber 1µg/ml Cis+50µM Qu dozlarının tek dozlara göre 96. saatten sonra SPC111 hücrelerinde az, SPC212 hücrelerinde biraz daha fazla etkin olduğu gözlenmiştir (Şekil 11.8. a).

Şekil 11.7. b, 11.8. b ve 11.9.'da görüldüğü gibi SPC111 ve SPC212 hücre hatlarında 5µg/ml Cis+50µM Qu ve 10µg/ml Cis+50µM Qu kombinasyonlarını hücre proliferasyonunu inhibe etmekte tek doz uygulamalarına göre daha etkili olduğu ve proliferasyonu üzerindeki etkisini 72. saatten itibaren gösterdiği belirlenmiştir.

(a)

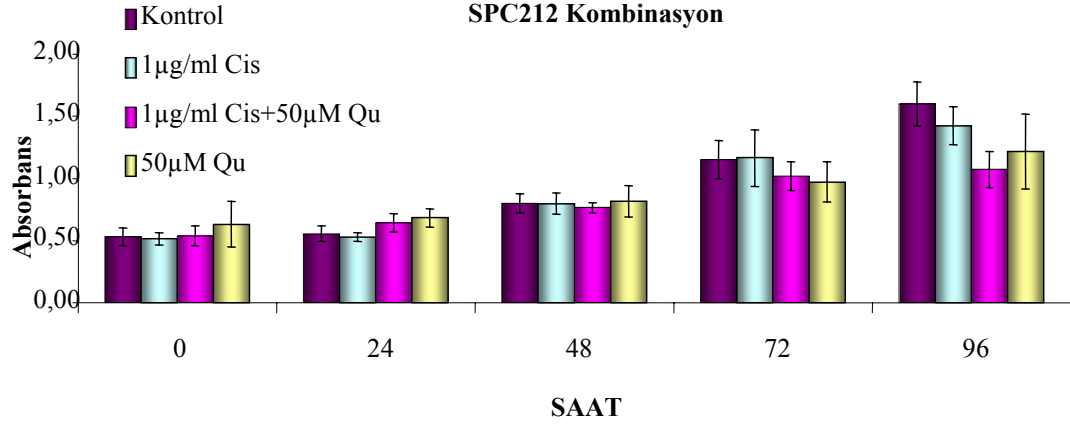


(b)

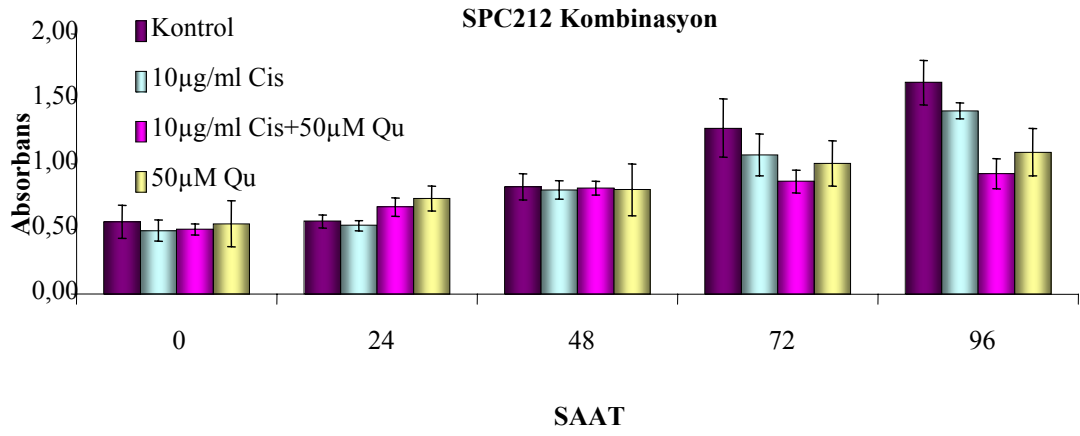


Şekil 11.7. SPC111 hücre hatlarında 1µg/ml Cis, 10µg/ml Cis, 50µM Qu ve kombinasyon uygulamaları görülmektedir.

(a)

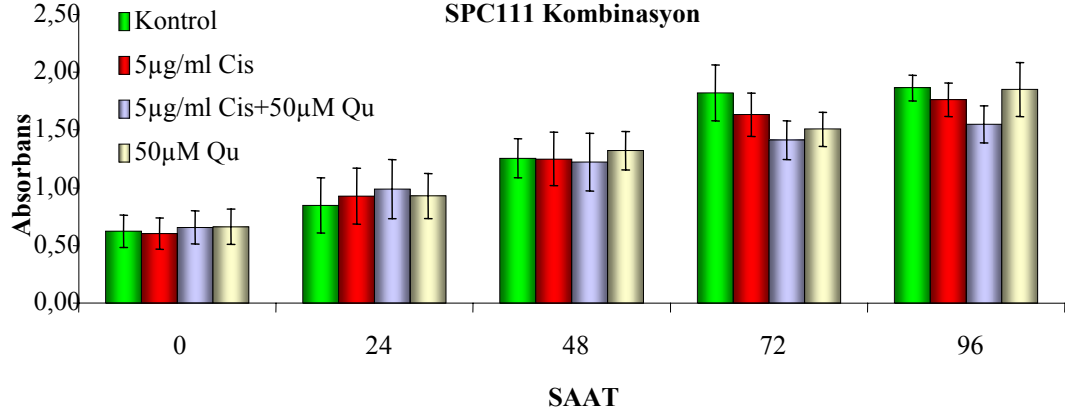


(b)

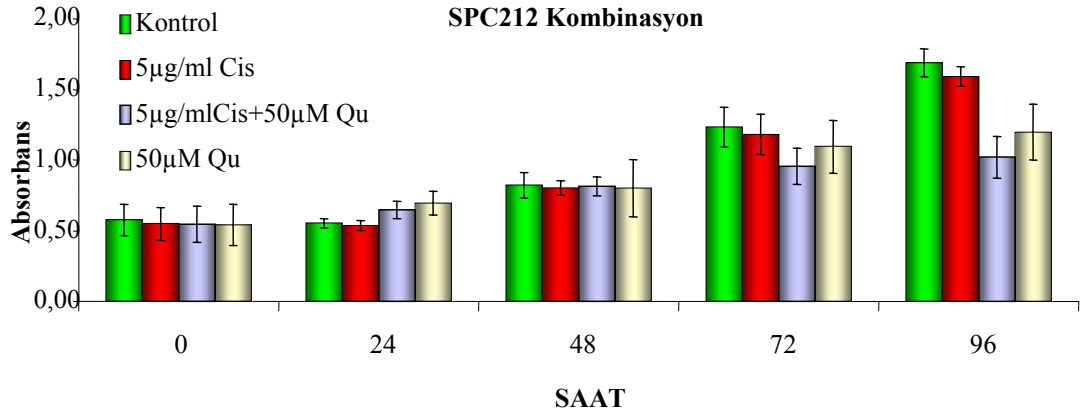


Şekil 11.8. SPC212 hücre hatlarında 1µg/ml Cis, 10µg/ml Cis, 50µM Qu ve kombinasyon uygulamaları görülmektedir.

(a)



(b)

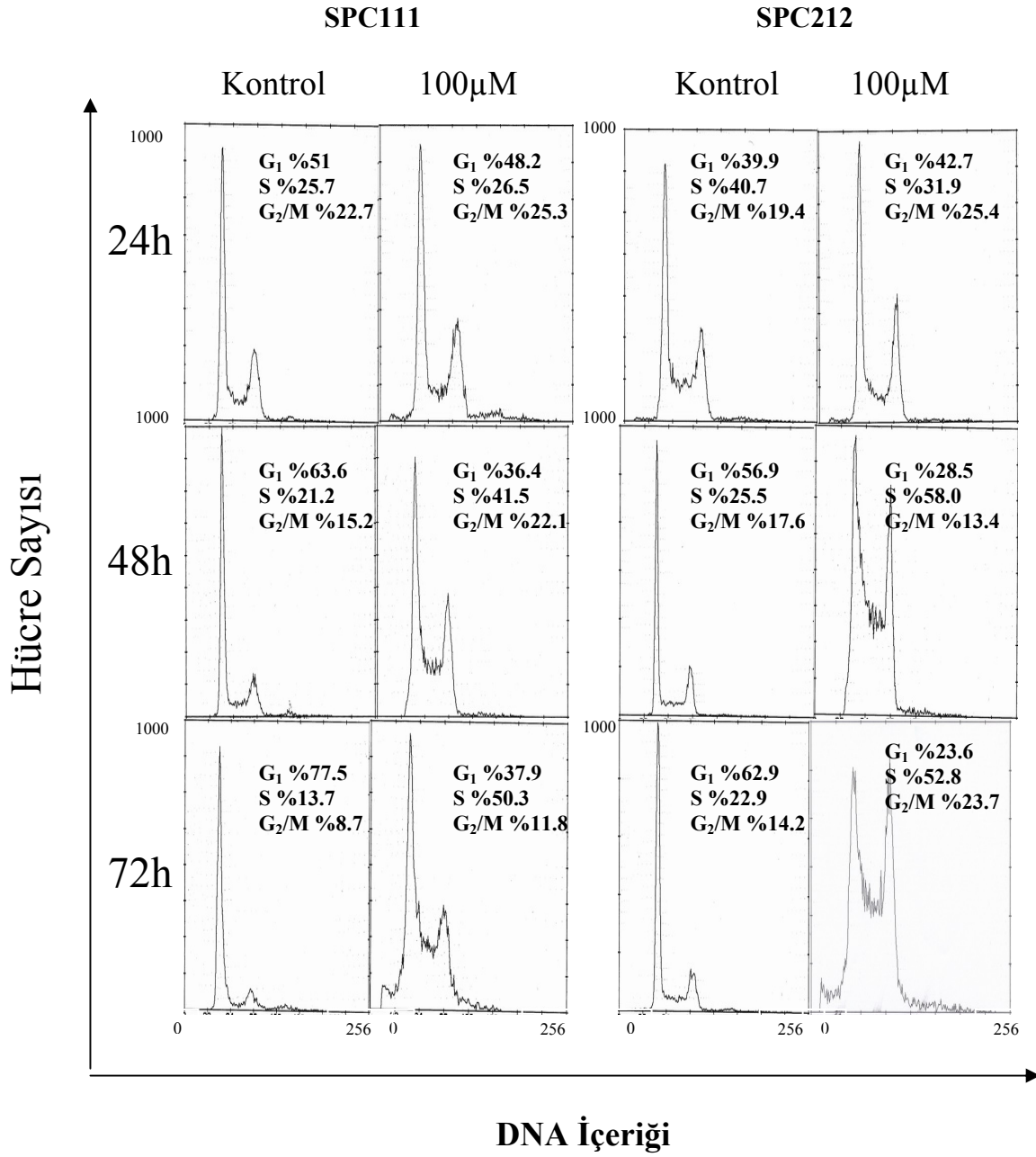


Şekil 11.9. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarında 5µg/ml Cis, 50µM Qu ve 5µg/ml Cis+50µM Qu kombinasyon uygulamaları görülmektedir.

11.5. Kersetinin Hücre Döngüsüne Etkisinin İncelenmesi

Kersetin'in SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne etkisini doz ve zamana bağlı olarak incelemek için 20cm²'lik petrilere her bir petride 1x10⁶ hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat sonra farklı dozlarda kersetin eklenmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerde hücreler fikse edilip, PI ile boyanarak flow sitometri cihazında sayım yapılmıştır. Deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

Kontrolle karşılaştırıldığında kersetinin 5, 10, 50 ve 100µM konsantrasyonlarının SPC111 hücre hatlarında ilk 24 saatte hücre döngüsünde belirgin bir etki yapmadığı belirlenmiştir. Bununla beraber, 100µM kersetin dozu 48. saatten sonra S fazında SPC111 hücrelerinin toplanmasına neden olmaktadır. SPC111 hücrelerinde 48. saatte % 41.5 olan hücre oranı 72. saatte % 50.3'e erişmiştir (Şekil 11.10.). SPC212 hücre hattında hem 50 hem de 100µM kersetin 48. ve 72. saatlerde S faz bloğuna neden olmaktadır (Şekil 11.10.).

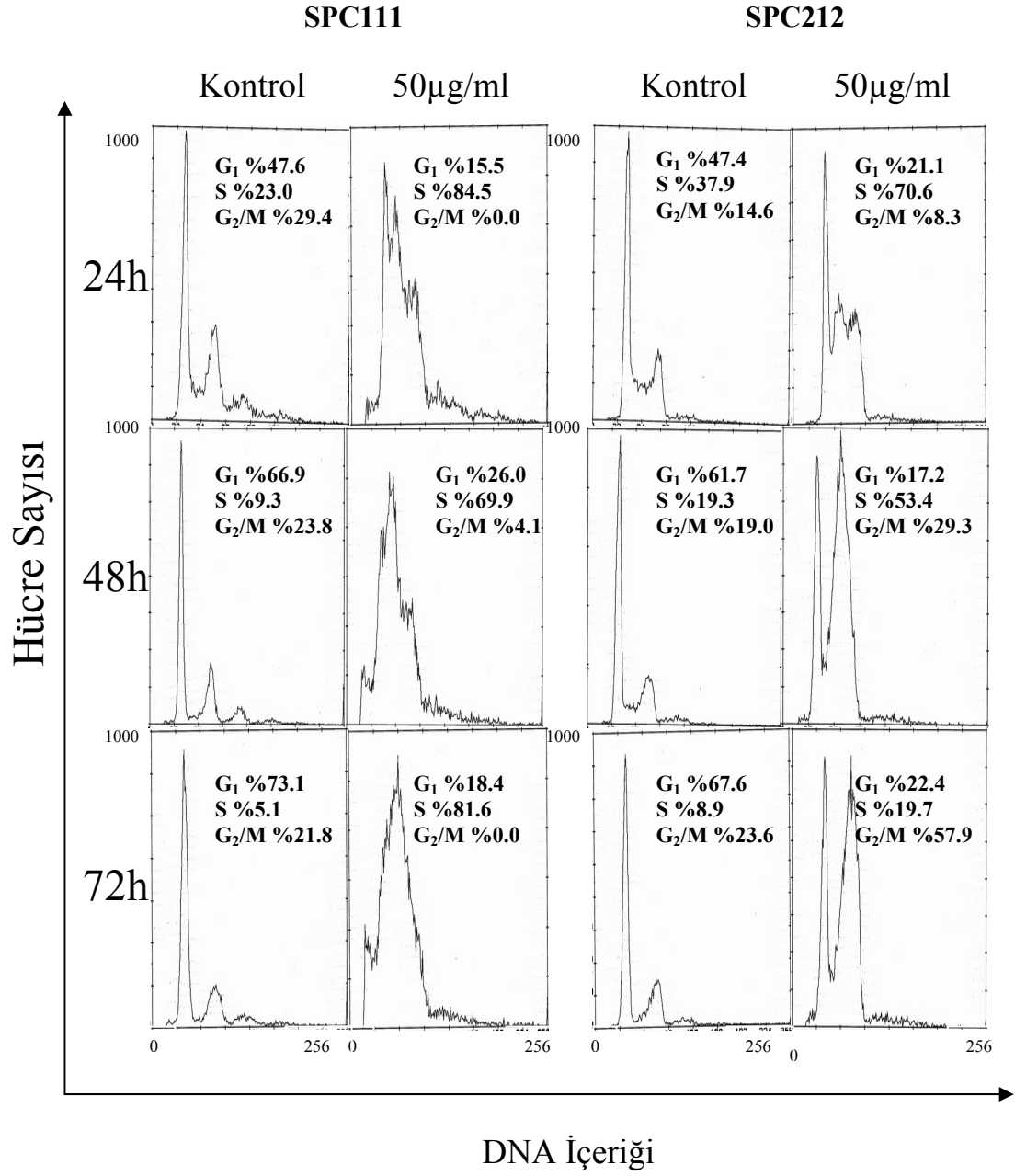


Şekil 11.10. Kersetin'in 100µM'lık dozunun SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne, zamana bağlı etkisi görülmektedir.

11.6. Cisplatin'in Hücre Döngüsüne Etkisinin İncelenmesi

Cisplatin'in SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne etkisini doz ve zamana bağlı olarak belirlemek için 11.5. bölümde anlatıldığı gibi ekim yapılmış ve 24 saat sonra 1, 5, 10 ve 50µg/ml'lik dozlarda cisplatin eklenmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerde hücreler fikse edilip PI ile boyanarak flow sitometri cihazında sayım yapılmıştır. Deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

Cisplatin 50µg/ml konsantrasyonda SPC111 hücre hatlarında 24. saatten itibaren belirgin olarak S faz bloğuna neden olmakta ve bu durum 72. saatte kadar sürmektedir. SPC212 hücre hatlarında 24. ve 48. saatte de S fazında blok görülürken, 72. saatte ise hücreler G2/M bloğunda tutuklanmaktadır ve Şekil 11.11'de görüldüğü gibi % 57.9 hücre G2/M fazında toplanmaktadır.

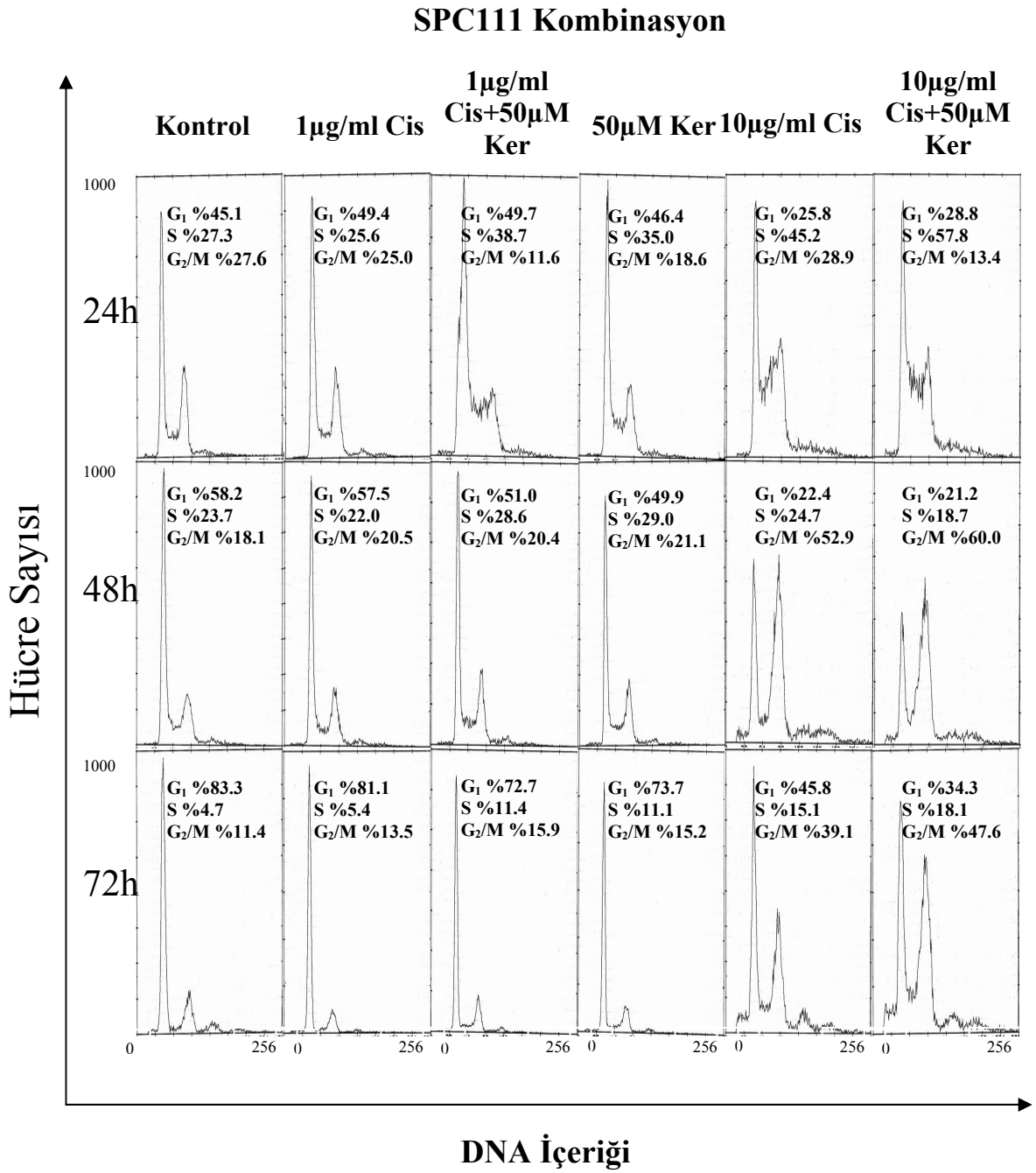


Şekil 11.11. Cisplatin'in 50µg/ml'lik dozunun SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne, zamana bağımlı etkisi görülmektedir.

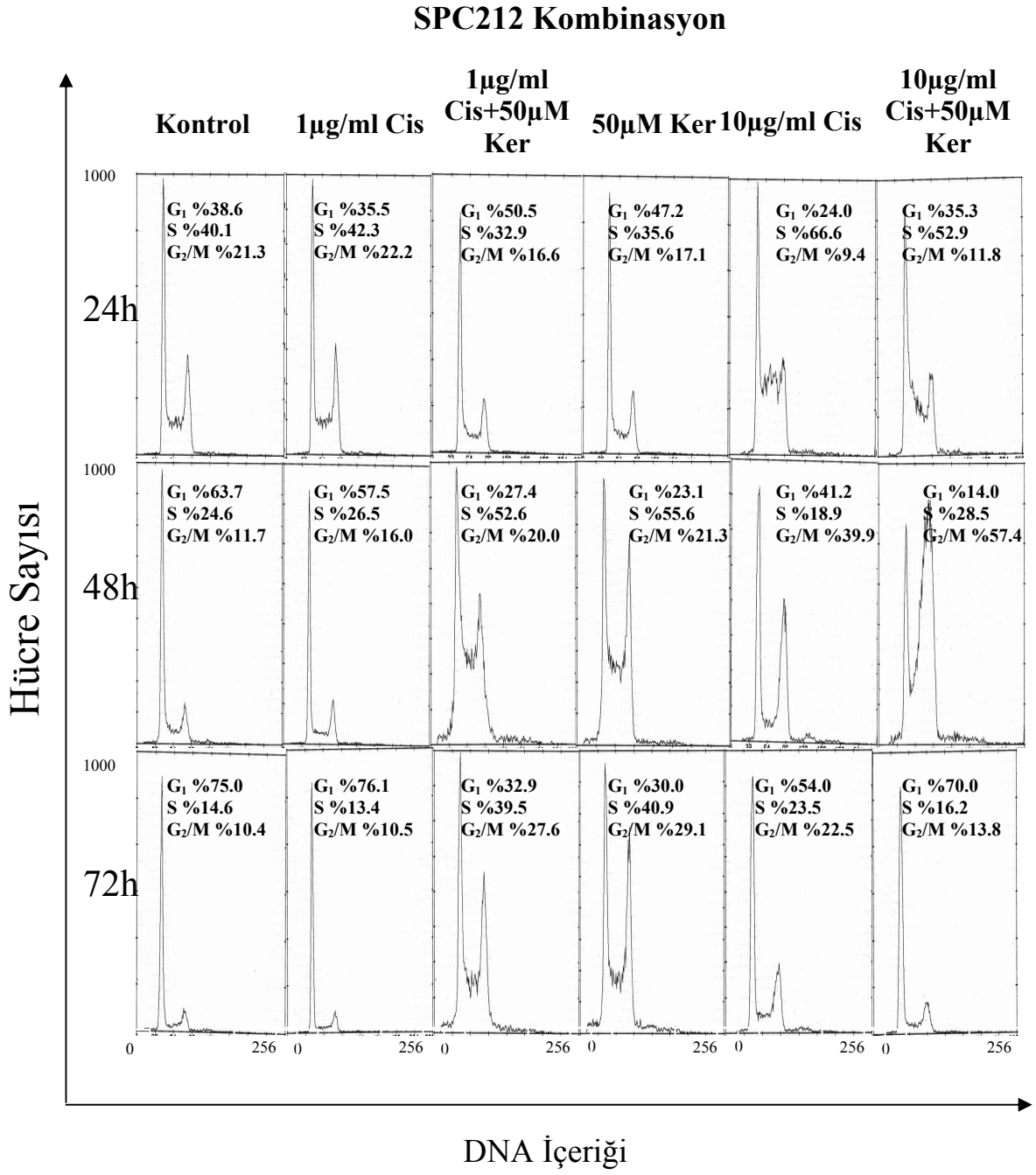
11.7. Kersetin ve Cisplatin Kombinasyonunun Hücre Döngüsüne Etkisinin İncelenmesi

Cisplatin'in SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne etkisini doz ve zamana bağlı olarak belirlemek için ekim yapılmış 24 saat sonra değişik kombinasyonlarda kersetin ve cisplatin kombinasyonu eklenmiştir. Birbirini izleyen 3 gün boyunca hücreler fikse edilip PI ile boyanarak flow sitometri cihazında sayım yapılmıştır. Deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

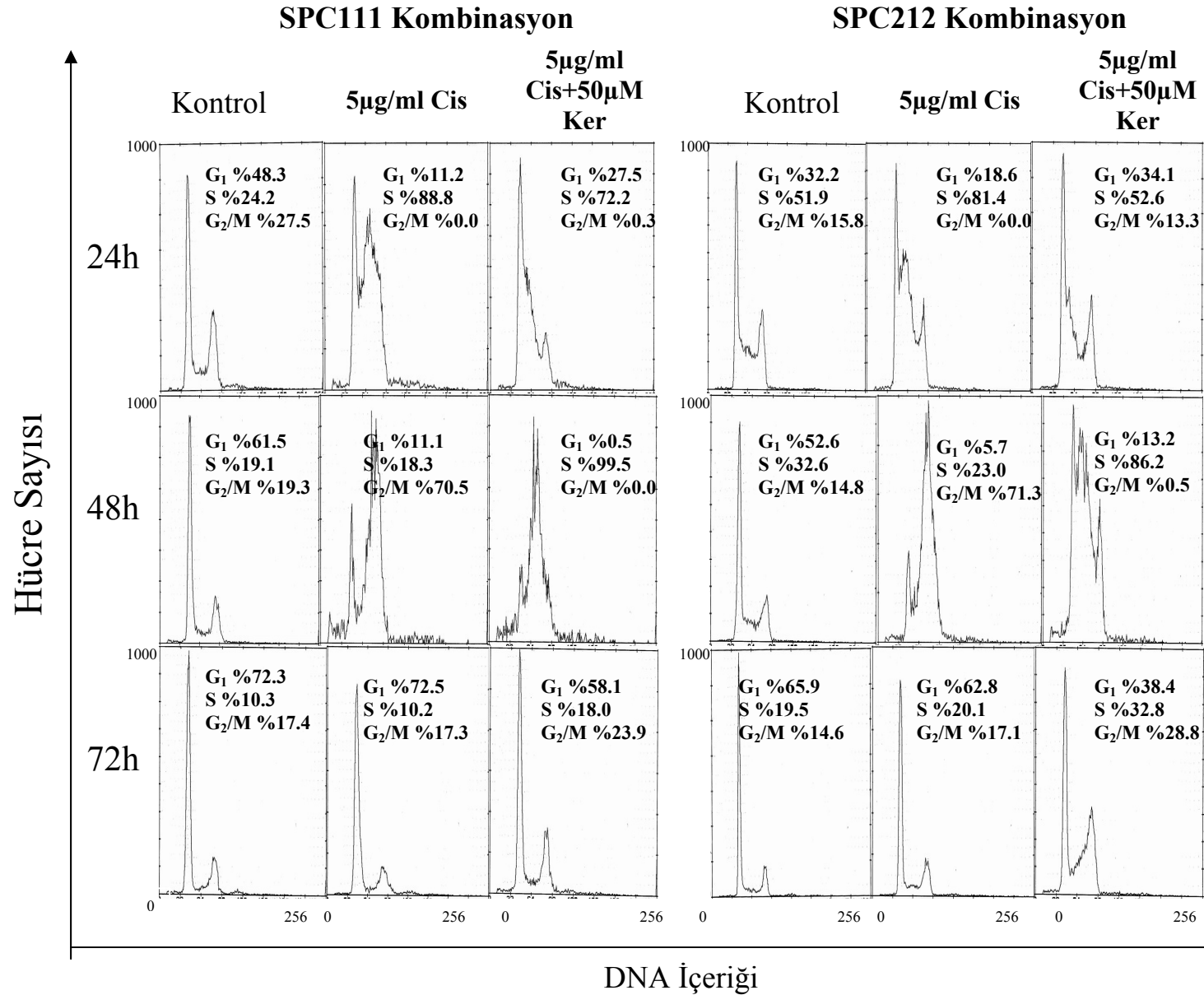
Şekil 11.12.'de görüldüğü gibi 1µg/ml Cis+50µM Qu kombinasyonunda SPC111 hücrelerinin döngüsünde etki gözlenmezken, SPC212 hücrelerinde 48 ve 72. saatte S fazı bloğuna neden olmuştur (Şekil 11.13.). Bu etki kersetinin tek etkisi nedeniyle olabilir. Her iki hücre de 5µg/ml Cis tek uygulamalarında 24. saatte S fazı bloğu oluşurken hücreler 48. saatte G2/M bloğunda tutuklanmaktadırlar. 5µg/ml Cis+50µM Qu doz uygulamaları sonucunda SPC111 hücre hatlarında 24. saatten başlayan bir S faz bloğu yapmakta ve 48. saatte de S fazında biriken hücre sayısı % 99.5'e ulaşmaktadır. Kombinasyon aynı şekilde SPC212 hücrelerinde S fazı bloğu yapmakta ve 48. saatte hücre sayısı % 86.2'ye ulaşmaktadır (Şekil 11.14.). Bu durum 5µg/ml Cis+50µM Qu kombinasyonunun her iki hücre grubu içinde kombinasyonun etkin olduğunu düşündürmektedir. 10µg/ml Cis+50µM Qu uygulaması sonucu SPC111 hücre hatlarında 24. saatte tek 10µg/ml Cis dozunda olduğu gibi S fazı bloğuna neden olmakta, 48 ve 72. saatte hücreler G2/M bloğunda birikmektedir. Bu sonuçlar etkinin kombinasyondan ziyade cisplatin tek etkisi nedeniyle olduğunu işaret etmektedir (Şekil 11.12.). SPC212 hücre hattında da aynı durum söz konusudur (Şekil 11.13.).



Şekil 11.12. 1µg/ml Cis, 10µg/ml Cis ve 50µM Qu'nun tek ve kombinasyon uygulamalarının SPC111 hücre hatlarının hücre döngüsüne zamana bağımlı etkisi görülmektedir.



Şekil 11.13. 1µg/ml Cis, 10µg/ml Cis ve 50µM Qu'nun tek ve kombinasyon uygulamalarının SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne, zamana bağlı etkisi görülmektedir.

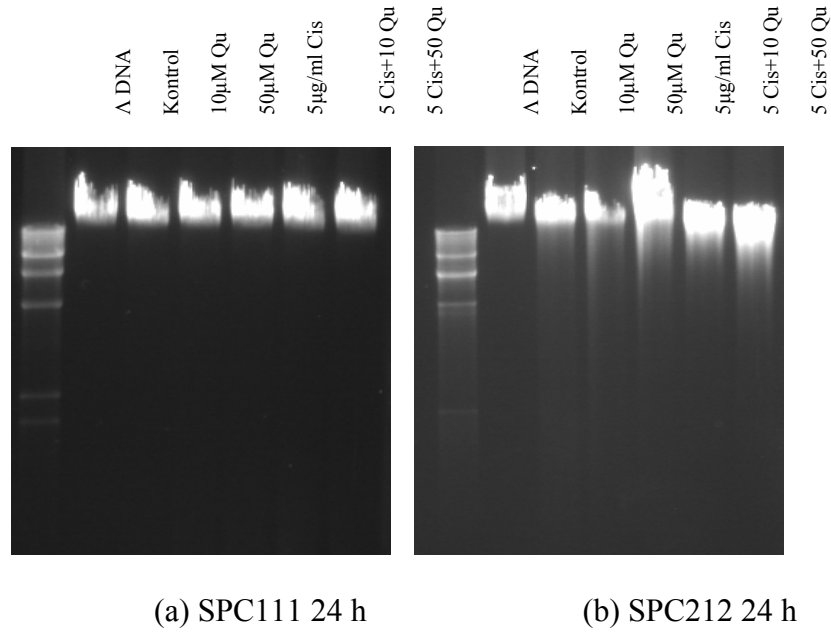


Şekil 11.14. 5µg/ml Cis ve 50µM Qu'nun tek ve kombinasyon uygulamalarının SPC111 ve SPC212 hücre hatlarının hücre döngüsüne, zamana bağlı etkisi görülmektedir.

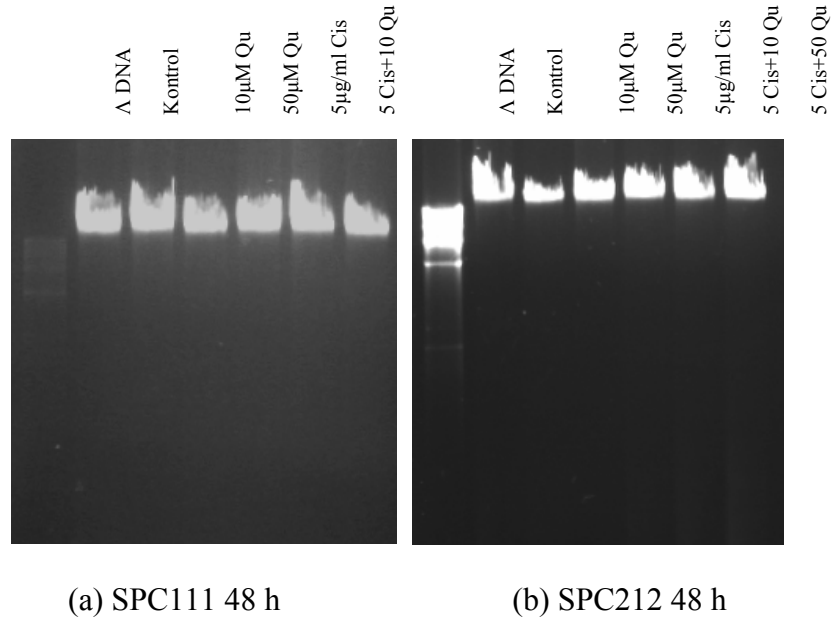
11.8. Kersetin, Cisplatin ve Kombinasyonlarının Hücre Ölümüne Etkisinin İncelenmesi

SPC111 ve SPC212 hücrelerinde kersetin, cisplatin ve kombinasyonlarının apoptoza neden olmadığı, apoptotik bir markır olan DNA laddering (merdiven) yöntemiyle incelenmiştir 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekim yapılan hücrelere 24 saat sonra kersetin, cisplatin ve kombinasyonları çeşitli dozlarda eklenmiş, 24, 48 ve 72 saat sonra DNA izolasyonları yapılmıştır. % 1'lik agarozda 2-2.5 saat yürütülen DNA'lar daha sonra U.V. görüntüleme cihazı (Photocap, Vilber Laurmat) ile görüntülenmiştir.

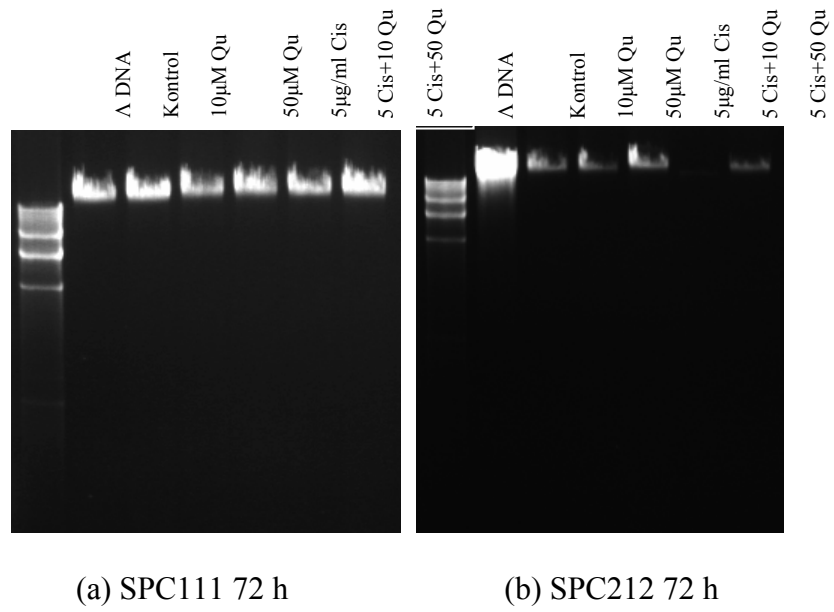
Bu deneylerde 10, 50 μ M Qu konsantrasyonları ile 5 μ g/ml Cis'in tek dozları ve 5 μ g/ml Cis+10 μ M Qu, 5 μ g/ml Cis+50 μ M Qu dozları olarak her iki hücre tipine de uygulanmıştır. Uygulanan kersetin, cisplatin ve kombinasyon dozları SPC111 ve SPC212 hücre hatlarında DNA fragmentasyonuna neden olmamıştır (Şekil 11.15., 11.16. ve 11.17.).



Şekil 11.15. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarının 24 saatlik DNA laddering profilleri gösterilmiştir.



Şekil 11.16. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarının 48 saatlik DNA laddering profilleri gösterilmiştir.



Şekil 11.17. SPC111 a ve SPC212 b hücre hatlarının 72 saatlik DNA laddering profilleri gösterilmiştir.

12. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kersetin birçok bitkide ve bitkisel besin kaynağında yaygın olarak bulunan bir bioflavonoidtir (Graefe *et al.*, 1999). Kersetin'in biyolojik etkileri arasında; anti-kanser, anti-viral, anti-trombotik, anti-iskemik, anti-inflamatör, anti-alerjik olması, arterosklerozisi ve koroner kalp hastalıklarını önlemesi ve hücrel immüniteyi stimule etmesi sayılabilir (Hertog *et al.*, 1993; Deschner *et al.*, 1991; Formica and Regelson, 1995; Gryglewski *et al.*, 1987). Ayrıca kersetinin lösemi hücreleri (Kang and Liang, 1997), meme kanseri (Choi *et al.*, 2001), kolon adenokarsinoması (Salucci *et al.*, 2002), prostat kanseri (Kobayashi *et al.*, 2002) ve endometriyal kanser (Kaneuchi *et al.*, 2003) gibi birçok kanserin büyümesini inhibe ettiği, malignant tümör hücrelerinin büyümesini; hücre döngüsünü durdurarak (Wei *et al.*, 1994; Hosokawa *et al.*, 1992) veya apoptozisi indükleyerek (Choi *et al.*, 2001; Iwao and Tsukamoto, 1999) inhibe ettiği bilinmektedir.

Cisplatin yaygın olarak kullanılan bir anti-kanser ajandır ve geniş bir anti-tümör aktiviteye sahiptir (Quin and Ng, 2001). Çoğu hücrede DNA addukt'ları oluşturarak hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Lee *et al.*, 2001).

Bu çalışmada kullanılan SPC111 ve SPC212 hücre hatları mezotelyoma hasta dokusundan izole edilmiş hücrelerdir. Bu hücreler üzerine kersetin, cisplatin ve kombinasyonlarının hücre proliferasyonuna, döngüsüne ve ölümüne etkilerinin incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Deneylerimiz sonucunda proliferasyon analizleri göz önüne alındığında, kersetin'in 50µM'ın altındaki dozlarda SPC111 hücre hattında hücre proliferasyonunu indüklerken, 50µM'lık dozda hücre büyümesini 72. saatten sonra, 100 µM'lık dozda ise hücre büyümesini 48 saatten itibaren yavaşlattığı belirlenmiştir. SPC212 hücre hattında kersetin'in 0-5µM dozlarda kontrolle karşılaştırıldığında hücreler üzerinde etkisinin olmadığı gözlenirken, 10, 50 ve 100µM konsantrasyonlarda doz artışına ve zamana bağımlı olarak hücre proliferasyonu sırasıyla 96, 72 ve 24. saatlerden itibaren yavaşlattığı belirlenmiştir.

Kesretin'in anti-proliferatif etkisi ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. 2003 yılında Ong *et al.* tarafından yapılan bir çalışmada; nazofaringeal karsinoma hücre hatları olan CNE2 ve HK1 hücreleri üzerine kersetinin anti-proliferatif etkisi araştırılmıştır. Kersetin'in doza ve zamana bağlı olarak (35 ve 54.5µM, sırasıyla 24 ve 48. saatlerde) CNE2 ve HK1 hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Tirozin kinaz ekspresyonunun büyüme kontrolünün normal düzenini bozma yeteneğiyle onkogeneze ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Boutin, 1994; Ferry *et al.*, 1996). İlerlemiş kanserli hastalarda kersetinin (60-170mg/m²) damar içine verilimi 11 hastanın 9'unda ve 1 saatte lenfosit tirozin kinazlarının inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Ferry *et al.*, 1996). Bu sonuç *in vitro* da non-malignant hücreler ve sıçan meme tümör hücreleri ile yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır (Levy *et al.*, 1984; Yokoo and Kitamura, 1997). Tirozin kinaz aktivitesini hedef alan ilaçlar konvensiyonel kemoterapide görülen sitotoksik yan etkiler olmaksızın muhtemel anti-tümör ajan olarak düşünülebilirler (Klohs *et al.*, 1997).

Cisplatin'in SPC111 ve SPC212 hücre hatlarında sitotoksik etkisinin 5 ve 10µg/ml'den ve 72. saatten sonra başladığı, 50µg/ml'lik dozda ise hücre proliferasyonunu 24 ve 48. saatten itibaren engellediği gözlenmiştir. Bu sonuç SPC212 hücrelerinin kersetin ve cisplatine diğer hücrelere göre daha hassas ve duyarlı olabileceğini işaret eder. Benzer bir çalışma Hepatoma hücreleri HepG2 (p53^{wt}) ve Hep3B (p53^{-/-}) ile yapılmış, her iki hücre hattında da cisplatinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği fakat bu etkinin zamana bağımlı olduğunu belirtmişlerdir. İki hücrede cisplatine farklı duyarlılık göstermiştir (Qin and Ng, 2001). Uveal melanoma hücre hatları (OMM1 ve OCM3)'ında ise cisplatinin proliferasyonu durdurucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (Li *et al.*, 2005).

Tek doz uygulamalarının takibinde 1µg/ml Cis+50µM Qu kombinasyonunun etkisi 96. saatten sonra her iki hücrede de gözlenmiştir. SPC111 ve SPC212 hücrelerinde 5µg/ml Cis+50µM Qu ve 10µg/ml Cis+50µM Qu kombinasyonlarının cisplatinin 5µg/ml tek dozundan daha etkili olduğu, proliferasyonu inhibe edici bu etkinin 72. saatten itibaren başladığı gözlenmiştir. Benzer bir çalışma lösemi hücre

hatların (HL-60 ve L1210) da gerçekleştirilmiştir. L1210 hücre hattına uygulanan kesretin-cisplatin kombinasyonunda kesretin ve cisplatinin sinerjik bir etki gösterdiği belirtilerek hücre ölümüne neden olduğu vurgulanmıştır (Cipak *et al.*, 2002).

Hücre döngüsü analizlerinde kesretinin SPC111 hücre hattında 5, 10 ve 50µM konsantrasyonlarda 72 saat süresince hücre döngüsü üzerinde etkili olmadığı; 100µM kesretin uygulamasının 48. saatten itibaren hücrelerin % 41.5'inin S fazında toplanmasına neden olduğu ve 72. saatte ise bu oranın artarak % 50.3'e eriştiği gözlenmiştir. SPC212 döngüsü üzerinde kesretinin etkisi daha düşük dozda (50µM) gerçekleşmektedir. 48. saatte hücreler S fazında toplanmış ve etki 72. saate kadar sürmüştür. 100µM kesretin dozu da benzer etki göstermiştir. Oral kanser hücre hattı olan SSC-9 hücrelerinde, kesretinin zamana ve doza bağlı olarak S faz bloğuna neden olduğu, bu etkinin DNA sentezinin inhibisyonu nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (Haghiac and Walle, 2005). Diğer çalışmalarda da kesretinin S fazı bloğuna neden olduğu (Cheong *et al.*, 2004) ayrıca hücre tipine bağlı olarak G1 faz (Hosokawa *et al.*, 1990) ve G2/M faz (Choi *et al.*, 2001) bloğuna neden olduğu bildirilmiştir.

Cisplatin 5 ve 10µg/ml'lik dozlarda ilk 24 saatte S fazında tutuklanmaya neden olurken, ilerleyen saatlerde hücrelerin G2/M fazına girdiği gözlenmiştir. 50µg/ml doz SPC111 hücre hattında 24. saatten itibaren belirgin olarak S fazı bloğuna neden olmakta ve bu durum 72. saatte kadar sürmektedir. SPC212 hücre hattında 24. ve 48. saatte de S fazında blok görülmektedir. Ancak 72. saatte hücreler G2/M bloğunda tutulmaktadır (% 57.9). SPC212 hücre hattında 24. saatten itibaren S fazında birikim azalırken zamana bağlı olarak G2/M fazında birikim gözlenmektedir. Hepatoma hücre hatları olan HepG2 ve Hep3B ile yapılan bir çalışmada, düşük doz cisplatinin (2µg/ml) HepG2 hücre hattında 6. saatte G1 faz bloğuna neden olduğu, 12 ile 72. saatler arasında ise G1 fazındaki hücre popülasyonunun azalarak S faz hücre popülasyonunda artış olduğu, 72. saatten sonra hücrelerin küçük bir kısmının S fazdan çıkarak apoptozise gittiği gösterilmiştir. Hep3B hücre hattında ise düşük doz cisplatin'in (2µg/ml) sub-G1 faza neden olduğu bildirilmiştir. Yüksek dozda cisplatin'in ise (16µg/ml) her iki hücre hattında da 12. saatten sonra apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (Qin and Ng, 2001).

1µg/ml Cis+50µM Qu kombinasyonunda SPC212 hücrelerinde kersetinin tek etkisi nedeniyle 48. saatten itibaren S fazı bloğu gözlenmiş ve etki 72. saatte devam etmektedir. SPC111 hücre hatlarında ise 50µM Qu ve kombinasyonun etkisi gözlenmemiştir. 5µg/ml Cis tek cisplatin uygulamasında hücreler 24. saatte S fazında ve 48. saatte G2/M'de tutuklanırken, 5µg/ml Cis+50µM Qu dozları SPC111 hücrelerinde 24. saatten başlayan bir S fazı bloğu yapmakta ve 48. saatte de S fazında biriken hücre sayısı % 99.5'e ulaşmaktadır. Bu etki kombinasyonun etkisidir. Aynı durum SPC212 hücre hattı içinde geçerlidir. 10µg/ml Cis tek uygulamasında olduğu gibi 10µg/ml Cis+50µM Qu kombinasyonu SPC111 hücre hattında 24. saatte S fazı ve 48. saatte G2/M bloğuna neden olmaktadır. SPC212 hücrelerinde de benzer durum gözlenmiştir. Lösemi hücreleri (MOLT-4) ile yapılan bir çalışmada; kersetin, ellagic asit ve resveratrolün hücre döngüsü üzerine etkileri incelendiğinde; ellagic asitin hücre döngüsü üzerine önemli bir etki göstermediği, kersetinin ise S fazı ve G2/M fazında bloğa neden olduğu ancak kersetin resveratrol ile uygulandığında 12. saatte G1 faz, 24. saatten sonra ise S fazı bloğuna neden olduğu gösterilmiştir (Mertens-Talcott *et al.*, 2004). Kersetin'in hücre döngüsünü mikromolar konsantrasyonlarda G1 faz (Yoshida *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1992), G2/M faz (Koide *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2001) veya S faz bloğuna (Richter *et al.*, 1999) neden olduğu gösterilmiştir. Madde uygulamaları hücre döngüsü kinetiğinde değişikliklere neden olur. Örneğin; kersetinin kanser hücre hatlarında DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir (Yamashita and Kawanishi, 2000; Yen *et al.*, 2003). DNA hasarına neden olan ajanların hücre döngüsünde kompleks değişikliklere sebebiyet verir ve böylece döngü fazlarında blok veya gecikmelere neden olabilir (O'Connor and Fan, 1996). Bundan sonra yapılacak çalışmamızda hücre proliferasyon ve döngü analiz sonuçlarımız doğrultusunda araştırmalarımıza moleküler düzeyde devam etmeyi planlamaktayız.

DNA Laddering sonuçları incelendiğinde her iki hücrede de herhangi bir fragmentlenme görülmemektedir. Bazen hücrelere spesifik olarak fragmentlenme gözlenmez. Bu nedenle diğer apoptotik ölçüm metodları incelenmesi gerekmektedir. Elde edilen bulgular doğrultusunda DNA laddering sonuçları ile karşılaştırmak amacıyla, Annexin V boyama ile kersetin, cisplatin ve kombinasyonlarının apoptoz profilleri çıkarmayı, Kaspaz-3 ve 9 analizleri ve bcl-2/bax seviyeleri değerlendirmeyi

ve hücre döngüsüne etki eden proteinlerin fosforilasyon düzeylerini incelemeyi hedefliyoruz.

Bu çalışma ve sonrasında elde edilecek sonuçların tıbbi uygulanabilir olması; kersetin veya kersetin-cisplatin kombinasyonlarının önümüzdeki yıllarda mezotelyomanın tedavisinde veya kullanılan tedavilerine ek tedavilere dahil olarak önerilmesini umuyoruz.

KAYNAKLAR

Ahamad A, Stevens CW, Smythe WR, *et al.*, 2003, 'Intensity-modulated radiation therapy: a novel approach to the management of malignant pleural mesothelioma'. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 55: 768–75.

American Cancer Society. 2003, 'Cancer Facts and Figures'.

Andersen MK, Krarup-Hansen A, Martensson G, *et al.*, 1999, 'Ifosfamide in malignant mesothelioma'. A Phase II study. *Lung Cancer.* 24: 39.

Appel JD, Fasy TM, Kohtz DS, *et al.*, 1988, 'Asbestos fibers mediate transformation of monkey cells by exogenous plasmid DNA'. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 7670.

Artner J, 2001, 'Cancer and Neoplasia'. *Cancer and Neoplasia.*

Astoul P, Picat-Joosen D, Viallat JR, Boutin C, 1998, 'Intrapleural administration of interleukin 2 for the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma: a phase II study'. *Cancer.* 83: 2099.

Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V, 1994, 'Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468'. *Cancer Res.* 54: 2424-2428.

Avila MA, Velasco JA, Harter KW, *et al.*, 1996, 'Quercetin as a modulator of the cellular neoplastic phenotype'. *Adv Expl Med Biol.* 401: 101-110.

Baas P, 2002, 'Chemotherapy for malignant mesothelioma: from doxorubicin to vinorelbine'. *Semin Oncol.* 29: 62-69.

Baas, P, 2005, 'Chemotherapy for malignant mesothelioma'. *Lung Cancer,* 49(1): 61-64.

Baas, P, van Meerbeeck, J, Groen, H, *et al.*, 2000, 'CaelyxTM in malignant mesothelioma: a phase II EORTC study'. *Ann Oncol.* 11: 697-700.

Bailly C, 2000, Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 7: 39-58

Bajorin D, Kelsen D, Mintzer DM, 1987, 'Phase II trial of mitomycin in malignant mesothelioma'. *Cancer Treat Rep.* 71: 857.

Baldini EH, 2004, 'External beam radiation therapy for the treatment of pleural mesothelioma'. *Thorac Surg Clin.* 14: 543.

Baris YI, Artvinli M, Sahin AA, 1979, 'Environmental mesothelioma in Turkey'. *Ann N Y Acad Sci.* 330: 423-32.

Barrett JC, 1989, 'Lamb PW, Wiseman RW. Multiple mechanisms for the carcinogenic effects of asbestos other mineral fibers'. *Environ Health Perspect.* 81: 81.

Basu J, 1999. *J. Cell Biol.* 146: 13-28.

Behnia M, Robertson KA, Martin WJ, 2000, 'Lung infections: Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease'. *Chest.* 117: 1771-7.

Belani CP, Adak S, Aisner S, *et al.*, 1999, 'Docetaxel for malignant mesothelioma'. Phase II study of the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG 2595). *Proc Am Soc Clin Oncol.* 18: 474a.

Bergsagel DJ, Finegold MG, Butel JS, *et al.*, 1992, 'DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood'. *N Engl J Med.* 326: 988-93.

Berry G, de Klerk NH, Reid A, *et al.*, 2004, 'Malignant pleural and peritoneal mesotheliomas in former miners and millers of crocidolite at Wittenoom, Western Australia'. *Occup Env Med.* 61: 14.

Bjeldanes, LF, Chang, G.W, 1977, 'Mutagenic activity of quercetin and related compounds'. *Science*. 197: 577–578.

Bloch A, Thomson CA, 1995, 'Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods'. *J Am Diet Assoc*. 95: 493-496.

Bocchetta M, Di Resta I, Powers A, *et al.*, 2000, 'Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity'. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 10214–19.

Boutin C, Nussbaum E, Monnet I, *et al.*, 1994, 'Intrapleural treatment with recombinant gamma-interferon in early stage malignant pleural mesothelioma'. *Cancer*. 74: 2460.

Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C, 1998, 'Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea'. *Food Chem Toxicol*. 36: 617-621.

Byrne, MJ, Davidson, JA, Musk, AW, *et al.*, 1999, 'Cisplatin and gemcitabine treatment for malignant mesothelioma: a phase II study'. *J Clin Oncol*. 17: 25-30.

Cahill DP, da Costa LT, Carson-Walter EB, Kinzler KW, Vogelstein B & Lengauer C, 1999. *Genomics*. 58: 181-187.

Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti , Aiello FB, Piantelli M, 2000, 'Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential'. *Int J Cancer*. 87: 595-600.

Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD, 1998, 'Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53'. *Science* 281: 1677.

Carbone M, 1999, 'Simian Virus 40 and Human Tumors: It Is Time to Study Mechanisms'. *J. Cellular Biochem*. 76: 189-193.

Carroll KK, Guthrie N, So FV, Chambers AF, 1998, 'Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids'.

Casagrande F, Darbon JM, 2001, 'Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1'. *Biochem Pharmacol.* 61: 1205–1215.

Chabner BA, Longo DL, 2001, 'Cancer chemotherapy and biotherapy'. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 453-9.

Chahinian AP, 1979, 'Case 38 1978'. *N Engl J Med.* 300: 263.

Chahinian AP, 1982, 'Malignant mesothelioma'. In: Holland JF, Frei E III, editors. *Cancer medicine*. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1744.

Chahinian AP, Pajak TF, Holland JF, *et al.*, 1982, 'Diffuse malignant mesothelioma. Prospective evaluation of 69 patients'. *Ann Intern Med.* 96: 74619.

Chahinian AP, Pajak TF, Holland JF, Green G, 1984, 'Adverse prognostic significance of thrombocytosis in patients with malignant mesothelioma'. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 25: 161.

Chahinian AP, Antman K, Goutsou M, *et al.*, 1993, 'Randomized phase II trial of cisplatin with mitomycin or doxorubicin for malignant mesothelioma by the Cancer and Leukemia Group B'. *J Clin Oncol.* 11: 1559.

Chan WS, Wen PC, Chiang HC, 1995, 'Structure-activity relationship of caffeic acid analogues on xanthine oxidase inhibition'. *Anticancer Res.* 15: 703-707.

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, 1993, 'Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase'. *Anticancer Res.* 13: 2165-2170.

Cheng JQ, Jhanwar SC, Kein WM, *et al.*, 1994, 'p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma'. *Cancer Res.* 54: 5547.

Cheng M, Sexl V, Sherr C & Roussel M, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1091-1094.

Cheong E, Ivory K, Doleman J, Parker ML, Rhodes M *et al.*, 2004, 'Synthetic and naturally occurring COX-2 inhibitors suppress proliferation in a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by inducing apoptosis and cell cycle arrest'. *Carcinogenesis*. 25: 1945-1952.

Chin PL, Momand J, Pfeifer GP, 1997, 'In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation'. *Oncogene*. 15: 87.

Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ *et al.*, 2001, 'Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin'. *Int J Oncol.* 19: 837-844.

Cipak L *et al.*, 2003, 'Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells'. *Leukemia Research*. 27: 65-72.

Cody V, 1986, 'Plant Flavonoids in Biology and Medicine'. *Prog Biol Res.* 213.

Cody V, 1988, 'Plant Flavonoids Biology, Medicine, part II'. *Prog Biol Res.* 280.

Cohen JJ, 1998, 'Apoptosis'. *Postgraduate Syllabus (AAAA-I)*. 1: 1-19.

Conklin DR, Tan KH, Aschner M, 1998, 'Dimethyl sulfoxide, but not acidosis induced metallothionein mRNA expression in neonatal rat primary astrocyte cultures is inhibited by the bioflavonoid, quercetin'. *Brain Res.* 794: 304-308.

Cooper GM, 1994, 'Chapter 14: Programmed cell death'. *The cell*,

Washington, ASM Pres. 592-6.

Coste F, Malinge JM, Serre L, Shephard W, Roth M, Leng M and Zelwer C, 1999, 'Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site'. *Nucleic Acids Res.* 27: 1837–1846.

Coşkun T, 2005, 'Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri'. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 48: 69-84.

Cote RJ, Jhanwar S, Novick S, 1991, 'Genetic alterations of the *p53* gene are a common feature of malignant mesotheliomas'. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 32: 301.

Cotran RS, Kumar V, Collins T, 1999, 'Robbins Pathology of Disease'. Philadelphia: Saunders. 18.

Coulter WH, 1956, 'High-speed automatic blood cell counter and cell analyzer'. *Proc Natl Electron Conf.* 12: 1034.

Cram LS, Bartholdi MF, Wheelles LL, Gray JW, 1993, 'Morphological analysis by scanning flow cytometry'. In: Van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, Melamed MR. *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis.* London, Academic Press. 164-194.

Crossland-Taylor PJ, 1953, 'A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube'. *Nature.* 171: 37.

Darzynkiewicz Z, Crissman HA and Robinson JP, 2001, 'Methods in Cell Biology'. *Flow Cytometry.* Academic Pres Inc., San Diego. 3nd. Edition, Vol 64, Part B.

Davis W, Lamson MS, ND and Matthew S, Brignall ND, 2000, 'Antioxidants and Cancer III: Quercetin'. *Altern Med Rev.* 5 (3): 196-208.

De Klerk NH, Musk AW, 2002, 'Epidemiology of mesothelioma. In: Robinson BWS, Chahinian AP, eds. *Mesothelioma*'. London: Martin Dunitz. 339–50.

De Klerk NH, Olsen N, Threlfall T, Shilkin K, Lee E, Musk AW, 2004, 'Mesothelioma survival in Western Australia'. Perth: 1st Perth Mesothelioma Centre Symposium.

Dean PN, 1990, 'Data processing'. In: Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML. *Flow Cytometry and Sorting*. New York, Wiley-Liss. 415-444.

Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL, 1991, 'Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia'. *Carcinogenesis*.12: 1193-1196.

DeVita NT, Hellman S, Rosenberg SA, eds., 1997, 'Cancer: Principles and Practice of Oncology', 5ed. Philadelphia, PA: Lippencott-Raven.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F, 1999, 'Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs'. *Life Sci* 65: 337-353.

Di Pietro A, Dayan G, Conseil G, Steinfels E, Krell T, Tromprier D, Baubichon-Cortay H, Jault J, 1999, 'P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: Using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships'. *Braz J Med Biol Res*. 32: 925-939.

Dobles M, Liberal V, Scott M, Benezza R & Sorger P, 2000. *Cell*. 101: 635-645.

Doğan H, 2003, 'Doğal ve Sentetik Zeolitler ve Uygulama Alanları'. Bor Teknolojileri ve Mineraller Grubu. TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi.

Draetta G & Eckstein J, 1997. *Biochem. Biophys. Acta*. 1332-1337.

Dreher D, Junod AF, 1996, 'Role of oxygen free radicals in cancer development'. *Eur. J. Cancer*. 32A: 30-38.

Dreyfus DH, Nagasawa M, Kelleher CA, Gelfand EW, 2000, 'Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF-1-encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphoblastoid cells'. *Blood*. 96: 625.

Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL, 1997, 'The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells'. *Mutat Res*. 390: 141–151.

Elangovan V, Sekar N, Govindasamy S, 1994, 'Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis'. *Cancer Lett*. 87: 107-113.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu PE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Merceur WE, Kinzler KW, Vogelstein B, 1993, 'WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression'. *Cell*. 75: 817.

Encyclopaedia Britannica. 2001, Cancer. In: Encyclopaedia Britannica, available [online]: <http://www.britannica.com/eb/article?eu=108748&tocid=0>, visited 07.06.

Fazal F, Rahman A, Greensill J, Ainley K, Hadi SM, Parish JH, 1990, 'Strand scission in DNA by quercetin and Cu(II): identification of free radical intermediates and biological consequences of scission'. *Carcinogenesis*. 11: 2005–2008.

Fearon ER, 1998, 'Tumor Suppressor Genes, The Genetic Basis of Human Cancer'. McGraw Hill, New York. 229.

Ferriola PC, Cody V, Middleton EJR, 1989, 'Protein-kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationship'. *Biochem Pharmacol*. 38: 1617–1624.

Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, *et al.*, 1996, 'Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition'. *Clin Cancer Res*. 2: 659-668.

Fired J, 1976, 'Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide'. J. Cell Biol. 71: 172-181.

Fong KM, Minna JD, 2002, 'Molecular biology of lung cancer: clinical implication'. Clinics In Chest Medicine. 23: 83-101.

Fong KW, Sekido Y, Minna JD, 1999, 'Molecular pathogenesis of lung cancer'. J Thorac Cardiovasc Surg. 118: 1136-1152.

Formica JV, Regelson W, 1995, 'Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids'. Food Chem. Toxicol. 33: 1061-1080.

Foulke RS, Davision K, Zaloznik AJ, Hoff DV, 1991, 'Absence of oncogene amplification in malignant mesothelioma specimens'. Proc Am Soc Clin Oncol. 10:302.

Fram RJ, 1992, 'Cisplatin and platinum analogues: recent advances'. Curr. Opin. Oncol. 4: 1073-1079.

Fuller TA, 1980, 'The physics of surgical lasers'. Laser Surg Med. 1: 15.

Fulwyler MJ, 1965, 'Electron separation of biological cells by volume'. Science. 150: 910.

Functional foods: nutrition therapy for tomorrow?
http://www.thelondonfreepress.com/HealthDOC/nutrition_article-dec.html, 2005.

Furnari B, Rhind N & Russell P, 1997. Science. 1495.

Gabrielson EW, Lechner JF, Gerwin BI, *et al.*, 1987, 'Growth factors for mesothelial and mesothelioma cells'. Chest. 91: 17S.

Gaines R *et al.*, 1997, 'Dana's New Mineralogy'. Ohn Wiley and Sons, New York.

Gazdar AF, Carbone M, 2003, 'Molecular pathogenesis of mesothelioma and its relationship to simian virus 40'. *Clin Lung Cancer*. 5: 177–81.

Gerwin BI, Lechner JF, Reddel RR, *et al.*, 1987, 'Comparison of production of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor by normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines'. *Cancer Res*. 47: 6180.

Giaccia AJ, Kastan MB, 1998, 'The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals'. *Gene Dev*. 12: 2973.

Gibas Z, Li FP, Antman KH, *et al.*, 1986, 'Chromosome changes in malignant mesothelioma'. *Cancer Genet Cytogenet*. 20: 191.

Go R, Adjel A, 1999, 'Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin'. *J Clin Oncol*. 17 (1): 409-22.

Graefe EU, Derendorf H, Veit M, 1999, 'Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans'. *Int. J Clin Pharmacol Ther*. 37: 219

Gray JW, 1986, 'Cell cycle analysis using flow cytometry'. *Int. J. Radiat. Biol*. 49 (2): 237-55.

Groeger AM, Esposito V, Mueller M., *et al.*, 1997, 'Advances in the understanding of lung cancer'. *Anticancer Research*. 17: 2519-2522.

Grylewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J, 1987, 'On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids'. *Biochem. Pharmacol*. 36: 317-322.

Guyton KZ, Kensler TW, 1993, 'Oxidative mechanism in carcinogenesis'. *Br. Med. Bull*. 49: 523-544.

Haghiac M and Walle T, 2005, 'Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells'. *Nutrition and Cancer*. 53: 220-231.

Halilçolar H, Tatar D, Ertuğrul G, *et al.*, 1999, 'Epidemiyoloji. Akciğer Kanseri Multidisipliner Yaklaşım'. Akkoçlu A, Öztürk C. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.17-23.

Hanahan D & Weinberg R, 2000. Cell. 100: 57-63.

Harborne JB, Williams CA, 2000, 'Advances in flavonoid research since 1992'. Phytochemistry. 55: 481-504.

Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI, 2001, 'Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers'. Science. 294: 1684-1688.

Hartwell LH and Weinert TA, 1988. Science. 241: 317.

Hartwell LH and Weinert TA, 1989. Science. 246: 629-634.

Harvey VJ, Slevin ML, Ponder BAJ, *et al.*, 1984, 'Chemotherapy of diffuse malignant mesothelioma'. Cancer. 54: 961.

Haschke F, Firmansyah A, Meng M, Steenhout P, Carriè A-L, 2001, 'Monatsschr Kinderheilkd'. 149 (Suppl): 66-70.

He X, Patterson TE & Sazer S, 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 7965-7.

Heald R, McLoughlin M & F, M, 1993. Cell. 74: 463-466.

Hemminki A, 2001, 'From molecular changes to customised therapy'. Eur J Cancer. 38: 333.

Hengartner MO, 2000, 'The biochemistry of apoptosis'. Nature. 407: 770-776.

Herbert DJ, 1989, 'Effects of several commonly used fixatives on DNA and total nuclear protein analysis by flow cytometry'. AM. J. Clin. Pathol. 91: 535-541.

Hershko A, 1997, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 788-799.

Hertog MGL, Fesken EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D, 1993, 'Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diseases: the Zutphen Elderly Study'. *Lancet.* 342: 1007-1011.

Hiebert RD, Sweet RG, 1983, 'Electronics for flow cytometers and sorters'. In: Van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, Melamed MR. *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis.* London, Academic Press. 130-163.

Hiebert SW, 1993, 'Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRB-mediated growth suppression'. *Mol Cell Biol.* 13: 3384-91.

Hillerdal G, 1983, 'Malignant mesothelioma 1982: review of 4710 published cases'. *Br J Dis Chest.* 77: 321.

Hirano T, Gotoh M, Oka K, 1994, 'Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells'. *Life Sci.* 55: 1061-1069.

Hirvonen, A. *et al.*, 1999, 'Simian Virus 40 (SV40)-Like DNA Sequences Not Detectable in Finnish Mesothelioma Patients Not Exposed to SV40-Contaminated Polio Vaccines', *Molecular Carcinogenesis.* 26: 93-99.

Hollman PC, Katan MB, 1999, 'Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability'. *Food Chem Toxicol.* 37: 937-942.

Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, Kawai K and Nagata K, 1992, 'Inhibition of the activation of heat shock factor *in vivo* and *in vitro* by flavonoids'. *Mol Cell.* 12: 3490-3498.

Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T, Yoshida M, Marui N *et al.*, 1990, 'Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-regulated 17-kDa protein, in human colon cancer cells'. *Int J Cancer.* 45: 1119-1124.

<http://www.enlimining.net>, 2004

<http://www.cancer.gov/publications>

<http://www.goguscerrahisi.com/mak/Mak032.html>, 2006.

http://www.mesoinfo.com/mesothelioma_information/Mesothelioma_index.html, 2006

<http://www.mesothelioma-tr.org/saglik/meztanim.php>, 2006.

<http://www.scq.ubc.ca/?p=248>, 2006.

<http://www.tipterimleri.com/ara.asp>, 2006.

Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS, 1997, 'Inhibition of estrone sulfatase in human liver microsomes by quercetin, other flavonoids'. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 63: 9–15.

Hunt T, Murray A, 1993. *The Cell Cycle*, Freeman, New York.

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC, 2003, 'Radical causes of cancer'. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 276–285.

Ishidate Jr, M, Harnois, MC, Sofuni T., 1988, 'A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures'. *Mutat. Res.* 195: 151–213.

Iwao K. and Tsukamoto I, 1999, 'Quercetin inhibited DNA synthesis and induced apoptosis associated with increase in c-fos mRNA level and the upregulation of p21WAF1/CIP1 mRNA and protein expression during liver regeneration after partial hepatectomy'. *Biochim Biophys Acta.* 1427: 112-120.

Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T, 2000, 'Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells'. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64: 1813-1820.

Jacobson DR, 1999, 'Ras mutations in lung cancer. Lung tumors fundamental biology and clinical management'. New York, Marcel Dekker Inc. 139-156.

Jamieson ER and Lippard SJ, 1999, "Structure, Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts," *Chem. Rev.* 99: 2467-2498.

Jaurand MC, Fleury J, Monchaux G, *et al.*, 1987, 'Pleural carcinogenic potency of mineral fibers (asbestos attapulgite) and their cytotoxicity on cultured cells'. *J Natl Cancer Inst.* 79: 797.

Jaurand MC, Kheuang L, Magne J, Bignon J, 1986, 'Chromosomal changes induced by chrysotile fibres or benzo-3, 4-pyrene in rat pleural mesothelial cells'. *Mutat Res.* 169: 141.

Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ, 1998, 'Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 AND Mdm2'. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 8292.

Kandaswami C, Middleton EJR, 1994, 'Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids'. *Adv Exp Med Biol.* 366: 351-376.

Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Sakuragi N, Fujimoto S and Dahiya R, 2003, 'Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1'. *Int J Oncol.* 22: 159-164.

Kang TB and Liang NC, 1997, 'Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukaemia cells'. *Biochem Pharmacol.* 54: 1013-1018.

Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B and Fornace AJ, Jr., 1992. 'A mammalian cell cycle checkpoint

pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia'. *Cell*. 71: 587-597.

Katmentsky LA, Melamed MR, Derman H, 1965, 'Spectrofotometer: New Instrument for ultrarapid cell analysis'. *Science*. 150: 630.

Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M, 1999, 'Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines'. *Biosci Biotechnol Biochem*. 63: 896-899.

Kearns WG, Liu JM, 2001, 'Cell Cycle Checkpoint Genes and Aneuploidy: A Short Review'. *Current Genomics*. 2: 171-180.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR, 1972, 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics'. *Br J Cancer*. 26: 239-57.

Kim SY, Gao JJ, Kang HK, 2000, 'Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line'. *Biol Pharm Bull*. 23: 451-455.

Kim TW, Lee YS and Lee SJ, 2001, 'Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin'. *Int J Oncol*. 19: 837-844.

Kim WK, Bang MH, Kim ES, Kang NE, Jung KC, Cho HJ and Park JHY, 2005, 'Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells'. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 16: 155-162.

Kioka M, Hosokawa N, Komano T, Hirayoshi K, Nagata K, Ueda K, 1992, 'Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the increase of human multidrug resistance gene (MDR1) expression caused by arsenite'. *FEBS Lett*. 301: 307-309.

Kitagawa R & Rose A, 1999. *Nature Cell Biol*. 1: 514-521.

Klaunig JE, Kamendulis LM, 2004, 'The role of oxidative stress in carcinogenesis'. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 239–267.

Klohs WD, Fry DW, Kraker AJ, 1997, 'Inhibitors of tyrosine kinase'. *Curr Opin Oncol.* 9: 562-568.

Knudson AGJR, 1971, 'Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma'. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68: 820.

Knudson AGJR, 1978, 'Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm'. *Semin. Oncol.* 5: 57-60.

Kobayashi T, Nakata T and Kuzumaki T, 2002, 'Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells'. *Cancer Lett.* 176: 17-23.

Koide T, Kamei H, Hashimoto Y, Kojima T, Terabe K, Umeda T, 1997, 'Influence of flavonoids on cell cycle phase as analyzed by flow-cytometry'. *Cancer Biother. Radiopharm.* 12: 111-115.

Kolch W, 2000, 'Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions'. *Biochem J.* 351: 289–305.

Konig A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabrilove JL, 1997, 'The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines'. *Blood.* 90: 4307-4312.

Kosty MP, Herndon JE, Vogelzang NJ, *et al.*, 2001, 'High-dose doxorubicin, dexrazoxane, and GM-CSF in malignant mesothelioma: a phase II study; Cancer and Leukemia Group B 9631'. *Lung Cancer.* 34: 289-295.

Kouchi Y, Maeda Y, Ohuchida A and Ohsawa M, 1996, 'Immunotoxic effect of low dose cisplatin in mice'. *J. Toxicol. Sci.* 21: 227–233.

Kufe, Donald W, Pollock, Raphael E, Weichselbaum, Ralph R, Bast, Robert C, Gansler Jr, Ted S, Holland, James F, Frei III, Emil, c2003, *Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton (Canada): BC Decker Inc.

Kuhlman MK, Horsch E, Burkhardt G, *et al.*, 1998, 'Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin'. *Arch Toxicol*. 72: 536-540.

Kuntz S, Wenzel U, Daniel H, 1999, 'Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines'. *Eur J Nutr*. 38: 133-142.

Lahiri-Chatterjee M, Katiyar SK, Mohan RR, Agarwal R, 1999, 'A flavonoid antioxidant, silymarin, affords exceptionally high protection against tumor promotion in the SENCAR mouse skin tumorigenesis model'. *Cancer Res*. 59: 622-632.

Lamb P, Wiseman R, Ozawa N, *et al.*, 1988, 'Detection of transforming genes in human mesotheliomas. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 29: 142.

Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN, 2000, 'Intake of flavonoids and lung cancer'. *J Natl Cancer Inst*. 92: 154-160.

Lechner JF, Tokiwa T, LaVeck M, *et al.*, 1985, 'Asbestos-associated chromosomal changes in human mesothelial cells'. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:3884.

Lecture GFF, 1996, 'Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors'. *Chest*. 109 (Suppl): 14-19.

Lee BJ, Chon KM, Kim YS, An WG, Roh HJ, Goh EK, Wang SG, 2005, 'Effects of cisplatin, 5-fluorouracil, and radiation on cell cycle regulation and apoptosis in the hypopharyngeal carcinoma cell line'. *Chemotherapy*. 51 (2-3): 103-10.

Lee RH, Song JM, Park MY, Kang SK, Kim YK, Jung JS, 2001, 'Cisplatin induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells'. *Biochem Pharmacol.* 62: 1013-23.

Lee TC, Zhang Y, Aston C, *et al.*, 1993, 'Normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines express insulin-like growth factor I and associated molecules'. *Cancer Res.* 53: 2858.

Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC, 2002, 'Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease'. *Biochem Pharmacol* 63: 225-236.

Lerner, HJ, Schoenfeld, DA, Martin, A, *et al.*, 1983, 'Malignant mesothelioma: the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) experience'. *Cancer.* 52: 1981-1985.

Levine AJ, 1997, 'P53: The cellular gatekeeper for growth, division'. *Cell* 88: 323.

Levy J, Teuerstein I, Marbach M, *et al.*, 1984, 'Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: inhibition by quercetin'. *Biochem Biophys Res Commun.* 123: 1227-1233.

Lewin B, 1997, Chapter 36: 'Apoptosis. Genes VI'. New York: Oxford University Press; 1122-9.

Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Alizadeh H, 2005, 'Down regulation of surviving expression enhances sensitivity of cultured uveal melanoma cells to cisplatin treatment'. *Experimental Eye Research.* 83: 176-182.

Libbus BL, Illenye SA, Craighead JE, 1989, 'Induction of DNA strand breaks in cultured rat embryo cells by crocidolite asbestos as assessed by Nick translation'. *Cancer Res.* 49: 5713.

Linke SP, Clarkin KC, DiLeonardo A, Tsou A, Wahl GM, 1996, 'A reversible, p53-dependent G0/G1 cell-cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage'. *Genes Dev.* 10: 934.

Liu F, Stanton, J.Wu, Z & Piwnica-Worms H, 1997. *Mol. Cell Biol.* 2: 571-583.

Liu RH, 2003, 'Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals'. *Am J Clin Nutr.* 78 (Suppl): 517-520.

Loft S, Poulsen HE, 1996, 'Cancer risk and oxidative DNA damage in man'. *J. Mol. Med.-JMM.* 74: 297–312.

M. Oren, 2003, 'Decision making by p53: life, death and cancer'. *Cell Death Differ.* 10: 431–442.

Mabry M, 1998, 'Activating oncogenes in lung cancer. In: Kane MA, Bunn PA, eds. *Biology of lung cancer*'. New York, Marcel Dekker Inc. 391-412.

Magri MD, Veronesi A, Foladore S, *et al.*, 1991, 'Epirubicin in the treatment of malignant mesothelioma: a phase II cooperative study'. *Tumori.* 77: 49-51.

Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK, 1989, 'Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II'. *Cancer Res.* 49: 5111-5117.

Marsh JP, Mossman BT, 1988, 'Mechanisms of induction of ornithine decarboxylase activity in tracheal epithelial cells by asbestiform minerals'. *Cancer Res.* 48: 709.

Mata-Greenwood E, Ito A, Westenburg H, Cui B, Mehta RG, Kinghorn AD, Pezzuto JM, 2001, 'Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells'. *Anticancer Res.* 21: 1763-1770.

McDonald JC, 1985, 'Health implications of environmental exposure to asbestos'. *Environ Health Perspect.* 62: 319-328.

McEvoy GK, 2004, *Drug Information*. Bethesda, Maryland: American Society of Health-System Pharmacists, Inc. 929-45.

Melnick JL, Stingbaugh S, 1962, 'Excretion of SV40 after ingestion as contaminant of oral poliovaccine'. *Proc Soc Exp Biol Med.* 109: 965-968.

Mendelsohn ML, 1980, 'The attributes and applications of flow cytometry'. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 274: 15,

Mertens-Talcott SU, Percival SS, 2004, 'Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells'. *Cancer Letters.* 218: 141-151.

Metcalf RA, Welsh JA, Bennett WP, *et al.*, 1992, 'p53 and Kirsten-*ras* mutations in human mesothelioma cell lines'. *Cancer Res.* 52: 2610.

Middleton EJr, Kandaswami C, 1994, 'The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer'. In: Harborne JB, editor. *The flavonoids advances in research since 1986*. 1st edition. London: Chapman and Hall. 619-652.

Miyagi Y, Om AS, Chee KM, Bennink MR, 2000, 'Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice'. *Nutr Cancer.* 36: 224-249.

Moberg K, Starz MA & Lees JA, 1996, 'E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry'. *Mol Cell Biol.* 16: 1436-49.

Moldaven A, 1934, 'Photo-electric technique for the counting of microscopic cells'. *Science.* 80: 188.

Morgan DO, 1997, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261-291.

Mossman BT, Bignon J, Corn M, *et al.*, 1990, 'Asbestos: scientific developments and implications for public policy'. *Science*. 247: 294.

Mossman BT, Gee JB, 1989, 'Asbestos-related diseases. *N Engl J Med*. 320: 1721.

Muirhead K, 1987, 'Induction to a flow cytometer. Annual course in flow cytometry: Applications in Immunobiology and Cell Biology'. Los Alamos. N.M. National Flow Cytometry Resource and Smith Kline and French Laboratories. 11-20.

Musk AW, 1995, 'More cases of miliary mesothelioma'. *Chest*. 108: 587.

Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K, 2000, 'Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: Structure-activity relationship'. *Jpn J Cancer Res*. 91: 686-691.

Nagata S, 1997, 'Apoptosis by death factor'. *Cell*. 88: 355-65.

Nakayasu M, Sakamoto H, Terada M, Nagao M, Sugimura T, 1986, 'Mutagenicity of quercetin in Chinese hamster lung cells in culture'. *Mutat. Res*. 174: 79-83.

Nass-Arden L, Breitbart H, 1990, 'Modulation of mammalian sperm motility by quercetin'. *Mol Reprod Dev*. 25: 369-373.

Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H, 2004, 'The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells'. *Carcinogenesis*. 25: 647-659.

Nieto Y, 2003, 'DNA-binding agents. *Cancer Chemotherapy & Biological Response Modifiers*' Annual. 21:Chapter 8.

Niklinski J, Niklinska W, Chyczewska E, *et al.*, 2004, 'The epidemiology of asbestos-related diseases'. *Lung Cancer*. 45: 7-15.

Niknafs B, Hosseini SF, 2002, 'Cell Cycle Analysis of Human Ovarian Carcinoma (OV2008) After Application of Different Doses of Cisplatin'. *Guilan University of Medical Sciences*. 42 (11).

Nowak AK, Lake RA, Kindler HL, Bruce, *et al.*, 2002, 'New approaches for mesothelioma: Biologics, vaccines, gene therapy, and other novel agents'. *Semin Oncol*. 29: 82-96.

Nurse P, Masui Y and Hartwell L, 1998, *Nature Med*. 4:1103-1106.

O'Connor PM, Fan S, 1996, 'DNA damage checkpoints: implication for cancer therapy'. *Prog. Cell Cycle Res*. 2: 165-173.

Ogretmen B, Bahadori H, McCauley M, *et al.*, 1998, 'Co-ordinated over-expression of the *MRP* and gamma-glutamylcysteine synthetase genes, but not *MDR1*, correlates with doxorubicin resistance in human malignant mesothelioma cell lines'. *Int J Cancer*. 75: 757.

Ong CS *et al.*, 2003, 'Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions'. *Oncology Reports*. 11: 727-733.

Oren M, 2003, 'Decision making by p53: life, death and cancer'. *Cell Death Differ*. 10: 431-442.

Ouyang B, Lan Z, Meadows J, Pan H, Fukasawa K, Li W & Dai W, 1998, 'Cell Growth and Differentiation'. 9: 877-85.

Owens MA, Loken MR, 1995, 'Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice'. New York: Wiley-Liss. 288p.

Ozvaran MK, Cao X, Miller SD, *et al.*, 2002, 'Histone deacetylase inhibition augments human mesothelioma cellular response to chemotherapy'. [abstract] *Am J Respir Crit Care Med.* 165 (Suppl): 33.

Özvaran MK, 2004, 'Malign Mezotelyomada Gen Tedavisi'. *Toraks Dergisi.* 5 (2): 110-115.

Paper DH, 1998, 'Natural products as angiogenesis inhibitors'. *Planta Med.* 64: 686-695.

Papi M. *et al.*, 2005, 'Malignant pericardial mesothelioma. Report of two cases, review of the literature and differential diagnosis'. *Tumori.* 91 (3): 276-9.

Park DS, Stefanis L, Greene LA, 1997, 'Ordering the Multiple Pathways of Apoptosis'. *Trends Cardiovasc Med.* 7: 294-301.

Park M, 1998, 'Oncogenes, The Genetic Basis of Human Cancer'. McGraw Hill, New York. 205.

Perkins AS, Stern DF, 1997, 'Apoptosis, Cancer Principle and Practice of Oncology'. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Philadelphia: Lippincott-Raven. 96-100.

Peto J, Seidman H, Selikoff IJ, 1982, 'Mesothelioma mortality in asbestos workers: implications for models of carcinogenesis and risk assessment'. *Br J Can.* 45: 124-135.

Pil P, Lippard SJ, 1997, 'In Encyclopedia of Cancer'. Bertino, J. R. Ed. Academic Press: San Diego, CA. 1: 392-410.

Pines J, 1999. *Nat. Cell Biol.* 1: 73-79.

Pinkel D, Stovel R, 1983, 'Flow chambers and sample handling'. In: Van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, Melamed MR. Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis. London, Academic Press. 78-129.

Pistolesi M and Rusthoven J, 2004, 'Malignant Pleural Mesothelioma. Update, Current Management, and Newer Therapeutic Strategies'. CHEST. 126: 1318-1329.

Popescu NC, Chahinian AP, DiPaolo JA, 1988, 'Nonrandom chromosome alterations in human malignant mesothelioma'. Cancer Res. 48: 142.

Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods. J Am Diet Assoc 1995; 95: 493-496.

Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C, Chulia AJ, 2001, 'Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells'. Bioorg Med Chem Lett. 11: 3095-3097.

Qin LF, Ng IOL, 2001, 'Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins, cell cycle changes in hepatoma cells'. Cancer Letters. 175: 27-38.

Raghavan D, Gianoutsos P, Bishop J, *et al.*, 1990, 'Phase II trial of carboplatin in the management of malignant mesothelioma'. J Clin Oncol. 8: 151.

Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, *et al.*, 1999, 'Quercetin inhibits p21-ras expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors'. Int J Cancer. 85: 438-445.

Reddel RR, Malan-Shibley L, Gerwin BI, *et al.*, 1989, 'Tumorigenicity of human mesothelial cell line transfected with EJ-ras oncogene'. J Natl Cancer Inst. 81: 945.

Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L, 2003, 'Flavonoids: Promising Anticancer Agents'. Medicinal Research Reviews. 4 (23): 519-534.

Richter M, Ebermann R, Marian B, 1999, 'Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling'. *Nutr. Cancer.* 34: 88-99.

Riesbeck K, 1999, 'Cisplatin at clinically relevant concentrations enhances interleukin-2 synthesis by human primary blood lymphocytes'. *Anticancer Drugs.* 10: 219–227.

Riley RS, Mahin EJ, 1989, 'Flow Cytometry Clinical Applications ASCP National Meeting Fall', Washington D.C. 3-15.

Robert A, 1991, 'Weinberg. Tumor Suppressor Genes. *Science*'. 1138-1143.

Roberts BT, Farr KA & Hoyt MA, 1994. *Mol. Cell Biol.* 14: 8282-8291.

Robinson BWS, Musk AW and Lake RA, 2005, 'Malignant Mesothelioma', *The Lancet.* 366: 397-408.

Rocco JW, Sidransky D, 2001, 'p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression'. *Exp Cell Res.* 264: 42.

Rong Y, Yang EB, Zhang K, Mack P, 2000, 'Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression'. *Anticancer Res.* 20: 4339-4345.

Rosenberg B, 1985, 'Fundamental studies with cisplatin'. *Cancer (Phila.).* 55: 2303–2316.

Ross MJ, 1981, 'Geological occurrence and health hazards of amphiholes and serpentines. In *Amphiholes: Petrology and Experimental Relations*'. *Reviews in Mineralogy.* Edited by D. Veblen, Mineralogical Society of America. (9B): 279-324.

Roth JA, 1994, 'Molecular events in lung cancer'. *Lung Cancer.* 10 (Suppl 1):3-15.

Ruffie P, Feld R, Minkin S, *et al.*, 1989, 'Diffuse malignant mesothelioma of the pleura in Ontario-Quebec: a retrospective study of 332 patients'. *J Clin Oncol.* 7: 1157

Ryan KM., Phillips AC., Vousden KH., 2001, 'Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein'. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 332.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA, 1999, 'Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease'. *Am J Med.* 107: 489-506.

Sakaguchi T, Watanabe A, Sawada H, Yamada Y, 1998, 'Prognostic Value of Cyclin E and p53 Expression in Gastric Carcinoma'. *Cancer.* 82 (7): 1238-42.

Salucci M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R and Vannini V, 2002, 'Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2)'. *Br J Cancer.* 86: 1645-1651.

Samuelsen AB, 2000, 'The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review'. *J Ethnopharmacol.* 71: 1-21.

Saydan N, Salicio V, Gotzos BC, Gotzos V, 2001, 'Expression of Calretinin in Human Mesothelioma Cell Lines and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry'. *Cancer Research.* 21: 181-188.

Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, *et al.*, 1992, 'Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diamminedichloroplatinum (II)'. *Gyn Oncol.* 45: 13-19.

Sclafani RA, Schaurer IE, Langan TA, 1998, 'Alterations in cell cycle control in lung cancer'. *Biology of lung cancer.* New York, Marcel Dekker Inc. 295-315.

Selikoff IJ, Hammond EC, 1979, 'Asbestos and smoking [editorial]'. JAMA. 242: 458.

Senderowicz AM, 1999, 'Flavopiridol: The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials'. Invest New Drugs. 17: 313-320.

Senderowicz AM, 2001, 'Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies'. Leukemia. 15: 1-9.

Sfikakis PP, Souliotis VL, Katsilambros N, Markakis K, Vaiopoulos G, Tsokos GC and Panayiotidis P, 1996, 'Downregulation of interleukin-2 and alpha-chain interleukin-2 receptor biosynthesis by cisplatin in human peripheral lymphocytes'. Clin. Immunol. Immunopathol. 79, 43-49.

Shapiro AB, Ling V, 1997, 'Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein'. Biochem Pharmacol. 53: 587-596.

Shivapurkar N, Wiethage T, Wistuba II, *et al.*, 1999, 'Presence of simian virus 40 sequences in malignant mesotheliomas and mesothelial cell proliferations'. J Cell Biochem. 76: 181-88.

Solheim OP, Saeter G, Finnanger AM, Stenwig AE, 1992, 'High-dose methotrexate in the treatment of malignant mesothelioma of the pleura. A Phase II study'. Br J Cancer. 65: 956.

Soliman KF, Mazzio EA, 1998, '*In vitro* attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds'. Proc Soc Exp Biol Med. 218: 390-397.

Solomon MJ and Kaldis P, 1998, Results Probl. Cell Differ. 22: 79-109.

Spivack SD, Fasco MJ, Walker VE, Kaminsky LS, 1997, 'The molecular epidemiology of lung cancer'. Crit Rev Toxicology. 27: 319-365.

Steele JPC, Shamash J, Evans MT, *et al.*, 2000, 'Phase II study of vinorelbine in patients with malignant mesothelioma'. J Clin Oncol. 18: 3912.

Steinmetz KA, Potter JD, 1996, 'Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review'. J Am Diet Assoc. 96: 1027- 1039.

Sterman DH and Albelda SM, 2005, 'Invited Review Series: Pleural Diseases. Advances in the diagnosis, evaluation, and management of malignant pleural mesothelioma'. Respirology. 10: 266-283.

Sterman DH, Kaiser LR, Albelda SM, 1999, 'Advances in the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma'. Chest. 116: 504-520.

Sukardiman, Darwanto A, Tanjung M, Darmadi MO, 2000, 'Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma'. Clin Hemorheol Microcirc. 23: 185-190.

Sun XY, Plouzek CA, Henry JP, Wang TT, Phang JM, 1998, 'Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells'. Cancer Res. 58: 2379-2384.

Suzuki S, Takada T, Sugawara Y, Muto T, Kominami R, 1991, 'Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting'. Jpn. J. Cancer Res. 82: 1061–1064.

Şenyiğit A, Dalgıç A, Kavak O, 2004, 'Asbestin Sağlığa Etkileri', Dicle Tıp Dergisi. 31 (4): 48-52.

Tchia MM, Holmes MD, McLennan G, 1991, 'The molecular biology of lung cancer'. Med J Australia. 154: 501-503.

Testa JR, Carbone M, Hirvonen A, *et al.*, 1998, 'A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesotheliomas'. Cancer Res. 58: 4505–09.

Thompson CB, 1995, 'Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease'. *Science*. 267: 1456-62.

Tiainen M, Tammilehto L, Rautonen J, *et al.*, 1989, 'Chromosomal abnormalities and their correlations with asbestos exposure and survival in patients with mesothelioma'. *Br J Cancer*. 60: 618.

Tood R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT, 2002. 'Cell Cycle Dysregulation In Oral Cancer'. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13 (1): 51-61.

Trosko JE, 2003, 'The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis'. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36: 43-48.

Trosko JE, Ruch RJ, 2002, 'Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy'. *Curr. Drug Target*. 3: 465–482.

Trueba GP, Sanchez GM, Giuliani A, 2004, 'Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer'. *Front. Biosci.* 9: 2029-2044.

Trush MA, Kensler TW, 1991, 'An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis'. *Free Rad. Biol. Med.* 10: 201–209.

Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV, 1994. 'Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids'. *Biochim Biophys Acta*. 1205: 325-335.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, 2006, 'Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer'. *Chemico-Biological Interactions*. (160): 1-40.

Van Haarst JMW, Baas P, Manegold Ch *et al.*, 2002, 'Multicentre phase II study of gemcitabine-cisplatin in malignant pleural mesothelioma'. *Br J Cancer*. 86: 342-345.

Van Meerbeeck JP, Baas P, Debruyne C, *et al.*, 1999, 'A Phase II study of gemcitabine in patients with malignant pleural mesothelioma'. *Cancer*. 85: 2577.

Van Meerbeeck JP, Debruyne C, Van Zandwijk N, *et al.*, 1996, 'Paclitaxel for malignant pleural mesothelioma'. A Phase II study of the EORTC Lung Cancer Cooperative Group. *Br J Cancer*. 74: 961.

Versnel MA, Hagemeijer A, Bouts MJ, *et al.*, 1988, 'Expression of c-sis (PDGF B-chain) and PDGF a-chain genes in ten human malignant mesothelioma cell lines derived from primary and metastatic tumors'. *Oncogene*. 2: 601.

Volk C, Kempfski B, Kempfski OS, 1997, 'Inhibition of lactate export by quercetin acidifies rat glial cells in vitro'. *Neurosci Lett*. 223: 121-124.

Wagner JC, Slegg CA, Marchand P, 1960, 'Diffuse pleural mesotheliomas and asbestos exposure in Northwestern Cape Province'. *Br J Ind Med*. 17: 260-265.

Waizenegger I, Hauf S, Meinke A & Peters J, 2000. *Cell*. 103: 399-410.

Walker C, Rutten F, Yuan X, *et al.*, 1994, 'Wilms' tumor suppressor gene expression in rat and human mesothelioma'. *Cancer Res*. 54: 3101.

Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK., 1999, 'Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells'. *Eur J Cancer*. 35: 1517-1525.

Wattenberg LW, 1992, 'Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents'. *Cancer Res*. 52: 2085-2091.

Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K and Uchida A, 1994, 'Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein'. *Cancer Res*. 54: 4952-4957.

Weinberg R, 1995. *Cell*. 81: 323-327.

Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H, 2000, 'Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells'. *Cancer Res.* 60: 3823-3831.

Whang-Peng J, 1989, '3p deletion and small cell lung carcinoma'. *Mayo Clin Proc.* 64: 256.

Wheeles LL, Petten SF, 1971, 'Definition of variable cellular parameters with a slit scan optical system'. *Acta Cytol.* 15: 111.

Wyllie AH, Kerr JFR and Currie AR, 1980, 'Cell death: the significance of apoptosis'. *Int. Rev. Cyt.* 68: 251-306.

Yamaguchi K, Sugano K, Fukayama N, Nakashima Y, 1997, 'Polymerase Chain Reaction-Based Approaches for Detection of Allelic Loss in the p53 Tumor Suppressor Gene in Colon Neoplasms'. *The American Journal of Gastroenterology*. 92 (2): 307-312.

Yamashita N, Kawanishi S, 2000, 'Distinct mechanism of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin'. *Free Radic. Res.* 33: 623-633.

Yates DH, Corrin B, Stidolph PN *et al.*, 1997, 'Malignant mesothelioma in south east England: Clinicopathological experience of 272 cases'. *Thorax.* 5: 512.

Yeh HC, Chahinian AP. Ultrasonography and computed tomography of peritoneal mesothelioma. *Radiology* 1980;135:705.

Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL, 2003, 'Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes'. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 67: 1215-1222.

Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ, 1999, 'Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO)'. *Anticancer Res.* 19: 4297-4303

Yokoo T, Kitamura M, 1997, 'Unexpected protection of glomerular mesangial cells from oxidant-triggered apoptosis by bioflavonoid quercetin'. *Am J Physiol.* 273: 206-212.

Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, *et al.*, 1990, 'The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells'. *FEBS Lett.* 260: 10-13.

Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T, 1992, 'Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle'. *Cancer Res.* 52: 6676-6681.

Yukishige Yamada, Teruhiko Yoshida, Kenshi Hayashi, 1991, 'p53 Gene Mutations in Gastric Cancer Metastases And in Gastric Cancer Cell Lines Derived from Metastases'. *Cancer Research* 51: 5800-5805.

Zörnig M, Hueber A-O, Baum W, Evan G, 2001, 'Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis'. *Biochimica Biophysica Acta.* 1551: 1-37.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Erbaa’da doğdu. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans programından mezun oldu. 2002 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2005 yılında yüksek lisans tez çalışmasına başladı. 2005 yılından itibaren GYTE Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.

