

**PAKLİTAKSEL, KERSETİN VE  
BERBERİNİN, A549, HeLa, HT-29,  
MCF-7 VE NIH3T3 HÜCRE  
KÜLTÜRLERİNDE SİTOTOKSİK  
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Ecz. Seval KORKMAZ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Farmakoloji Anabilim Dalı  
Ekim-2002**

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi  
Araştırma Fonunca desteklenmiştir.  
Proje No: 000332**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Seval KORKMAZ'ın "Paklitaksel, Kesretin ve Berberinin A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi" başlıklı Farmakoloji Anabilim Dalındaki Doktora tezi 25.10.2002 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK	
Üye	:Prof. Dr. Ayhan BİLİR	
Üye	:Doç. Dr. Kubilay UZUNER	
Üye	:Doç. Dr. Süleyman AYDIN	
Üye	:Yrd. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11.10.2002 tarih ve 27/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK



# ÖZET

Doktora Tezi

## PAKLİTAKSEL, KERSETİN VE BERBERİNİN, A549, HeLa, HT-29, MCF-7 VE NIH3T3 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

SEVAL KORKMAZ

Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

2002

Görülme sıklığı ve ölüm oranları açısından akciğer, meme, kolon ve genital kanserler tüm kanser türleri açısından ilk sırayı almaktadır. Bu tez çalışmasında, kersetin, berberin ve aspirin'in etkileri A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, HeLa serviks adenokarsinomu, HT-29 kolon adenokarsinomu, MCF-7 meme adenokarsinomu ve normal hücrelere örnek olarak NIH3T3 fibroblast hücrelerinde test edilmiştir. Deneylerimizde standart sitotoksik madde olarak Paklitaksel kullanılmıştır. Yöntem olarak MTT ölçümü, nötral kırmızısı ölçümü, kristal viyole ölçümü, tripan mavisi hücre sayımı, yumuşak agar koloni formasyonu ve akridin turuncusu testleri uygulanmıştır.

İncelenen bütün hücrelerde, paklitakselin sitotoksik ve apoptotik etkileri gözlenmiştir. Kersetin östrojen (+) meme kanseri MCF-7 ve östrojen (+) serviks adenokarsinom hücreleri HeLa üzerine muhtemelen antiöstrojenik etki ile antikanser etki göstermiştir. Berberin HT-29 kolon kanseri ve MCF-7 meme adenokarsinom hücreleri üzerine antikanser etkili bulunmuş ve normal hücreler (NIH3T3) üzerine düşük sitotoksikite göstermiştir. Tez kapsamında gözlenen tüm etkilerin muhtemel mekanizmaları literatür bilgileri ışığında tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, paklitaksel, kersetin, berberin

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### EVALUATION OF CYTOTOXIC EFFECTS OF PACLITAXEL, QUERCETIN AND BERBERINE ON A549, HeLa, HT-29, MCF-7 AND NIH3T3 CELL CULTURES

Anadolu University  
Graduate School of Health Sciences  
Pharmacology Program

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Regarding to incidences and mortality rates, cancers of lungs, mammary, colon and genital organs have primary importance among all cancer types. In this thesis, effects of quercetin, berberine and aspirin were tested on A549 non-small cell lung cancer, HeLa cervix adenocarcinoma, HT-29 colon adenocarcinoma, MCF-7 mammary adenocarcinoma, and, as an example of normal cells, NIH3T3 fibroblast cells. In our experiments, paclitaxel was used as a standart cytotoxic agent. Measurements of MTT, neutral red and crystal violet and trypan blue cell counts along with soft agar colony formation and acridine orange tests were applied as methods.

Cytotoxic and Apoptotic effects of paclitaxel were observed in all cells examined. Quercetin exhibited anticancer activities on estrogen(+) MCF-7 mammary adenocarcinoma and estrogen(+) HeLa cervix adenocarcinoma cells possibly through its antiestrogenic action. Berberine was found to have an anticancer activity on HT-29 colon cancer and MCF-7 mammary adenocarcinoma cells and to exhibit lower cytotoxicity on normal (NIH3T3) cells.

Key words: Cancer, paclitaxel, quercetin, berberine

## TEŞEKKÜR

Başta beni her konuda destekleyen, bir hocada bulunması gereken özellikler konusunda örnek aldığım, farmakolojiyi en baştan bugüne kadar öğreten, sevdiren, tez danışmanım ve sayın hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e bugüne kadar yaptığı her şey için,

Hücre kültürü ile tanışmamı sağlayan ve bana bu güzel dünyanın kapılarını açan, sayın hocalarım, Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU ve Yard. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU'na benim üzerimde olan haklarından dolayı,

Tanıştığım günden beri bana çalışmalarında destek olan, benden hiç bir konuda yardımlarını esirgemeyen kişiliği ve bilgisi ile takdir ettiğim sayın hocam Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e,

TBAM'da bize çalışma imkanı sunan, üzerimde çok emeği bulunan sayın hocam Prof. Dr. K.Hüsnü Can BAŞER'e,

Çalışmaya başladığım günden bugüne kadar birlikte çalıştığımız değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Bülent ERGUN'a,

HT-29 hücrelerini gönderen Dr. Eric BLAIR'e,

Tezimin çeşitli basamaklarında yardımları olan sevgili arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Tansu KOPARAL, Yrd. Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ, Dr. Selda DELİORMAN KABADERE, sevgili kardeşim Araş. Gör. Ahmet SARAÇOĞLU, Araş. Gör. İlham ERÖZ ve biricik kardeşim Adil KORKMAZ'a fiili ve manevi desteklerinden dolayı,

Beni yetiştirip bugüne getiren, hayatımın her basamağında daima yanımda ve bana destek olan biricik annem ve canım babama,

Master ve doktoram boyunca istediğim kadar ilgilenemediğim, ama onun benimle daima ilgilenmesinden memnun olduğum hayatım oğlum Emre'ye,

Teşekkür yazdığım bu son geceye kadar benimle uykusuz kalmaya katlanan, tezimdiki ve evdeki faaliyetlerinden dolayı sevgili eşim Fikret'e,

Sonsuz Teşekkürler....

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. NORMAL VE KANSERLİ DOKU ARASINDAKİ FARKLAR.....	3
2.1. Normal Hücreler ve Dokular.....	3
2.2. Kanserli Hücreler.....	3
2.2.1. Kanser Tiplerinin Sınıflandırılması.....	3
2.2.2. Hücreyi Kanserleştiren Nedenler.....	4
2.2.3. Hücre Bölünmesinin Kontrolü ve Kanser.....	6
2.2.4. Apoptoz ve Kanser.....	8
2.2.5. Kanserli Dokunun Büyüme Profili.....	9
3. KEMOTERAPİDE KANSERİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİNE YÖNELİK YENİ STRATEJİLER.....	13
3.1. p53 proteini ve geni.....	13
3.2. Gen terapisi ve Viroterapi.....	13
3.3. Proteazom İnhibitörleri.....	14
3.4. Aromataz İnhibitörleri ve ATAC.....	14
3.5. Epigenomikler ve Epigenetik Terapi.....	14
3.6. Histon Proteinlerin Modifikasyonu.....	15
3.7. Hipoksi-İndükleyen Faktör (HIF-1 $\alpha$ ) İnhibitörleri.....	15
3.8. Antianjiyojenik ve Antimetastatik Terapiler ve Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri .....	16
3.9. Hsp90 İnhibitörleri.....	17
3.10. STI571 (Gleevec).....	17

3.11. Siklin Bağımlı Kinazların İnhibitörleri.....	17
3.12. Raf/MAP Kinaz Yolağı.....	18
3.13. ErbB Reseptör Ailesi.....	18
<b>4. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN HÜCRELER, TEST</b>	
<b>MADDELERİ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>19</b>
4.1. Çalışmalarda Kullanılan Hücrelerin Özellikleri.....	19
4.1.1. A546 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu	19
4.1.2. HeLa Serviks Adenokarsinomu.....	19
4.1.3. HT-29 Kolorektal Adenokarsinomu.....	20
4.1.4. MCF-7 Meme Adenokarsinomu.....	20
4.1.5. NIH3T3 Fibroblast Hücreleri.....	21
4.2. Çalışmalarda Kullanılan Maddelerin Özellikleri.....	22
4.2.1. Paklitaksel (Taxol).....	22
4.2.2. Kersetin (Quercetin).....	25
4.2.3. Berberin.....	27
4.3. Tezde Kullanılan Yöntemler Hakkında Genel Bilgiler .....	28
4.3.1. Tripan Mavisı Diskalifikasyonu.....	28
4.3.2. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Testler ve MTT	
Ölçümü.....	29
4.3.3. Lizozomal Aktiviteye Dayanan Testler ve neutral red	
up-take Ölçümü.....	30
4.3.4. Hücre Çekirdeği Ölçümüne Dayanan Testler ve Kristal	
Viyole Yöntemi.....	31
4.3.5. Hücrelerin Koloni Oluşturma Yeteneklerinin Ölçülmesi	
Yumuşak Agar Koloni Formasyonu.....	31
4.3.6. Hücrelerdeki DNA ve RNA Miktarları ve Akridin	
Oranj ile Boyama .....	32
5. AMAÇ.....	33
6. MATERYAL YÖNTEM.....	35
6.1. Gereçler.....	35
6.2. Yöntemler.....	37
6.2.1. Hücrelerin Testleri için Hazırlanması.....	37

6.2.2. Tripın Mavisi İle Hücreslerin Sayılması.....	38
6.2.3. MTT Ölçümü.....	39
6.2.4. Neutral Red Up-take Sitotoksosite Ölçümü.....	39
6.2.5. Kristal Viyole Proliferasyon Ölçümü.....	40
6.2.6. Yumuşak Agar Koloni Formasyonu.....	40
6.2.7. Akridin Oranj ile Floresan DNA ve RNA Boyaması.....	41
6.2.8. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	41
7. SONUÇLAR.....	42
7.1. Paklitaksel Sonuçları.....	42
7.1.1. Paklitakselin MTT Ölçüm Sonuçları.....	42
7.1.2. Paklitakselin NR Ölçüm Sonuçları.....	47
7.1.3. Paklitakselin CV Ölçüm Sonuçları.....	52
7.1.4. Paklitakselin Koloni Formasyon Sonuçları.....	57
7.1.5. Paklitakselin Akridin Oranj Boyama Sonuçları.....	58
7.2. Kersetin Sonuçları.....	63
7.2.1. Kersetinin MTT Ölçüm Sonuçları.....	63
7.2.2. Kersetinin NR Ölçüm Sonuçları.....	68
7.2.3. Kersetinin CV Ölçüm Sonuçları.....	73
7.2.4. Kersetinin Koloni Formasyon Sonuçları.....	78
7.2.5. Kersetinin Akridin Oranj Boyama Sonuçları.....	79
7.3. Berberin Sonuçları.....	84
7.3.1. Berberinin MTT Ölçüm Sonuçları.....	84
7.3.2. Berberinin NR Ölçüm Sonuçları.....	89
7.3.3. Berberinin CV Ölçüm Sonuçları.....	94
7.3.4. Berberinin Koloni Formasyon Sonuçları.....	99
7.3.5. Berberinin Akridin Oranj Boyama Sonuçları.....	100
8. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	105
8.1. Paklitaksel Sonuçları.....	105
8.1.1. Paklitakselin MTT Sonuçları.....	105
8.1.2. Paklitakselin NR Sonuçları.....	105
8.1.3. Paklitakselin CV Ölçüm Sonuçları.....	106
8.1.4. Paklitakselin Koloni Formasyon Sonuçları.....	107

8.1.5. Paklitakselin Akridin Oranj Sonuçları.....	107
8.2. Kersetin Sonuçları.....	108
8.2.1. Kersetinin MTT Sonuçları.....	108
8.2.2. Kersetinin NR Sonuçları.....	108
8.2.3. Kersetinin CV Sonuçları.....	109
8.2.4. Kersetinin Koloni Formasyon Sonuçları.....	110
8.2.5. Kersetinin Akridin Oranj Boyama Sonuçları...	110
8.3. Berberin Sonuçları.....	110
8.3.1. Berberinin MTT Sonuçları.....	110
8.3.2. Berberinin NR Sonuçları.....	111
8.3.3. Berberinin CV Ölçüm Sonuçları.....	112
8.3.4. Berberinin Koloni Formasyon Sonuçları.....	112
8.3.5. Berberinin Akridin Oranj Boyama Sonuçları.....	113
9. TARTIŞMA.....	114
9.1. Paklitaksel.....	114
9.2. Kersetin.....	116
9.3. Berberin.....	117
10. KAYNAKLAR.....	120
EK1.....	140
EK2.....	156

## ŞEKİLLER DİZİNİ

1. Paklitakselin A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	42
2. Paklitakselin HeLa hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	43
3. Paklitakselin HT-29 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	44
4. Paklitakselin MCF-7 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	45
5. Paklitakselin NIH3T3 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	46
6. Paklitakselin A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	47
7. Paklitakselin HeLa hücrelerinde NR sonuçları grafiği	48
8. Paklitakselin HT-29 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	49
9. Paklitakselin MCF-7 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	50
10. Paklitakselin A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	51
11. Paklitakselin A549 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	52
12. Paklitakselin HeLa hücrelerinde CV sonuçları grafiği	53
13. Paklitakselin HT-29 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	54
14. Paklitakselin MCF-7 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	55
15. Paklitakselin NIH3T3 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	56
16. Paklitakselin koloni formasyon sonuçları	57
17. Paklitakselin A549 hücrelerinde AO sonuçları	58
18. Paklitakselin HeLa hücrelerinde AO sonuçları	59
19. Paklitakselin HT-29 hücrelerinde AO sonuçları	60
20. Paklitakselin MCF-7 hücrelerinde AO sonuçları	61
21. Paklitakselin NIH3T3 hücrelerinde AO sonuçları	62
22. Kersetinin A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	63
23. Kersetinin HeLa hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	64
24. Kersetinin HT-29 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	65
25. Kersetinin MCF-7 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	66
26. Kersetinin NIH3T3 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	67
27. Kersetinin A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	68

28. Kersetinin HeLa hücrelerinde NR sonuçları grafiği	69
29. Kersetinin HT-29 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	70
30. Kersetinin MCF-7 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	71
31. Kersetinin NIH3T3 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	72
32. Kersetinin A549 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	73
33. Kersetinin HeLa hücrelerinde CV sonuçları grafiği	74
34. Kersetinin HT-29 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	75
35. Kersetinin MCF-7 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	76
36. Kersetinin NIH3T3 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	77
37. Kersetinin koloni formasyon sonuçları	78
38. Kersetinin A549 hücrelerinde AO sonuçları	79
39. Kersetinin HeLa hücrelerinde AO sonuçları	80
40. Kersetinin HT-29 hücrelerinde AO sonuçları	81
41. Kersetinin MCF-7 hücrelerinde AO sonuçları	82
42. Kersetinin NIH3T3 hücrelerinde AO sonuçları	83
43. Berberinin A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	84
44. Berberinin HeLa hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	85
45. Berberinin HT-29 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	86
46. Berberinin MCF-7 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	87
47. Berberinin NIH3T3 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	88
48. Berberinin A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	89
49. Berberinin HeLa hücrelerinde NR sonuçları grafiği	90
50. Berberinin HT-29 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	91
51. Berberinin MCF-7 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	92
52. Berberinin NIH3T3 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	93
53. Berberinin A549 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	94
54. Berberinin HeLa hücrelerinde CV sonuçları grafiği	95
55. Berberinin HT-29 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	96
56. Berberinin MCF-7 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	97
57. Berberinin NIH3T3 hücrelerinde CV sonuçları grafiği	98
58. Berberinin koloni formasyon sonuçları	99
59. Berberinin A549 hücrelerinde AO sonuçları	100

60. Berberinin HeLa hücrelerinde AO sonuçları	101
61. Berberinin HT-29 hücrelerinde AO sonuçları	102
62. Berberinin MCF-7 hücrelerinde AO sonuçları	103
63. Berberinin NIH3T3 hücrelerinde AO sonuçları	104

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>AO</b>	: Acridine Orange – Akridin Turuncusu
<b>Ber</b>	: Berberin
<b>Cox</b>	: Siklooksijenaz
<b>CSFs</b>	: Koloni Stimüle edici faktörler
<b>CV</b>	: Crystal violet- Kristal viyole
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>EDTA</b>	: Etilen-diamintetra asetik asit
<b>ELISA</b>	: Enzyme- Like Immuno-Sorbent Assay
<b>HBSS</b>	: Hank' in tuz tampon solüsyonu ( Hank's Balanced Salt Solution )
<b>HB</b>	: Hoechst 33258 Boyama
<b>HS</b>	: Hücre sayımı
<b>Hsp</b>	: Heat shock protein- Isı şoku proteini
<b>MMP</b>	: Matriks Metalloproteinazlar
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
<b>NR</b>	: Neutral Red- Nötral kırmızısı
<b>Pac</b>	: Paklitaksel
<b>PBS</b>	: Fosfat tuz tamponu ( Phosphate Buffer Saline )
<b>PSA</b>	: Puck's Saline A- Puck'un tuz tamponu
<b>Que</b>	: Kersetin
<b>TIMP</b>	: Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

## 1. GİRİŞ

Yazılı tarihin başlangıcından beri bilinen kanser, uzun yıllardır en yoğun biçimde araştırılan hastalık olmasına karşın radikal tedavisi bulunamamış olan ölümcül bir hastalıktır. 19. Yüzyılın ortalarından itibaren kanserin görülme sıklığı artmıştır ve günümüzde her üç insandan birinde kanser geliştiği ve kansere yakalanan her dört erkekten birinin ve kansere yakalanan her beş kadından birinin hastalıktan öldüğü bilinmektedir (Franks, 1998). Kanser vaka sayısı son on yılda 10 milyondan 20 milyona tırmanmıştır, yani insidensi dünya çapında on yılda iki kat artmıştır ve ölüm oranının da gelecek 20 yılda 6 milyondan 10 milyona artması beklenmektedir (World Health Report, 1998). Görülme sıklığı ve ölüm oranları göz önüne alındığında, ülkeden ülkeye % oranlar değişmekle beraber, erkeklerde ilk sıraları akciğer, prostat ve kolon, kanseri, kadınlarda ise meme, akciğer, kolon ve over-serviks kanserleri almaktadır (Hart, 1998). Bunların ötesinde kanserin epidemik boyutta ortaya çıkması ve gerek hastanın, gerekse yakın çevresinin morali ve davranışı üzerinde yıkıcı yansımalar yapması nedeniyle çağımızın en önemli ve dramatik mediko-sosyal sorunlarından biridir. Gelişmiş ülkelerde kanser ölüm istatistiklerinde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırayı almaktadır. Türkiye’de yıllık kanser insidensi yüzbinde 150 olarak tahmin edilmiş ve her yıl 90,000-100,000 dolayında yeni kanser olgusunun görüleceği bildirilmiştir (Kayaalp, 1998).

Kanser, insidensinin yüksek olması dışında terapisinde görülen problemlerle de önem kazanmaktadır. Kemoterapide amaç hastanın normal hücrelerine zarar vermeksizin tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak ve mümkünse onları yok etmektir. Ancak, kanser hücrelerinin de insanın kendi hücresi olması ve kalitatif açıdan normal hücreler ile aralarında fark olmaması ve sadece kantitatif farkların bulunması sebebi ile antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı selektiviteleri düşüktür, bu da tedaviyi güçleştiren önemli bir faktördür. Antikanser etkili bir ilaç kanser hücresi üzerine toksik etki gösterirken aynı mekanizma ile normal hücreler üzerine de toksik etki göstermekte ve etkilenen normal hücrelerin bulunduğu organın çalışmasını bozmaktadır ve bu sebeple kürler sırasında hastalar ilaçların bu istenmeyen yan etkilerine tolerans gösteremeyerek, enfeksiyonlar başta olmak üzere başka

hastalıklarla m¼cadele etmek zorunda kalmakta veya m¼cadele edemeyerek çabalar ¼l¼mle sonuçlanabilmektedir. Kanserin sosyal boyutları ve ¼zellikleri ile antikanser ilaçların normal h¼creler ¼zerine g¼sterdikleri istenmeyen etkiler, kanser tedavisinde yeni ilaçlar bulma ve kanser ile ilgili bilinmeyenleri aydınlatma çabalarını hızlandırmaktadır. Kanser ile ilgili gelişmelerde amaç, kanserin normal h¼celere g¼re farklı ¼zelliklerinin aydınlatılması ve bu ¼zelliklere y¼nelik, normal h¼crelerde istenmeyen etkiler g¼stermeyecek yani kanser dokusuna selektif olacak terapilerin geliştirilmesidir. ¼zetle kanser tedavisi için daha iyi ilaçlara şiddetle gereksinim vardır, ¼nk¼ kanser hastalığı radikal tedavisi hen¼z bulunamamış progresif bir hastalıktır. Bu tezin amacı, çeşitli y¼ntemler kullanılarak antikanser ¼zellikleri daha ¼nceden bildirilmiş olan çeşitli maddelerin etkilerinin tek başlarına ve kombinasyonlar halinde çeşitli kanser h¼cre tipleri ¼zerinde araştırılmasıdır.

## **2. NORMAL VE KANSERLİ DOKU ARASINDAKİ FARKLAR**

### **2.1. Normal Hücreler ve Dokular**

Vücutta dokular; bağ dokusunu da içeren destek dokuların tamamı mezenşim, dokuya spesifik hücreler-epitel, defans hücreleri retikülo-endotelial ve sinir sistemi olarak dört temel gruba ayrılır. Mezenşim bağ doku, kollajen fibrillerini ve ilişkili proteinleri sentezleyen fibroblastlar, kemik, kartilaj, kas, kan damarları ve lenfatikleri içerir. Epiteliyal hücreler deri, barsak, karaciğer, salgı bezleri gibi farklı organlara spesifik hücrelerdir. Retikülo-endotelial sistem büyük çoğunluğu kemik iliğinden kök alan kırmızı ve beyaz kan hücrelerini oluşturan prekürsör hücreler, bunlara ilaveten vücudun her yerinde serbest veya karaciğer gibi temel organlarda ya da dalak ve lenf nodları gibi özel organlarda sabit olarak bulunan bazı hücreleri (lenfosit ve makrofajlar) içerir. Lenf nodları, vücuda tamamen dağılmış bakteri ve diğer yabancı cisimlere karşı filtre görevi gören özel lenfoid hücre nodülleridir. Sinir sistemi; beyin ve omurilik ile koruyucu kısımların yer aldığı santral sinir sistemi ve bu santral yapıdan başlayan sinirleri içeren periferik sinir sisteminden oluşur. Bu nedenle, her bir doku kendine has, dokuya özel fonksiyon ve yapıya sahip bir kaç farklı tipte hücelere sahiptir.

Standart düzene sahip spesifik hücreler organları oluşturur. Dokuya spesifik hücrelerin oluşturduğu epitelyum temel (basement) membranla dokuyu destekleyici mezenşimden ayırır. Destekleyici dokular (stroma) kas ve kemiklerin üzerinde destekleyici tabaka oluşturan, bağ dokusu ve fibroblastlardan oluşur. Kan damarları lenfatik damarlar ve sinirler bağ dokuyu geçer ve spesifik doku hücreleri için besin, sinirsel kontrol sağlarlar (Franks, 1998).

### **2.2.Kanserli Hücreler**

#### **2.2.1. Kanser Tiplerinin Sınıflandırılması**

Kanseri iki karakteristik özelliği açıklar; eksternal sinyaller (örn: otonom) ile düzenlenemeyen hücre büyümesi ile dokuları istila etmesi ve metastaz ile farklı bölgelerde kolonize olması. Bu karakterlerden ilki, bütün neoplazmaların bir özelliği olan anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ya da yeni çoğalmalarıdır. Neoplazma beniyin ya da maliyn olabilir. Beniyin tümörler tek bir

kütle halinde kalır, orijini olan dokuya benzer, sınırları dokudan yükselir ancak dokuyu istila etmez, kenarları düzenlidir ve genelde bir bağ dokusu kapsülü ile etrafındaki dokudan ayrılır, cerrahi girişimlerle çıkartılabilir ve tamamen tedavi edilebilirler. Eğer istila kanserin ikinci temel özelliği ise bu durumda neoplazma maliyandır. Tümör eğer maliynant neoplazma ise kanser olarak sayılır. Maliyn tümörler etraflarındaki dokuları istila etme yeteneğine sahiptirler, bu yetenek genellikle hücrelerin kan dolaşımına veya lenfatik sisteme girerek taşınması ve dokuda ikincil bir tümör oluşturması veya vücudun diğer bölgelerinde metastaz yapmasıdır, metastaz yapan kanserlerin de tamamen yok edilmesi çok zordur.

Kanser köken aldığı doku ve hücre tipine göre isimlendirilir; epiteliyal dokuların kanserleri karsinoma, nonepitelial olan bağ dokusu ve kas (mezenşimal) dokuların kanserleri sarkoma olarak adlandırılır. Bu iki gruba girmeyen, lösemilerin de içinde olduğu uç kategorilerdeki kanserler hemopoitik hücrelerden veya sinir sistemi hücrelerinden kaynaklanır. İnsanda oluşan kanserlerin %90'ı epiteliyal hücrelerin fiziksel ve kimyasal hasarlara uğraması sonucu meydana gelmektedir (Franks, 1998, Alberts ve ark., 1994).

### **2.2.2. Hücreyi Kanserleştiren Nedenler**

Yapılan çalışmalar, kanserin çeşitli çevresel faktörlerin etkisiyle olduğunu göstermekle birlikte, oluşumunda genetik yatkınlığın önemli olduğunu ve aslında genetik temellere dayandığını göstermektedir.

Kanser, tek bir somatik hücrede ortaya çıkan bir hücre hastalığıdır, DNA düzeyinde intirinsik hatalar nedeniyle ortaya çıkar veya karsinojene maruz kalma ile indüklenir. Tek hücrede genetik lezyon genellikle bir hücrenin neoplastik transformasyonunu indüklemeye yeterli değildir. İnsan hayatın boyunca  $10^{16}$  hücre bölünmesi gerçekleşir, yaşam süresi daha kısa olan ve daha az sayıda hücreye sahip farede bu rakam  $10^{12}$ 'dir. Eğer çevrede hiç mutajen olmasaydı, hücrede DNA replikasyonu ve onarım için bir hücrede bir gene düşen mutasyon sayısı yaklaşık  $10^{-6}$  olurdu. Ancak günümüz şartlarında maliynant fenotip için aynı hücre üzerine aynı gen ya da çeşitli gen ürünlerinde düzensizliklerin önderlik

ettiği, yıllar süren, 5-10 mutasyon gerekir. Her bir genetik değişim epiteliyal dokularda gelişen hiperplazi, adenoma, displazi, in situ karsinoma, invazif karsinoma ile sonuçlanabilir. Neoplastik formasyona direnç hücre fonksiyonlarının her fazında kontrol ile gerçekleşir.

Vücutta 200 üzerinde hücre tipinde kanser gelişme riski eşit düzeyde değildir. Kalp kası hücreleri, ışığa ve sese duyarlı reseptör hücreleri, lens fiberleri gibi hücreler yaşam boyunca bölünmeden ve yenilenmeden kalırlar ve bu dokularda neoplazi son derece nadirdir. Yenilenebilen dokularda hücre ölümü ve yeni hücrelerin üretimi (turnover) söz konusudur. “Turnover” oranı düşük olan (hepatosit gibi) hücrelerde proliferasyon yaralanma, hasar ya da cerrahi girişimler sonucu atılan karaciğer dokusunun yerine yenisini koymak için gerçekleşir. Hızlı “turnover’a” sahip hücrelerde (kemik iliği, deri, barsak gibi) farklılaşma ve yerine koyma fonksiyonları farklı hücre tipleri tarafından denetlenir. Normal koşullarda tek bir hücre bölünme ve farklılaşma olaylarının birine maruz kalır. Bölünme yeteneğine sahip hücreler, stem (kök) hücreleri farklılaşma yeteneğine, farklılaşmış hücreler de bölünme yeteneğine sahip değildir. Stem hücreleri, her ikisi de yeni stem hücresi olacak iki kardeş hücreye bölünebilir ya da duruma ve çevreden gelen uyarılara göre terminal farklılaşmaya uğrayabilirler. Stem hücrelerinin gen ekspresyon kalıpları, farklılaşan hücrelerin gen ekspresyonlarından farklıdır. Gen ekspresyonu, hücre-hücre, hücre-ekstraselüler matriks ilişkisi gibi, endokrin hormonlar, parakrin büyüme faktörleri ve farklılaşma faktörleri, sıcaklık, oksidasyon, ışınlar, fiziksel stresler gibi faktörlerin dokuya spesifik olan etkilerinin bir ürünüdür.

Kanser en çok proliferasyonları hormonlarla düzenlenen ve çevresel kanserojenlere maruz kalan hızlı turnover’lı dokularda yaygındır. Çevresel faktörlerin hedef hücrelerde gen ekspresyonu üzerine güçlü etkileri vardır. Belirli hücreler tarafından alınan sinyaller transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenen aktivasyonlara yol açar. Transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon kalıpları hücrenin bölünmesi, farklılaşması ya da ölüp ölmeyeceğini belirler. En

yaygın genetik değişimler protoonkogenlerin aktivasyonu ya da tümör supresör genlerin inaktivasyonu ile gerçekleşir.

### 2.2.3. Hücre Bölünmesinin Kontrolü ve Kanser

Günümüzde kullanılan antineoplastik ilaçların kullanılış amaçlarını tam olarak anlayabilmek için hücre siklusu kinetiğini bilmek gereklidir. Sitotoksik ajanların çoğu hücre siklusunun spesifik bir fazında etkilidir ve bu nedenle yalnızca bu fazdaki hücreleri etkileyerek bölünmeyi engellerler. Neoplazmaların büyüme fraksiyonları ve bölünme yüzdesi yüksektir ve bu yüzden ilacın etkisini göstermesi kolaydır. Benzer şekilde, hızlı proliferen olan normal dokular (kemik iliği, saç folikülleri ve intestinal epitelyum), kullanılan terapötik dozlarda antineoplastik ilaçlar tarafından hasara uğratılırlar. Diğer taraftan, yavaş büyüme fraksiyonuna sahip yavaş büyüyen tümörler (kolon veya akciğer karsinomu gibi) sitotoksik ilaçlara cevapsız kalır.

İnsan vücudunda yaklaşık olarak  $1 \times 10^{14}$  üzerinde hücre olduğu tahmin edilmektedir. Tabii ki tüm bu hücrelerin aslında bir tek fertilize hücreden çoğaldığı da gözardı edilmemelidir. Benzer şekilde kültürde, teorik olarak gerekli besin ortamı sağlanan hücreler de tek bir hücreden milyonlarca hücreye çoğalabilirler. Kültürdeki hücrelerin çoğu yüzeye tutunarak çoğalırlar, ancak bazı transform ya da neoplastik hücreler kültürde süspansiyon halinde de yaşamlarını devam ettirebilirler. Kültürdeki tek bir hücreyi ele aldığımızda, teorik olarak hücre belli bir zaman periyodu içinde iki kardeş hücre oluşturacak şekilde bölünür, oluşan iki hücre tekrar ikiye bölünür ve bu olay  $2^n$  formülü ile sonsuza dek devam edecektir, ancak teorikte böyle olan bu olay, pratikte farklıdır; kültürdeki tüm hücreler aynı anda bölünmez, bir kısmı bölünürken diğerleri bölünmesini tamamlamış, durgun hücreler olabilir, hücrelerin de bir bölünme kapasiteleri vardır ve bu kapasiteyi tamamlanan veya farklı etki altında kalan hücreler ölebilir, kontakt inhibisyon gerçekleşebilir ve bu sebeple kültürdeki popülasyonun büyümesi idealden farklı olur. Bu olay, ekspanseyonel büyüme olarak tanımlanır.

Kültürde eksponensiyel olarak çoğalan hücrelerin iki katına çıkmaları, başka bir deyişle bir siklusu tamamlamaları için geçen süre iki katına çıkma zamanı (doubling time) olarak kabul edilir. Bu süre ve bununla ters orantılı olan çoğalma fraksiyonu kanser kinetiği açısından klinik anlamda da oldukça önemli parametrelerdir. İkiye katlanma zamanı hücre siklusu süresi veya jenerasyon süresi olarak da bilinmektedir. Kültürde belirli aralıklarla sayımları yapılan hücrelerin iki katına çıkma zamanları aşağıdaki formüller kullanılarak yapılır. Sağlıklı bir sayım için hücreler yüzeyi kaplayıncaya kadar 3-4 siklus süresi kadar (yaklaşık 96 saat boyunca) takibe alınmalıdır.

$$2,3 \log 2 = kT \quad (\text{Formül 1})$$

$$T = (t_2 - t_1) = \text{doubling time}$$

$$0,693 = kT \quad (\text{Formül 2})$$

$$T = 0,693 / k \quad (\text{Formül 3})$$

İlk formülde (Formül 4)  $\log 2$  hücrelerin iki katının logaritmasıdır. Yapılan deneylerde elde edilen sonuçlara göre, 2 yerine, sayılan hücre sayısının ( $n_2$ ) ekilen hücre sayısına ( $n_1$ ) oranı kullanılır :

$$2,3 \log (n_2 - n_1) = kT$$

formülünden k sabiti bulunur ve

$$T = 0,693 / k$$

formülünden T yani hücrelerin ikiye katlanma süreleri ayrı ayrı hesaplanır (Sheeler, 1987; Cos ve Sanchez-Barcelo, 1994; Pinaud ve ark., 1996, Liebmann ve ark., 1994, Sato, 2001).

Proliferasyon oranı aşağıdaki formülde verildiği gibi hesaplanır (Reddel, 1995);

$$\text{Proliferasyon Oranı} = \frac{\text{Kontrol Grubundaki hücrelerin iki katına çıkma zamanı}}{\text{Deney grubundaki hücrelerin iki katına çıkma zamanı}} \quad (\text{Formül 4})$$

Hücre bölünme mekanizması, bölünen hücrelerin tamamen aynı olması ve evrim boyunca hücrelerin genetik özelliklerinin korunması edilmesi esasına dayanır. Hücre bölünme süreci, hücrelerin içeriklerini ve özellikle de kromozomlarını doğru bir şekilde duplike etmeyi garanti eder. Hücre bölünmesinde, protein kinazlar tarafından regüle edilen nükleer DNA sentezinin ve ardından mitozun başlaması olayları kritik öneme sahiptir. Hücre siklusu dört faza ayrılır: M (mitoz) fazı sırasında replike edilen kromozomlar ayrılır ve mitoz ile ayrılan iki yeni çekirdekte paketlenir ve sitoplazma sitokinler tarafından iki kardeş hücreye bölünür. Hücre siklusunun diğer üç fazı “interfaz” olarak bilinir; G<sub>1</sub> (gap 1) fazı bölünme sonucu oluşan hücrenin tekrar DNA sentezine başlayacağı zaman için kullanılan fazdır. Bu fazda kalan ve bölünmeyen hücreler G<sub>0</sub> fazına geçerler, G<sub>0</sub> fazındaki hücreler “durgun (quiescent) hücre” olarak isimlendirilir. S (sentez) fazı sırasında DNA sentezi gerçekleşir, DNA replike olur ve bir daha replike olmasına izin verilmez. G<sub>2</sub> (gap 2) fazına geçen hücrelerin DNA replikasyonunun doğruluğu onaylanır, hatalar düzeltilir ve iğ iplikçikleri ile yeni DNA yapısı oluşmaya başlar. Hücre bundan sonra M yani mitoz fazına geçer. Mitoz olayında sırasıyla dört faz gerçekleşir; profaz, metafaz, anafaz, telofaz. İki katına çıkmış olan DNA'nın iki kardeş hücreye eşit olarak bölündüğü fazdır. Mitozdan önce DNA zinciri sık sarmallar yaparak kalınlaşmaya başlar. Bu arada histon proteinlerle de kompleks yaparak kromozomlar oluşturulur. Bu fazda her kromozomun bir kopyası meydana gelmiştir (kardeş kromatidler). 2n kromozom sayısı 4n'e çıkar ve kardeş kromatidlerden biri, bir hücre kutbuna, diğeri öteki kutba doğru hareket etmeye başlar. Telofaz safhasında kutuplara çekilen kromozomlar iki yavru hücre oluştururlar (Fenton ve Longo,1988; Alberts ve ark., 1994; Kayaalp, 1998; Bozkurt, 2000).

#### 2.2.4. Apoptoz ve Kanser

Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü, embriyonik morfogenez, metamorfoz, hormona bağımlı doku atrofisi ve timusta lenfosit olgunlaşması gibi pek çok biyolojik süreçte önemli rol oynaması ile nekrozdan ayrılır (Duvall ve Wyllie, 1986; Arends ve Wyllie, 1991; Meyn ve ark., 1994). Proliferasyon,

diferansiyasyon ve hücre ölümü oranları sabittir ve bu sabit oranlar, büyüme faktörleri ya da sitokinler gibi faktörlerin salınımındaki oranların oluşturduğu kombinasyonlara göre düzenlenir. Hücre-hücre teması da bu dengede önem taşır. Örnek olarak hücre bölünme oranı hücre ölüm oranından daha fazla ise hücrelere düşen alan azalacağından hücreler büzölmeye başlayacaklardır. Hücre büyüklüğü ve hücre dansitesi her doku için aynı kalmalıdır ve bu sürekli kontrol edilir (Hardy ve Stark, 2002). Bu nedenle, hücre-hücre teması bir noktadan sonra hücre bölünmesi ve proliferasyonunu durduran bir faktör olmaktadır. Bu olay “kontakt inhibisyon” olarak adlandırılmaktadır.

Apoptoz hem rodent hem de insan orijinli maliyn tümörlerde intirinsik homeostatik proseslerle (muhtemelen mitozla) hücre kazanımını ve böylece tümör büyümesini düzenlemek için spontan olarak gerçekleşir (Meyn ve ark., 1994). Ancak, bazı tümör hücrelerinin apoptotik yeteneklerini kaybettikleri de bilinen bir gerçektir (Karp, 1999). Apoptoz, tumorigenez için önemli modölatör görevi gören ve bcl-2 ile p53 proto-onkogenleri tarafından regüle edilen bir süreçtir. Hücre kültürü çalışmaları çeşitli uyarılara karşı apoptotik yanıtı p53'ün indüklediğini ve bcl-2'nin suprese ettiğini açıkça göstermektedir (Pan ve ark., 1997). Apoptoz, yargı (commitment) ve infaz (execution) fazlarından oluşur. Yargı fazı hücrenin uyarılara kendi kendisini imha etmesini sağlayacak yanıtlar oluşturması, bu işlemde ölüme kadar olan aşamalar da infaz fazını oluşturur. Apoptoz ile ölüm, hücre ve nükleusunun tamamının düzenli bir şekilde küçülmesi, komşu hücrelerle adhezyonunun kaybı, hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşması ile hücre yüzeyinin girintili çıkıntılı bir hal alması, kromatinlerin küçük parçalara bölünmesi ve hızlı bir şekilde fagositoz ile yutulup yok edilmesidir (Karp, 1999).

### **2.2.5. Kanserli Dokunun Büyüme Profili**

Kanserin bir somatik hücre hastalığı olduğuna daha önce değinilmişti. Hücrede hastalık meydana geldikten sonra hücrenin bölünmesi kontrol edilemez ve hücre mitozdan çıkamayarak sürekli bölünmeye devam eder. Kanserli dokuda tümör kitlesi kanserin tipine göre 24 saat-3 ay gibi bir sürede iki katına çıkar. Tümör kitlesinde proliferasyon hızının kolay saptanabilen bir göstergesi, çoğalma

fraksiyonu ve bu parametre ile ters orantılı olan iki katına çıkma (doubling) süresidir. Çoğalma fraksiyonu, tümör kitlesi içindeki bölünme halindeki hücrelerin sayısının toplam hücre sayısına oranıdır. İki katına çıkma süresi ise tümör kitlesindeki hücre sayısının iki katına çıkma süresidir. İkiye katlanma süresi tümör kitlesinin ilaca karşı duyarlılığı hakkında fikir verir; hızlı çoğalan tümör hücreleri antineoplastik ilaçların çoğuna karşı (özellikle antimetabolitlere ve antineoplastik antibiyotiklere), yavaş çoğalan hücrelere göre daha duyarlıdır. Çoğalma fraksiyonu düşük tümörlere solid tümör denir. Solid tümörlerde büyüme hızı kitle büyüdükçe azalır. Tümör içindeki kanser hücresi sayısının zamana göre seyrini gösteren eğri (Gompertz eğrisi) lineer değil hiperboliktir. Bunun sonucu olarak hücre sayısı arttıkça ve tümör kitlesi büyüdükçe çoğalma fraksiyonu azalır ve iki katına çıkma süresi uzar. Bunun sonucu olarak tümörün ilaca karşı duyarlılığı azalır Bu tip tümörlerde üç tabaka vardır: A tabakası dışta kalan ve sürekli mitoz halinde olan hücrelerin oluşturduğu tabakadır. B tabakası arada kalan ve bölünemeyen ancak bölünme yeteneklerini kaybetmemiş hücrelerden oluşur. C tabakası ise en içte kalan ve bölünme yeteneklerini kaybetmiş, fakat tümör kitlesine katkıda bulunan ilk çoğalan öncü hücrelerden oluşur. Tespit edilebilir bir tümör kitlesi yaklaşık  $10^9$  hücre içerir ve çapı 1-2 cm kadardır. Ancak kitledeki hücre sayısı  $10^{12}$  hücre olduğunda kitle 20 cm çapa gelir ki bu letal bir kitledir. 1-2 cm çapta iken tespit edilen bir kitle kısa sürede 20 cm çapa gelebilir, teşhisten sonra kitlenin sabit kalması mümkün olmadığı için terapiye bir an önce başlamak gerekir. Ancak özellikle döneme özgü ilaç kullanılması ile ilaca alınan cevap A kitlesi azaldıkça düşecektir. Kemoterapi kesildikten sonra da B kitlesinde bulunan hücreler yine bölünme yeteneklerini kullanıp çoğalmaya başlayacaklardır ve terapi hedefine ulaşmamış olacaktır. Bu yüzden terapide önce cerrahi ekstirpasyon veya radyoterapi ile tümör kitlesinin büyük bir hacmi çıkarılır (debulking) ve kalan kısmın çoğalması hızlandırılarak ilaca duyarlılığı artırılır. Büyük bir kitle ile savaşmak yerine bu kitlenin %0.1'i gibi küçük ve gözle dahi görülemeyecek bir kitle ile mücadele edilir. Cerrahi girişim ve radyoterapi gibi farklı bir tedavi uygulandıktan sonra uygulanan kemoterapi programına adjuvan kemoterapi denir. Adjuvan kemoterapi, günümüzde en yaygın olarak kullanılan kemoterapi şeklidir. İlaç kürler halinde verilir ve hangi aralıklarla kaç kür verileceği programda

belirlenir. Genel olarak ilk önce cerrahi ekstrepsiyon ile kitle çıkarılır, ardından radyoterapi kürleri uygulanır ve bunu takiben kemoterapiye geçilir. Adjuvan kemoterapinin kısıtlı şekilde uygulanan bir diğer şekli de neoadjuvan terapidir. Bu duruma örnek olarak, baş-boyun kanserlerinde radyoterapi ile birlikte sisplatin ve fluorourasil verilir ve kitlede küçülme sağlandıktan sonra daha az hasar verecek bir cerrahi operasyonla kitle alınır.

Tümör kitlesi yaklaşık 1-2 mm çaplı bir kitle oluşturduğu zaman iç kısımlarda kalan hücreler o bölgede kan dolaşımı olmadığı için beslenemez ve oksijen yeterli derecede ulaşamaz. Bunun sonucunda hücreler bazı büyüme faktörleri salgılayarak yeni kan damarlarının oluşmasını talep ederler. Yeni kan damarlarının üretilmesine anjiyogenez denir. Kitlede kan damarları oluşur ve bu damarlar sayesinde kitle beslenir ve etrafındaki dokuyu istila ederler (invazyon). Normal hücrelerde invazyon yeteneği yoktur, birbirlerine temas ettikleri zaman çoğalmaları kontakt inhibisyon nedeniyle durur. Tümör hücrelerinin sentezlediği matriks proteinlerini parçalayan enzimler olan matriks metalloproteinazlar (kollajenaz gibi) kan damarlarının duvarlarındaki hücreler arasında adhezyon proteinleri ile kurulmuş olan hücreler arası bağlantıları parçalayıp damar içine girerler ve uygun bir doku bulduğunda metastaz yaparak orada çoğalmaya başlarlar. Maliyn tümörlerin en önemli özelliği, metastaz yapma yetenekleri nedeniyle terapilerinin güç olmasıdır. Örneğin akciğerde olan bir tümör için uygulanan kürler, beyine metastaz yapmışsa, akciğerdeki kitle için kullanılan ilaç kan-beyin engelini geçemeyebilir ve burada etkisiz kalabilir. Bu sebepten dolayı kanser terapisinde metastaz başarısız olmanın en büyük sebebidir. Bazen yıllar sonra dahi metastaz ortaya çıkabilir.

Halen kullanımda olan antineoplastik ilaçların büyük bir kısmı özellikle sitotoksik olanlar antiproliferatif etkilidir ve sadece kontrolsüz çoğalmaya karşı etkilidir. İnvaziflik, diferansiyasyon kaybı ve metastaz oluşturabilme özellikleri üzerine spesifik etkileri yoktur. Antiproliferatif etkileri sadece hücre siklusunun S ve G<sub>1</sub> fazları üzerine olan etkilerinden değil aynı zamanda Apoptoz (programlı hücre ölümü) neden olay olaylar üzerine var olan apoptotik etkilerinden

kaynaklanmaktadır. Normal hücreler ile kanserli hücreler organizmanın kendi hücreleri olduğundan aralarında kalitatif yönden bir fark yoktur, farklar kantitatif düzeydedir ve kanser tedavisi kalitatif farklara yönelik olmalıdır. Bu nedenle, her ne kadar çok sayıda antineoplastik ilaç var görünse de spesifitelerinin düşük olması ve kalitatif farkları oluşturan mekanizmalara yönelik ilaçların henüz yeterli derecede bulunmaması sebebi ile spesifik olarak kanserli hücreleri etkileyebilecek ve diğer dokularda toksik etkileri gözlenmeyecek yeni ilaçlara halen klinik kullanımda gereksinim duyulmaktadır (Bozkurt, 2000).

### 3. KEMOTERAPİDE KANSERİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİNE YÖNELİK YENİ STRATEJİLER

#### 3.1. p53 proteini ve geni

Normal hücrelerde p53 proteini, spesifik gen ekspresyonu için genomdaki 300'den fazla farklı promoter elementi bağlayarak proliferasyonda rol oynayan güçlü bir transkripsiyon faktörü ve tümör supresörüdür. İnsan tümörlerinde p53 geni, mutasyonu en yaygın gendir ve insan tümörlerinin %50'den fazlasında, genin fonksiyonlarını inaktive eden p53 mutasyonları gözlenmiştir. p53'teki kalıtsal mutasyonların (Li-Fraumeni Sendromu) kalıtsal kanserlerden sorumlu olduğu ve inaktive edilmiş p53'e sahip farelerin kansere aşırı derecede eğilim gösterdiği bilinmektedir. Normal nonstress hücrelerde p53 geninin yarılanma ömrü 5-20 dakika gibi çok kısa bir süredir ve bu negatif feed-back mekanizmasında Mdm2 proteini anahtar rol oynar. p53, Mdm2 genlerinin kodlanmasında transkripsiyonal rol oynar. Ancak Mdm2'nin de yarılanma ömrü çok kısadır ve bunun sebebi otoubikitinizasyon aktivitesidir ve ubiquitin E3 ligaz promoterliğinde ubiquitin p53 ile etkileşerek konjügasyon oluşturur. Bu ubiquitin konjügasyonu ile etiketlenen p53 proteazom tarafından degradasyona uğratarak hücre içinde p53, normal hücre proliferasyonu için düşük düzeyde tutulur. INK4a/ARF tarafından kodlanan ARF tümör supresörü, Mdm2 aracılıklı p53 degradasyonunu inhibe eder. Yeni bir tedavi şekli olarak p53 mutasyonu mevcut kanser tiplerinde bu yolağa yönelik tedaviler uygulanmaktadır (Lane ve Lain, 1996; Balint ve Vousden, 2001).

#### 3.2. Gen Terapisi ve Viroterapi

Bu terapiler hedeflendirilmiş (targeting) tedavilerin ilklerindedir ve pro-drug olarak gen hedefleyen terapi şekilleridir. Herpes simplex virüs-timidin kinaz-gansiklovir (HSV-TK-GCV) kombinasyonu ve sitozin deaminaz-5-florositozin (CD-5-FC) kombinasyonu klinik olarak test edilmektedir. Bu grupta yer alan kombinasyonlar hedef enzimlerle hedef noktada birleştiklerinde antineoplastik ajanlar açığa çıkar ve hedef gene yöneltilir. Viroterapide hücreleri enfekte edip ölüme sevk eden reovirus, autonomous parvovirus, Newcastle disease virus,

measle virus ve ve vesicularstomatitis virus gibi virüslerden yararlanılmaktadır (Kim ve ark., 2002).

### **3.3. Proteazom İnhibitörleri**

Hücre proliferasyonunun regülasyonunda rol oynayan regülatörlerin ekspresyonunun kontrolünde en önemli görev proteazomundur. Siklin A, B, D, E, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, p53, c-fos/c-jun, c-myc, N-myc, IκB, p130, cdc25 fosfataz, tirozin aminotransferaz, topoizomeraz I, topoizomeraz IIα gibi hücre siklusu aracılıklı çalışan proteinlerin degradasyonundan sorumludur. PS-341 klinik kullanıma girmiş ilk proteazom inhibitörüdür (Adams, 2002.).

### **3.4. Aromataz İnhibitörleri ve ATAC**

Androjenin östrojene dönüşmesine aracılık eden aromataz enziminin inhibisyonunu sağlayan tamoksifen, aminoglutetimid, toremifen, formestan gibi aromataz enzim inhibitörleri östrojen pozitif kanserlerin tedavisinde kullanıma girmiş bir gruptur. Bu gruba yeni eklenen anastrozol (Arimidex®) adjuvan kemoterapide östrojen pozitif meme kanserlerinde en yaygın olarak kullanılan tamoksifenden daha etkili bulunmuştur. Son zamanlarda ATAC ( Arimidex-Tamoksifen alone or combination) tedavi şekli umut verici bulunup adjuvan olarak uygulanmaya başlanmıştır (Nicholis, 2002)

### **3.5. Epigenomikler ve Epigenetik Terapi**

Normal hücre büyümesinin kontrolü için genlerin epigenetik inaktivasyonu hayati önem taşımaktadır. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve diğer kromatin yapı komponentleri arasındaki iletişimi (crosstalk) kapsayan epigenetik mekanizmalar, gen transkripsiyon mekanizmalarının regülasyonuna önderlik eder. Bugün epigenetik inaktivasyon sağlayan küçük moleküller klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA metil transferaz (DNMT), histon deasetilaz (HDAC), histon metilaz (HMT) enzimlerinin inhibisyonlarına yönelik moleküllerin geliştirilmesi, metilasyon sessizleştirilen genin (methylation-silenced gene MLH1) reaktivasyonunu sağlayacak desitabin gibi moleküllerin kullanıma kazandırılması çalışmaları devam etmektedir (Brown ve Strathae, 2002).

Trikostatin A, RKO kolorektal kanser hücrelerinde MLH1 ve TIMP3 genlerinin ekspresyonunda sinerjistik reaktivasyon sağlamıştır (Cameron, 1999).

### 3.6. Histon Proteinlerin Modifikasyonu

Histon proteinlerinin modifikasyonu için kanser terapötiklerinde “gelecek dalga” terimi ile gelecekte bu terapinin oldukça önem kazanacağı vurgulanmıştır. Histon proteinleri amino terminalinden bağlanarak kromatin liflerini paketleyerek kromatinleri ve dolayısıyla DNA'nın esas ve işlevsel şeklini almasını sağlayan proteinlerdir. Ökaryotik kromatinleri paketleyen histon proteinleri özellikle H1, H2A, H2B, H3 ve H4 proteinleridir. Histon proteinlerinin post translasyonel modifikasyonları amino terminallerinin kuyruk kısmından asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ADP-ribozilasyon ve ubikinasyon ile gerçekleşir. Bu işlemlerin tümü enzimler tarafından gerçekleştirilir ve histon modifiye edici enzimlerin kodlanmasında meydana gelen bir mutasyon paketleme ve daha sonra yapılacak olan proteinlerde hata oluşturacağı için hücre normal işlevini yapamayacak ve kanser oluşabilecektir. P. Workman, kanseri “ Histonların modifikasyonu ile modüle edilen bir gen ekspresyon hastalığı olduğunu ve bu olaydan enzimlerin sorumlu olduğunu ” söylemiştir. Trikostatin A ve tropoxin gibi bazı doğal diğer sentetik histon deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin prelinik ve klinik çalışmaları sürmektedir. Trichostatin A'nın p53 geninin up-regülasyonu ve Hipoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) down-regülasyonu ile anjiyogenezini inhibe ettiği bulunmuştur. Histon asetiltransferaz (HAT) enziminin ilaç benzeri selektif inhibitörleri henüz bulunmamıştır ancak asetil-koenzim A ile peptid konjugatları dizayn edilip sentezlenmiştir (Chung, 2002; Molinari, 2000).

### 3.7. Hipoksi -indükleyen Faktör (HIF-1 $\alpha$ ) İnhibitörleri

HIF-1 $\alpha$ , anjiyogenezde oksijen dağılımını ve glikoliz sırasında hipoksiye metabolik adaptasyonu kontrol eder. İnsan kanserlerinde HIF-1 $\alpha$  aşırı eksprese edilir ve sonuç olarak intratümoral hipoksi ve onkogenler ve tümör supresör genlerde anahtar rol oynayacak değişimler meydana gelir. HIF-1 $\alpha$  tümör anjiyogenezini için gerekli olan VEGF gibi bazı proseslerde rol oynayan proteinlerin genlerinin 40'tan fazlası üzerinde kontrolü olan transkripsiyonel bir

faktördür. Tedavide başarısızlık ile ölümlerle sonuçlanan beyin, meme, serviks, özofageal, orofaringeal ve over kanserlerinin biyopsilerinde HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun aşırı olduğu gözlenmiştir. Klinik ve prelinik çalışmalar tirapazaminin hipoksik hücreler üzerine selektif olarak toksik olduğunu göstermektedir (Semenze, 2000).

### **3.8. Antianjiyojenik ve Antimetastatik Terapiler ve Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri**

Matriks metalloproteinazlar (MMPs), matriksinler olarak da bilinen ekstraselüler matriksin ana komponentlerini degrade eden ve çinkoya bağımlı çalışan endopeptidazlardır. Normal dokularda bu enzimler embriyonik gelişimde, ovülasyonda, meme bezlerinin küçülmesi ve yara iyileşmesinde remodeling olaylarında rol oynarlar. MMP'lerin anormal ekspresyonları romatoid artrit, osteoartrit, pulmonar anfizem ve tümör büyümesi, invazyonu ve metastazını kapsayan patolojik olaylarda ortaya çıkar. Bugün bilinen 19 MMP vardır (Duffy ve ark., 2000).

Kanserde hastalanma (morbidite) ve ölüm (mortalite) açısından en önemli sebep metastazdır. Karsinogenezde anahtar rol oynayan tümör supresör genler, DNA onarıcı enzimler ve c-onkogenlerde değişimler olurken, metastaza sebep olan proteazların ve motilite faktörlerinin ekspresyonu artar adhezyon moleküllerinin ekspresyonları değişir. Proteazlar aracılıklı metastazda ürokinaz-plazminojen aktivatörü, katepsin B, ve L, matriks metalloproteinazlar rol oynar. Kanser yayılmasında rol oynayan bu faktörlere yönelik uygulanan terapiler antimetastatik terapi olarak adlandırılır (Duffy, 1998a). MMP'ların inhibitörleri olan TIMP'lerle uygulanan antineoplastik terapi ve VEGF'ye yönelik anti-TNF- $\alpha$  antikolar ile yapılan çalışmalarda antianjiyojenik terapiler olarak gösterilmektedir (Griffioen ve Molema, 2000) Son on yılda yapılan çalışmalarda sinyal iletiminin altında yatan moleküler mekanizmaların temelinde hücre iskeletini de kapsayan hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriksinin olduğunu göstermiştir. Özellikle hücre-hücre bağlantılarının sitoplazmik plağında kalan moleküllerin nükleusa doğru lokalize olacak şekilde transkripsiyon faktörleri ile kompleks yaptıkları

gösterilmiştir. Buna ilaveten bu birleştirici plak proteinlerinin tümörjenezde etkin supresörler olarak rol oynadıkları da gözlenmiştir (Ben-Ze'ev 1997). Marimastat bugün bilinen ve oral olarak kullanılan klinik çalışmalardaki en iyi biyoyararlanım elde edilen kollajeni taklit eden hidroksamat yapısında bir bileşiktir (Duffy ve McCarthy, 1998b.) Marimastatın yanısıra araştırmaları süren MMP inhibitörleri de oldukça fazladır ve bunlardan bazıları romatoid artrit için kullanım için geliştirilmektedir (Michaelides, 1999).

### **3.9. Hsp90 İnhibitörleri**

Isı şok proteinleri (Hsp, heat shock proteins) kanser hücrelerini büyüme ve hayatta kalmaya sevk eden mutasyona uğramış, kimerik sinyal proteinlerinin stabilitesi için eşliği gerekli olan yol gösterici (chaperon) bir moleküldür. Mutant p53, Bcr-Arb, Raf-1, Akt, Erb2 ve HIF-1a, Hsp 90'ın müvekkil proteinleridir. Hsp90 inhibitörleri, tüm bu müvekkil proteinleri destabilize ettiği için prelinik model sistemlerinde umut verici antitümör etkinlik göstermişlerdir. Bir hsp90 inhibitörü olan 17-allilamino geldanamisin (17AAG) faz I klinik denemededir (Neckers, 2002).

### **3.10. STI571 (Gleevec™):**

STI571 (Gleevec, iminitab mesilat) spesifik kanser tedavisi için moleküler hedef için kullanıma yönelik geliştirilmiştir ve bu hastalarda mutajenik olan Bcr-Abl geni hedeflenmiştir. Gleevec Abl spesifik tirozin kinaz inhibitörüdür (Druker, 2002; Novak, 2001).

### **3.11. Siklin bağımlı Kinazların İnhibitörleri**

Hücre siklusunun regülasyonundaki anormallikler neoplazmalara sebep olur. İlaçlar, tümördeki patojenik kusurlar için sebep olarak gösterilen normal hücre siklusunun sürdürülmesini yöneten siklin bağımlı kinazlara (CDKs) karşı yöneltilmektedir. Storosporin, flavopiridol, olomusin, roskovitin, purvalanol, pollonlar, bütirolakton, aminotiazoller, benzokarbazoller, primidinler, tio/okzoflavopiridoller, oksindoller siklin bağımlı kinaz inhibitörleri olarak deneme çalışmaları devam eden gruplardır (Sausville, 2002).

### 3.12. Raf/MAP kinaz Yolağı

Ras-MAP kinaz yolağı, tümör hücrelerinin büyümesi, hayatta kalması, farklılaşması ve anjiyogenezde hayati rol oynaması nedeni ile araştırma laboratuvarları tarafından büyük ilgi çekmiştir. Ras, raf ve MEK bugüne kadar iyi çalışılmış olmakla beraber MAP kinazı hedefleyen bazı kk moleküller klinik arenaya yeni girmiştir. R11577, SCH66336, Bay-43-9006, CI-1040, PD184352 Raf/MAP kinaz yolağında inhibitör olarak test edilen maddelerdir (Herrera ve Sebolt-Leopold, 2002.)

### 3.13. ErbB Reseptör Ailesi

Kanser tedavisinde, yapısal olarak EGF reseptörleri ile ilişkilendirilen tirozin kinaz reseptörleri olan ErbB ailesini hedefleyen ZD1839 (Iressa®), OSI-774 (Tarceva®), Cetuximab® (IMC-C225) ve Trastuzumab (Herceptin®) klinik çalışmalara sunulan ve çalışmaları halen devam eden maddelerdir (de Bono 2002).

## 4. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN HÜCRELER, TEST MADDELERİ VE YÖNTEMLER

### 4.1. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN HÜCRELERİN ÖZELLİKLERİ

#### 4.1.1. A549 Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu:

Akciğer kanserleri içinde görülme sıklığı en yüksek (%70) kanser türü olan küçük hücreli olmayan (non-small cell) akciğer kanseri seçildi. 1972 yılında D.J. Giard tarafından 58 yaşında bir Orta Asyalı erkek hastadan alınıp eksplant kültüre alınan epitelial özellikte adherent akciğer karsinomudur. Keratin üretmektedir ve üretilen keratin immüno peroksidaz ile pozitif reaksiyon vermektedir. M. Lieber tarafından daha sonra yapılan çalışmalar A549 hücrelerinin sistidin difosfokolin yolağından yüksek oranda desatüre yağ asitleri ile birlikte lektin de sentezlediklerini göstermiştir. Revers transkriptaz negatiftir (Lieber ve ark., 1976; Lewis ve ark., 1996).

#### 4.1.2. HeLa serviks adenokarsinomu

31 yaşında zenci bir kadından alınarak W.F. Scherer tarafından stoklanan adherent ve epitelial serviks adenokarsinom hücreleridir. Lizofosfatidilkolin AP-1 aktivitesi ve protein kinaz-C bağımlı yolak ile c-jun-terminal kinaz aktivitesi oluşturur. Hücreler immünoperoksidaz ile boyanmaları sonucunda keratin için pozitif reaksiyon verirler. HeLa hücrelerinin insan papilloma virus 18 (HPV-18) sekuensleri taşıdığı rapor edilmiştir. P53 ekspresyonu düşük ve pRB (retinoblastoma supressör) düzeyi normal olarak tespit edilmiştir. Poliovirus 1, 2, 3; adenovirus 3, ensefalomiyokardit coxsackievirus B serotiplerine duyarlıdır. Hücrelerin %98'inde küçük telosentrik kromozomlar vardır. Test edilen 1385 hücrenin tümü anöploididir. Literatürde dört tipik HeLa marker kromozomu rapor edilmiştir (Chen, 1998; Boshart ve ark., 1984; Shneider-Gadicke ve ark., 1986; Schwarz, 1986; Pater ve Pater, 1985; Yee ve ark., 1985; Jones ve ark., 1971; Fang ve ark., 1997; Huber, 1997) .

#### 4.1.3. HT-29 kolorektal adenokarsinomu

J. Fogh tarafından 44 yaşında A Rh(+) kan grubuna sahip bir orta asyalı kadından alınarak kültüre edilmiş adherent, epitelial insan hücreleridir (Fogh, 1975; Fogh ve ark., 1977a; Fogh ve ark., 1977b). IgA'nın sekretuar komponentlerini, karsinoembriyjenik antijeni (CEA), TGF-beta bağlayıcı protein ve musin üretir (Hanski ve ark., 1992; Butzow ve ark., 1993; Lesuffleur, 1993). Ultrastrüktür karakterleri; mikrovillus, mikroflament, geniş vakuollü ve koyu granüllü mitokondriler düz ve granüllü endoplazmik retikulumlar ve serbest ribozomlar, yağ damlacıkları, az sayıda primer ve çok sayıda sekonder lizozomlar içerir. Virüs partikülleri yoktur (Didier ve ark., 1996; White ve ark., 1996). HT-29 hücreleri ürokinaz reseptörlerini eksprese ederler, fakat tespit edilebilir bir plasminojen aktivatör aktivitesine sahip değildirler. P53 geninin Arg -> substitüsyonu ile son bulan 273. Kodonunda a G -> A mutasyonu vardır. P53 antijeni yüksek miktarda üretilmektedir. Hücreler CD4 için negatiftir, fakat hücre yüzeyinde HIV için alternatif reseptör olan galaktoz seramid ekspresyonu vardır (Adachi ve ark., 1987; Fantini ve ark., 1992; Barnett ve ark., 1991). myc+, ras+, myb+, fos+, sis+, p53+, abl-, ros-, src- onkogenlerini taşır, c-myc, K-ras, H-ras, N-ras. Myb, sis ve fos onkogenlerinin ekspresyonları pozitif olmasına rağmen N-myc onkogen ekspresyonu saptanamamıştır (Pollack ve ark., 1981; Trainer ve ark., 1988; Anonim, 2002; Chen, 1987; Santoro ve Groden, 1997; Tsao ve ark., 1998; Qian ve ark., 1997; Wang, 1996; Young, 1996; Groh, 1996; Takahashi, 1996). Vitamin D reseptör ekspresyonu düşüktür (Shabahang ve ark., 1993). İnsülin uygulanmış HT-29 hücrelerinin alfa-2-adrenerjik reseptör sayısında doz ve zamana bağlı azalmalar gözlenmiştir (Devedjian, 1991).

#### 4.1.4. MCF-7 Meme adenokarsinomu

C.M. McGrath tarafından 69 yaşında 0 Rh + kan grubuna sahip orta asyalı bir kadından plevral efüzyon ile elde edilmiş adherent, epitelial süt bezi adenokarsinomudur (Soule, 1973;. IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP) BP-2, BP-4, BP-5 üretir (Bellet ve ark., 1997;. Östrojen reseptörü pozitif hücrelerdir (Takahashi ve ark., 1993; Pratt ve Pollak, 1993; Taşıdığı onkogen Wnt7h + ve Tx-4 tür. MCF-7 hücrelerinin büyümeleri TNF- $\alpha$  tarafından inhibe edilir

(Sugarman ve ark., 1985; Brandes ve Hermanat, 1983;. IGFBPlerin sekresyonu anti-östrojen tedavisi ile modüle edilebilir. MCF-7 hücreleri sitoplazmik östrojen reseptörleri aracılığı ile östradiol'ü prosesleme de dahil diferansiye olmuş meme epitel hücrelerinin çeşitli özelliklerini taşımaktadır. (Anonim, 2002; Lan, 1990; Littlewood-Evans ve ark., 1997; van Dijk ve ark., 1997; Umekita ve ark., 1996; Zamora-Leon ve ark, 1996; Geiger ve ark, 1998; Jang ve ark., 1996; Lee ve ark., 1996; Chang vePastan, 1996; Zhu, 1996; Bacus, 1990). Radyosyon uygulanan MCF-7 hücrelerinde çekirdekte p53 akümülyasyonunun p21waf1 ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir ve p53'ün hücre siklusu süresince değişimleri araştırılmıştır (Komarova ve ark., 1997). Bir diğer çalışmada da p53 ile mdm2 ekspresyonu ilişkilendirilmiştir (Landers ve ark, 1997).

#### **4.1.5. NIH3T3 Fibroblast Hücreleri**

S.A. Aaronson tarafından stoklanan NIH Swiss fare embriyosundan elde edilen kontakt inhibisyona duyarlı adherent fibroblast hücreleridir. Özellikle DNA transfeksiyonu ve transformasyon çalışmaları için kullanılmaktadır. Ectromelia virus (mousepox) virüsü için test edilmiş ve negatif bulunmuştur. Fare sarkoma virusleri ve murine lösemi virüslerine duyarlıdır. Kültürdeki hücrelerin normal çalışması için haftada bir kez yüzeyi tamamen kaplamadan pasajlanmalıdır (Anonim, 2002; Jainchill ve ark., 1969).

## **4.2. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN MADDELERİN ÖZELLİKLERİ**

### **4.2.1. Paklitaksel (Taxol®)**

Bu bileşik ilk kez *Taxus brevifolia*'dan 1971 yılında izole edilmiştir. Vinca alkaloidleri ve kolşisin türevlerinden farklı olarak mikrotübül formasyonunu inhibe değil promote eder ve mitoz inhibitörü olarak farmakolojik etki gösterir (Wani ve ark., 1971). Klinik kullanımına sunulmasını takiben sisplatine dirençli over kanserlerinin tedavisi için uygun görülmüştür (Rowinsky ve Done-hower, 1995) ve meme, akciğer, özofagus ve baş-boyun kanserlerine karşı ümit verici bulunmuştur. İlaç kombinasyonlarında optimal dozu, doz rejimi

ve kullanımını tamamen anlayamamıştır. Akciğer ve prostat kanserlerine ve kaposi sarkomu üzerine olan etkileri araştırılmaktadır (Reynolds, 1996).

Paklitaksel çekirdeğinde kompleks taksan halkaları içeren bir diterpenoid bileşiktir. Yan zincir taksan halkasına antitümör aktivite için gerekli olan karbon 13'ten bağlanmıştır. Yan zincirin modifikasyonu meme ve over kanserlerine karşı klinik aktiviteye sahip daha aktif bir analog olan dosetaksel (Taxotere®)'ye önderlik etmiştir. Molekülün çözünürlüğü düşüktür ve taşıyıcı olarak %50 etanol ve %50 polietoksillenmiş hintyağı (Cremophor EL) içinde uygulanmaktadır, muhtemelen hastanın, difenilhidramin gibi H<sub>1</sub> antihistaminik, simetidin gibi H<sub>2</sub> antihistaminik ve deksametazon gibi kortikosteroidlerle engellenemeyen aşırı duyarlık reaksiyonlarından sorumlu olan bu formülasyondur. Paklitaksel, esasen *Taxus brevifolia*'nın gövde kabuklarında izole edilen ve çeşitli kültüre alınmış kanser hücrelerinde antiproliferatif ve kanserli hastalarda, antineoplastik etkiler gösteren diterpen bir bileşiktir. Bu etkiler taksolün tübülün polimerizasyonunu artırma yeteneği ve tübülün depolimerizasyonunu engellemesi ile ilişkili görünmektedir. Ayrıca taksolün gen ekspresyonunu da değiştirdiğine ilişkin çalışmalar mevcuttur (Toillon ve ark., 2000; Hawkins ve ark., 1996 ).

Paklitaksel mikrotübüllerin  $\alpha$ -tübülün alt ünitesine spesifik olarak bağlanır ve bu anahtar hücre iskeleti proteininin çözülmesini antagonize ederek etki göstermektedir. Bunun sonucunda, paklitaksel uygulanan hücrelerde mikrotübül demetlerinin çözülmemesinden kaynaklanan hatalı yapı oluşur ve bunu mitozun durdurulması takip eder. Hücre ölümü hem ilaç konsantrasyonuna hem de hücrelerin maruz kalma süresine bağlıdır. Hücre kültürlerindeki tümör hücreleri *mdr-1* geni ve bunun ürünü P-glikoprotein ile rezistans gösterirken, bazı hücre soyları tübülün polimerizasyonunda mutasyon ile paklitaksele rezistan hale gelirler, bu mutasyon sonucunda Vinca alkaloidlerine karşı duyarlılıklarının arttığı gözlenmiştir (Cabral, 1983.). Klinik olarak gözlenen rezistansın temelinde ne olduğu ise bilinmemektedir.

Paklitaksel klinik olarak 3 ve 24 saatlik infüzyonlar halinde uygulanır. Daha uzun süreli infüzyonlar (96 saat) meme kanserleri hastalarında ilk uygulamada yüksek cevap alabilmek için uygulanır. (Wilson , 1994). Paklitaksel yoğun olarak P450-aracılıklı hepatik metabolizmaya uğrar (izoenzimleri CYP3A ve CYP2C), dozun %10'unundan daha azı idrarla atılır. Ana metaboliti 6-hidroksipaklitakseldir, ancak idrar ve plazmada daha farklı metabolitleri de tespit edilmiştir (Cresteil, 1994). Taksolün over kanserlerinde kullanımına ilişkin sunulan bir raporda taksolün over kanserleri için önemi ve kullanılmakta olan diğer aktif ilaçlarla kombinasyonları ve bunların klinik kullanımları tartışılmıştır (Runowicz, 1993). Taksole ait, MCF-7 hücreleri ile yapılmış pek çok antikanser etki çalışmaları vardır. MCF-7 hücreleri kullanılarak yapılan bir *in vitro* çalışmada taksolün 2-100 nM konsantrasyonları hücrelerin büyüme inhibisyonu, koloni formasyonu, DNA fragmentasyon testleri uygulanarak araştırılmış ve taksolün tiazofurin ile kombinasyonları test edilerek antiproliferatif ve apoptotik etkileri gösterilmiştir (Olah, 1996). Taksol kullanılarak MCF-7 hücreleri ile yapılan bir mekanizma çalışmasında plazma membranı östrojen reseptörleri aracılığı ile meydana gelen apoptozun östradiol (E<sub>2</sub>) ile engellendiği gösterilmiştir (Razandi, 2000) MCF-7 hücreleri ile yapılan bir mekanizma çalışmasında Bcl-2 gen ekspresyonu ile östrojen miktarının ilişkili olduğu ve östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücrelerinde antitümöral aktiviteden östrojenin sorumlu olduğu taksol kullanılarak gösterilmiştir (Huang ve ark.,1997). Paklitaksel ve radyasyon uygulayarak HeLa ve MCF-7 hücrelerinin de içinde olduğu dört hücre tipi üzerinde bisbenzimid (Hoechst-33258) ile yapılan mikronükleus testinde paklitakselin genotoksik etkileri saptanmıştır (Preisler ve ark., 1999). MCF-7 ve MD-MBA-468 meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada paklitakselin 1-500 nM dozları denenmiş ve seramid jenerasyonu ve apoptoz üzerine olan etkileri araştırılmıştır (Charles ve ark., 2001). MCF-7 meme kanseri ve DLD-1 kolon karsinoma hücreleri ve multiselüler sferoidleri ile yapılan bir çalışmada hücre migrasyonu ve sferoidlere ilaç penetrasyonu doz ve süre değiştirilerek araştırılmıştır (Nicholson ve ark., 1997). MCF-7 hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada 0-20 ng/ml dozda uygulanan paklitakselin apoptoz oluşturduğu ve bu etkinin kafein ile güçlendiği tespit edilmiştir (Saunders ve ark.,1997).

Flutax (taksoid) ile MCF-7, HeLa, OVCAR-3 ve K562 hücreleri ile mikrotübül formasyonu çalışmasında standart olarak taksol kullanılmış ve interfaz sırasında flutax bağlanması ile kromozom, DNA parçalanması, tübülün polimerizasyonu ve mikronükleus testleri uygulanmış ve hücre siklusu de-regülasyonu ile hücre ölümü tespit edilmiştir (Abal ve ark., 2001). Bir klinik çalışmada metastatik meme kanserine karşı vinorelbin ve paklitaksel kombinasyonu önerilmiştir (Cocconi ve ark., 2000.). Myeloblastik lösemilerde paklitakselin koloni stimüle edici faktörler, sitozin arabinozid ve trans retinoik asitler ve hidrokortizon ile kombinasyonları hücre kültürlerinde test edilmiş ve sinerjistik etkileri gösterilmiştir (Curtis ve ark., 1996). Bir başka çalışmada paklitakselin kumarin ile kombinasyonunda sinerjik etkiler tespit edilmiştir (Zobel ve ark., 2000). Kanseröz kolon hücreleri ve polipozda paklitaksel rezistansına bağlı olarak p-glikoprotein ekspresyonunda artış gözlenmiş ve normal kolon epitelial hücrelerinde minimal etki olduğu gösterilmiştir (Sheppard ve ark., 1999). Normal ve maliyn hücrelerde yapılan bir hücre kültürü çalışmasında akciğer fibroblastları ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde paklitakselin toksisitesine karşı aminofostin kullanılmıştır (Taylor ve ark., 1997).

A549 hücreleri ile yapılan bir çalışmada p53 (wild-type) geninin olması ya da olmamasının paklitakselin apoptotik etkisini değiştirmedığı gösterilmiş ve yüksek doz yerine klinik olarak yinelenen düşük dozlarda kullanılması önerilmiştir (Das ve ark., 2001). Multiselüler over kanser hücre sferoidlerinde taksolün hücre siklusunu G<sub>2</sub>-M fazında durdurduğu gösterilmiştir (Frankel ve ark., 1997). Paklitakselin etki mekanizmasına yönelik daha önceden yapılan genetik bir çalışmada, çalışmalarımızda kullandığımız HeLa, MCF-7 ve NIH3T3 fibroblast hücreleri kullanılmıştır (Makino ve ark., 2001). Paklitakselin suda çözünen polimerik misellar formu ile yapılan bir çalışmada androjenden bağımsız prostat tümörleri ile apoptotik etki çalışılmış ve bu formun kombinasyonları prelinik çalışmalar için önerilmiştir (Leung ve ark., 2000).

#### 4.2.2. Kersetin (Quercetin)

Kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) yenebilir sebze ve meyvelerde en yaygın olarak bulunan bioflavonoidlerden biridir. Maliyn hücrelerin büyümesini glikoliz ve makromolekül ve enzim sentezinin inhibisyonu, östrojen tip II bağlanma bölgesi ile etkileşmesi sonucu hücre siklusunu dondurması gibi mekanizmalarla maliyn hücre büyümesini durdurur. Ayrıca kersetin Hsp ekspresyonunu durdurur ve tümör hücrelerini apoptoza sevk eder (Pawlikowska-Pawlega ve ark., 2001; Wie ve ark., 1994). Kersetinin mitokondriyal ATPaz, fosfodiesteraz, histidin dekarboksilaz, protein-tirozin kinaz, tripsin ve lizin aminopeptidazları inhibe ettiği, antioksidan, antimitojenik, antikanser ve antifungal etkileri olduğu bildirilmiştir (Bilaloğlu ve Harmandar 1999.). Flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Kersetinin de içinde bulunduğu çeşitli flavonoidler ile MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, kersetin tirozin spesifik protein kinazları inhibe etmektedir (So ve ark., 1997). Günlük diyetlerde 1 gram flavonoid alınımının tümör oluşumuna karşı sitoprotektif etkili olduğu söylenmektedir. MCF-7 hücreleri ile yapılan bir diğer çalışmada mirisetin, epikateşin ve kersetinin sitokrom p450 üzerine olan etkileri araştırılmış ve anti-tümör ilaçlar ile kombinasyonlarının sinerjik etkileri olduğu savunulmuştur (Rodgers ve ark., 1998). HL-60 lösemi hücreleri ile yapılan bir çalışmada kaspaz-3 ve 9 aktivasyonları ile sitokrom c salınımı araştırılmış ve etkilerinin hidroksil grupları ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Wang ve ark., 1999). 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenaz (tip 5) enzimi, östrojen androjen metabolizmasının bir üyesidir. Kersetinin de içinde bulunduğu bir grup fitoöstrojenin 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenaz tip 5 enzimi üzerine olan etkileri araştırılmış ve aromaz inhibitörü olma potansiyelleri test edilmiştir. Bu enzimi inhibe ettikleri için kansere karşı proflaktik olarak flavonlarca zengin olan soya ile beslenme önerilmiştir (Krazeisen ve ark., 2001). MCF-7 ve MD-MBA-468 meme kanseri hücreleri ile şaraptaki polifenollerin p53 gen ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmış etkilerinin doza bağımlı olmadığı ve p53 gen modülasyonunu sağlamadıkları tespit edilmiştir (Soleas ve ark., 2001). Antiproliferatif etkili flavonoidlerle Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerinde askorbik asit

akümülyasyonunu engelleyerek antiproliferatif etkilerini gösterdikleri savunulmaktadır. Askorbik asit pek çok biyokimyasal reaksiyon için gerekli kofaktör olan suda çözünen çok önemli bir antioksidan bir maddedir ve ayrıca önemli genlerin ekspresyonlarını da regüle etmektedir. Kersetinin, askorbik asit oksidasyonunu sağlayarak antiproliferatif etki gösterdiği tartışılmaktadır (Kuo ve ark., 1997). Sebzeler, domates ve çaydaki antioksidanların etkilerinin anlatıldığı bir derlemede kersetin ve besinlerle alınan diğer polifenolik bileşiklerin besin olarak hazırlanışı ile biyoyararlanımı ve farmakolojik etkileri tartışılmıştır (Weisburger, 1999). HeLa ve A549 hücrelerinin de kullanıldığı üç boyutlu ve iki boyutlu kültür sisteminde kersetinin Hsp27 ısı şoku proteini üzerine etkileri araştırılmış ve üç boyutlu sisteminde hücrelerin ilaçların etkilerine rezistans gösterdikleri, iki boyutlu sistemde etkili olan kersetinin sadece A549 üç boyutlu sisteminde etki gösterdiği bulunmuştur (Jakubowicz-Gil ve ark., 2002). Bitkisel kaynaklı polifenollerin pankreas kanserlerinde mitokondriyal sitokrom C salınımını sağladıkları ve apoptoz oluşturdıkları, ayrıca kersetinin metastazı da engellediği bulunmuştur (Mouria ve ark., 2002). Soya fasulyesi ile beslenen Asya halkında meme kanserlerinin az görüldüğü tespit edilmiş ve soya fasulyesinde bol bulunan iki fitoöstrojen genistein ve kersetinin etkilerinin MCF-7 ve HeLa hücrelerinde erkilerinin östrojen reseptörlerin m-RNA'larının down-regülasyonuna bağımlı olarak gösterdikleri saptanmıştır (Maggiolini ve ark., 2001). Flavonoidlerin antioksidan etkilerinin çalışıldığı bir çalışmada, oksidatif bir reaksiyon olan hemoglobin glikozilasyonundan yararlanılarak kersetin ve flavonoid içeren bitkilerin diabetik komplikasyonlara karşı koruyucu olabileceği savunulmuştur (Asgary ve ark., 1999). HeLa hücreleri ile yapılan bir çalışmada kersetinin süperoksit dismutaz aktivitesini artırarak, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Horakova ve ark., 2001). Colo-320 kolon kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada proliferasyonu engelleyen fitoöstrojen taşıyan bitkisel ilaçlar kansere karşı protektif olarak önerilmişlerdir (Mori ve ark., 2001). Kersetinin MMP gen regülasyonu üzerine etkisi olduğu, TIMP-1 ve 2 düzeyleri çalışılmış ve sadece TIMP-1 gen transkripsiyonunu artırdığı ve MMP-2 ve TIMP-2 üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Morrow ve ark., 2001). Rodent ve insan hücrelerinde kersetinin mutant H-ras ve p53 ekspresyonu üzerine olan

etkisi ile neoplastik fenotip hücrelerde modülatör etki gösterdiği savunulmaktadır (Avila ve ark., 1996). Kersetin ile yapılan bazı yayınlarda kersetinin etkilerinin spesifik olmaması tartışılmış ve sitokinler ve tirozin protein kinazlar üzerine modülatör etkileri tartışılmıştır (Barret ve ark., 1993; Kenny ve ark., 1990).

#### 4.2.3. Berberin

Berberin, *Coptidis* ve *Berberis* türlerinde bulunan izokinolin türevi bir alkaloiddir. Berberinin antiülser, antimikrobiyal gibi diğer etkilerinin yanında antikanser etkilerinin de olduğu bilinmektedir (Leibich ve ark., 1998). Bundan dolayı berberin içeren bitkiler geleneksel tıpta kullanılmaktadır ve Çin tıp tarihinde az 3000 yıllık bir kullanıma sahiptir (Timoty ve ark., 1997). Yapılan bir çalışmada, berberin malignant beyin tümörleri için test edilmiş, insanda beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılması için daha fazla klinik çalışma yapılması önerilmiştir (Zhang ve ark., 1990). Berberin EL4 lösemi hücrelerine trityum işaretli timidinin inkorporasyonunu inhibe ettiği, makrofajları aktive ettiği ve tümörostatik olduğu saptanmıştır (Kumazawa ve ark., 1984). Antibakteriyal, antimalaryal, antileishmaniyal etkileri bildirilmiştir. Son zamanlarda berberinin antitümoral etkileri klinik onkologların ilgisini çekmektedir. Beyin tümörleri, özofagus kanseri, lösemi ve kolon kanserleri üzerine test edilmiş ve önemli derecede öldürücü etkileri bulunmuştur (Kuo ve ark., 1995; Kuo ve ark., 1996; Iizuka ve ark., 2000). Berberinin 5-200 µM dozlarının sküamöz hücre karsinomu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ölçümler 30-90 dakika gibi çok kısa sürelerde yapılmış ve doza bağımlı DNA hasarı gözlenmiştir (Szeto ve ark., 2002). Berberin ve paklitaksel kombinasyonlarının çeşitli sindirim sistemi kanserlerinde denenmiş, berberinin multi-drug rezistan transportörü olan pgp-170 ekspresyonunda up-regülasyona sebep olduğu tespit edilmiştir (Lin ve ark., 1999).

Özofagus kanser hücrelerinde berberin ve *Coptidis* rizomları ile yapılan bir çalışmada berberinin 0.25-10 mg/ml dozları kullanılmış ve 72 saat sonunda MTT testi ile proliferasyonu doza bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (Iizuka ve ark., 2000). DLD-1 insan kolon kanserleri ve β-galaktozidaz taşıyıcı

gen sistemlerini kullanılarak spesifik olarak Cox-2 transkripsiyonu araştırılmış ve kolon kanserlerinde berberinin Cox-2 transkripsiyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Fukuda ve ark., 1999). Protoberberin alkaloidleri ile larinks, farinks ve uterus kanser hücreleri üzerinde yapılan sitotoksik testlerinde, berberinin kanser hücreleri üzerine sitotoksik olduğu, ancak selektivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir (Orfila ve ark., 2000). Daha önce yaptığımız bir çalışmada berberinin C6 gliomalar üzerine selektif olarak sitotoksik etki gösterdiğini gözlemlenmişti (Korkmaz ve ark., 2000). Berberinin antikanser etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar henüz az sayıda olduğu için çalışmamızda berberin tercih edilmiştir.

#### **4.3. ÇALIŞMALARDA KULLANILAN YÖNTEMLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER**

Hücre membranının seçici geçirgenliğine bağlı olarak vital boyalar hücrenin çeşitli organellerine karşı afinite gösterirler; tetrazolyum tuzları ve Janus yeşili-B mitokondriye, neutral red up-take lizozomlara, seramid analogları Golgi aygıtına, Hoechst 33258 ve DAPI çekirdeğe affinite duyarlar. Çok yaygın olarak kullanılan tripan mavisi ve nigrosin WS ise ölü hücreleri boyarlar. Vital boyalar, hücre besiyerine verildiklerinde canlı hücreleri selektif olarak boyayan ekstrinsik işaretleyicilerdir (Celis, 1998; Barile, 1997; Roguet, 1997).

##### **4.3.1. Tripan Mavisi Diskalifikasyonu**

Tripan mavisi diskalifikasyonu, hücre bütünlüğü bozulan hücrelerin boyanması esasına dayanır ve yaşayan ( boyanmayan ) hücrelerin ayırt edilmesini sağlar ve büyüme eğrilerinin çıkartılmasında canlı kalan hücrelerin sayılmasını kolaylaştırır. Her iki odacıkta beşer alan boyanan-ölü ve boyanmayan-canlı hücreler olarak sayılır. Canlı hücreler parlak ve şeffaf yuvarlak halinde görülürken ölen hücreler kenarları düzensiz ve boyalı/mavi olarak görülür. Boya ile hücrelerin uzun süre muamelesi canlı hücrelerin de boyanmasına sebep olacağı için hücreler boya da uzun süre bekletilmeden sayılmalıdır.

**ml'deki Hücre Sayısı** = karedeki ortalama hücre sayısı x dilüsyon faktörü x 10<sup>4</sup> (Formül 5)

**Total Hücre Sayısı** = ml'deki hücre sayısı x hücre örneğinin toplam volümü (Formül 6)

**% Hücre canlılığı (Cell Viability)** = Toplam yaşayan hücre (boyanmamış) / Toplam hücre (boyanmış ve boyanmamış) x 100 (Formül 7)

formülleri kullanılarak yaşayan hücreler hesaplanır (Giannoni ve ark., 2000, Ercoli ve ark.,1998).

#### **4.3.2. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Testler ve MTT Ölçümü:**

*In vitro* çalışmalarda hücre sayısının ifade edilmesini sağlayan farklı biyolojik ölçümler vardır. MTT hücre proliferasyon ölçümü hücre proliferasyonunu, canlılığını ve sitotoksisiyeyi ölçmekte kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Holst-Hansen ve Brünner, 1998). Bu tekniğin mitokondriyal enzim sistemleri tarafından katalize edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayandığı ve hücre büyümesi ve ksenobiyotik sitotoksitesini yansıttığı bildirilmiştir. Her ne kadar kolay, uygulanabilir ve kolaylıkla otomatize edilebilir olsa da belirli artifaktlar tarafından etkilenmektedir.

Yaşayan hücreler bazı vital boyalar kullanılarak boyanabilmektedir, ancak yıkama basamakları hem süreyi uzatmakta, hem de hata payını arttırmaktadır. ELISA cihazı (çok kuyucuklu plaka okuyucu) çok miktarda örneği, yüksek oranda doğrulukla okuyabilir, böylece kullanılan renk reaksiyonunu yaşayan hücre sayısı olarak değerlendirebilme imkanı sağlar. Bu tür kolorimetrik ölçümlerde ideal olan renksiz substratlar kullanarak yaşayan hücrelerde renkli ürünler elde etmektir. Tetrazolyum tuzları bu amaçla kullanılan, substrat olarak renksiz, yaşayan hücrelerin aktif mitokondrilerinde renkli ürünler veren maddelerdir. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) bu amaçla kullanılan bir tetrazolyum tuzudur ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Formazan tuzları organik solventlerde (DMSO, izopropanol gib) kolayca çözünürler.

Solventte çözünen materyalin optik dansitesi, çözülmüş olan boyanın konsantrasyonunun verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçülen değer direkt olarak kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini verir, bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (Mosmann, 1983; Denizot ve Lang, 1986; Carmichael ve ark., 1987). Bu yöntem hızlı kolay ve çalışma basamaklarının az olması ve 96 kuyucuklu plaka ile çalışma imkanı olması açısından hızlı kolay ve çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren bir testtir (Reile ve ark., 1990; Kueng ve ark., 1989; Senaratne ve ark. 2000).

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

#### **4.3.3. Lizozomal Aktiviteye Dayanan Testler ve Neutral red up-take (NR) Ölçümü**

Borenfreund ve Puerner (2000) tarafından tanımlanan ve çok yaygın olarak kullanılan bu teknik, lizozomlar tarafından katyonik boya (Neutral Red) uptake'ine dayanır. Supravital bir boya olan neutral red up-take zayıf katyonik bir boyadır ve noniyonik difüzyonla hücre membranından penetre olarak lizozomlarda akümüle olur ve lizozomal matriksin anyonik bölgelerine bağlanır. Hücre yüzeyinde veya lizozomal membranda meydana gelen değişiklikler lizozomal hassaslığa ve diğer irreversibl değişmelere önderlik ederler. Ksenobiyotiklerin aktivasyonu ile meydana gelen bu değişimler NR'in bağlanmasında veya up-take'inde azalmaya sebep olur. Bu nedenle yaşayan-sağlıklı, hasarlı-ölü hücreler boyayı almaları farklı olur ki, bu da yöntemin temelini oluşturmaktadır. Uygulanabilirliği yüksek ve duyarlı olan bu test otomatik hale getirilebilir ve diğer sitotoksisite testleri ile kombine edilebilir. Hücrelerin metabolik aktivitesi farklı düzeylerde tespit edilebilir. Ksenobiyotiklerin etkisi hücre fizyolojisi ve spesifik makromoleküllerin sentezini

baz alan tekniklerle ölçülebilir (Anonim, 2000a,b; Horakova ve ark., 2001; Shen, 1998; Xie ve ark., 1999).

#### **4.3.4. Hücre Çekirdeği Ölçümüne Dayanan Testler ve Kristal Viyole Yöntemi**

Hücrede DNA miktarını ölçmek için kullanılan pek çok yöntem ve kitler vardır. Bunlardan en yaygın kullanımı olan testlerden biri bromodeoksiüridin DNA proliferasyon kitleridir. Kristal viyole ise son zamanlarda popülaritesi artan ve web sitelerinde kanserojen olan etidyum bromüre alternatif olarak önerilen bir boyadır.

Bu yöntem de sitotoksik aktiviteyi göstermekte kullanılan hızlı ucuz ve kolay bir yöntemdir. Gluteraldehit veya formaldehit ile fikse edilen hücreler, kristal viyole ile boyanır. Boya direkt çekirdek tarafından absorbe edilir. Yıkama işlemi ile absorbe edilmeyen boya ortamdan uzaklaştırılır. Spektrofotometrik olarak ölçülen nükleer ekstraktların optik dansitesi ile hücre miktarı arasında direkt ilişki kurulur (Gillies ve ark.,1986; Kueng ve ark., 1989; Reile ve ark., 1990; Senaratne ve ark., 2000).

#### **4.3.5. Hücrelerin Koloni Oluşturma Yeteneklerinin Ölçülmesi Yumuşak Agar Koloni Formasyonu**

Çift agar tabakası arasına tek tek ekilen hücrelerin, ksenobiyotiklerin etkisi ile koloni oluşturabilme kabiliyetlerindeki değişimleri ölçmeye yarayan bir testtir. Ancak efektif olarak kemotaktik ve kemokinetik cevaplar ayırt edilemez. Kemokinez ve kemotaksis arasındaki farklar Zigmond Çemberi yöntemi ile ölçülür (Celis, 1998). Hastadan alınan dokudaki hücreler ile yapılan yumuşak agar koloni formasyon testlerinden elde edilen sonuçlar ile ilacın hastaya uygulanması ile birebir örtüşen sonuçlar elde edilmiştir. Bu sebeple koloni formasyon testi antineoplastik ilaçların *in vitro* yanıtları ile ilacın hastaya uygulanması ile elde edilecek *in vivo* cevapları tahmin edebilmek için pratik bir yöntemdir (Von Hoff,

1983). Koloni formasyonu hücre adhezyonu ile ilgili testlerde karşılaştırma yapmak amacı ile de kullanılabilir (Yeates ve Powis, 1997).

#### **4.3.6. Hücrelerdeki DNA ve RNA Miktarları ve Akridin oranj ile Boyama**

Nükleer kromatinler hücre siklusu boyunca yoğunlaşmaya başlarlar. Mitozda maksimum yoğunlaşma gözlenirken S fazına girdiğinde yoğunlaşma azalmaya başlar. Bu yöntem ile nükleik asitler (DNA-yeşil ve RNA-turuncu) floresan olarak boyanır (Kasten, 1981). Etidyum, akridin oranj, proflavin gibi (planar aromatic cation) maddeler DNA'nın iki zinciri arasında birikir ve U.V. lambası ışığında serbest boya dan çok fazla floresans gösterir, deney bu esas göz önünde tutularak uyulanmaktadır. DNA miktarına bağlı olarak floresans miktarı da değişmektedir (Celis1998). Elde edilen sonuçlar diğer testlerde elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılacak. Bu yöntem ile elde edilen preparatlar, tezde sadece fotoğraf olarak verilecek, sayım yapılmayacak .

## 5. AMAÇ

Kanser, üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan biri olmasına rağmen, halen radikal tedavisinin bulunamaması sebebi ile ilgiyi toplamaktadır. Günümüzde insidensi yüksek olan ve ölüm oranlarında kanserler içinde ilk sıraları alan akciğer, kolon, meme ve serviks kanserleri olduğu için çalışmalarımızda bu kanserleri kullanmayı tercih ettik. Ayrıca çalıştığımız hücreler kendi kategorilerindeki çalışmalarda en çok kullanılan ve pek çok yönüyle tanınan hücrelerdir. Bunları bilmemiz bize çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçları daha güvenilir bir şekilde değerlendirme imkanı vermektedir.

Tercih ettiğimiz test maddelerinden paklitaksel, üzerinde pek çok klinik ve prelinik çalışma yapılmış ve etkileri ve toksisitesi iyi bilinen ancak, çalışmalarımızda kullandığımız dozları ve kullandığımız hücre ve yöntem kombinasyonları çalışılmamış, standart madde olarak iyi bir örnektir.

Kersetin, antioksidan özelliği sebebi ile bilinen ve günlük olarak tükettiğimiz sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan, kanser üzerine etkileri araştırılmaya devam edilen, ancak üzerinde halen bir sonuca varılamamış popüler bir maddedir. Ayrıca antioksidan maddelerin aynı zamanda antikanser etkilerinin olduğuna dair inancı test etmekte kullanabileceğimiz bir prototiptir.

Berberin ise, antikanser özelliği açısından son yıllarda önem kazanmaya başlayan, araştırmanın sınırları henüz yeni olarak uzak- doğudan batıya genişlemiş, uzun yıllardır Çin halk tıbbında kullanılan ancak yeterli bilimsel destekten yoksun bir maddedir. Bu sebeple daha önce yaptığımız çalışmalar doğrultusunda, berberini daha çok kanser tipinde ve farklı yöntemlerin kombinasyonu ile çalışmayı amaçladık.

Tüm maddeler için yapılan çalışmalarda konsantrasyonları çok yakın iki ya da üç doz çalışıldığını, dozların çoğunun hücre kültürleri için yüksek olduğunu ve genelde bir gün çalışma ile sonuçlara varıldığını tespit ettik. Bu süreyi daha uzun tutarak etki süresinin ne olabileceği de çalışmamızın amaçları arasındadır. Ayrıca maddeyi ilk gün tek doz uygulayarak direkt bir sitotoksitate gösterme, siklusa katılma ve ilaçlarda en önemli parametrelerden biri olan etkinin geçici olması gibi yorumları da yapabileme imkanı bulduk.

Kullandığımız yöntemler hücrenin farklı organellerine yönelik proliferasyon, apoptotik etki ve mutajenik etkilerin değerlendirilebildiği yöntemlerdir. Bu yöntemlerden elde edilen sonuçların birlikte değerlendirilmeleri ile daha sağlıklı yorumlar yapabileceğimize inanıyoruz.

## 6. MATERYAL YÖNTEM

### 6.1. GEREÇLER

#### Kimyasallar ve Çözeltiler

Akridin oranj (Sigma)

Amfoterisin-B (Sigma)

Bovine Pankeas İnsülin (Sigma)

Berberin (TBAM)

Dimetilsülfoksit -DMSO (Sigma, Merck)

Dulbecco's Modification Eagles Medium (Biological Industries)

tanol

Fetal Calf Serum (Biological Industries)

Formaldehit (Merck)

Fosfat Tuz Tamponu (PBS-A)

Glasiyel Asetik asit (Sigma)

Hank's Balans Tuz Solüsyonu (Sigma)Paklitaksel (Bristol-Myers-Squibb)

Kalsiyum klorür-  $\text{CaCl}_2$  (Merck)Kersetin (sigma)

Kristal violet (Reidel-de Haén)

MEM vitamin solüsyonu (Sigma)

MEM non-esansiyel amino asit solüsyonu (Sigma)

Metanol

Minimal Essential Medium-Eagle (Biological Industries)

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

Neutral red (Sigma)

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (Sigma)

Sodyum pirüvat solüsyonu (Biological Industries)

Sodyum sitrat (Carlo Erba)

Tripsin-EDTA Solüsyonu (Biological Industries)

Tripan Mavisi (Sigma)

## **Malzemeler**

- Otoklavlanabilir cam şişe (Isolab)
- 96, 24 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP)
- 25 ve 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür şişeleri (TPP)
- 15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpü (TPP)
- 1, 2, 5 10 ve 25 ml'lik cam pipet (Isolab)
- 5, 10 ve 25 ml'lik tek kullanımlık pipet (Serological Pipette)
- Neubauer lamı (Iso-lab)

## **Cihazlar**

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

## 6.2. YÖNTEMLER

### 6.2.1. Hücrelerin testler için hazırlanması

Hücreler deneyler için yeterli sayıya eriştiklerinde tripsinlenerek toplandı ve Neubauer lamı ile sayılarak ml'de 250 000 hücre olacak şekilde hazırlandı. MTT, neutral red up-take ve kristal viole testleri için 96 kuyucuklu plakalara 0,1 ml hücre süspansiyonu (25 000 hücre) ekildi. Hücreler yapışmaları için 24 saat bekletildi. Süre sonunda hücrelerin üzerlerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırıldı. Üzerlerine test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edildi.

Paklitaksel'in 0,5-1-5-10-50 ve 100  $\mu\text{M}$  , Kersetin'in 1-10-50-100 ve 250 mM ve Berberinin 0,1-1-10-25 ve 50 mM dozları hazırlandı. Tüm maddelerde çözücü olarak DMSO kullanıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda öngürülen şekilde besiyerinde DMSO oranı % 0,1-0,2'yi geçmeyecek şekilde maddeler besiyerinde % 0,1 olacak şekilde 1 ml içine 1  $\mu\text{l}$  DMSO'da verildi ve final konsantrasyonları: Paklitaksel'in 0,5-1-5-10-50 ve 100 nM , Kersetin'in 1-10-50-100 ve 250  $\mu\text{M}$  ve Berberinin 0,1-1-10-25 ve 50  $\mu\text{M}$  olarak sağlandı. Kullandığımız Berberin TBAM'da Dr Müberra Koşar tarafından *Berberis crataegina* L. den izole edilmiştir (Koşar 1998). Paklitaksel ise Bristol Myers-Squibb ilaç firması tarafından sağlanmıştır.

Bu konsantrasyonlarda besiyerinde hazırlanan test maddelerinin konsantrasyonları, kontrol grubu (boş) ve %0,1 DMSO içeren çözücü kontrol grubu da teste eklendi. Test maddeleri içeren besiyerleri 96 kuyucuklu plakaların kuyucuklarına 24 saat sayımları için 0,1 ml, 48 saat sayımları için 0,2 ml, 72 ve 96 saat sayımları için 0,3 ml koyularak gerekli sürelerde inkübasyona bırakıldı. Bu süreler sonunda hücrelere gerekli boyama yöntemleri uygulandı.

Hücre sayıları için ml'de 25 000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanarak 24 kuyucuklu plakalara 1'er ml koyuldu.

Koloni formasyonu için sayımı yapılan hücre süspansiyonundan ml'de 1000 hücre olacak şekilde hesaplayarak hazırlandı.

Akridin oranı için hücreler 250 000 hücre/ml olacak şekilde petrilere koyulmuş 22x22 mm steril lamellere ekildi. 24 saat sonra lamellerin üzerindeki besiyerleri çekildi ve test maddeleri içeren taze besiyerleri ilave edildi. Hücrelerde diğer testlerde maksimum etki görülen süreler (HeLa hücreleri için 48 saat, diğer hücreler için 72 saat) bekletildikten sonra boyama işlemi uygulandı.

### **6.2.2. Tripan Mavisi ile Hücrelerin Sayılması**

Yetiştirilen hücreler tripsinlendi ve Neubauer lamı ile sayılarak 25 000 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı. 24 kuyucuklu plakalara ekildi 24 saat sonra maddeler ilave edildi ve sırası ile 24, 48, 72 ve 96 saat bekletildikten sonra sayıma alındı. Hücrelerin üzerindeki besiyerleri atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 250 µl tripsin solüsyonu eklendi ve 5-10 dakika hücrelerin kalkması beklendikten sonra üzerine 750 µl HBSS ilave edildi (hacim ilk koyduğumuz hacme toplam 1 ml'e getirildi).

2 ml hacimli Eppendorf tüplere her bir örneğimiz için 0.5 ml %0.4'lük tripan mavisi solüsyonundan koyuldu ve üzerine iyice pipetleyerek homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 0.5 ml ilave ederek karıştırıldı (dilüsyon faktörü:2) ve 10 dak kadar beklendi (süre geçtiğinde yaşayan hücreler de boyanmaya başlar).

Hücre sayma lamının her iki odacığına da hücre süspansiyonu koyuldu ve bir odacıkta dört köşe ve ortada kalan 1 mm<sup>2</sup>'lik alanlardaki boyanmış ve boyanmamış hücreler sayıldı. Daha sonra elde edilen değerlerden, genel bilgilerde verilen formüller yardımı ile yaşayan hücre sayıları hesaplandı (Ducommun ve ark. 2001; Giannoni ve ark. 2000; Ercoli ve ark. 1998; Yamamoto ve ark. 2000).

### 6.2.3. MTT Ölçümü

MTT 5 mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözündürülerek stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de 6 ay bekleyebilmektedir. Çalışma solüsyonu stok solüsyondan 1 kısım stok solüsyon ve 9 kısım besiyeri olarak taze hazırlandı ( 0,5 mg/ml MTT ) (bir plaka için 10 ml). Her bir kuyucuğa 0,1 ml MTT çalışma solüsyonu ilave edilerek karbondioksit inkübatöründe 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda plakalar alındı ve besiyerleri uzaklaştırıldı ve 0,1 ml DMSO ilave edildi. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutuldu. Bu deneyin her aşaması boya ışıktta bozulduğu için mümkün olduğunca karanlıkta yapılmalıdır (Mosmann, 1983; Denizot ve Lang 1986; Holst-Hansen ve Brünner 1998; Tedone ve ark. 1996; Kokawa ve ark. 2001; Alley ve ark.,1988; Horakova ve ark., 2001; Reile ve ark., 1990; Korkmaz ve ark., 2001).

### 6.2.4. Neutral Red Up-take Sitotoksisite Ölçümü

Test maddeleri ile gerekli süre bekletilen hücreler alındı, besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ 'ye getirilmiş PBS ile yıkandı. Neutral red up-take stok solüsyonu 1: 100 oranında besiyeri ile karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı (bu solüsyon Ek.1'de anlatıldığı şekilde hazırlandı) ve her bir kuyucuğa 0,1 ml ilave edilerek  $37^{\circ}\text{C}$  'de 3-4 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda boyama solüsyonu uzaklaştırılarak taze hazırlanmış formaldehit-kalsiyum klorür fiksatif/yıkama solüsyonundan 100'er ml ilave edilerek yıkandı ve solüsyon döküldü, plakalar ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde bir gün bekletilerek kurutuldu ve asetik asit-etanol solüsyonu her bir kuyucuğa 0,1 ml ilave edilerek 15 dakika oda ısısında bekletildi ve 30 dakika çalkalayıcıda çalkalanarak boya homojen hale getirildi. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutuldu. Bu deneyin her aşaması boya ışıktta bozulduğu için mümkün olduğunca karanlıkta yapılmalıdır. Bu test 6 kez tekrar edildi. (Horakova 2001, Shen 1998, Xie, 1999).

### 6.2.5. Kristal Viyole Proliferasyon Ölçümü

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara yukarıda anlatıldığı gibi ekildi ve gereken süre test maddeleri ile muamele edildikten sonra, hücreler inkübatörden alındı ve üzerlerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerlerine %25 metanolde çözünmüş 0.5 kristal viyole çözeltisi ilave edildi ve 10 dakika bekletildi. Boya uzaklaştırıldı ve plakalar daldırma metodu ile 4-5 kez distile su ile yıkandı. Yaklaşık bir gün kuruması için kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek bekletilen plakalar, bu süre sonunda alındı ve üzerlerine 0.1 ml okuma solüsyonu ilave edildi ve 5 dakika çalkalandıktan sonra optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okundu. Bu test 6 kez tekrar edildi. (Yamamoto, 2000, Xie 1999, Thompson 1993, Shaik 2001, Leung 2000, Takahashi 1994, Ducommun 2001).

### 6.2.6. Yumuşak Agar Koloni Formasyonu

Önceden hazırlanıp steril hale getirilmiş %3 select agar, 60 °C'ye besiyeri 37 °C'ye getirildi. Alt agar tabakası 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğu için 1 ml olarak hesaplandı ve 1 kısım agar + 4 kısım besiyeri olacak şekilde hazırlandı ve hemen kuyucuklara ilave edildi. Donması için 5 dakika buzdolabında +4 °C'de bekletildi. Bu sırada üst agar tabakası ve 1 ml üst tabaka için 1000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Üst agar tabakası 1 kısım hücre süspansiyonu (hücre miktarı, tüm üst tabaka hacmi için hesaplanacak) + 2 kısım agarlı besiyeri (alt agar tabakası: 1 kısım agar + 4 kısım besiyeri) olarak hazırlandı. Buzdolabından alınan plakalara ilave edildi, tekrar buzdolabında 5 dakika bekletildikten sonra üzerlerine bir kuyucuk hacmi 2 ml olacak şekilde hesaplanarak 0.1 ml içinde test maddelerinin konsantrasyonları uygulandı ve hücreler 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Hergün takip edilerek koloniler 35-40 hücreye ulaşınca (her hücre için bu süre farklıdır, yaklaşık 10-13 gün) inverted mikroskopta sayıldı. Sayımlar üç kez tekrar edildi. (Kim ve ark. 1984; Glinsky ve ark., 1996; Wan ve ark.1998; Yeates ve ark., 1997; Kachhap ve ark., 2001; Ruohola ve ark. 2001; Altinoz ve ark., 2001;Korkmaz 2001).

### **6.2.7. Akridin oranj ile Floresan DNA ve RNA Boyaması:**

Test maddeleri ile gereken süre muamele edilmiş lameller alındı, 2 kez 2 dakika PBS ile yıkandı. 5 dakika % 70 etanol ile fikse edilen hücreler 5 defa distile su ile yıkandı. 2 dakika PBS'de bekletilir, oda ısısında 15 dakika akridin oranj çalışma çözeltisi ile boyandı. Boya kurutma kağıdının üzerine lamellerin dik tutulması ile uzaklaştırıldı ve 4 kez PBS ile yıkandı. Lameller bir damla PBS damlatılmış lamların üzerlerine kapatıldı ve etrafları şeffaf tırnak cilası ile sabitlenerek floresan mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi (Celis 1998, Kasten 1981). Bu yöntemde fiksasyondan sonra tüm işlemler mümkün olduğunca karanlık bir ortamda yapılmalıdır.

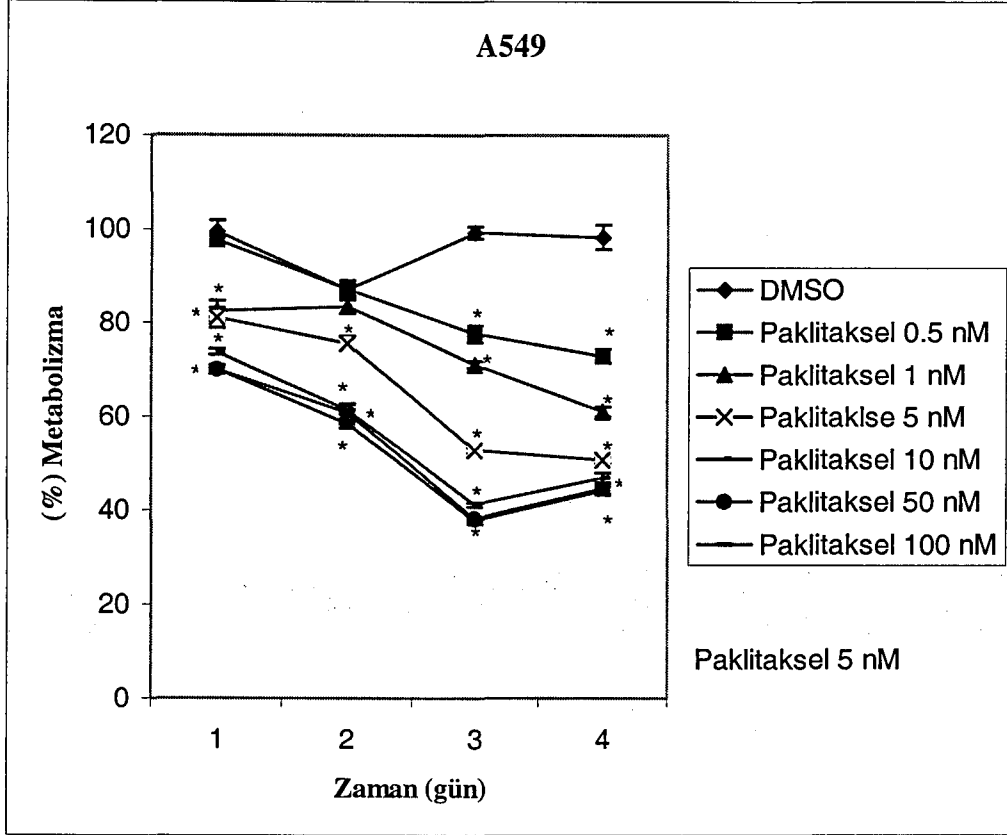
### **6.2.8. İstatistiksel Değerlendirmeler:**

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS programı kullanıldı. Elde edilen veriler; hücreler, günler ve gruplar parametrelerine göre değerlendirildi ve çok yönlü ANOVA ile post-hoc olarak da Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlendi. Anlamlılık değeri olarak  $p < 0,05$  kabul edildi.

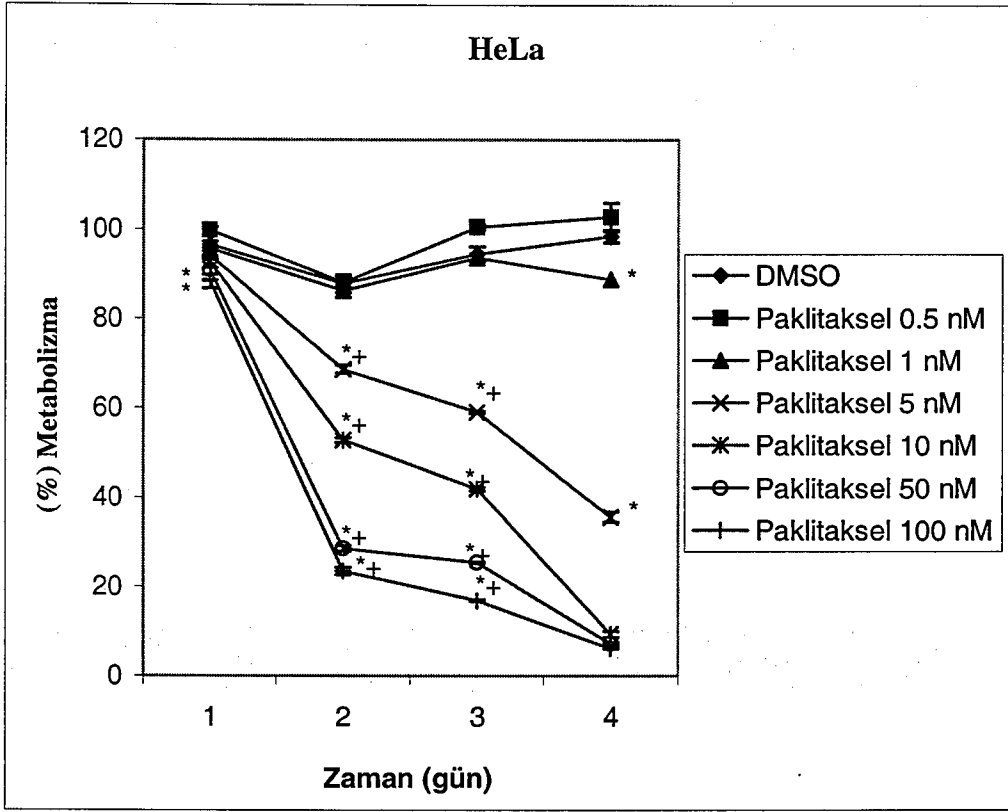
## 7. SONUÇLAR

### 7.1. PAKLİTAKSEL SONUÇLARI

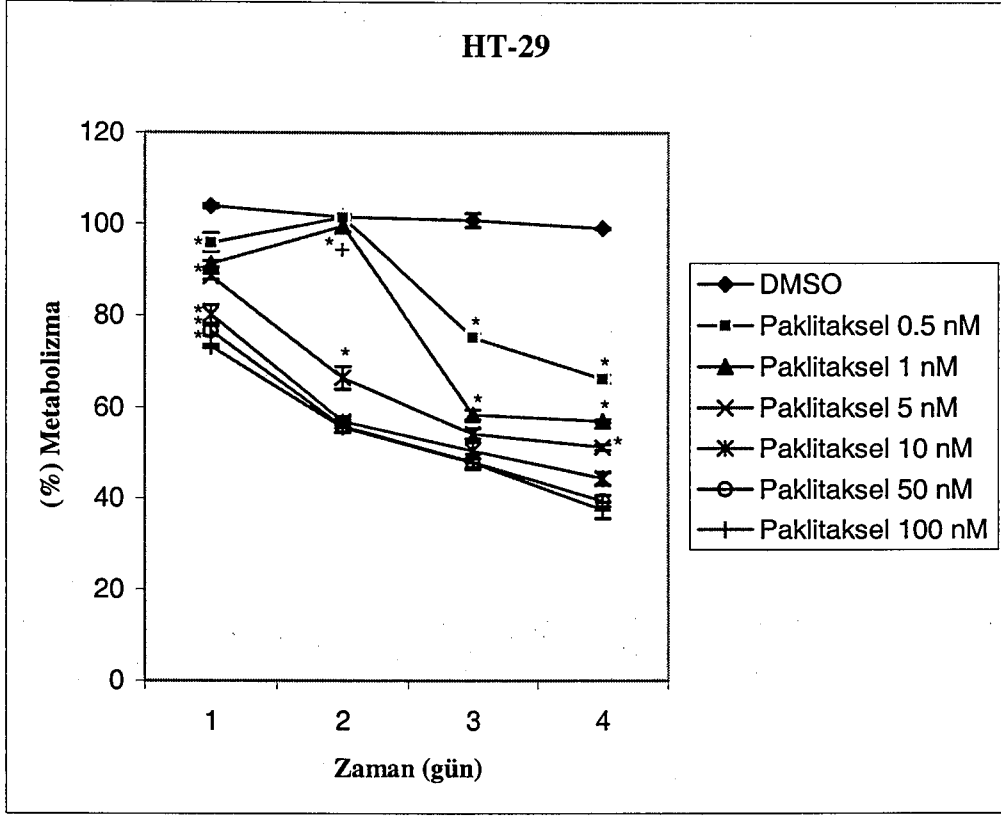
#### 7.1.1. Paklitakselin MTT Ölçüm Sonuçları



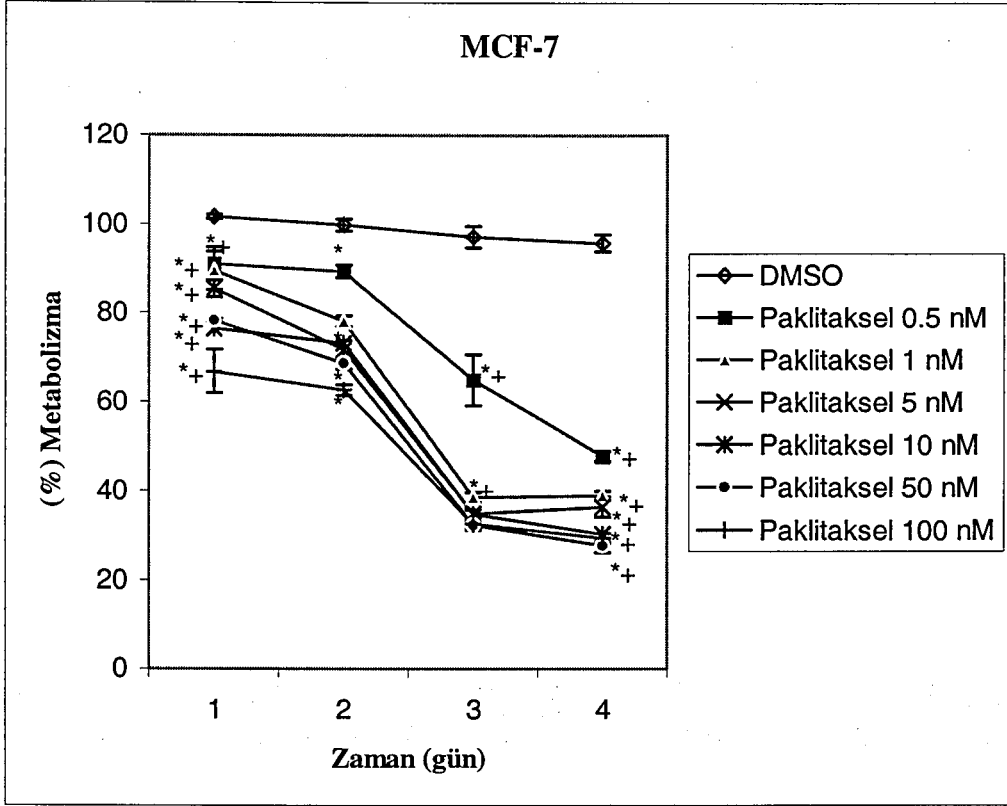
**Şekil 1.** Paklitakselin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).



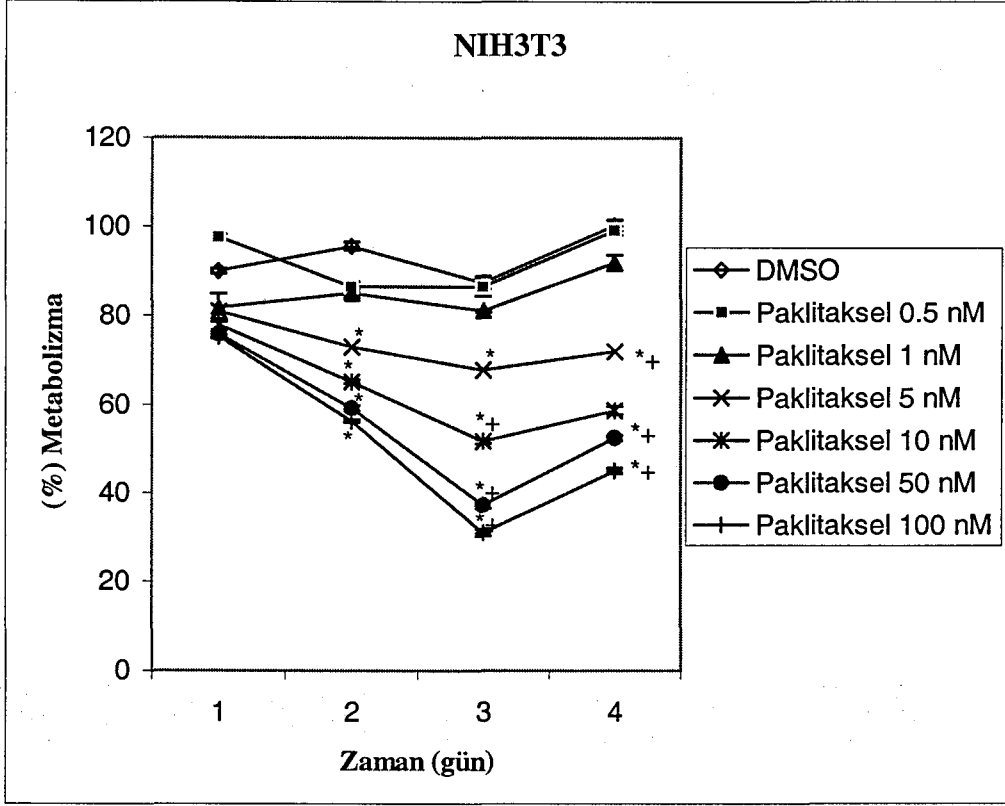
**Şekil 2.** Paklitakselin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).



**Şekil 3.** Paklitakselin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. Hata ( $n = 6$ ).

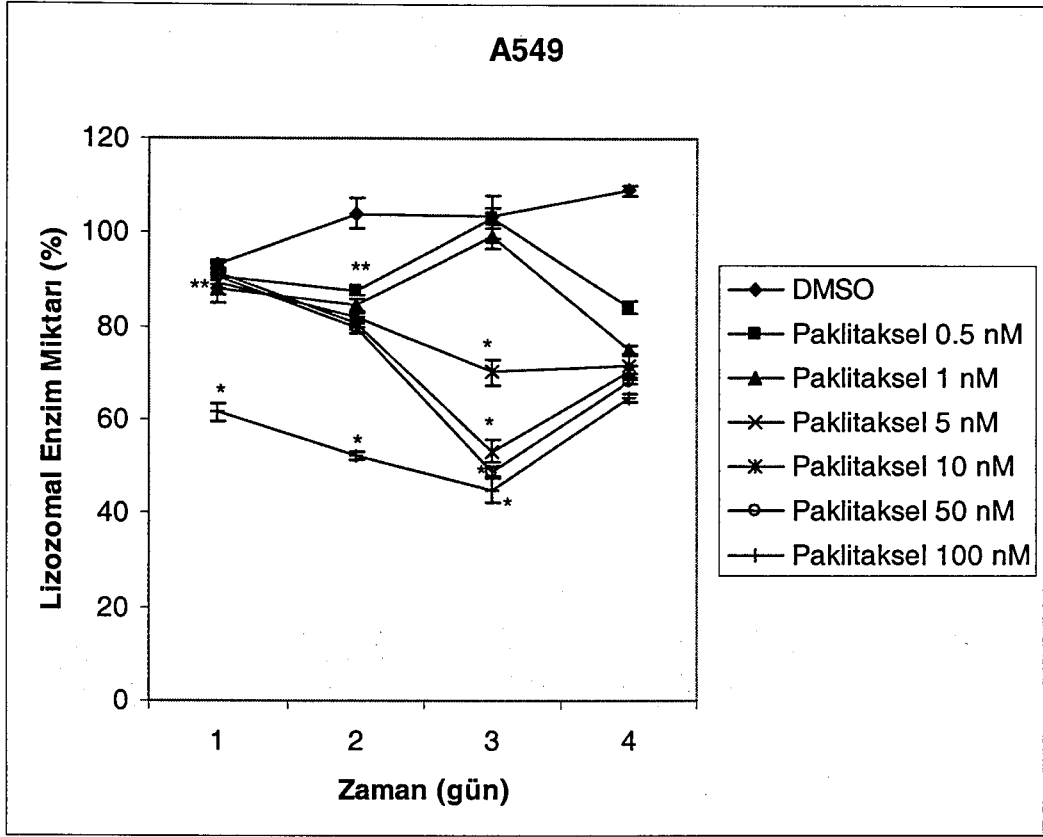


**Şekil 4.** Paklitakselin MCF-7 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).

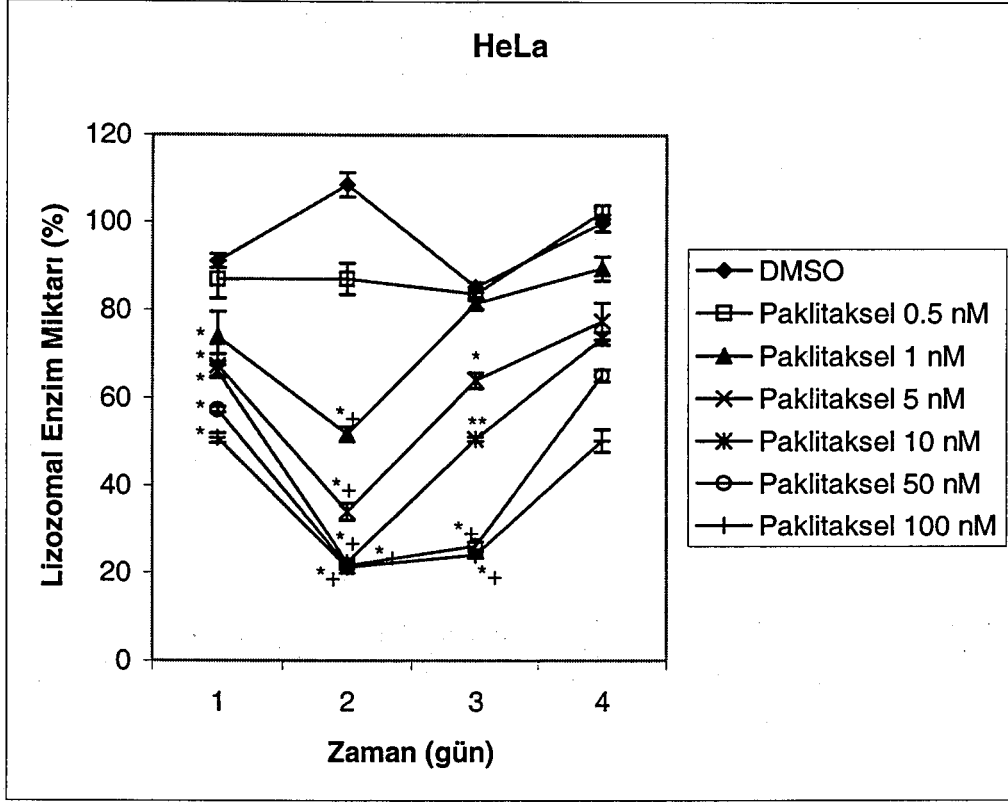


**Şekil 5.** Paclitaxelin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

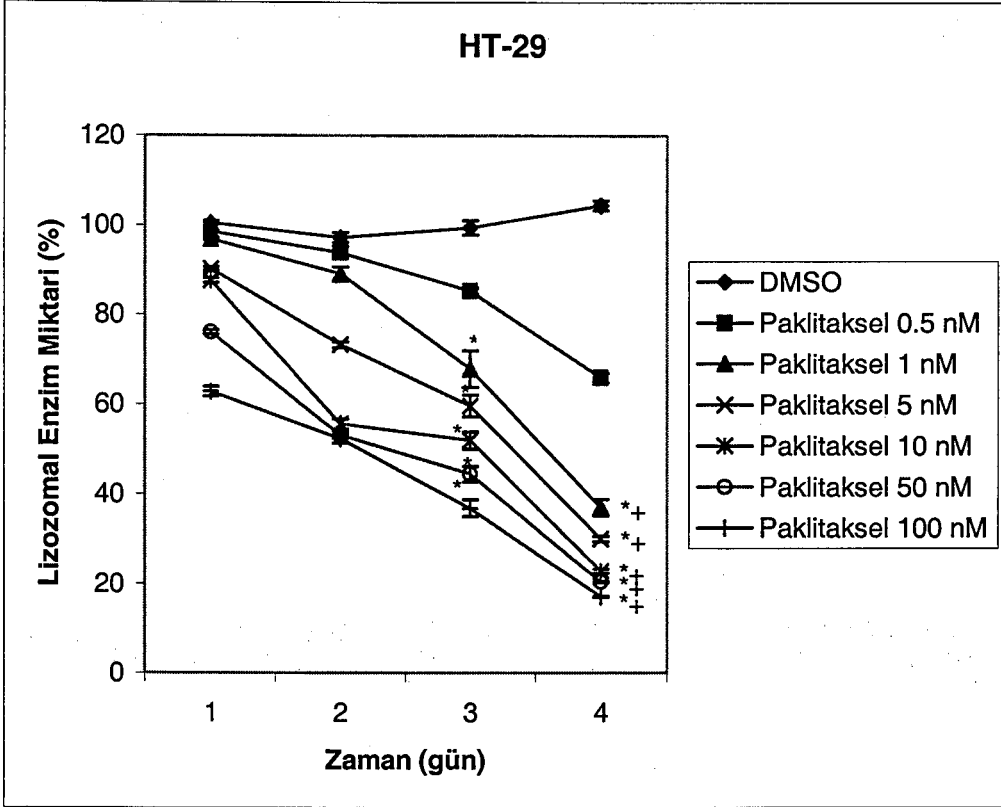
### 7.1.2. Paklitaxelin Neutral Red Up-take Ölçüm Sonuçları



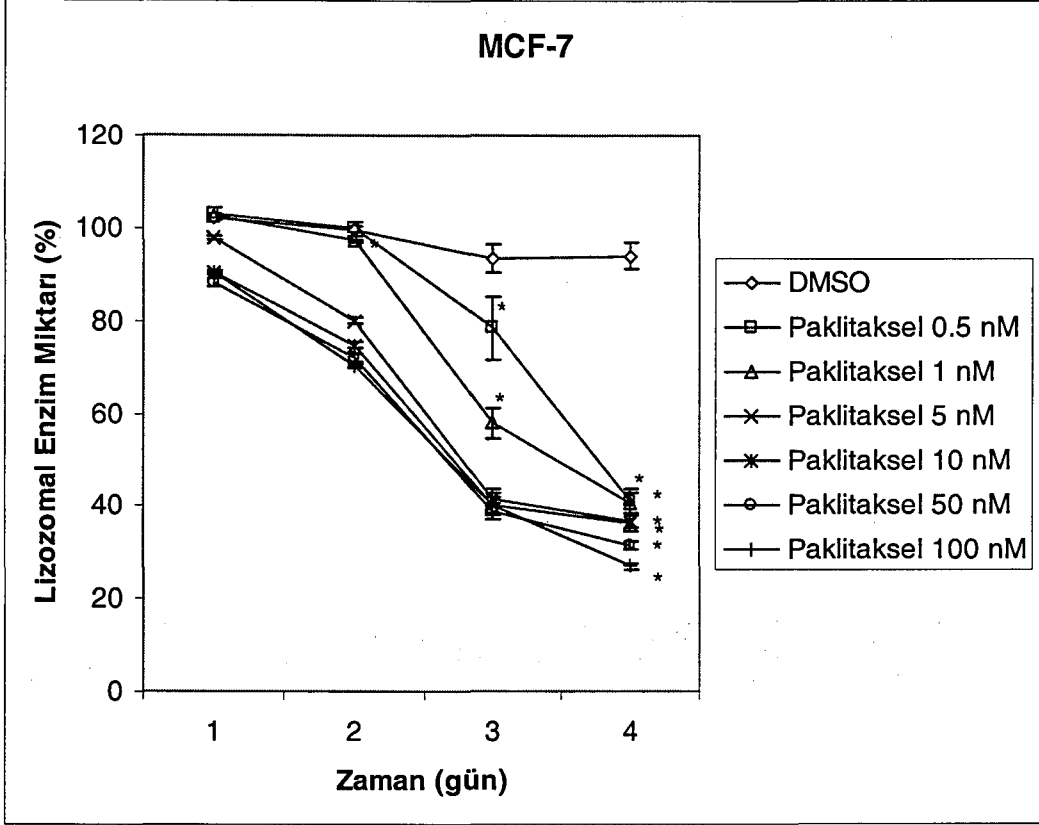
**Şekil 6.** Paklitaxelin A549 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



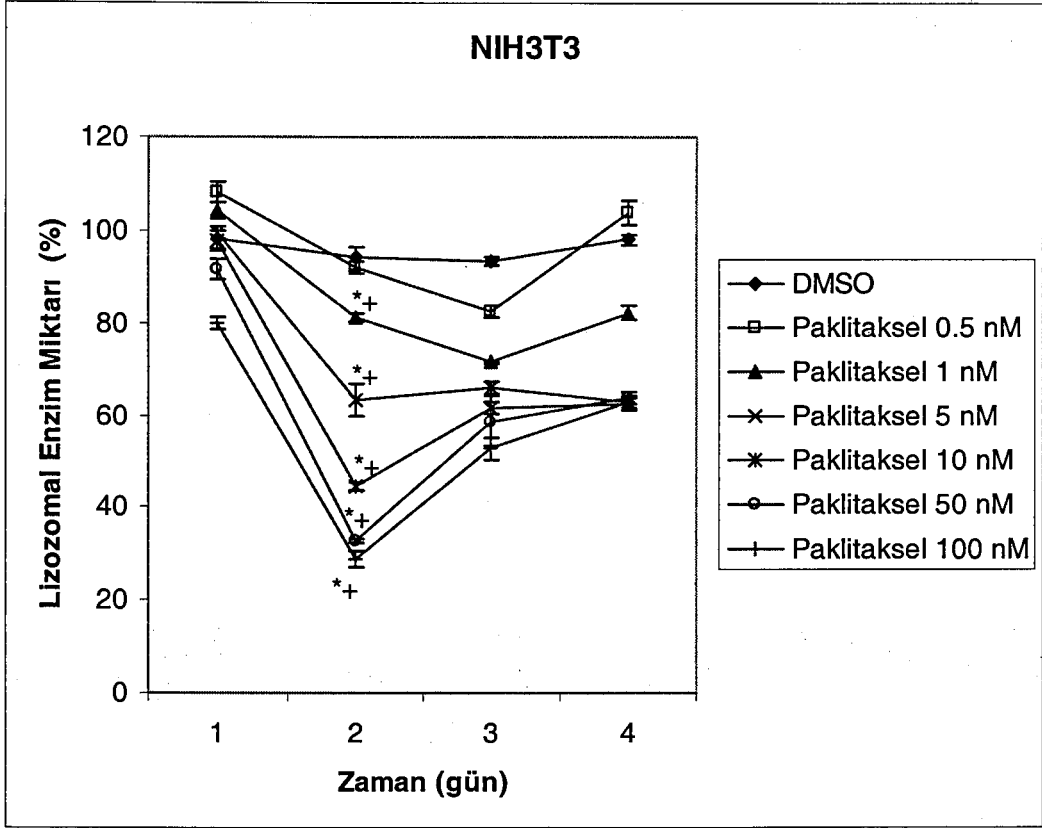
**Şekil 7.** Paklitakselin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).



**Şekil 8.** Paklitakselin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

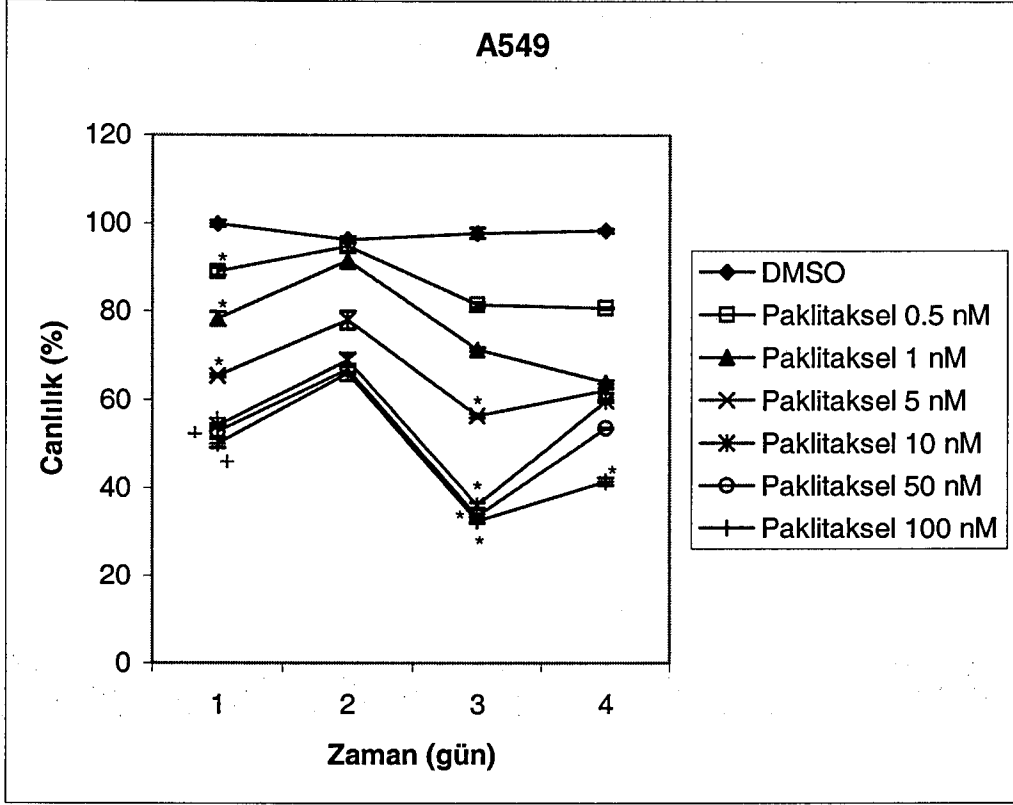


**Şekil 9.** Paklitakselin MCF-7 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

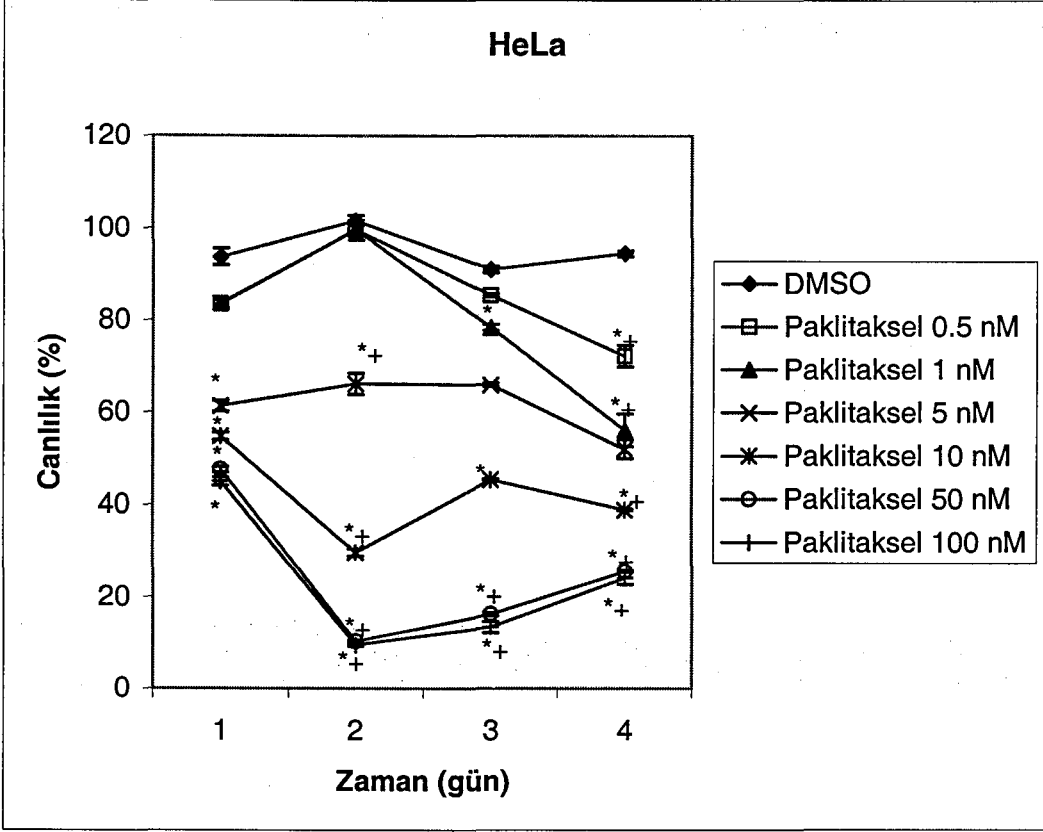


**Şekil 10.** Paklitakselin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

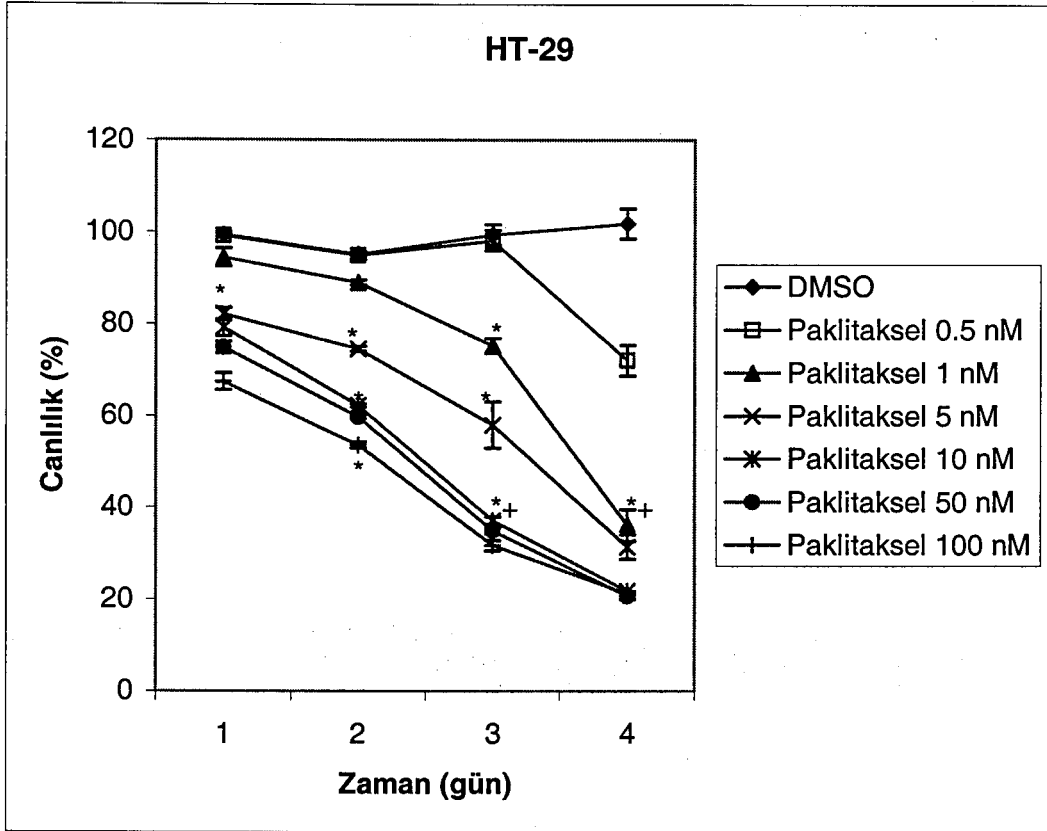
### 7.1.3. Paklitakselin Kristal Viyole Ölçüm Sonuçları



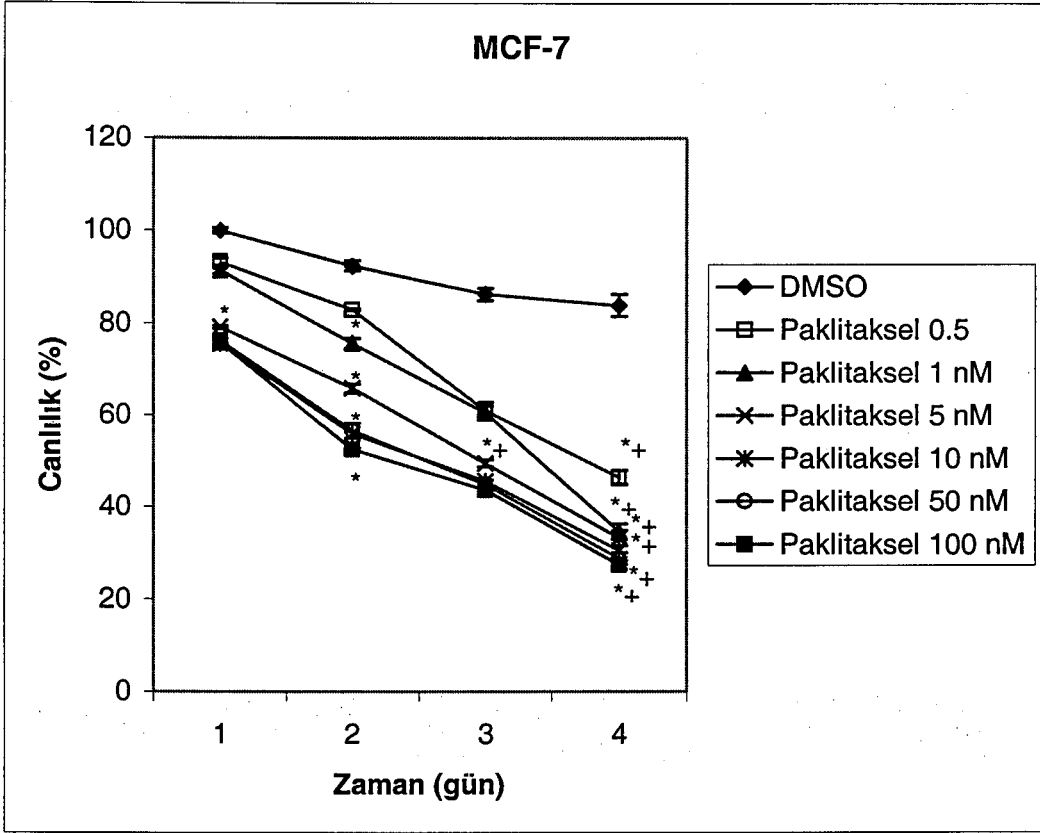
**Şekil 11.** Paklitakselin A549 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).



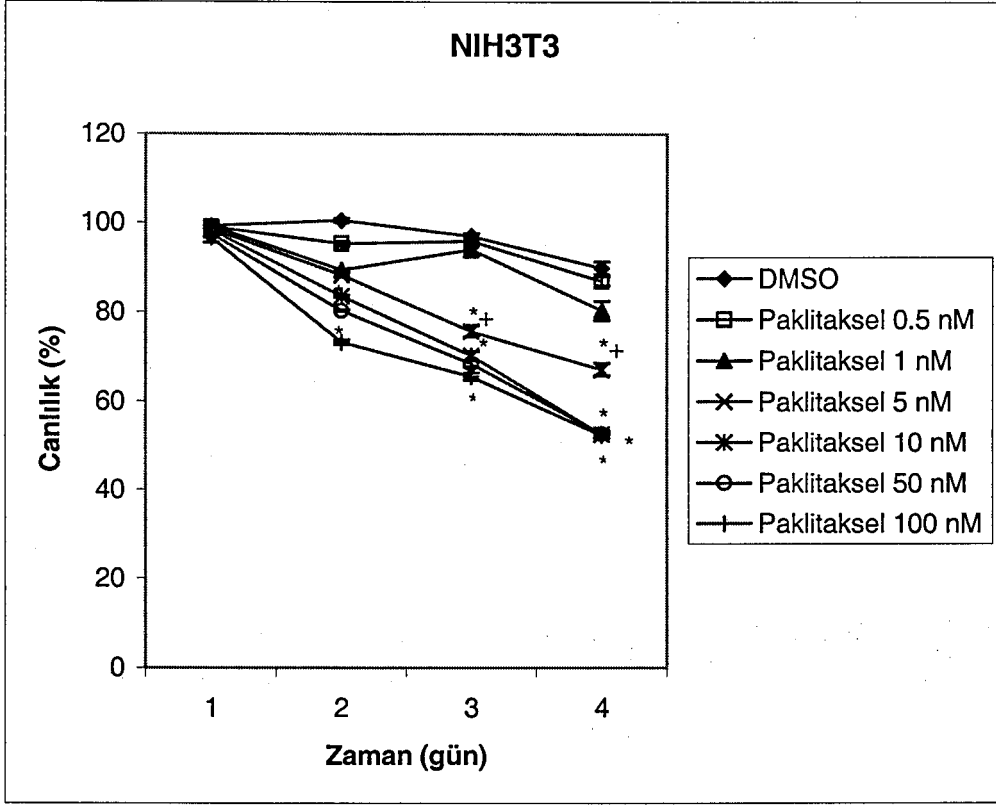
**Şekil 12.** Paclitaxelin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



**Şekil 13.** Paklitakselin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

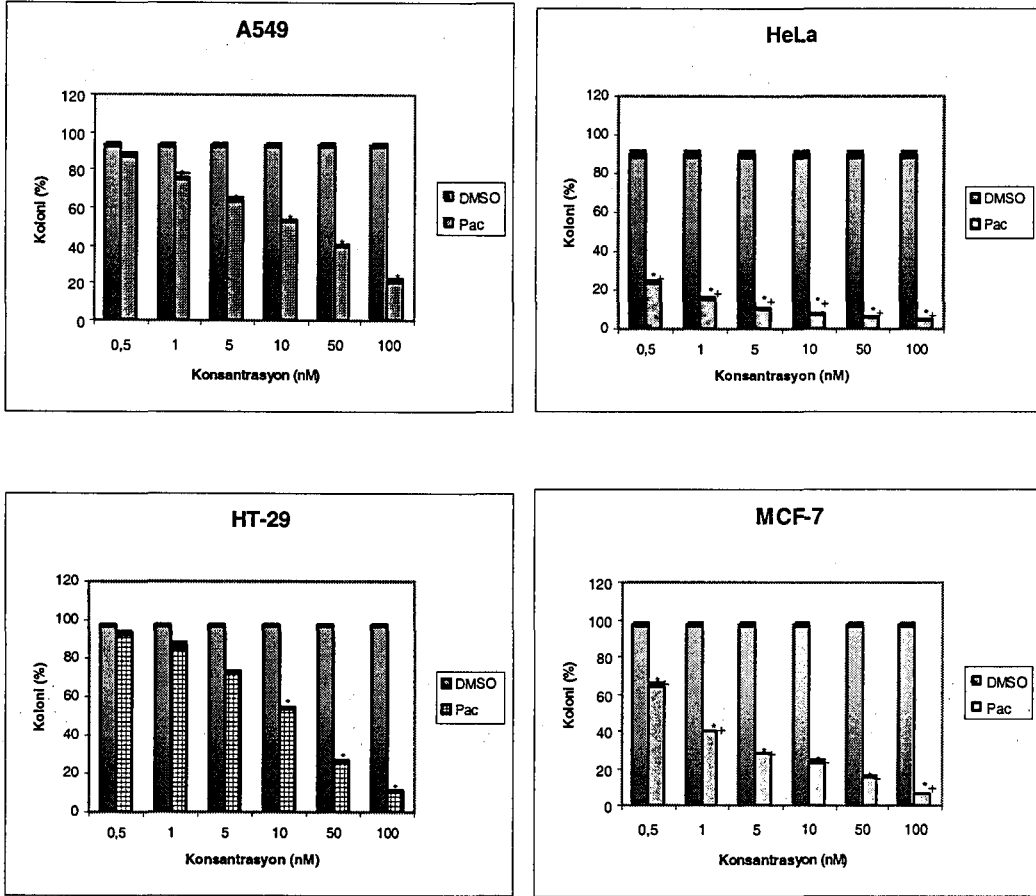


**Şekil 14.** Paclitakselin MCF-7 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



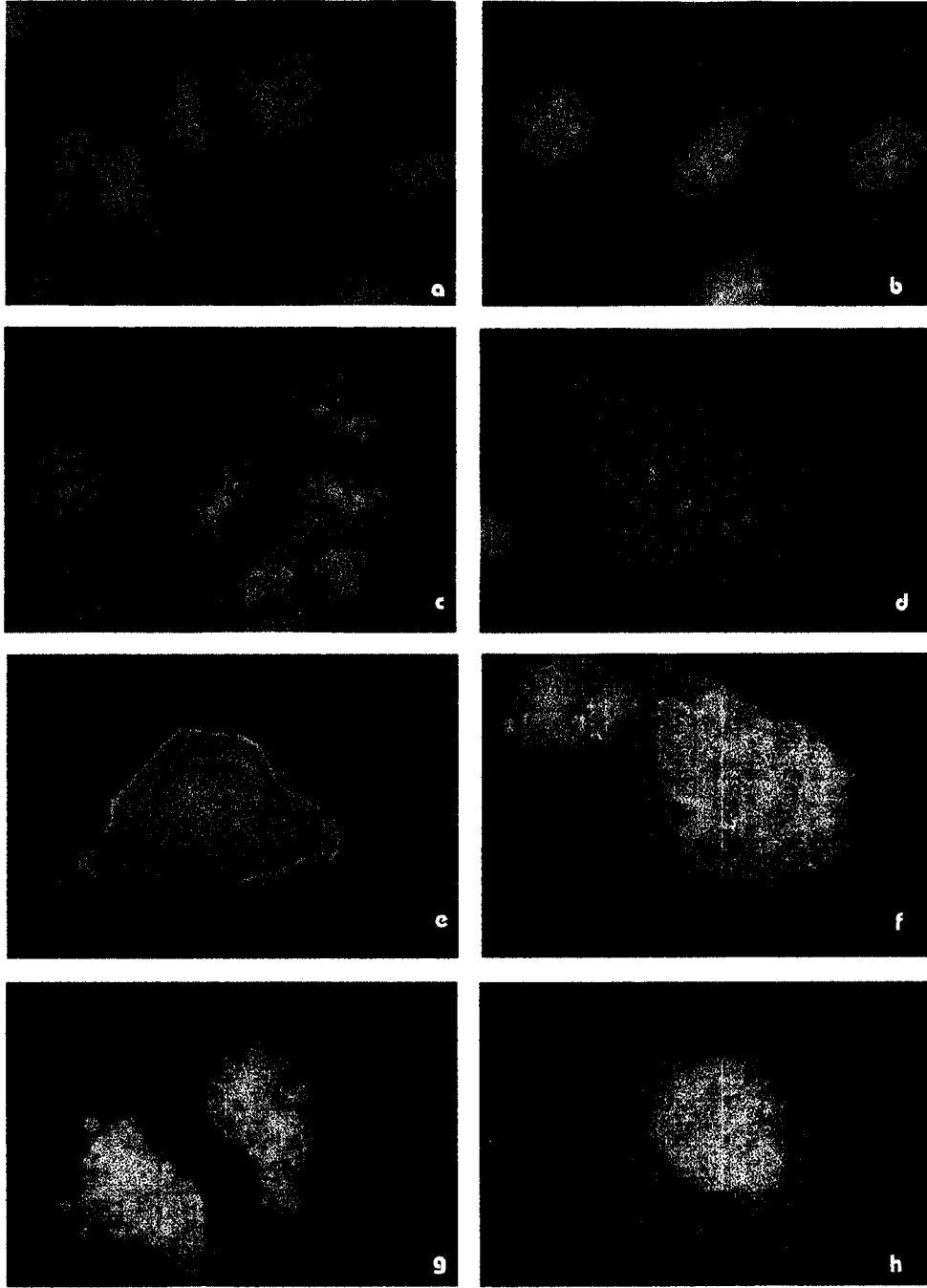
**Şekil 15.** Paklitakselin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

#### 7.1.4. Paklitakselin Koloni Formasyonu Sonuçları

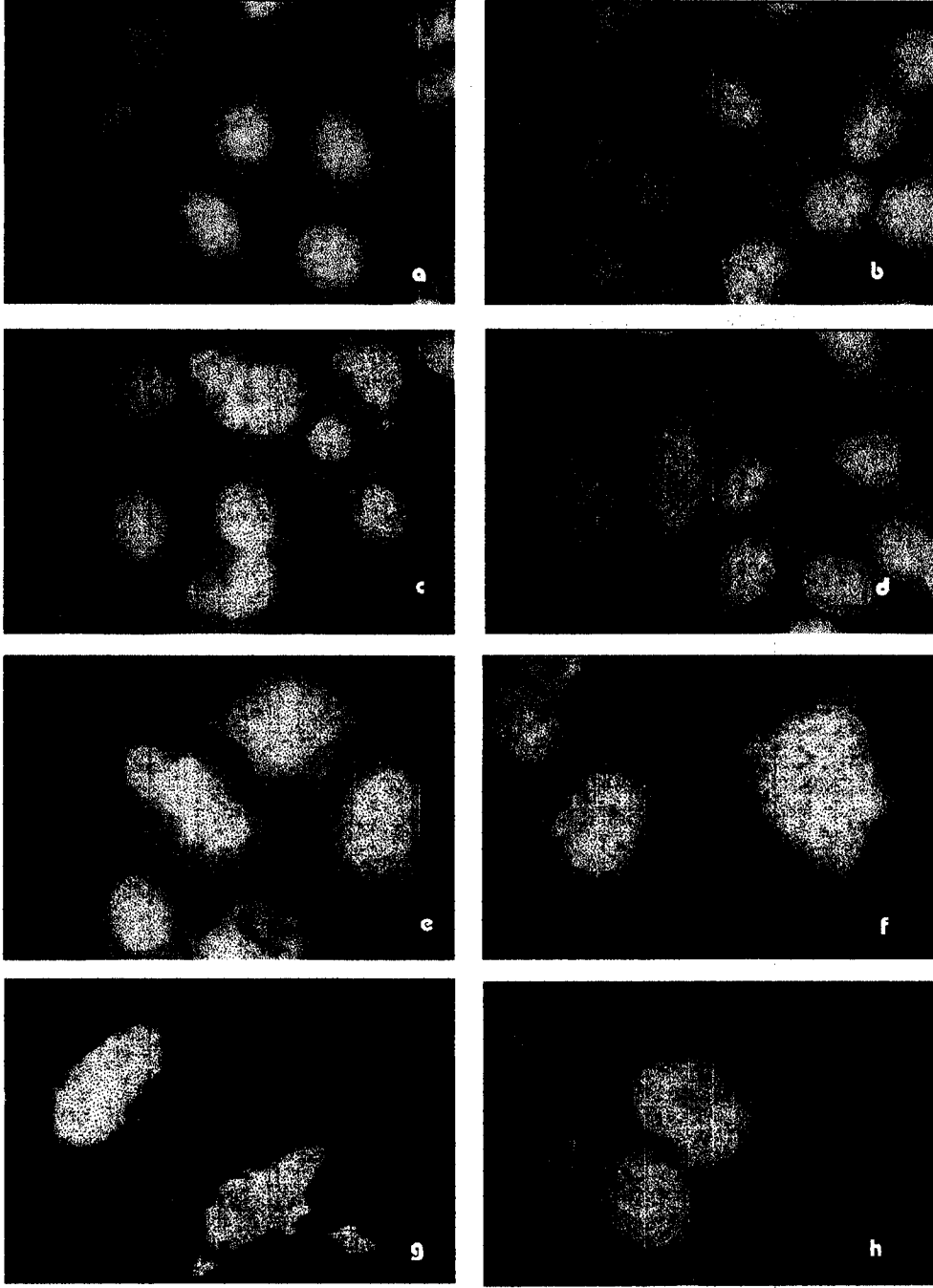


**Şekil 16.** Paklitakselin A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri. (\*) Dozlara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 3$ ).

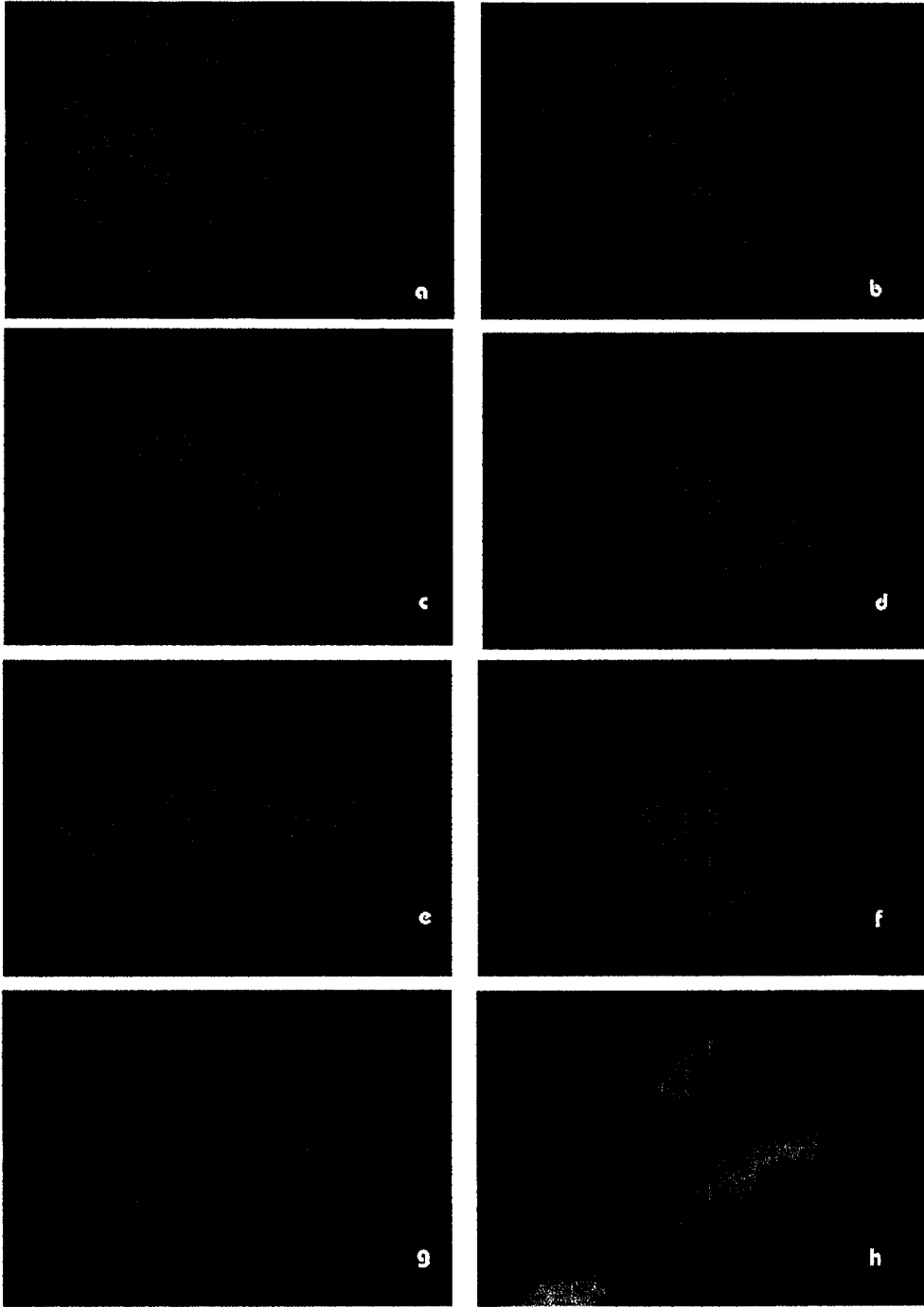
### 7.1.5. Paklitakselin Akridin Oranj Boyama Sonuçları



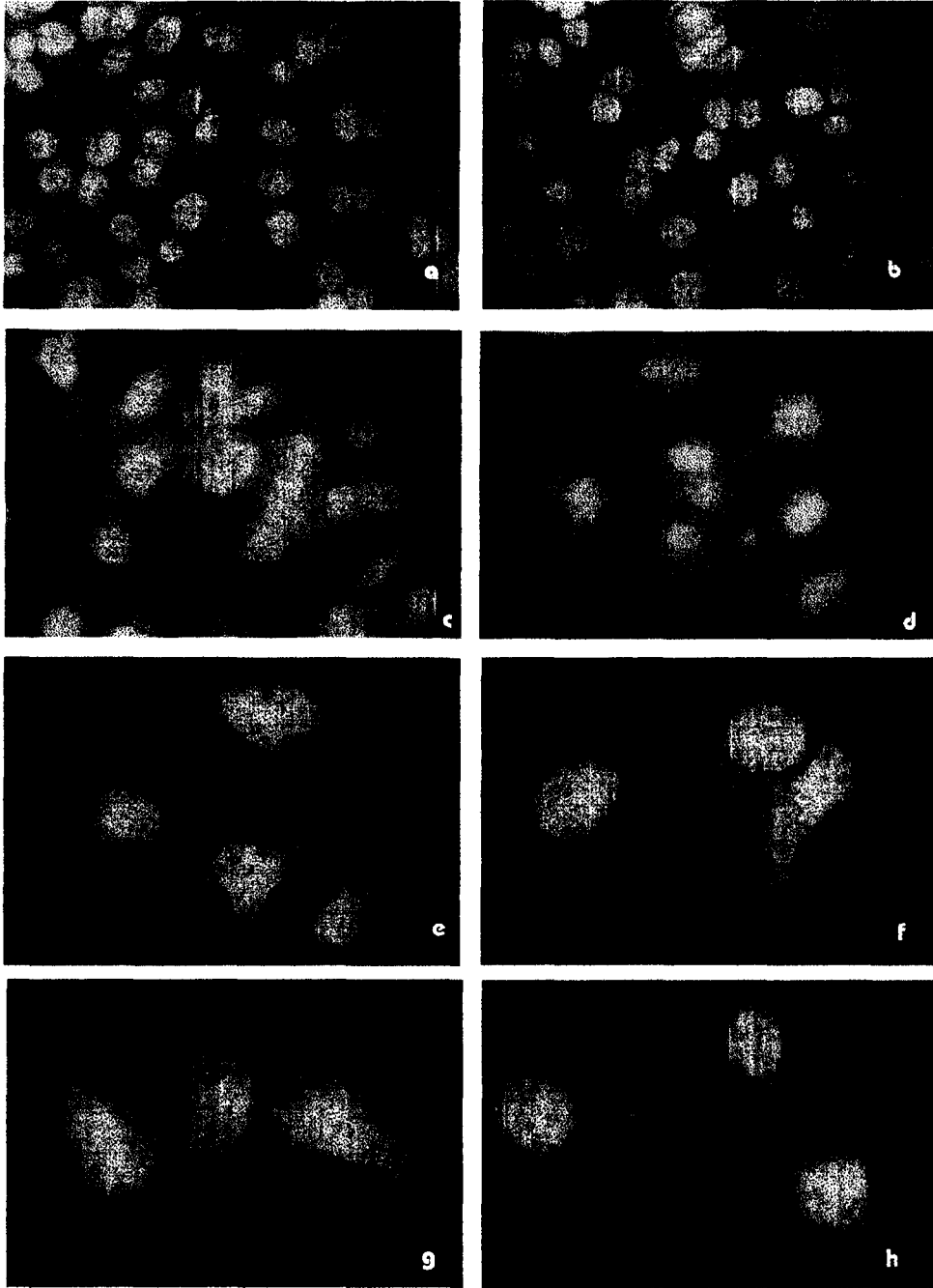
**Şekil 17.** Paklitaksel uygulanan A549 hücrelerin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarıyeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.5 nM , d- 1 nM, e- 5 nM, f- 10 nM, g- 50 nM, h- 100 nM Paklitaksel. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)



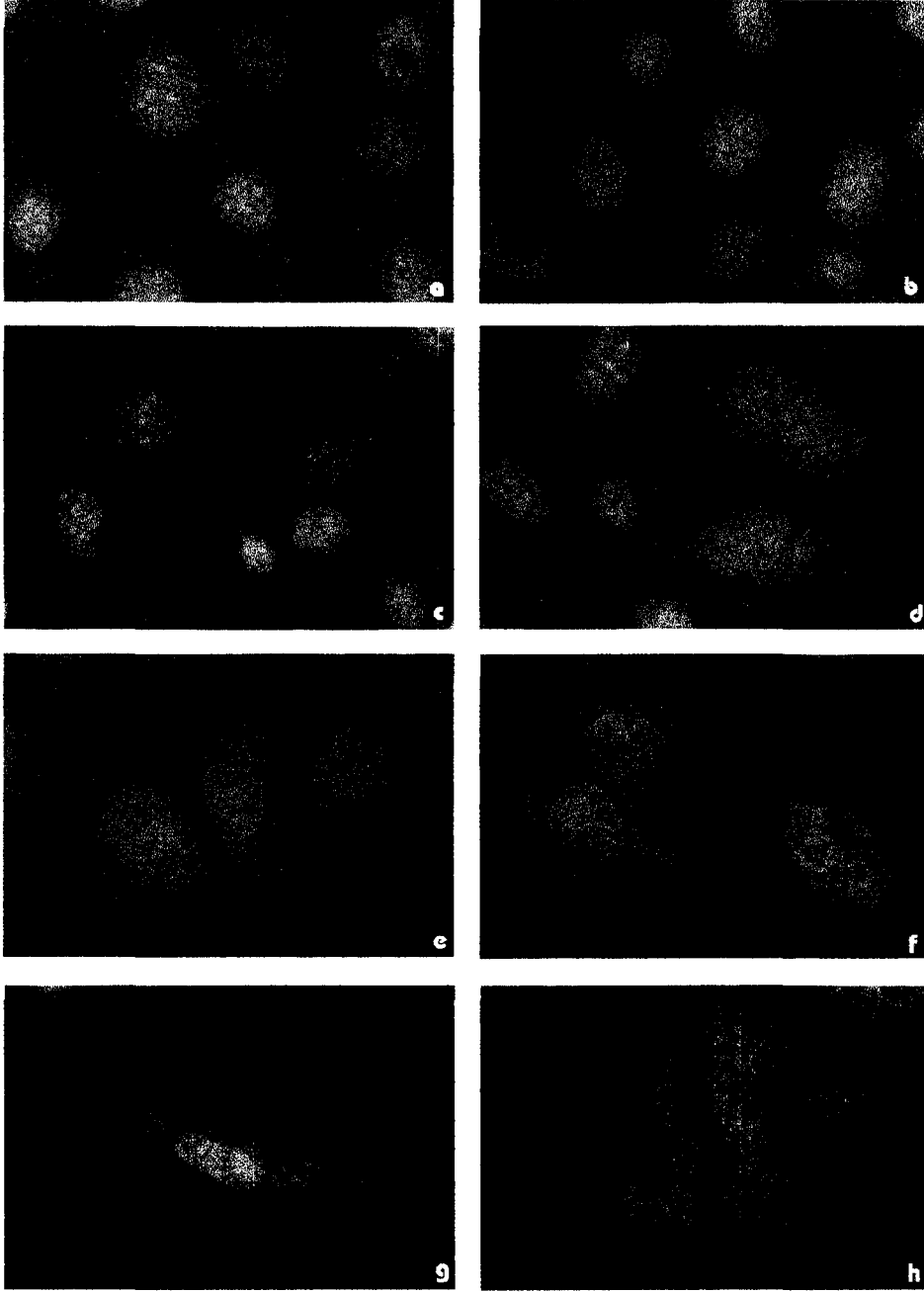
**Şekil 18.** Paklitaksel uygulanan HeLa hücrelerin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.5 nM , d- 1 nM, e- 5 nM, f- 10 nM, g- 50 nM, h- 100 nM Paklitaksel. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)



**Şekil 19.** Paklitaksel uygulanan HT-29 hücrelerin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.5 nM , d- 1 nM, e- 5 nM, f- 10 nM, g- 50 nM, h- 100 nM Paklitaksel. (1cm = 62.5 µm, büyütme 1600X)



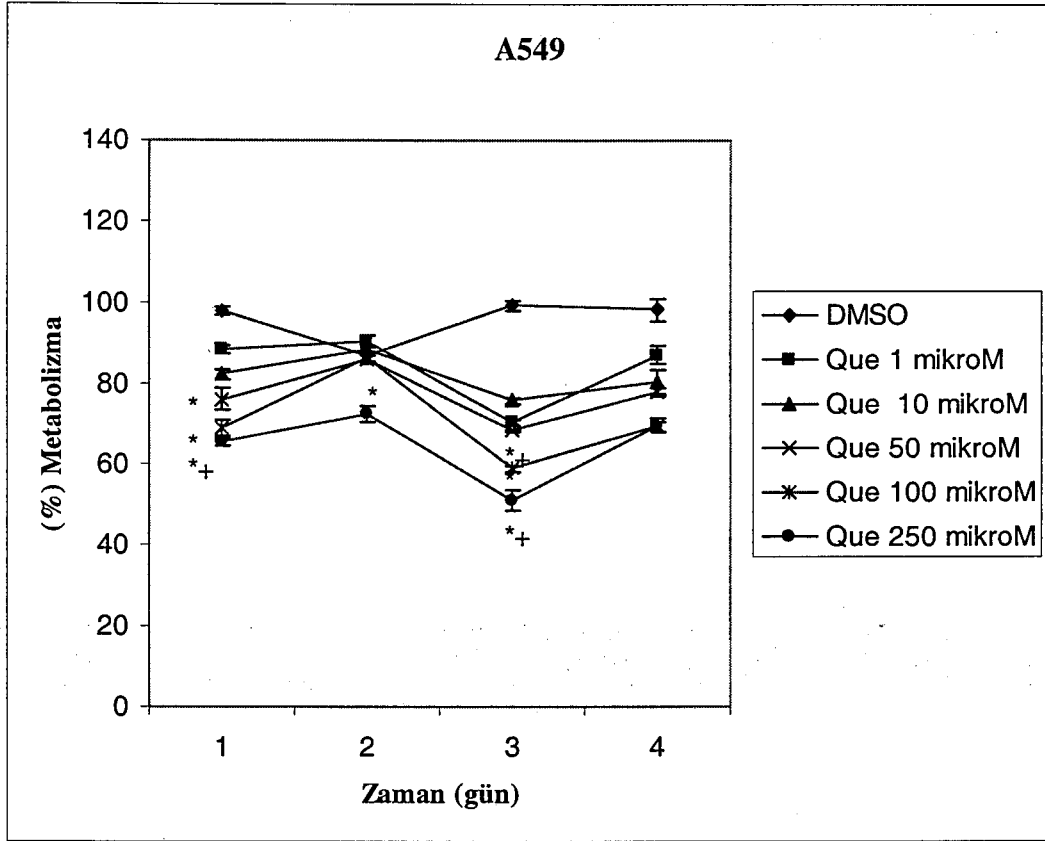
**Şekil 20.** Paklitaksel uygulanan MCF-7 hücrelerin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.5 nM , d- 1 nM, e- 5 nM, f- 10 nM, g- 50 nM, h- 100 nM Paklitaksel. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)



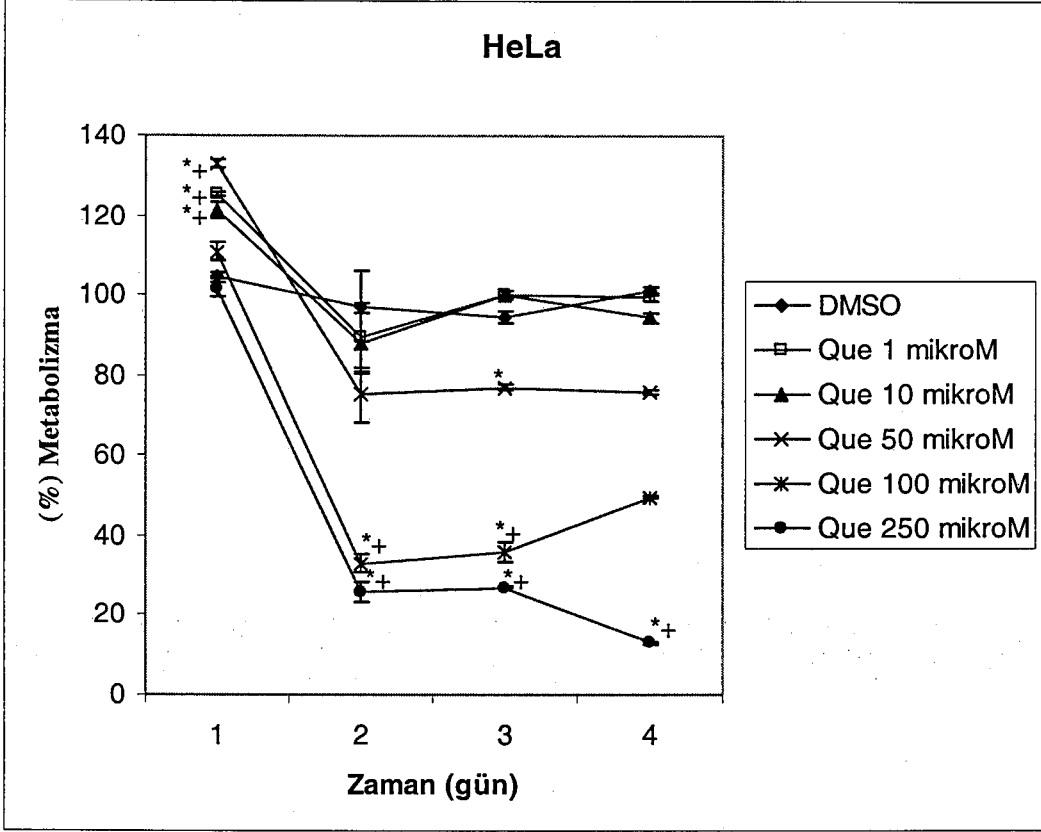
**Şekil 21.** Paklitaksel uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.5 nM , d- 1 nM, e- 5 nM, f- 10 nM, g- 50 nM, h- 100 nM Paklitaksel. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)

## 7.2. KERSETİN SONUÇLARI

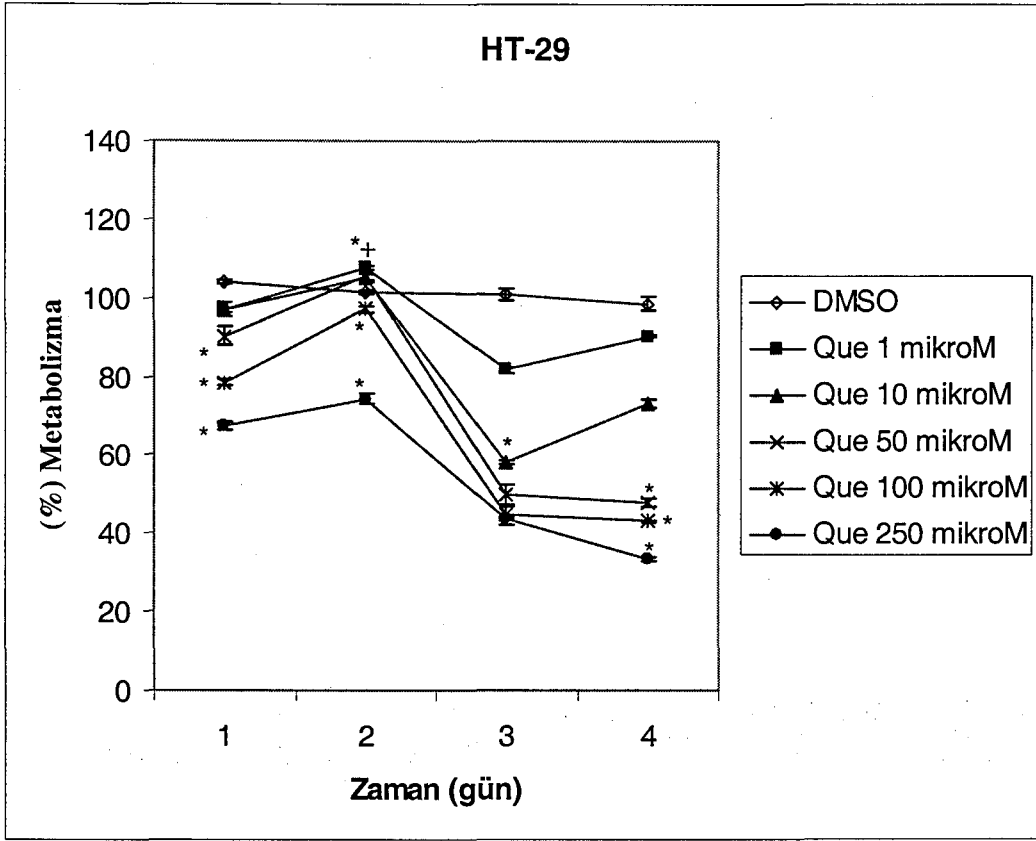
### 7.2.1. Kersetinin MTT Ölçüm Sonuçları



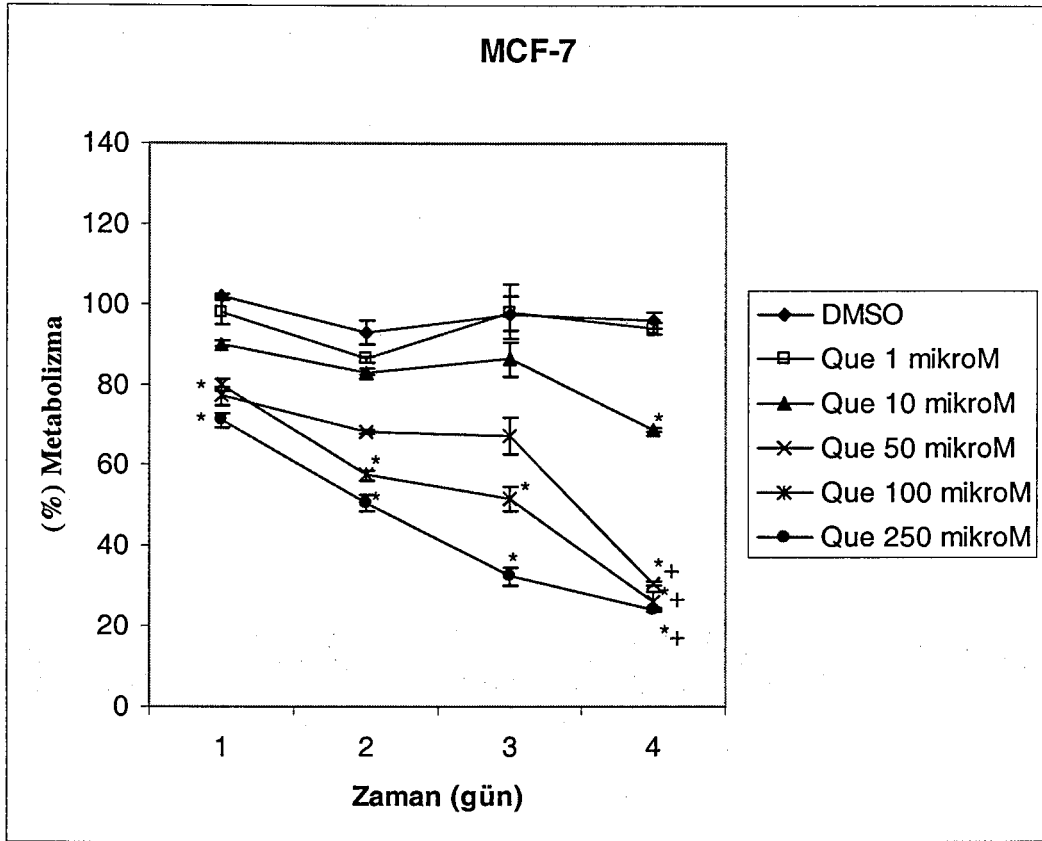
**Şekil 22.** Kersetinin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).



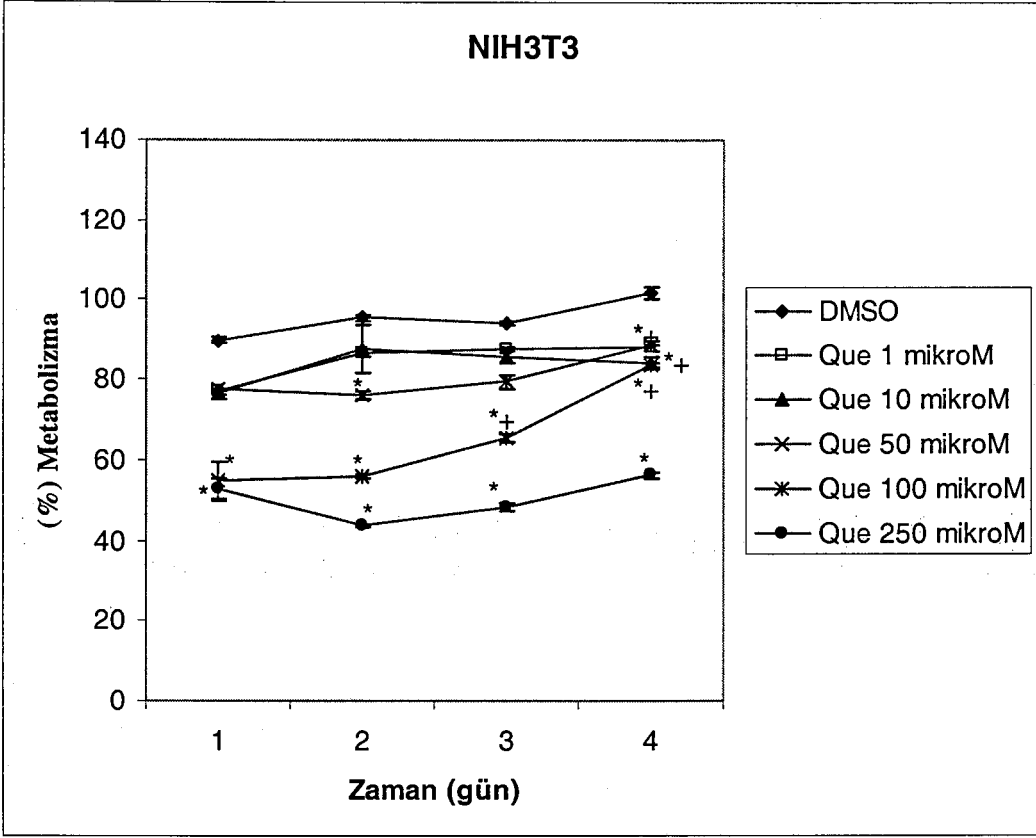
**Şekil 23.** Kersetinin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).



**Şekil 24.** Kersetinin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).

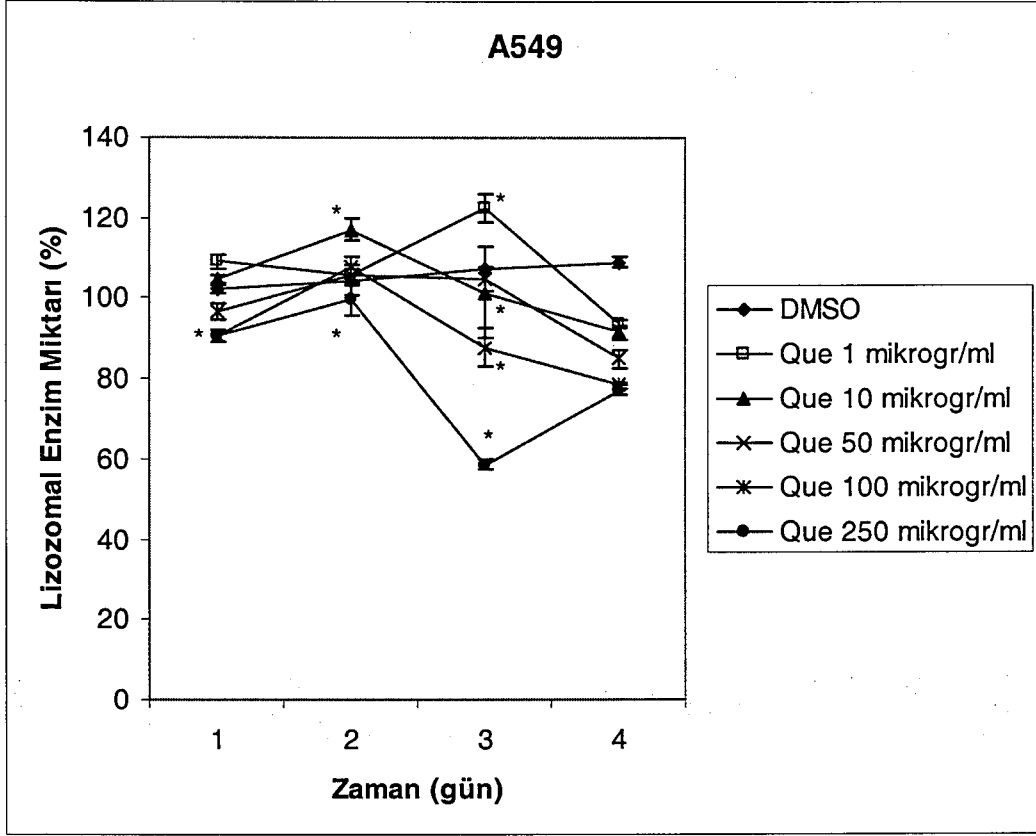


**Şekil 25.** Kersetinin MCF-7 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).

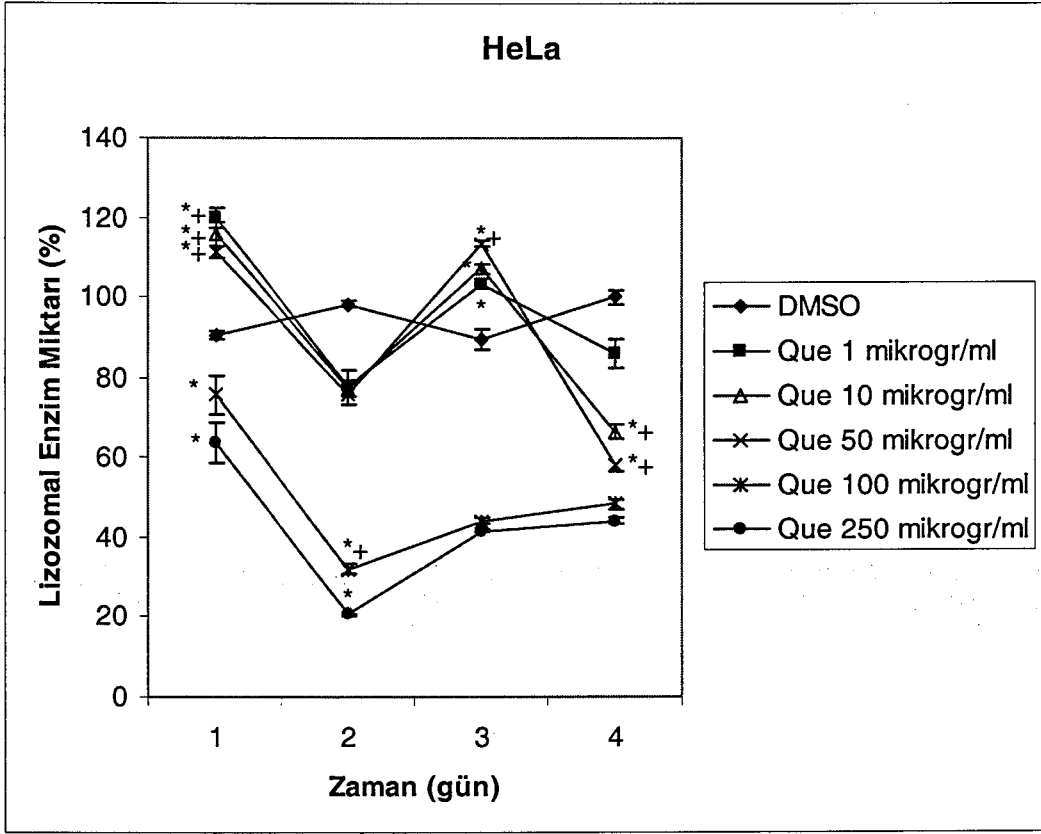


**Şekil 26.** Kersetinin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

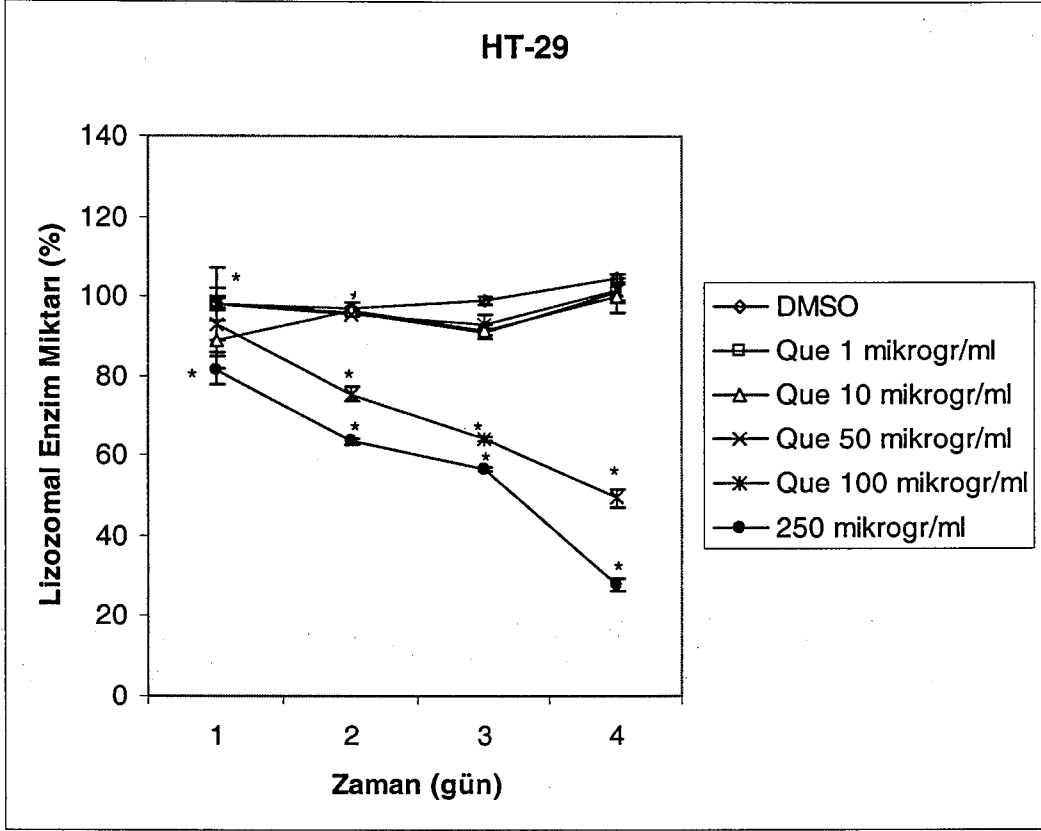
### 7.2.2. Kersetinin (Que) Neutral Red Up-take Ölçüm Sonuçları



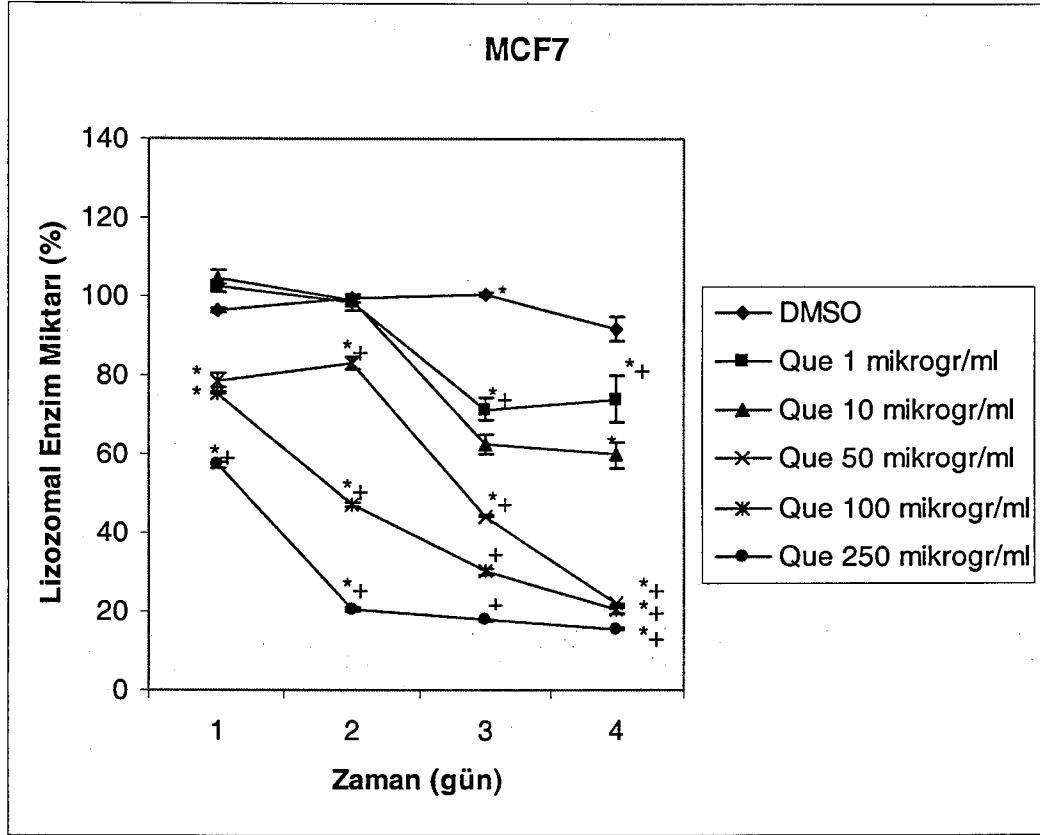
**Şekil 27.** Kersetin A549 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).



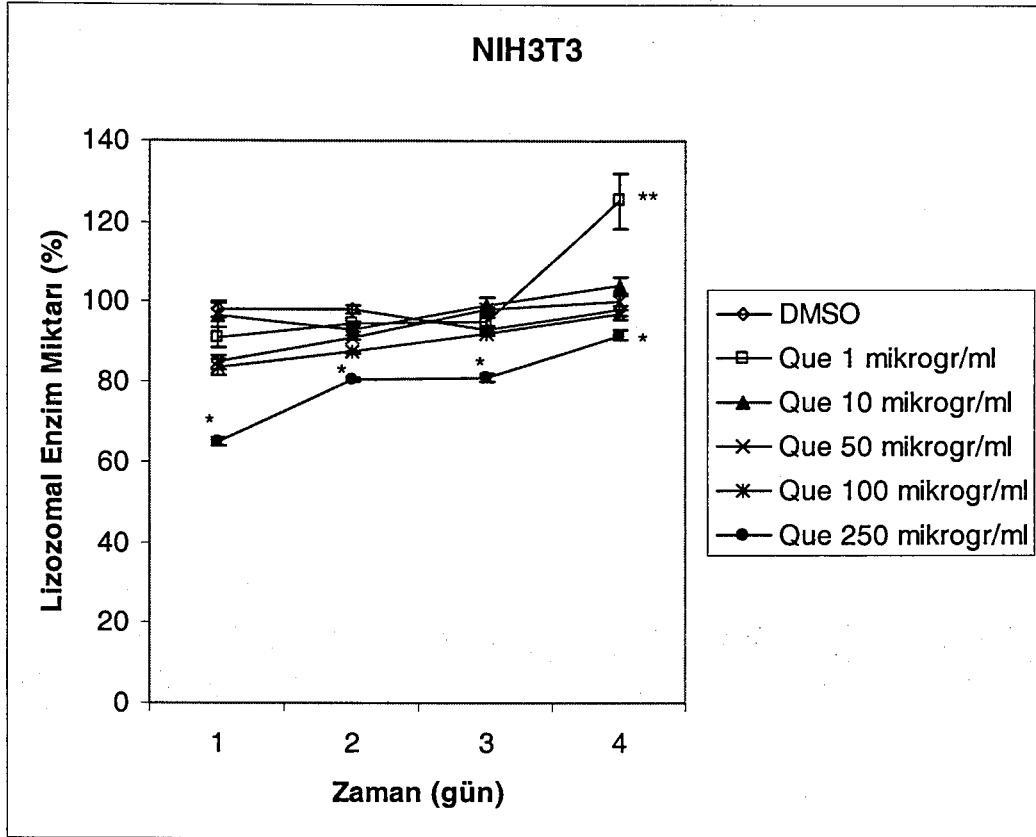
**Şekil 28.** Kersetinin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



**Şekil 29.** Kersetinin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

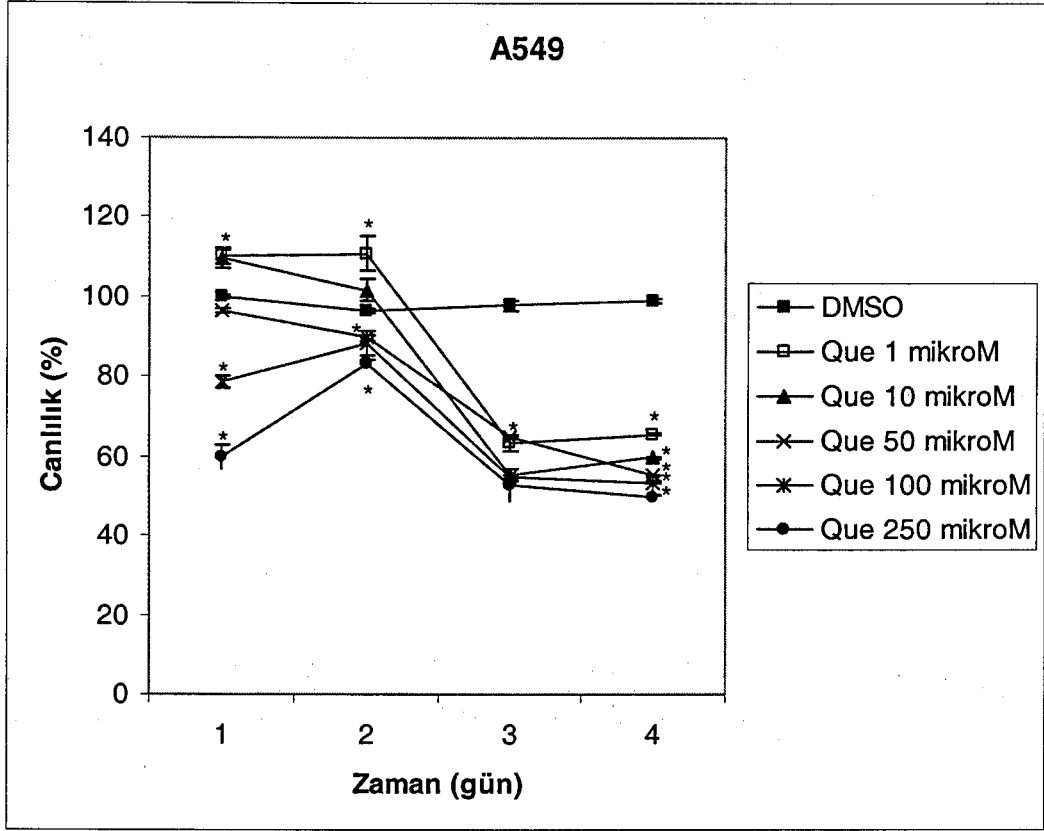


**Şekil 30.** Kersetinin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

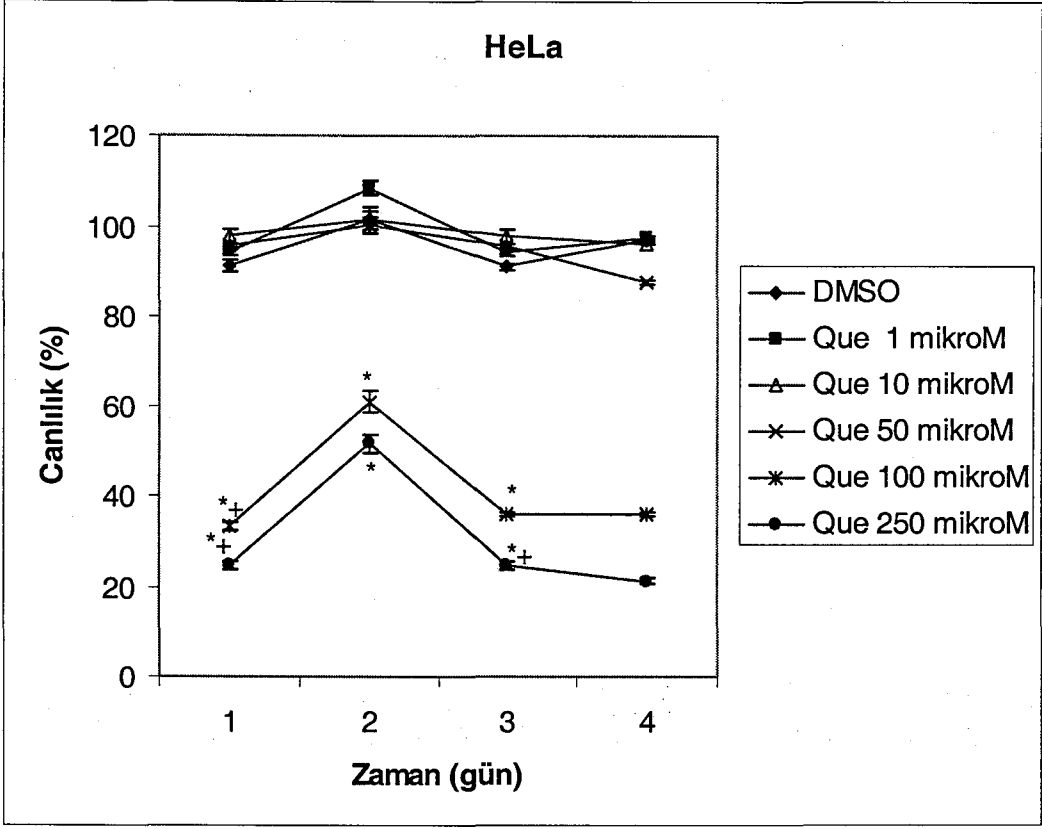


**Şekil 31.** Kersetinin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

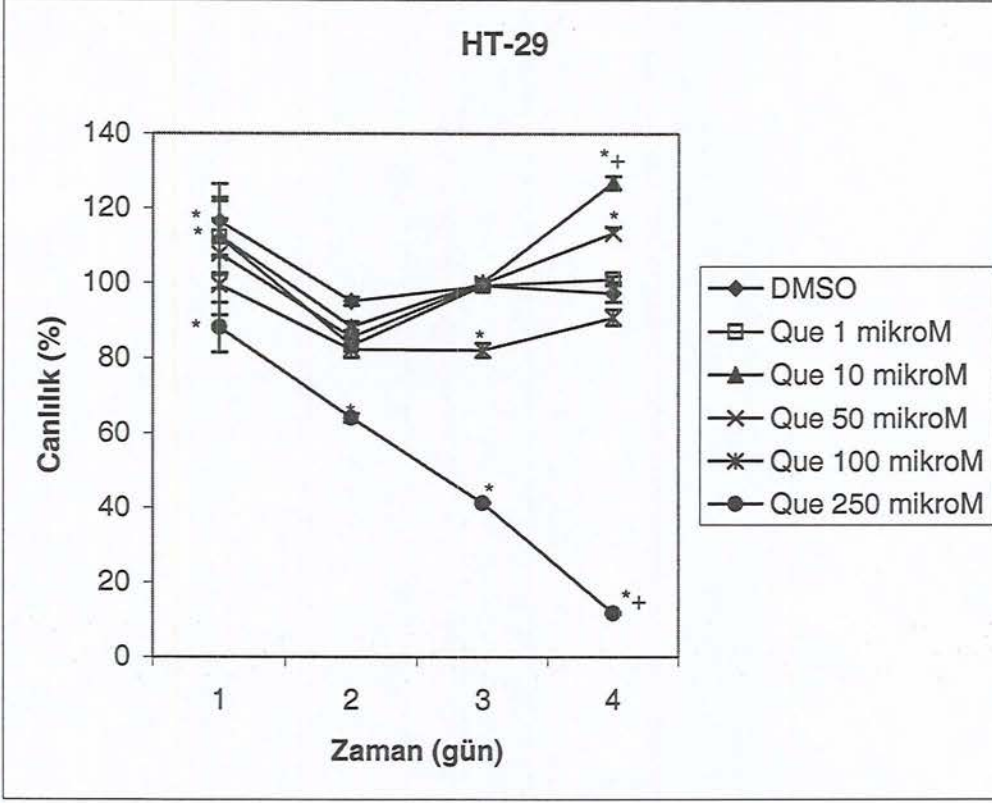
### 7.2.3. Kersetinin Kristal Viyole Ölçüm Sonuçları



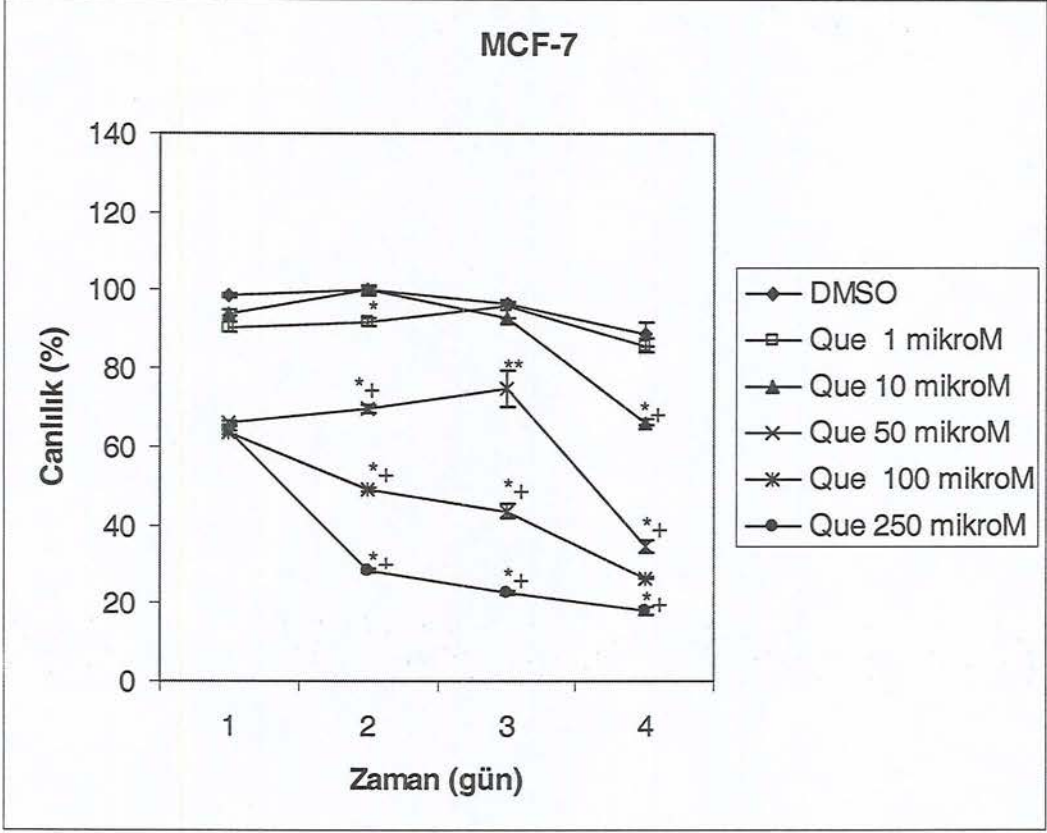
**Şekil 32.** Kersetinin A549 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



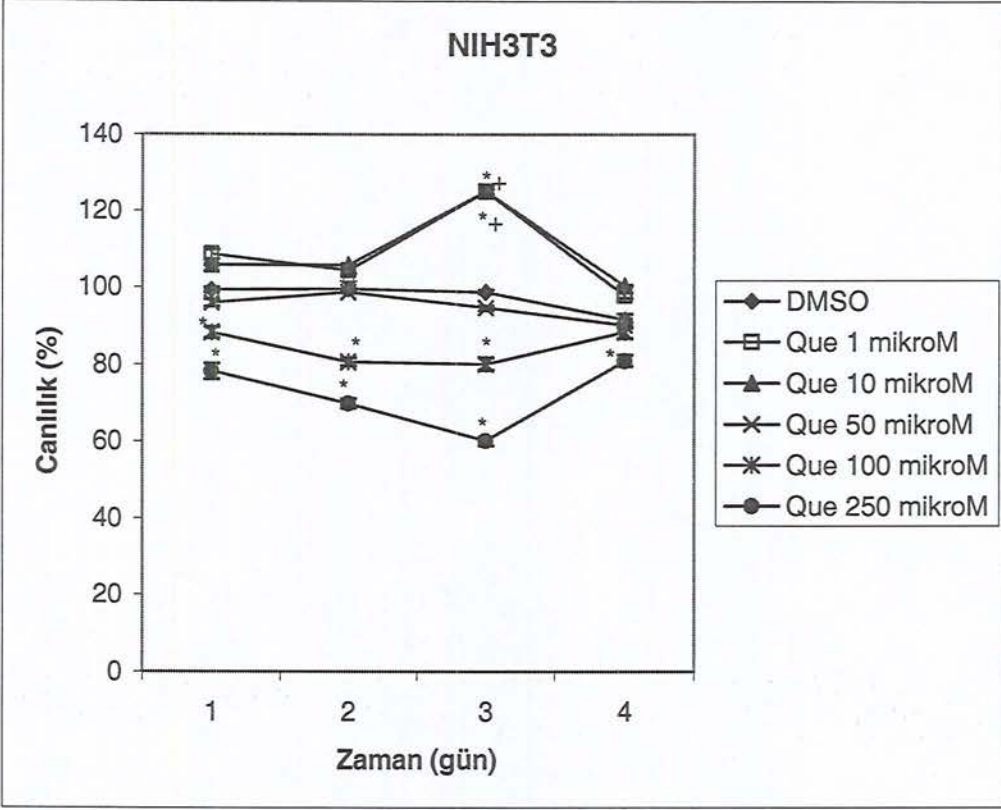
**Şekil 33.** Kersetin'in HeLa hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



**Şekil 34.** Kersetinin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

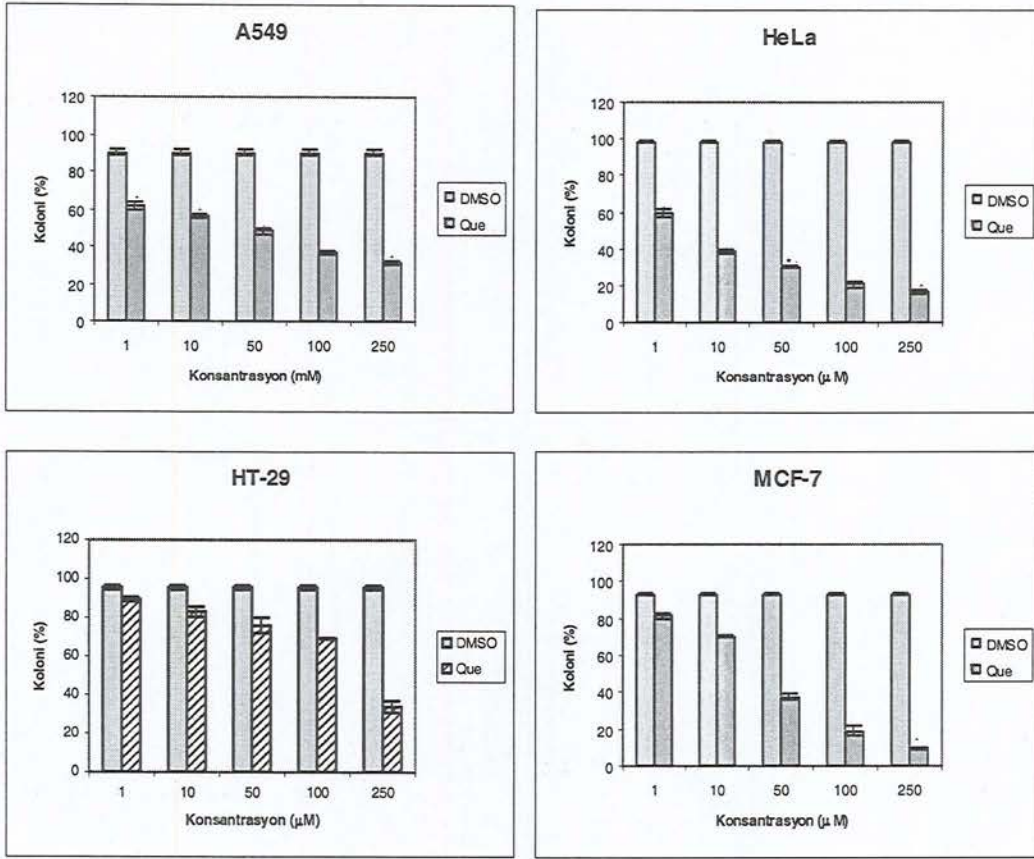


**Şekil 35.** Kersetinin MCF-7 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



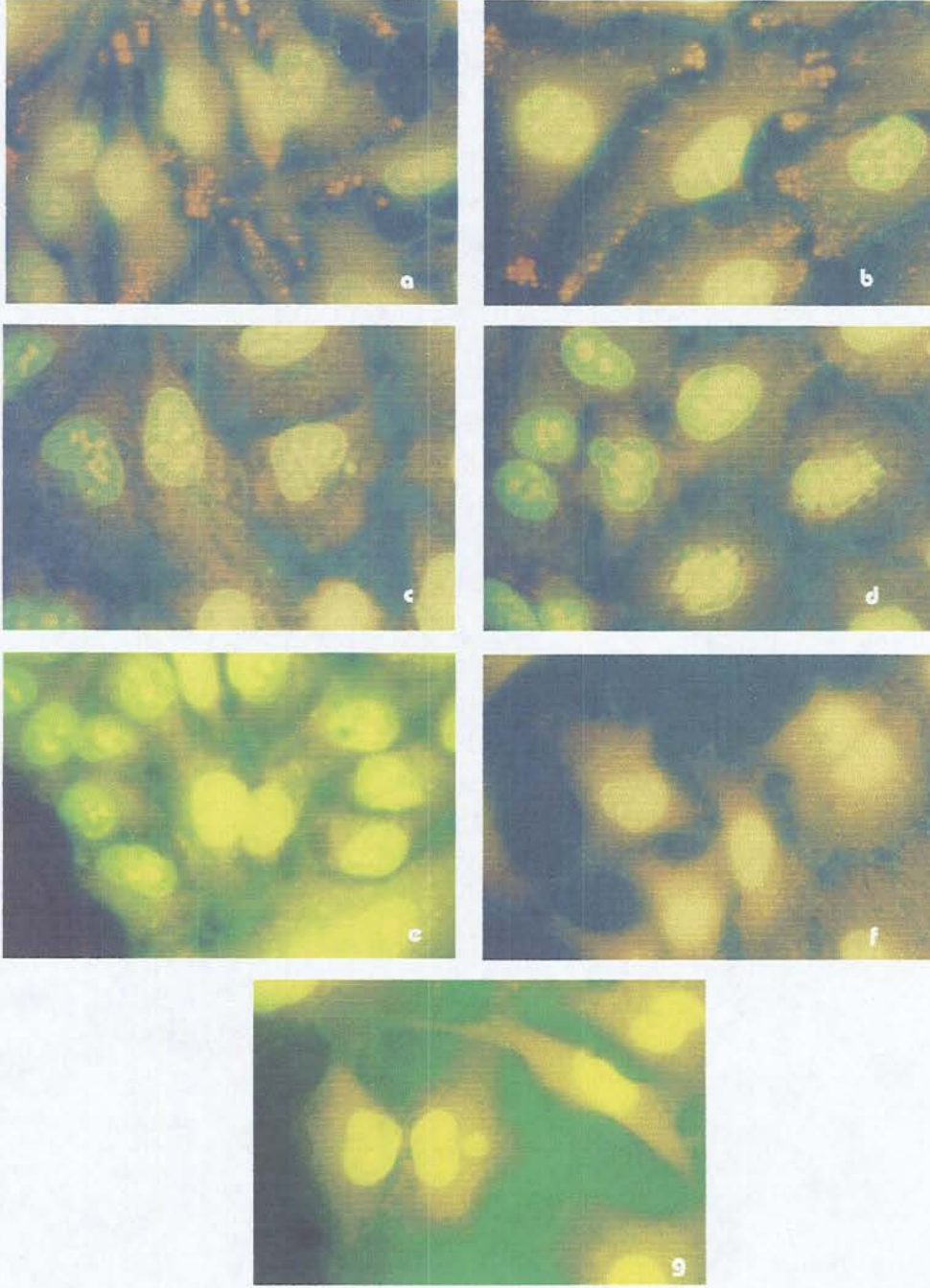
**Şekil 36.** Kersetinin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

## 7.2.4. Kersetinin Koloni Formasyonu Sonuçları

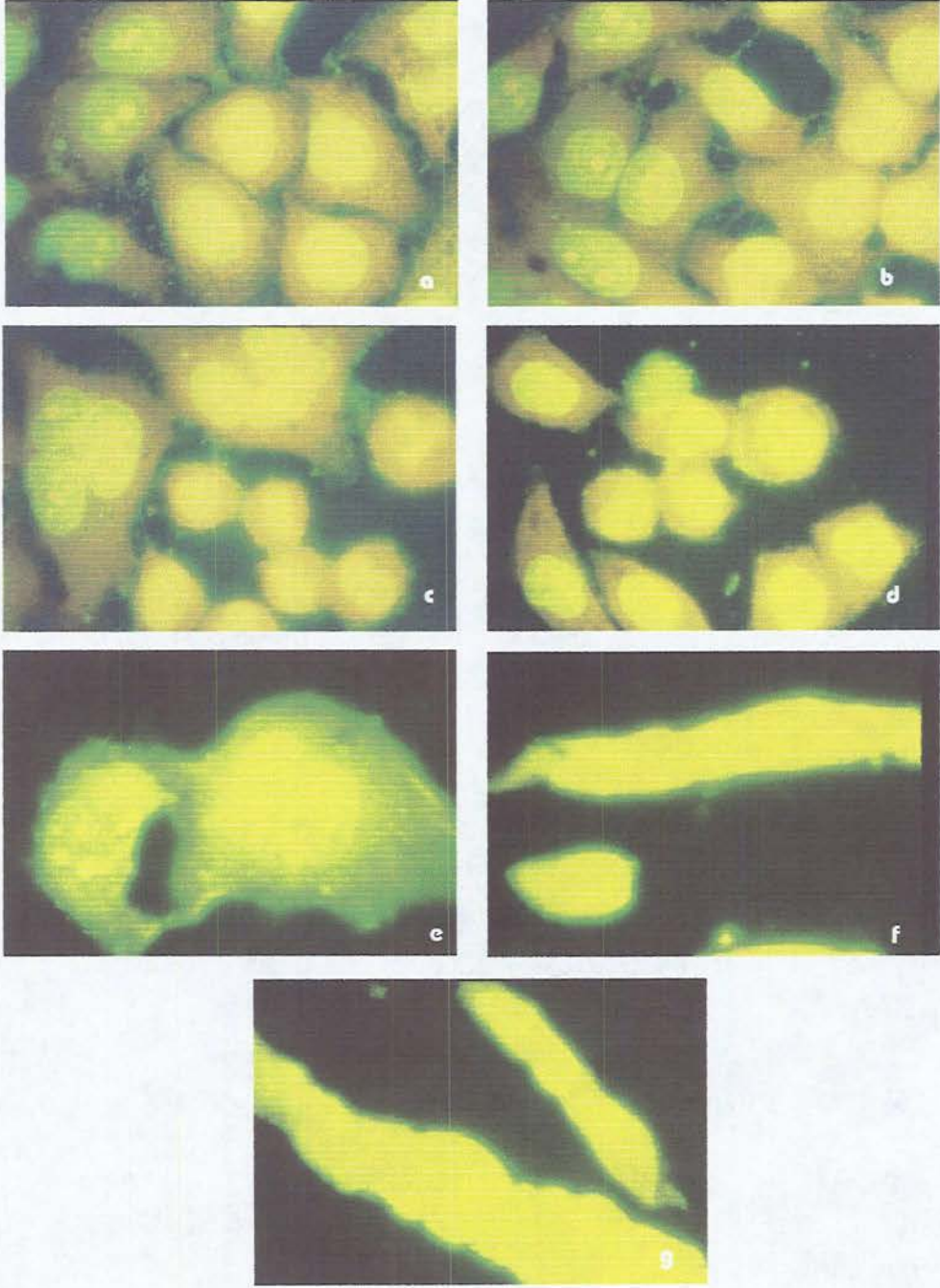


Şekil 37. Kersetinin A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyonu oluşumu açısından değerlendirilmeleri. (\*) Dozlara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 3$ ).

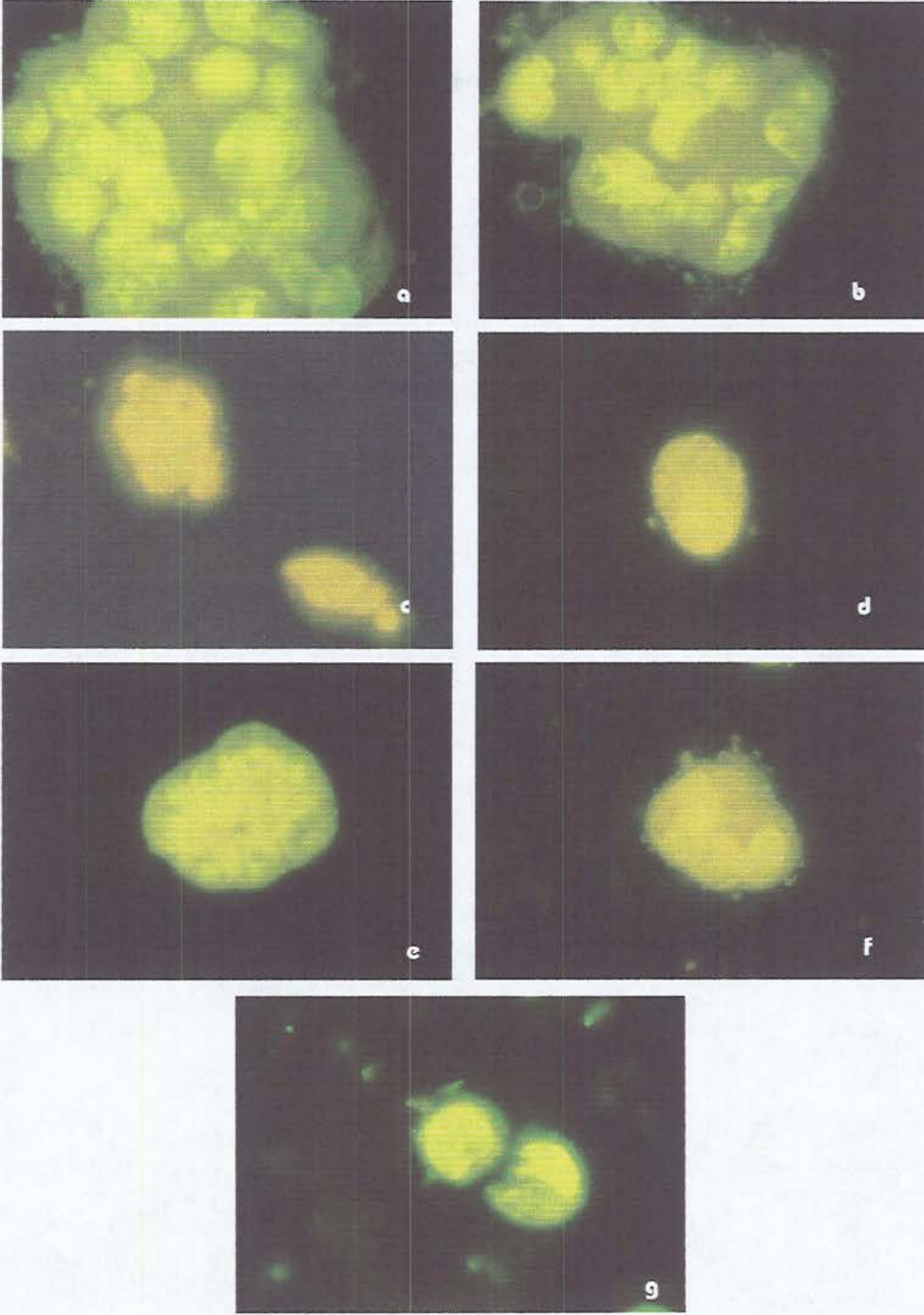
### 7.2.5. Kersetinin Akridin Oranj Boyama Sonuçları



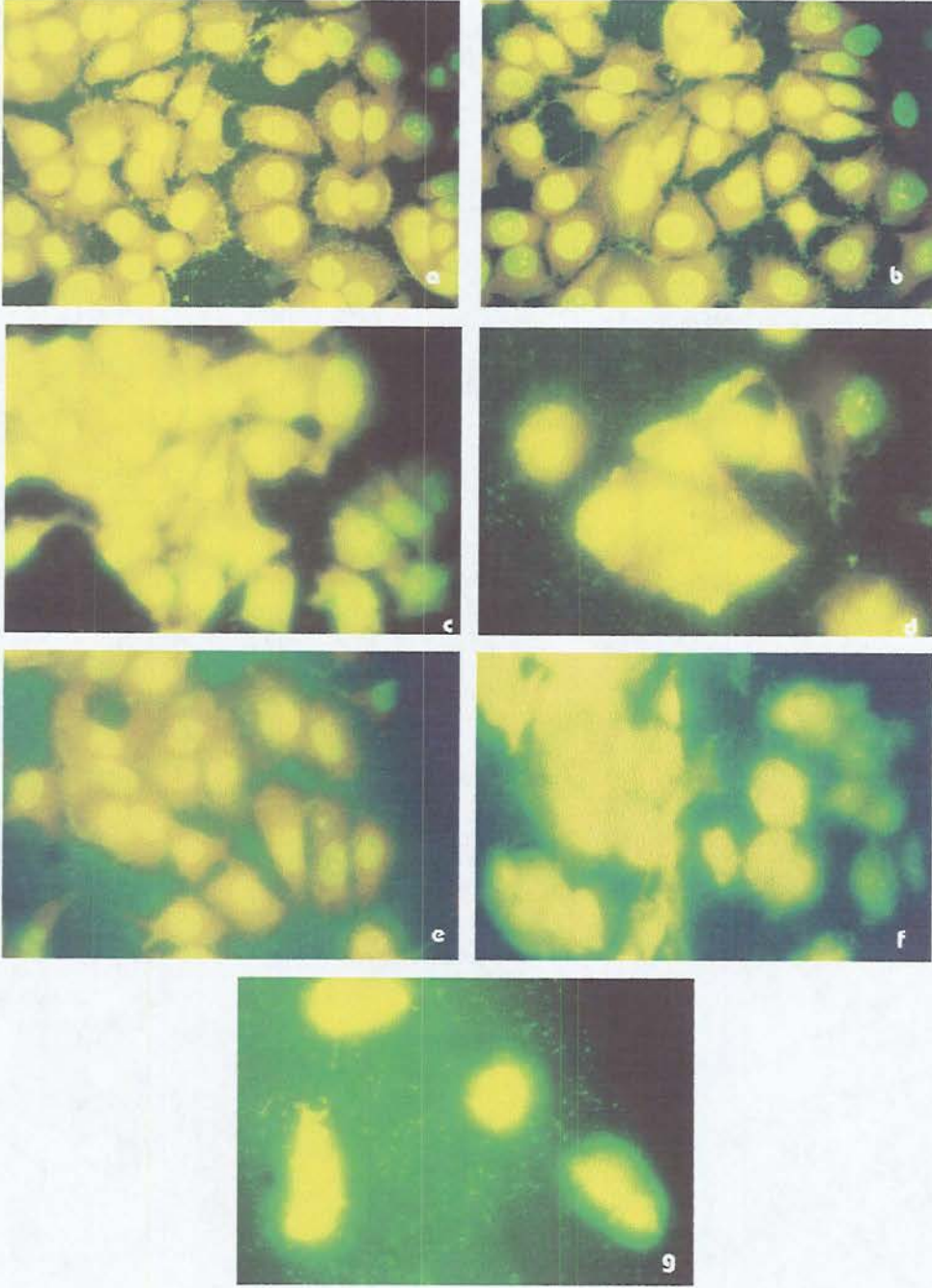
**Şekil 38.** Kersetin uygulanan A549 hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA.a- Kontrol, b- DMSO, c- 1  $\mu$ M, d- 10  $\mu$ M, e- 50  $\mu$ M, f- 100  $\mu$ M, g- 250  $\mu$ M Kersetin. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)



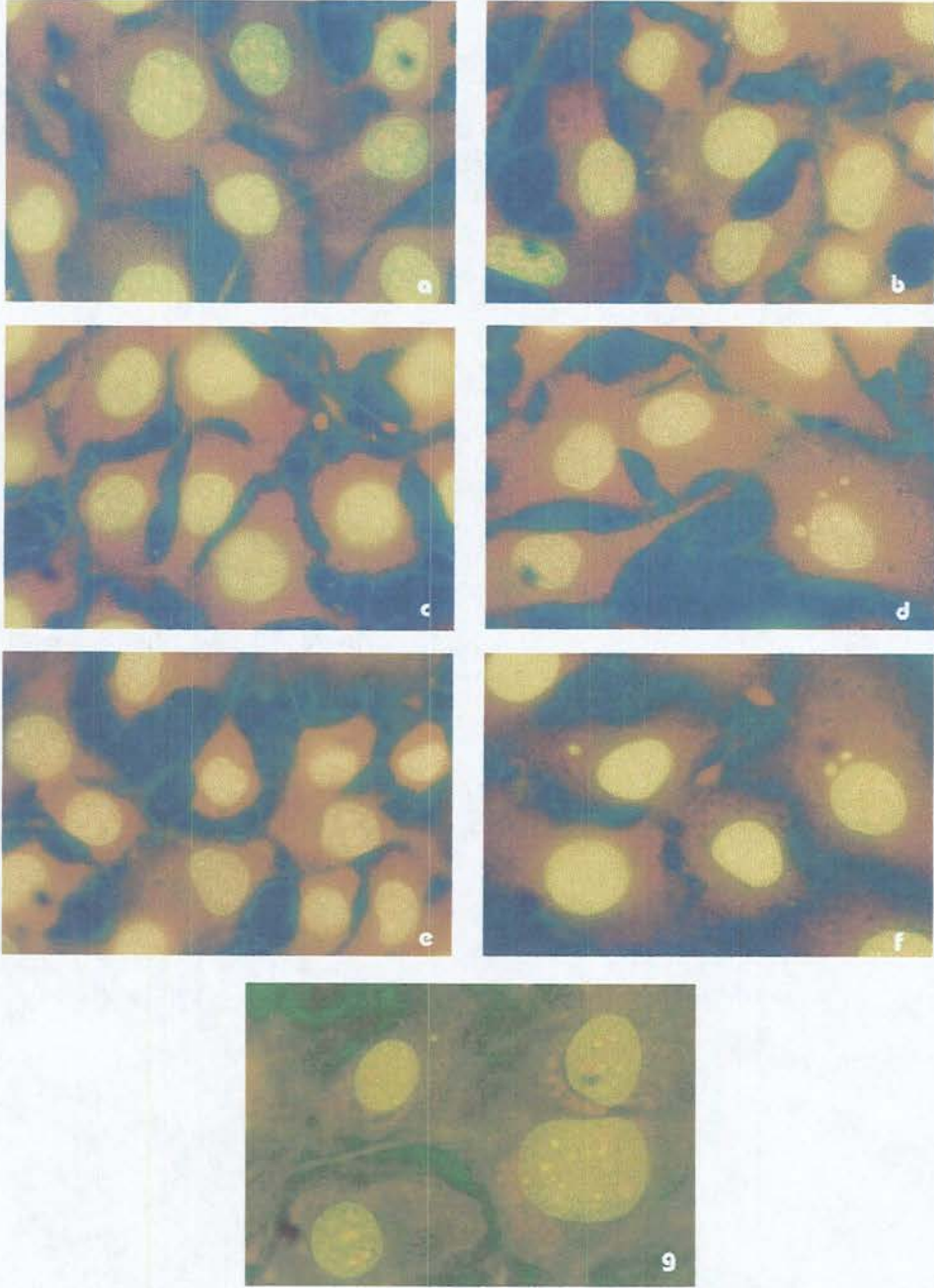
**Şekil 39.** Keretin uygulanan HeLa hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 1  $\mu$ M, d- 10  $\mu$ M, e- 50  $\mu$ M, f- 100  $\mu$ M, g- 250  $\mu$ M Keretin. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)



**Şekil 40.** Kersetin uygulanan HT-29 hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarıyeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 1  $\mu$ M, d- 10  $\mu$ M, e- 50  $\mu$ M, f- 100  $\mu$ M, g- 250  $\mu$ M Kersetin. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)



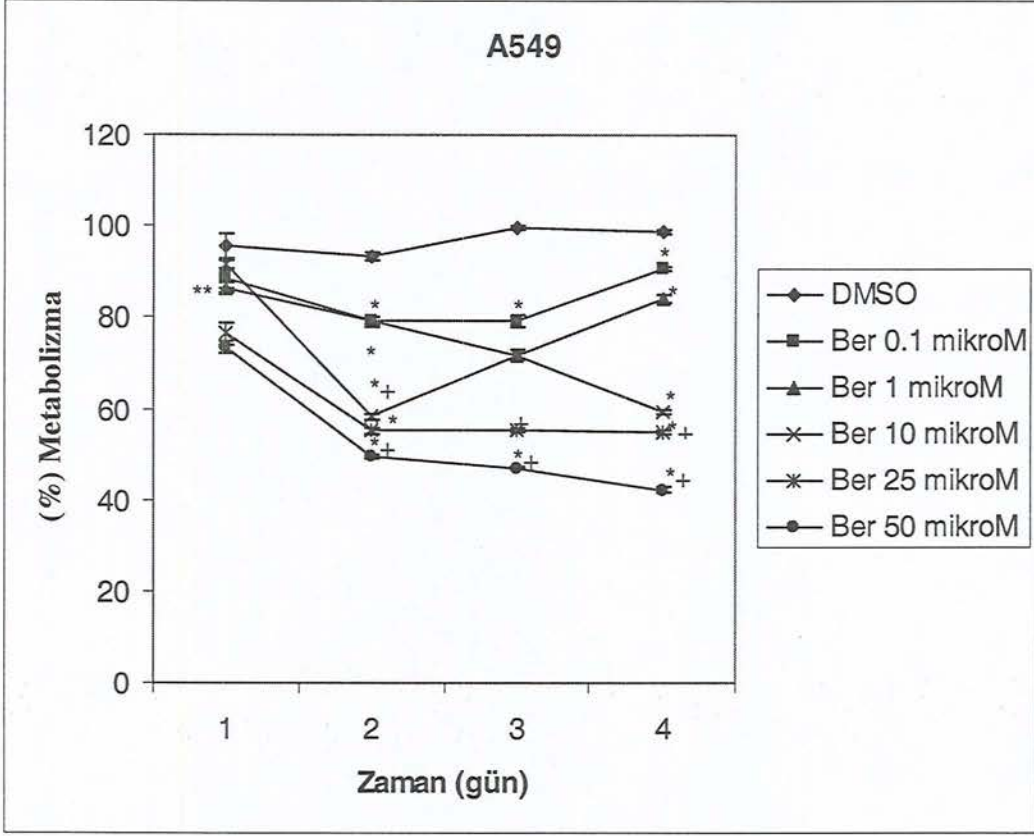
**Şekil 41.** Kersetin uygulanan MCF-7 hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 1  $\mu$ M, d- 10  $\mu$ M, e- 50  $\mu$ M, f- 100  $\mu$ M, g- 250  $\mu$ M Kersetin. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)



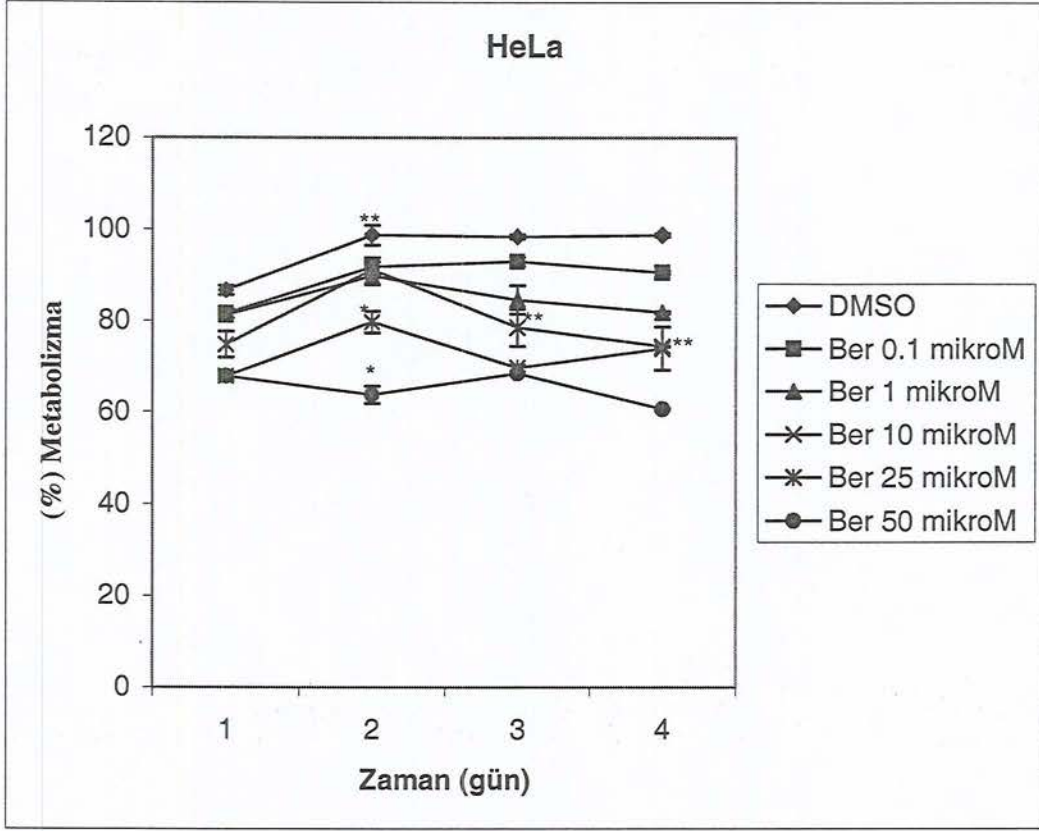
**Şekil 42.** Kersetin uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 1  $\mu$ M, d- 10  $\mu$ M, e- 50  $\mu$ M, f- 100  $\mu$ M, g- 250  $\mu$ M Kersetin. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)

### 7.3. BERBERİN SONUÇLARI

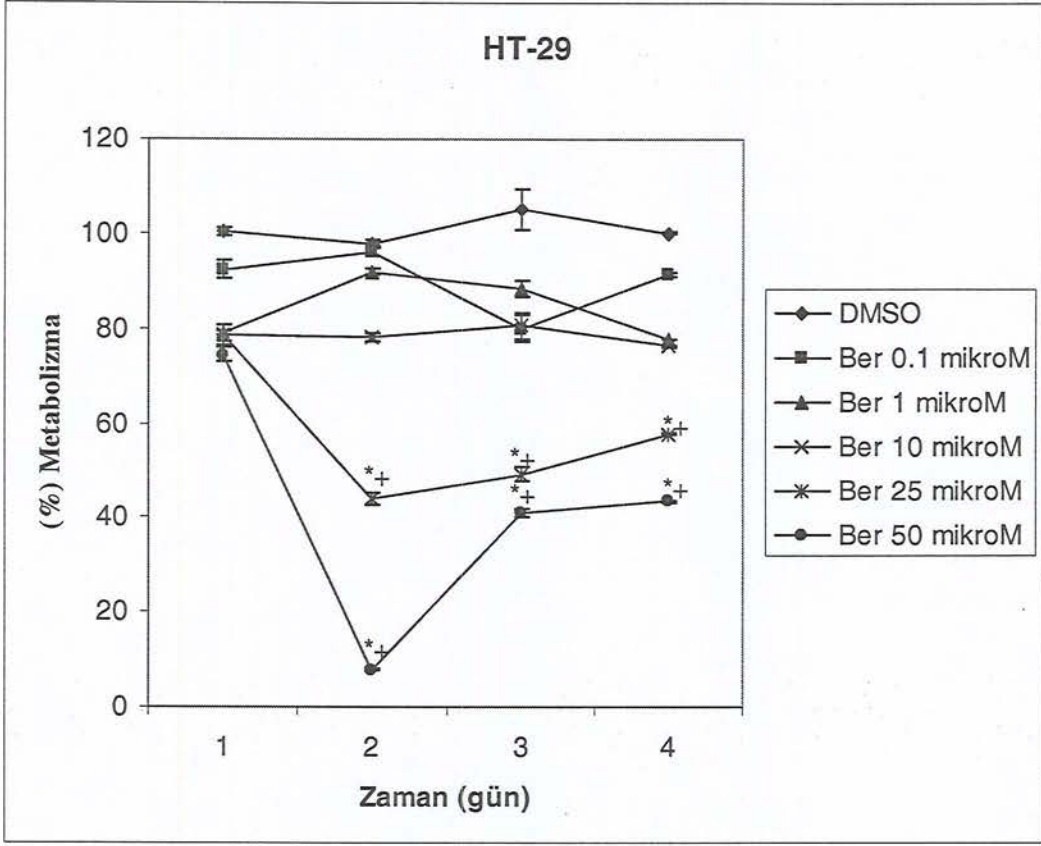
#### 7.3.1. Berberinin MTT Ölçüm Sonuçları



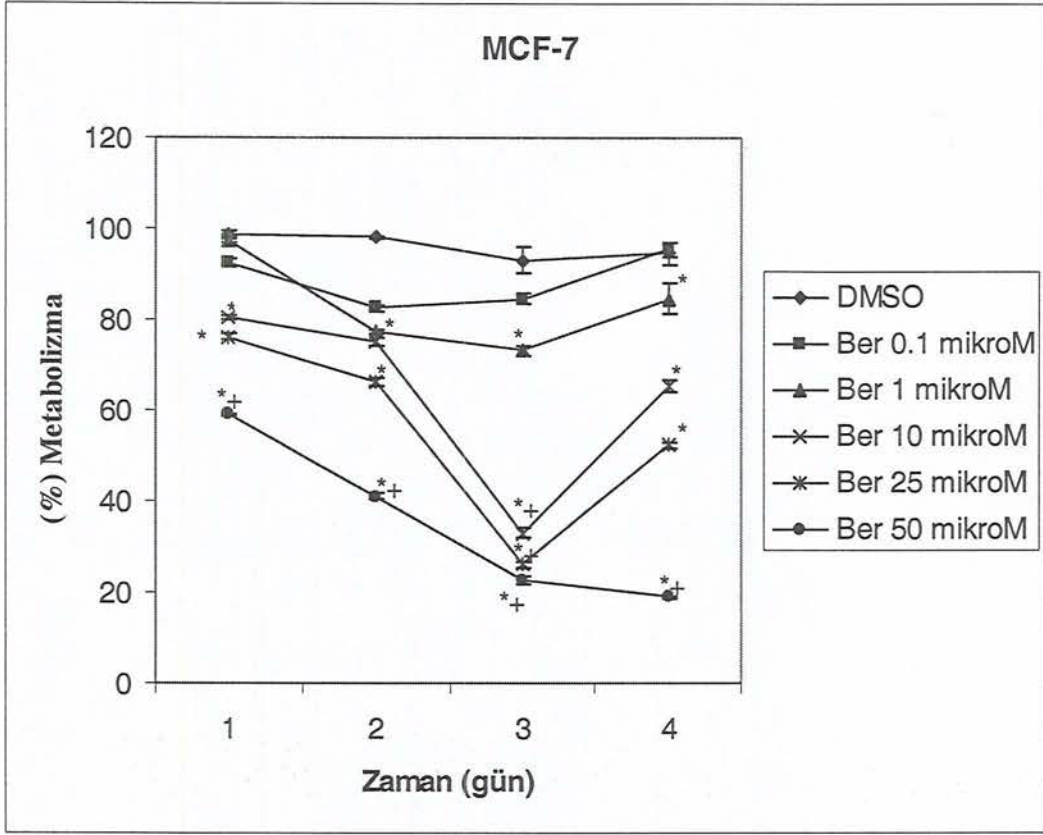
**Şekil 43.** Berberinin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) Gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



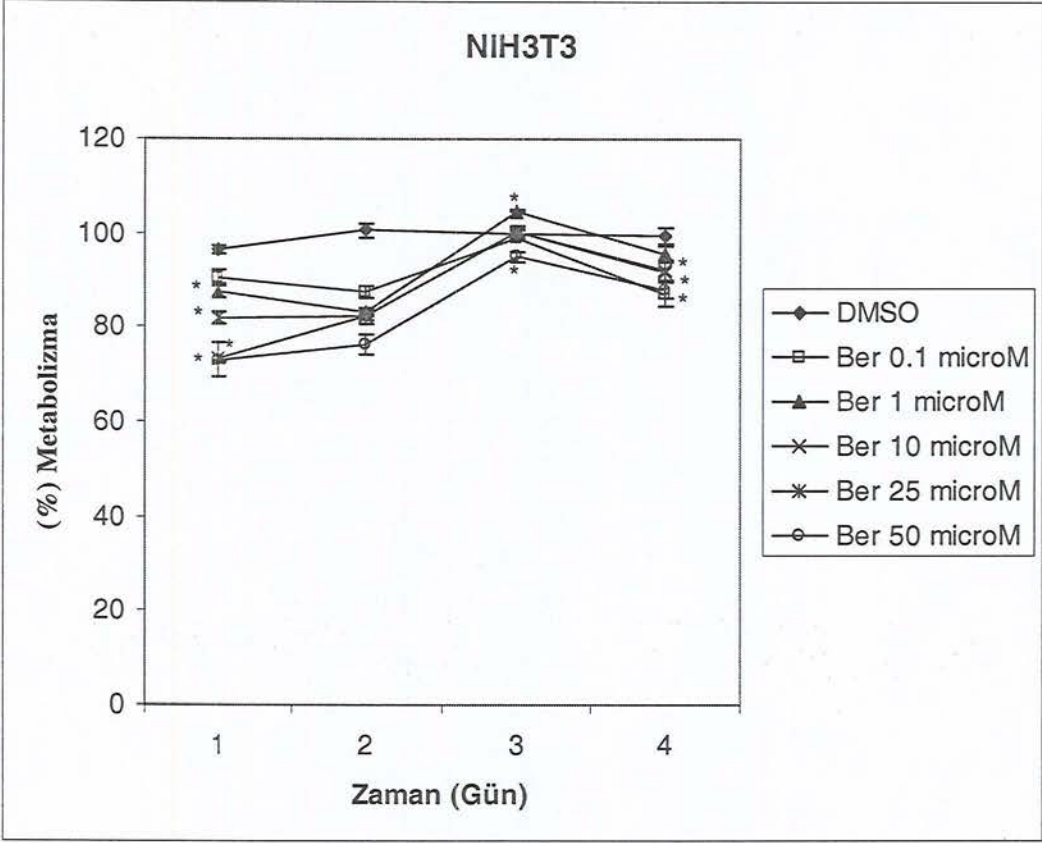
**Şekil 44.** Berberinin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) Gruplara göre anlamlı farklılıklar. Anamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).



**Şekil 45.** Berberinin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar Anamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

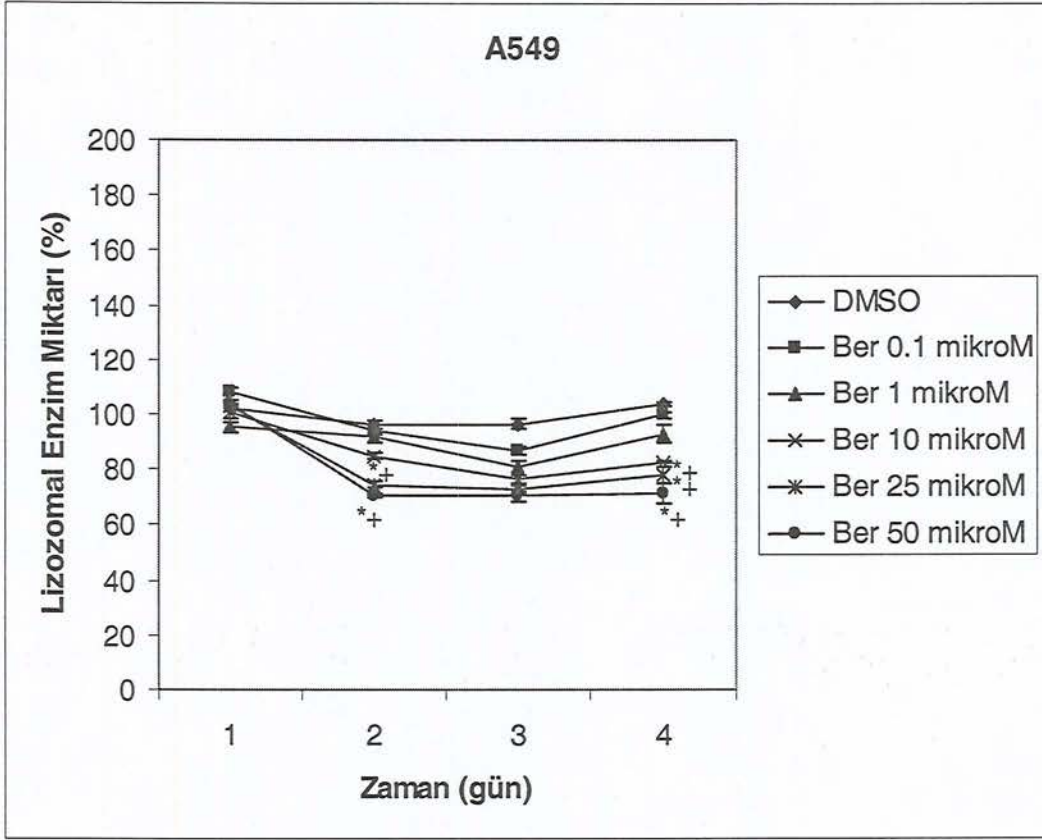


**Şekil 46.** Berberinin MCF-7 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).

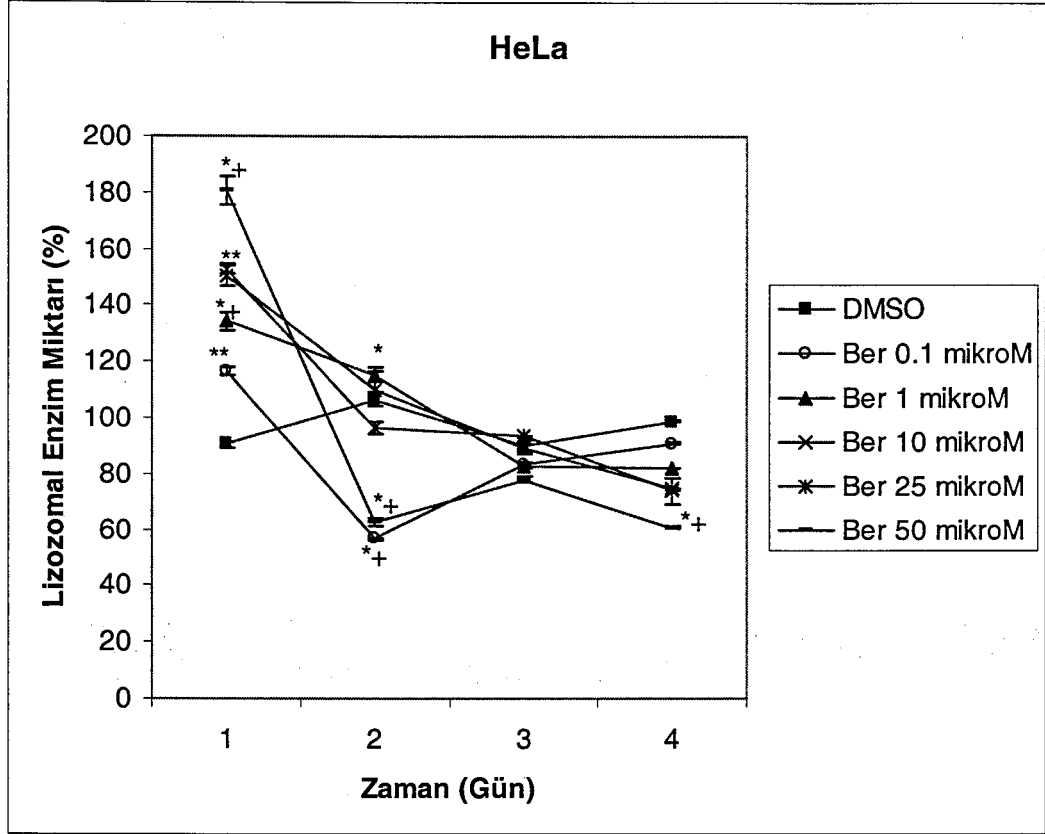


**Şekil 47.** Berberinin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ölçümü ile değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

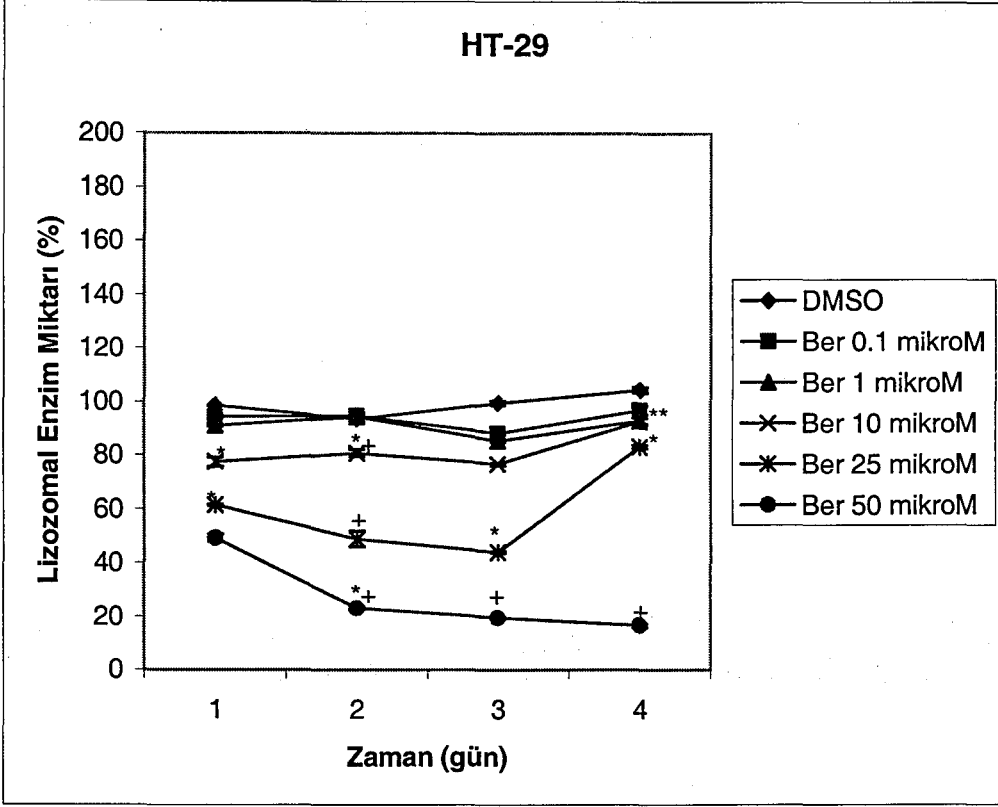
### 7.3.2. Berberinin Neutral Red Up-take Ölçüm Sonuçları



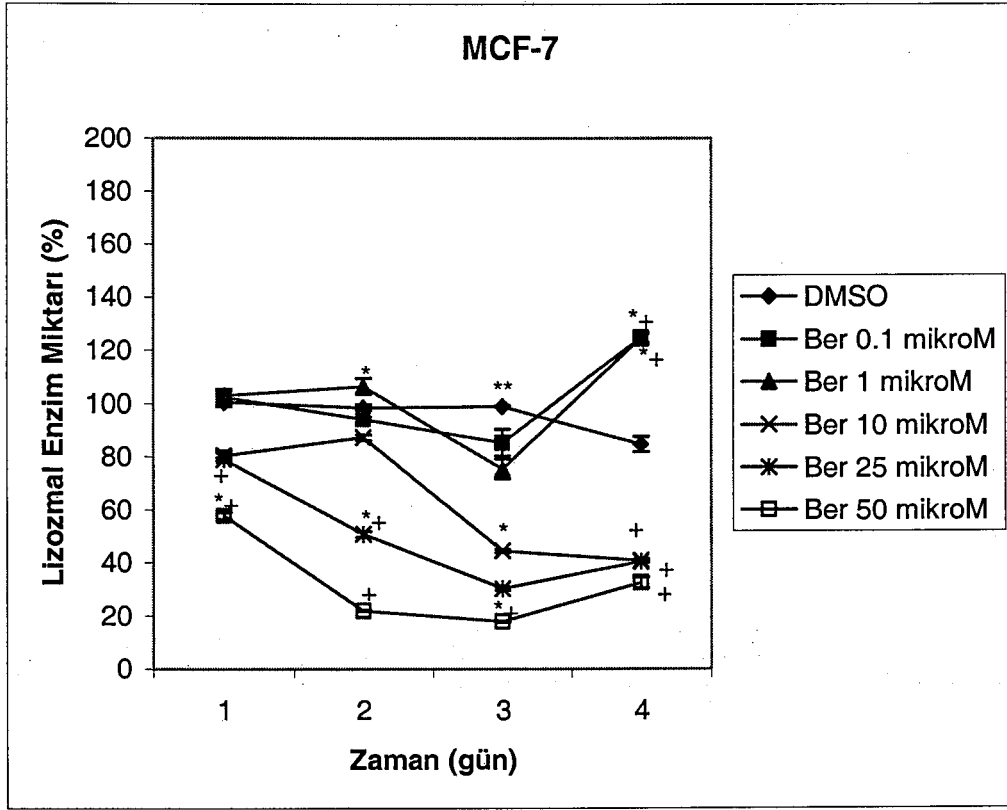
**Şekil 48.** Berberinin A549 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



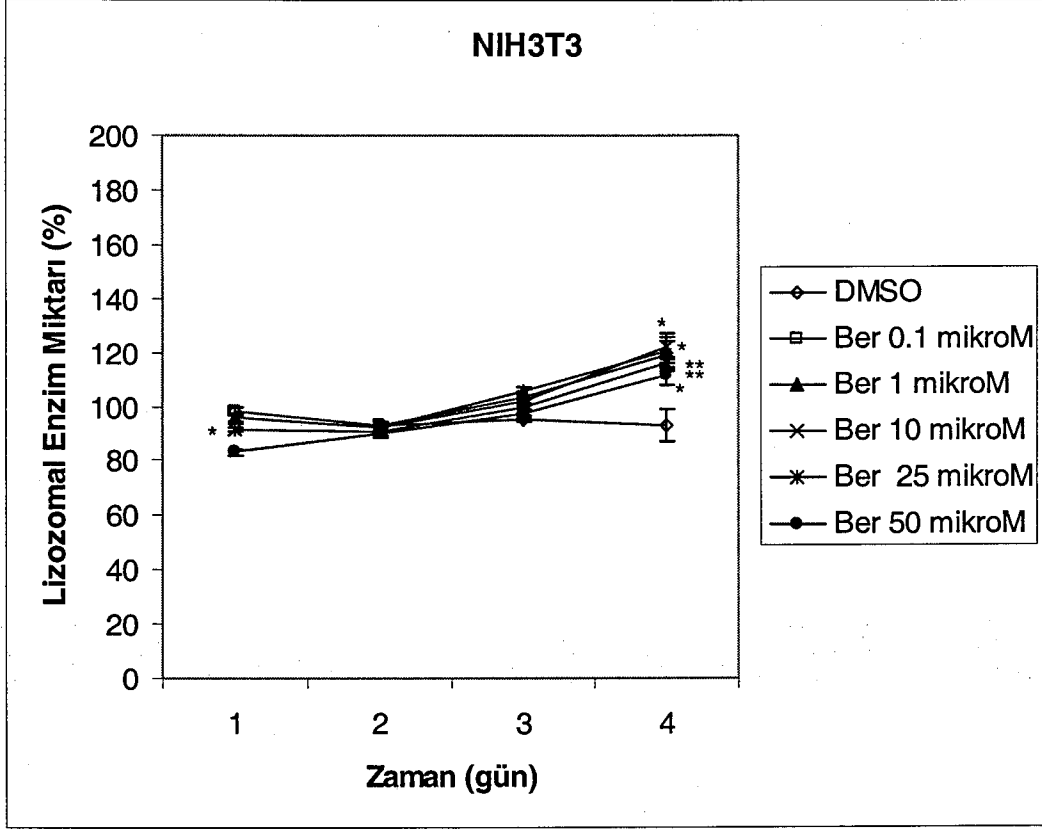
**Şekil 49.** Berberinin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



**Şekil 50.** Berberinin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 6$ ).

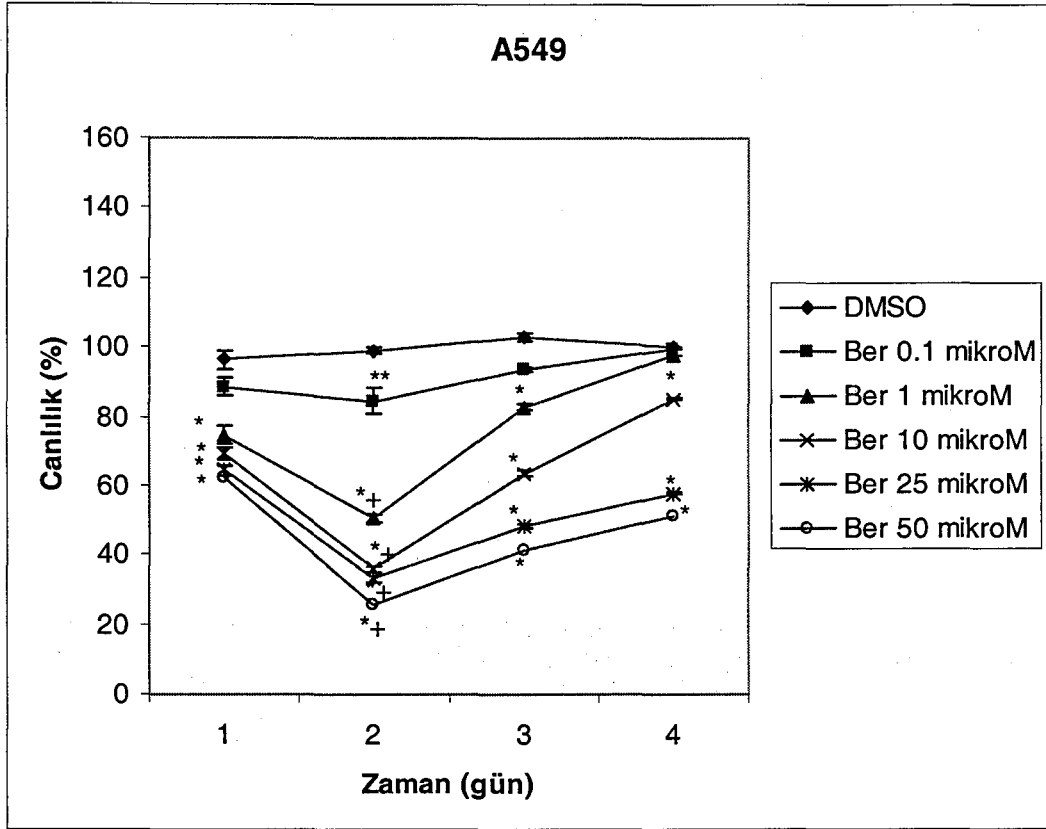


**Şekil 51.** Berberinin MCF-7 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

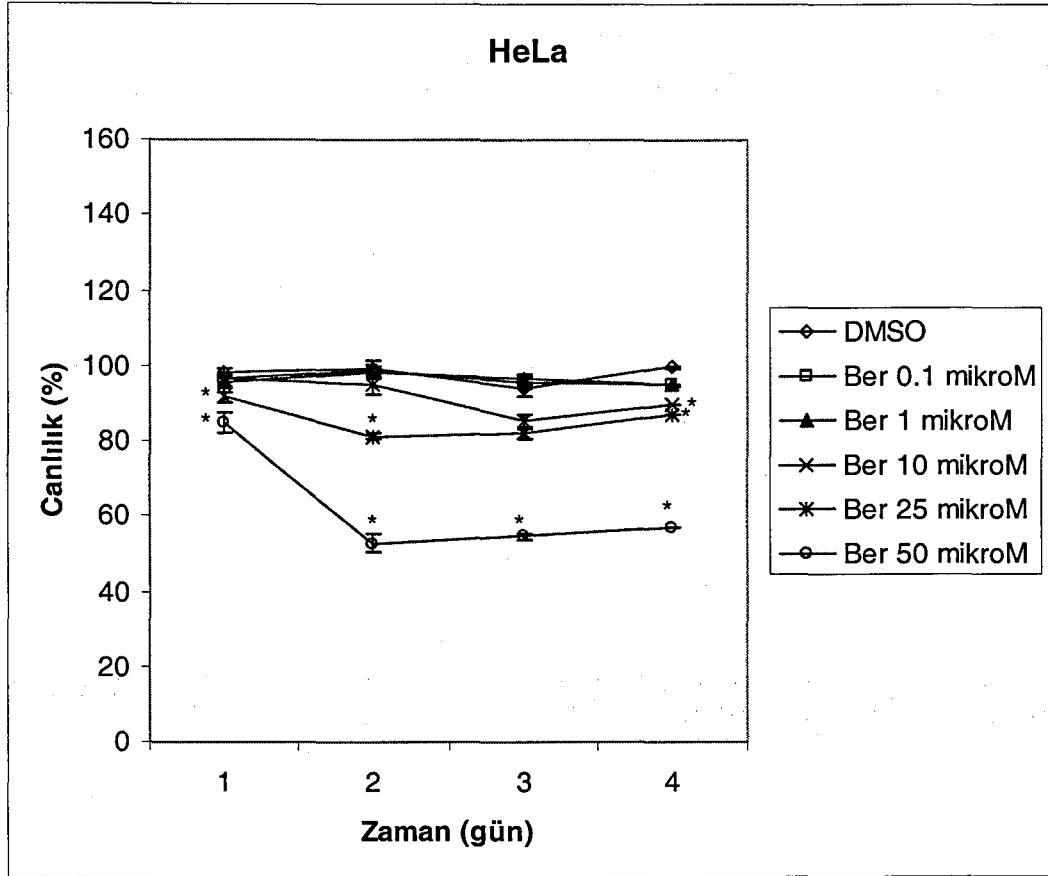


**Şekil 52.** Berberinin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin neutral red up-take ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

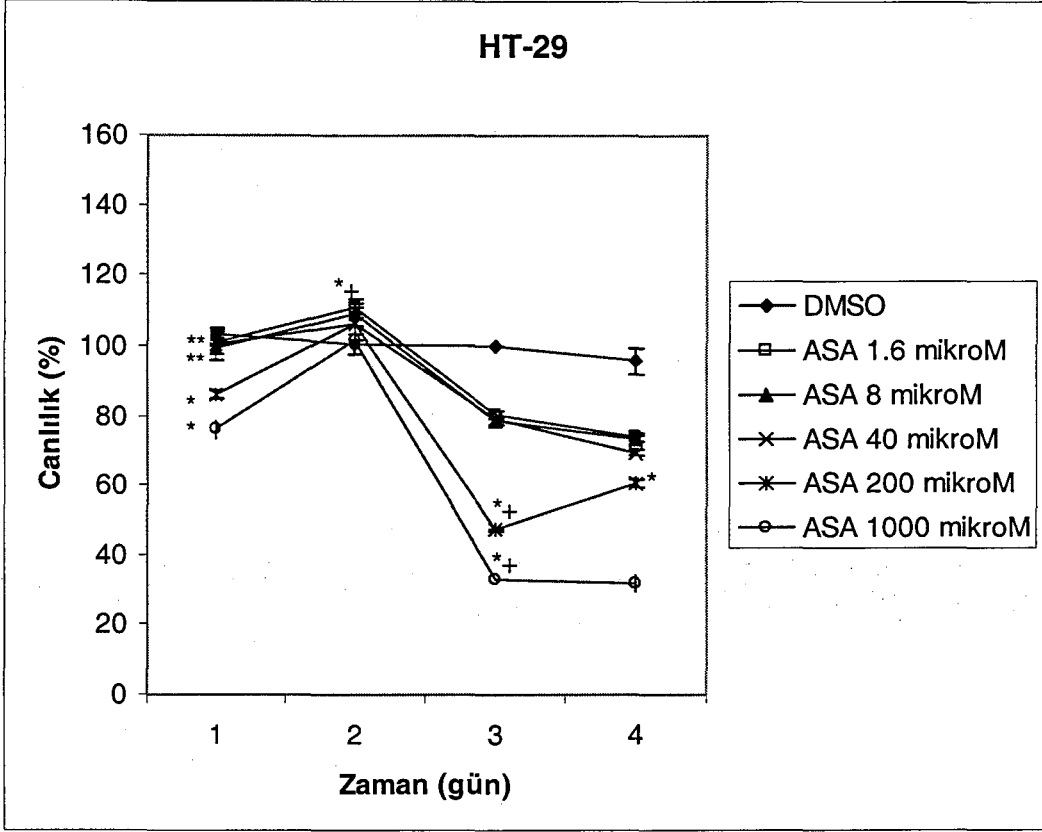
### 7.3.3. Berberinin Kristal Viyole Sonuçları



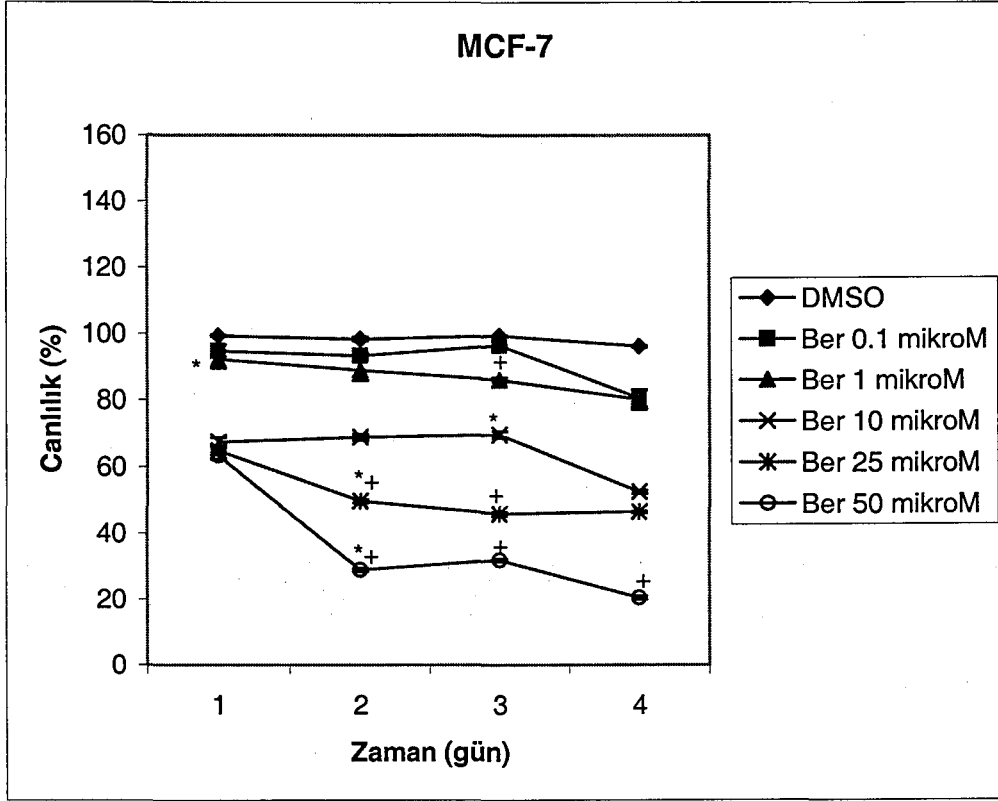
**Şekil 53.** Berberinin A549 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



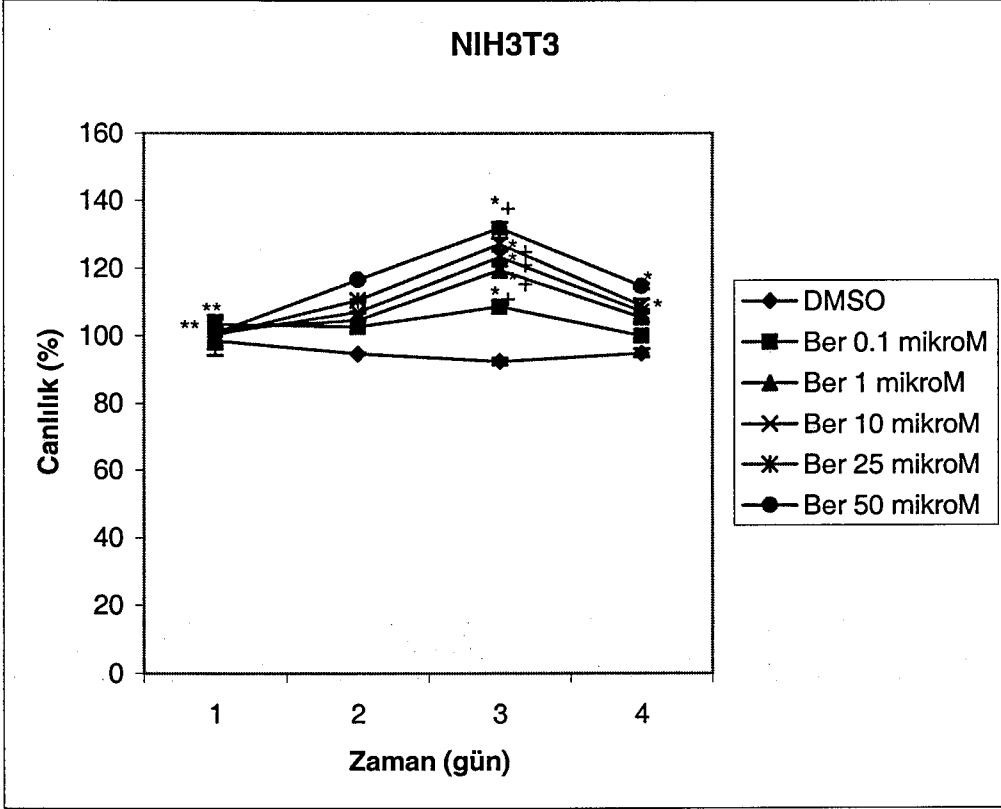
**Şekil 54.** Berberinin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



**Şekil 55.** Berberinin HT-29 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

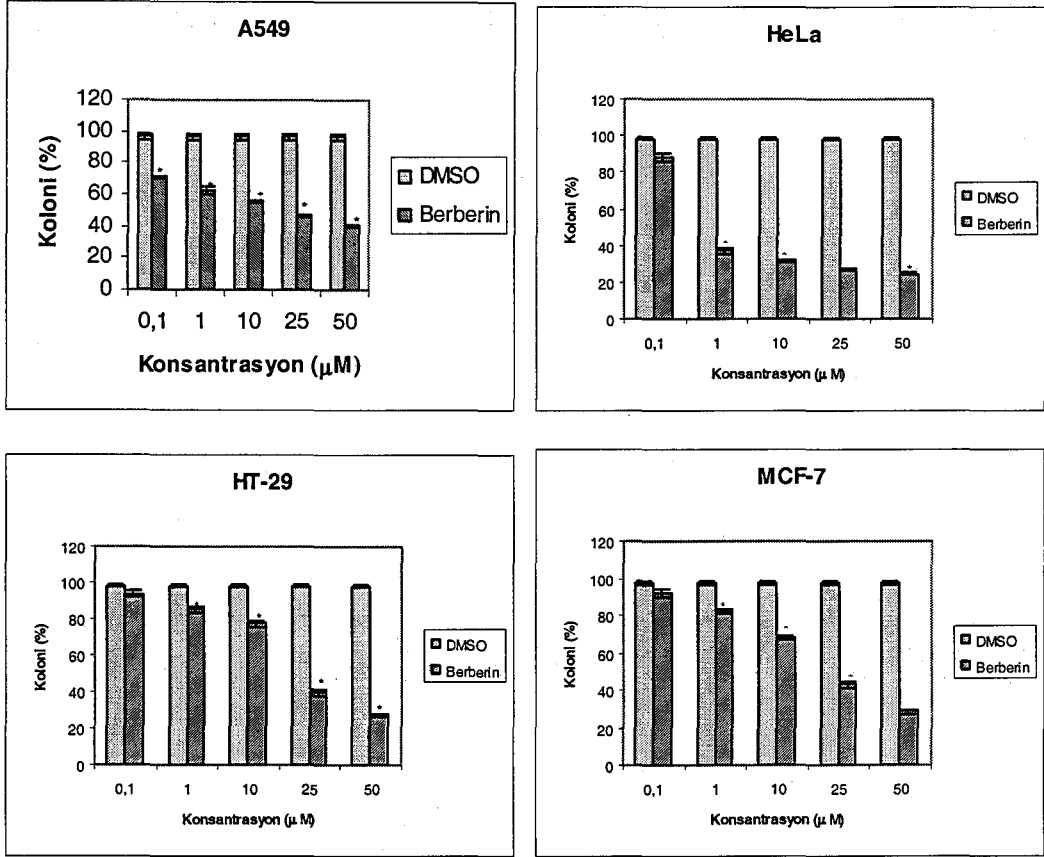


**Şekil 56.** Berberinin MCF-7 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).



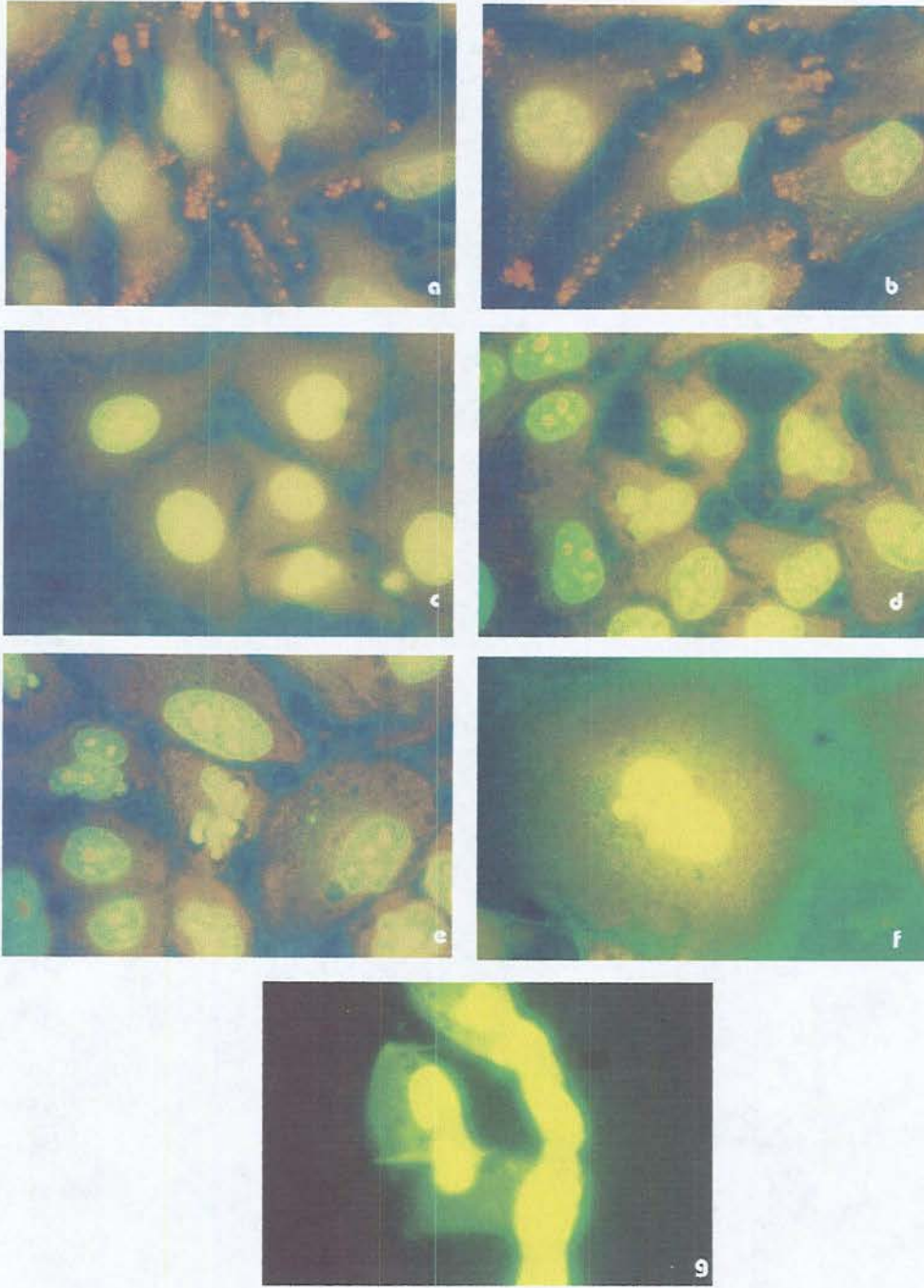
**Şekil 57.** Berberinin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin kristal viyole DNA ölçümü ile canlılık açısından değerlendirilmeleri. (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, (\*\*) gruplara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücrelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata (n = 6).

### 7.3.4. Berberinin Koloni Formasyonu Sonuçları

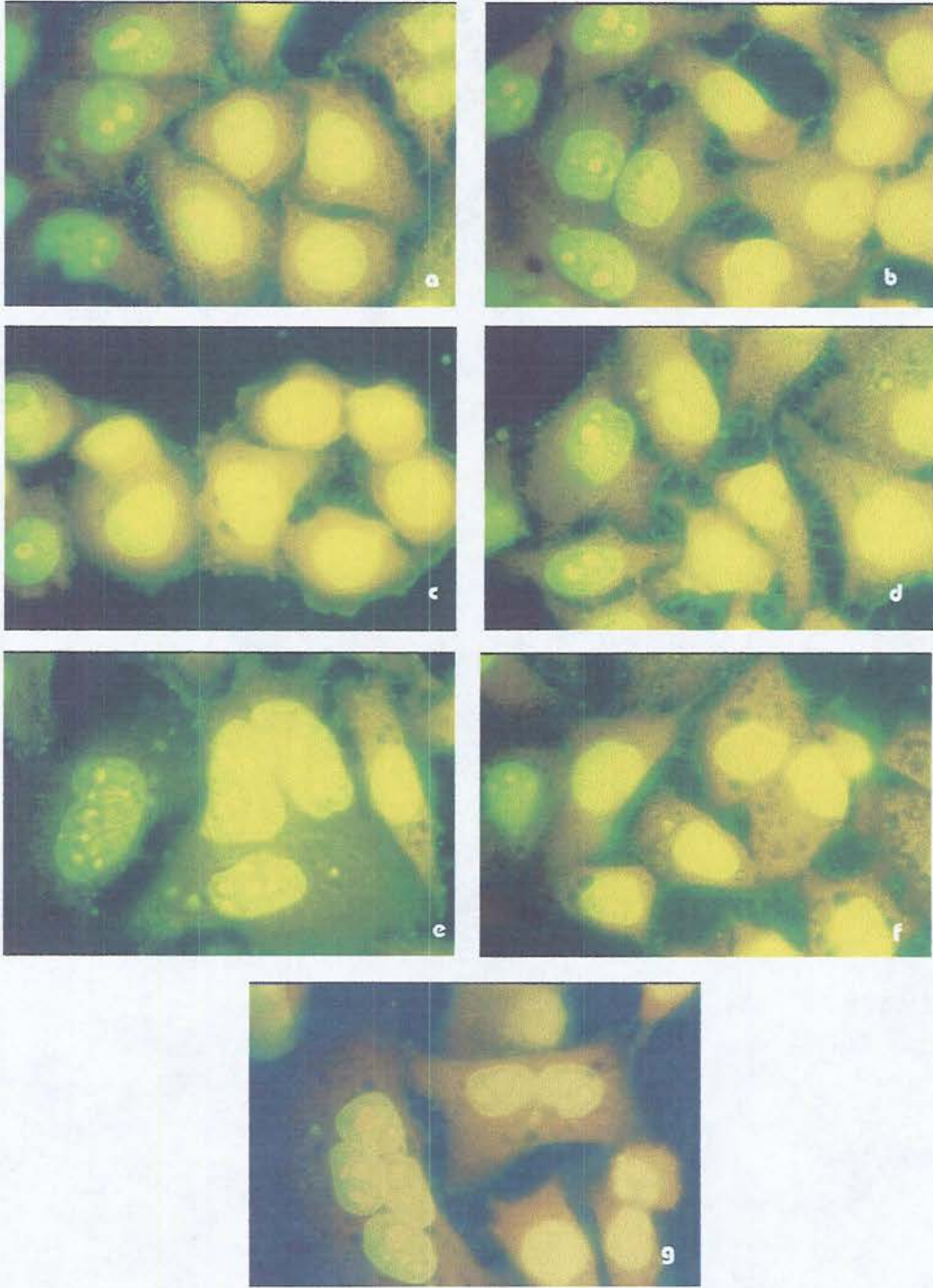


**Şekil 58.** Berberinin A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri. (\*) Dozlara göre anlamlı farklılıklar, (+) hücelere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ , Ortalama değerler  $\pm$  St. hata ( $n = 3$ ).

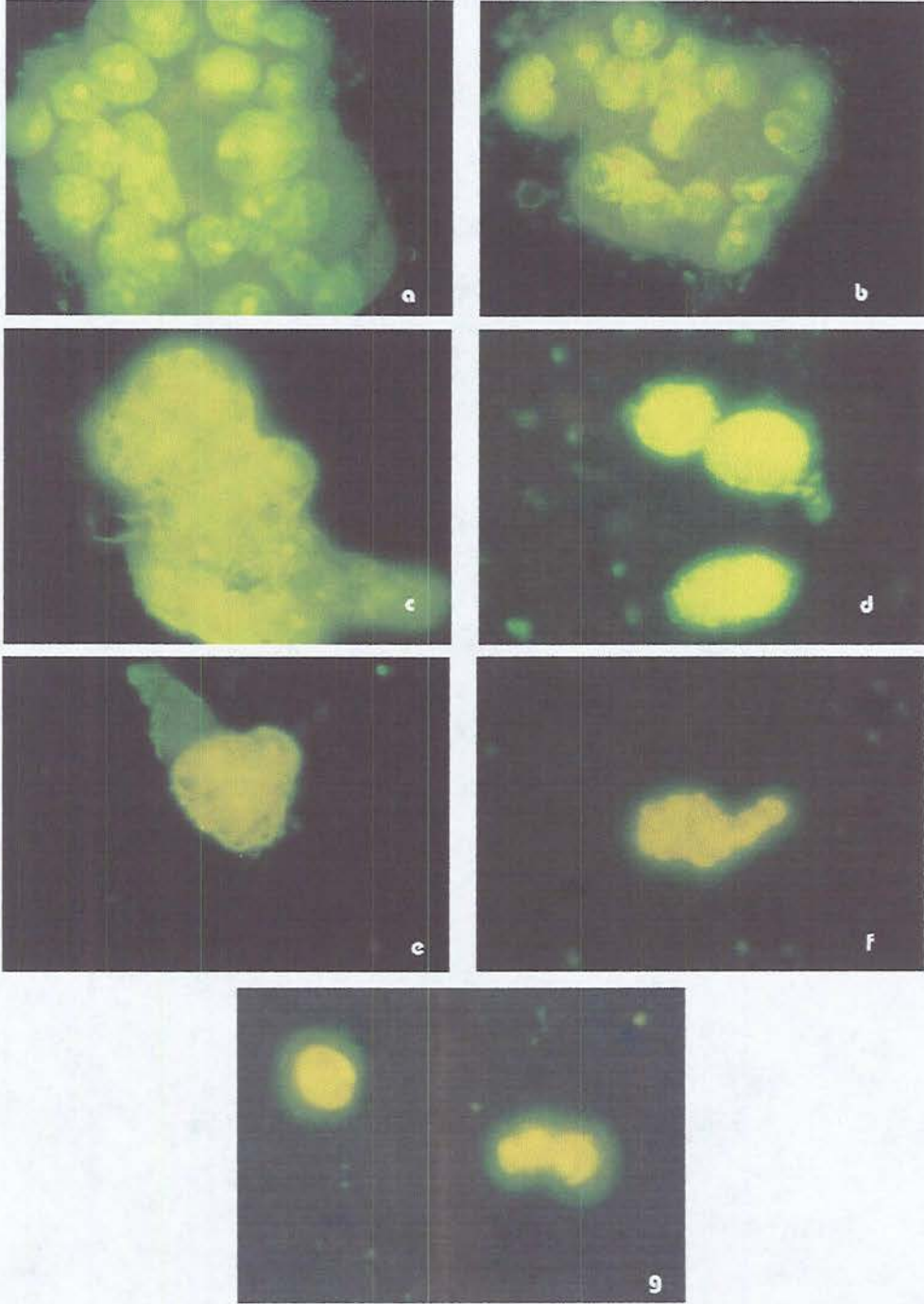
### 7.3.5. Berberinin Akridin Oranj Boyama Sonuçları



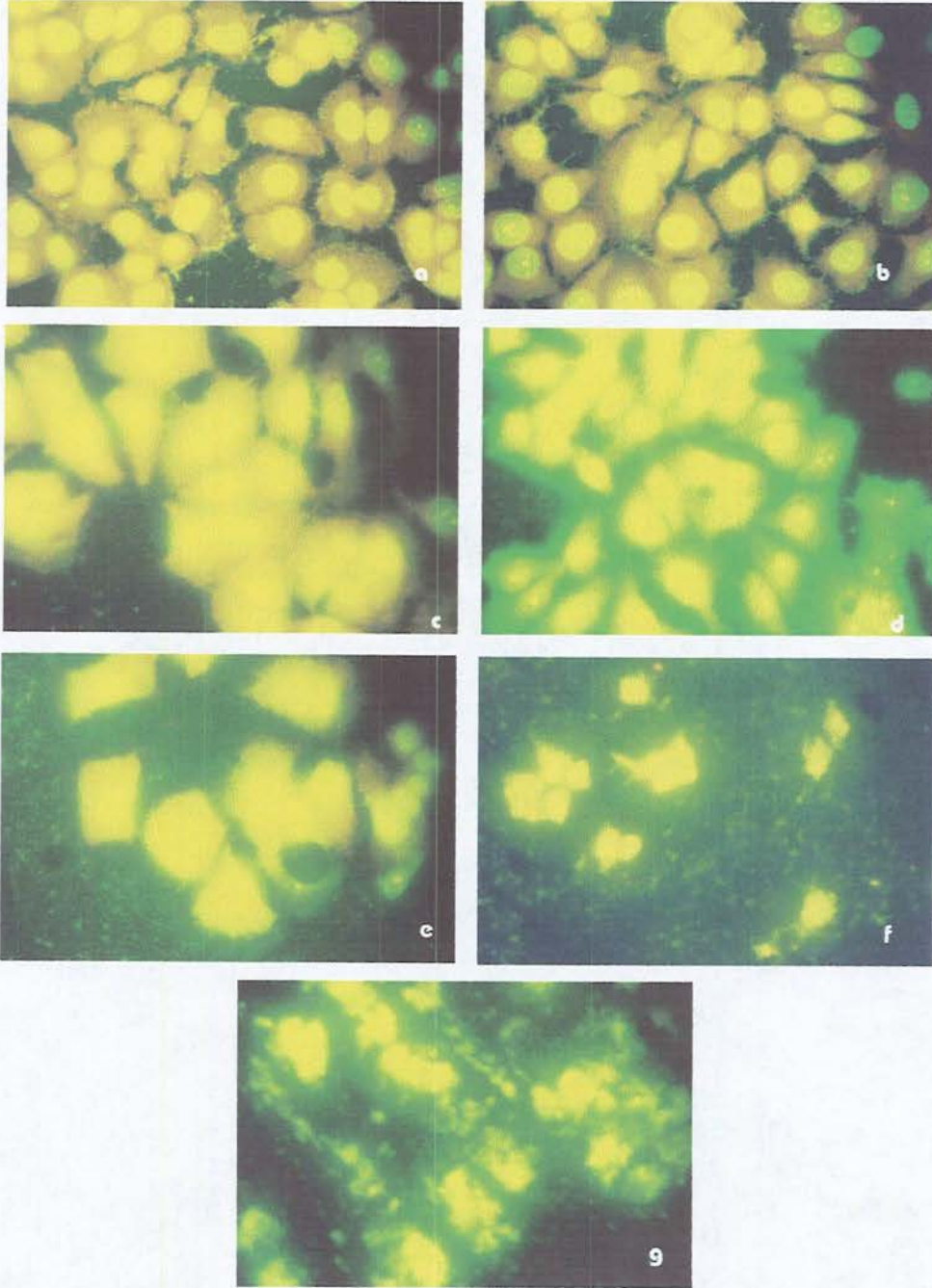
**Şekil 59.** Berberin uygulanan A549 hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.1  $\mu\text{M}$ , d- 1  $\mu\text{M}$ , e- 10  $\mu\text{M}$ , f- 25  $\mu\text{M}$ , g- 50  $\mu\text{M}$  Berberin. (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)



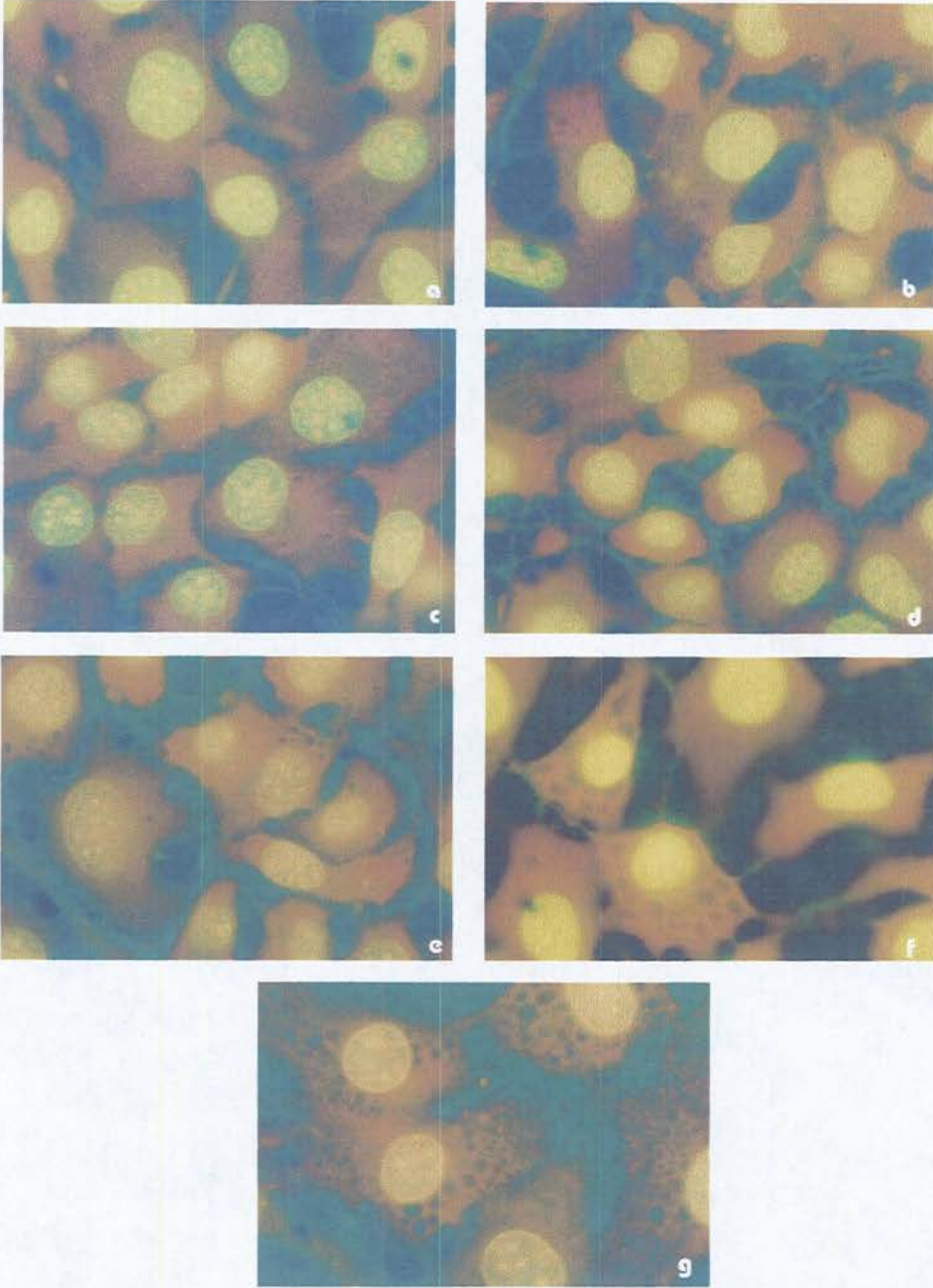
**Şekil 60.** Berberin uygulanan HeLa hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.1  $\mu\text{M}$ , d- 1  $\mu\text{M}$ , e- 10  $\mu\text{M}$ , f- 25  $\mu\text{M}$ , g- 50  $\mu\text{M}$  Berberin. (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)



**Şekil 61.** Berberin uygulanan HT-29 hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.1  $\mu$ M, d- 1  $\mu$ M, e- 10  $\mu$ M, f- 25  $\mu$ M, g- 50  $\mu$ M Berberin. (1cm = 62.5  $\mu$ m, büyütme 1600X)



**Şekil 62.** Berberin uygulanan MCF-7 hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.1  $\mu\text{M}$ , d- 1  $\mu\text{M}$ , e- 10  $\mu\text{M}$ , f- 25  $\mu\text{M}$ , g- 50  $\mu\text{M}$  Berberin. (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)



**Şekil 63.** Berberin uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. Kırmızı- RNA, Sarı-yeşil-DNA. a- Kontrol, b- DMSO, c- 0.1  $\mu\text{M}$ , d- 1  $\mu\text{M}$ , e- 10  $\mu\text{M}$ , f- 25  $\mu\text{M}$ , g- 50  $\mu\text{M}$  Berberin. (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

## 8. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

### 8.1. Paklitaksel Sonuçları

#### 8.1.1. Paklitakselin MTT Sonuçları

Paklitaksel uygulanan hücrelerle yapılan MTT testi sonucunda A549 hücrelerinde maksimum yanıtın üçüncü gün elde edildiği 100 nM dozda paklitaksel uygulanması ile hücre yüzdelerinin %  $37,6183 \pm 0.6096$ 'ya düştüğü ve dördüncü gün ilacın etkisinin azaldığı gözlenmektedir. İlacın etkisi doza bağımlı ve 1,10 ve 100 nM dozlar ile elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir (Şekil 1). HeLa hücrelerinde 0.5 ve 1 nM dozların etkilerinin DMSO ile yakın olduğu ve beklenen etkinin gözlenmediği, ancak 5-100 nM dozlarda doza bağımlı bir etkinin elde edildiği ve bu etkinin özellikle ikinci gün başlayıp dördüncü gün de devam eden uzun süreli bir etki olduğu ve 10,50 ve 100 nM dozlarda dördüncü gün alınan cevapların birbirine çok yakın olduğu gözlenmekte ve 100 nM paklitaksel uygulanması ile dördüncü günde maksimum cevap olarak hücre popülasyonunun kontrole göre %  $6,1750 \pm 0.1909$ 'a kadar azaldığı gözlemlendi (Şekil 2). HT-29 hücrelerinde etkinin ilk gün başlayıp dördüncü gün de devam eden zamana ve doza bağımlı bir etki vardır maksimum etki dördüncü günde 100 nM paklitaksel uygulanan hücrelerde %  $37,3666 \pm 1,8535$  olarak ölçüldü (Şekil 3). MCF-7 hücrelerinde ilk gün etki doza bağımlı olarak başlamış, maksimum etkinin üçüncü gün gözlemlendi ve dördüncü gün de devam ettiği ve maksimum etkinin dördüncü gün 100 nM paklitaksel uygulanması ile kontrole göre hücre popülasyonunun %  $29,3817 \pm 1,1860$ 'a kadar azaldığı görüldü, 0.5 nM haricinde diğer dozlarla yakın cevaplar elde edildiği gözlemlendi (Şekil 4). NIH3T3 hücrelerinde de fibroblastik karakter gösteren A549 hücreleri ile benzerlik gösteren ve yine maksimum etkinin üçüncü gün elde edildiği (%  $30,9833 \pm 0.7572$ ) ve dördüncü gün bu etkinin ortadan kalktığı doza bağımlı bir etki elde edilmiştir (Şekil 5).

#### 8.1.2. Paklitakselin NR Sonuçları

Paklitaksel uygulanan A549 hücrelerinde 100 nM haricindeki dozların ikinci gün birbirine yakın bir grafik verdiği, üçüncü günde ise 0.5 ve 1 nM dozlarda lizozomal enzimlerde ikinci güne oranla fakat DMSO'yu aşmayan bir

artış, diğer dozlarda azalma gözlenmiş ve etkinin üçüncü günden itibaren ortadan kalktığı görülmüştür (Şekil 6). Maksimum etki üçüncü günde 100 nM paklitaksel uygulandığında  $44,8916 \pm 2,4696$  olarak bulundu. Paklitaksel uygulanan HeLa hücrelerinde maksimum etkinin ikinci gün görüldüğü ( $21,1783 \pm 1,3343$ ) ve takip eden günlerde etkinin kalktığı gözlemlendi ve doza bağımlı yanıtlar elde edildi (Şekil 7). HT-29 hücrelerinde doza ve zamana bağımlı uzun süreli bir etki elde edilmiş ve etkinin dört gün boyunca devam ettiği görülmüştür. Maksimum etki dördüncü günde 100 nM paklitaksel uygulanan hücrelerde  $17,0483 \pm 0,1419$  olarak ölçüldü (Şekil 8). MCF-7 hücrelerinde özellikle 5-100 nM dozlarda birbirine yakın cevaplar elde edildi ve etkinin dört gün boyunca sürdüğü gözlemlendi (Maksimum cevap 4. gün 100 nM dozda  $26,9683 \pm 0,9683$  (Şekil 9). NIH3T3 hücrelerinde 0.5 ve 1 nM dozlarda paklitaksel uygulanması ile lizozomal enzim miktarında hafif bir artış gözlemlendi. Maksimum etki ( $28,9117 \pm 1,8369$ ) ikinci günde gözlemlendi ve bu süreyi takiben etkinin azaldığı tespit edildi (Şekil 10).

### 8.1.3. Paklitakselin Kristal Viyole Sonuçları

Paklitaksel uygulanan hücrelerle yapılan kristal viyole ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde ikinci gün DNA miktarında birinci güne oranla bir artış olduğu ancak bu etkinin üçüncü gün zıt yönde değiştiği ve üçüncü günden itibaren etkinin azaldığı tespit edilmiştir maksimum etki 100 nM paklitakselde üçüncü gün elde edildi ( $32,5850 \pm 0,5759$ ) (Şekil 11). 10, 50 ve 100 nM dozlarda elde edilen cevaplar ilk üç günde birbirine çok yakın, dördüncü günde alınan cevaplar iseda ise 10 nM ile 1 ve 5 nM dozlarda elde edilen cevaplar birbirine çok yakın görüldü. HeLa hücrelerinde ilk günde doza bağımlı bir azalma, ikinci günde 0.5-1 nM dozlarda DMSO'nun daha altında ancak ilk güne göre DNA miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak grafiğe bakıldığında doza ve zamana bağımlı bir etki gözlenmekle beraber 50 ve 100 nM dozlarda alınan yanıtlar birbirine yakın görülmektedir, elde edilen maksimum cevap ikinci günde DNA miktarını % 100'den  $9,4783 \pm 0,2217$ 'ye düşüren 100 nM paklitaksel ile elde edildi ve bu yanıt bu grupta elde edilen sonuçlar içinde en iyi olanıdır (Şekil 12). HT-29 hücrelerinde MTT ve NR sonuçlarına benzer profilde dört gün boyunca devam eden uzun bir etki gözlemlendiği grafik elde edilmiştir. Yüksek dozlarda elde edilen

etki dördüncü gün birbirine yakın görülmektedir. Maksimum yanıt dördüncü gün 100 nM paklitaksel uygulaması ile  $\% 21,1633 \pm 0,2843$ 'tür. (Şekil 13). MCF-7 hücrelerinde de DNA miktarı açısından dört gün boyunca devam eden uzun süreli bir yanıt elde edilmiştir ve hücre yüzdeleri bu süre sonunda 100 nM paklitaksel uygulaması ile  $\% 27,4133 \pm 0,93,37$ ' ye kadar düşmüştür (Şekil 14). Benzer şekilde NIH3T3 hücrelerinde de doza bağımlı ve dört gün boyunca devam eden sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 15). Maksimum cevap 100 nM paklitaksel uygulanması ile dördüncü günde  $\% 52,2967 \pm 0,5210$  olarak bulundu.

#### **8.1.4. Paklitakselin Koloni Formasyon Sonuçları**

Koloni formasyon ölçümlerinden elde edilen grafiklerde A549, HeLa, HT-29 ve MCF-7 hücrelerinde koloni sayılarında doza bağımlı bir azalma olduğu görülmüştür. Dört hücre tipi birbirleri ile karşılaştırıldığında MCF-7 ve HeLa hücrelerinde daha iyi cevaplar alındığı gözlemlendi (Şekil 16).

#### **8.1.5. Paklitakselin Akridin Oranj Sonuçları**

Akridin oranj ile floresan boyama sonucunda elde edilen görüntülerden, A549 hücrelerinde, ilk dozdan itibaren hücre şekillerinin bozulduğu, kontrol ve DMSO uygulanan gruplarda gözlenen RNA görüntülerinin ve düzgün kenarlı çekirdek yapısının kaybolduğu, 0,5 ve 1 nM dozlarda çekirdeğin parçalı bir hal aldığı ve kontrolde hücre membranına yakın görülen RNA'ların hücre içinde dağılık görüldükleri, 5 nM ve üzeri dozlarda hücrelerde RNA sentezinin durduğu ve hücrelerin karakterlerinin bozulduğu görüldü (Şekil 17). HeLa hücrelerinde de yine RNA sentezinin ilk dozdan itibaren azaldığı, hücrelerin giderek küçüldüğü ve ölüme gittiği gözlemlendi (Şekil 18). HT-29 hücrelerinde epiloid yapının bozulduğu, hücrelerin tek başlarına ve giderek sağlıklı bir görüntü gösterdiği ve ölüme gittiği tespit edildi (Şekil 19). MCF-7 hücrelerinde de hücre sayısının giderek azaldığı ve özellikle 10-100 nM dozlarda apoptotik hücre görüntüsü kazandığı saptanmıştır (Şekil 20). NIH3T3 hücrelerinde de ilk dozdan başlayarak RNA sentezinin durduğu, 1 nM'dan itibaren çekirdeğin parçalanmaya başladığı ve mikronükleusların arttığı, 50 ve 100 nM dozlarda paklitaksel uygulanan hücrelerin bol vakuollü ve karakterizasyonlarını yitirmiş oldukları gözlemlendi (Şekil 21).

## 8.2.Kersetin Sonuçları

### 8.2.1. Kersetinin MTT Sonuçları

Kersetin uygulanan hücrelerle yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde ikinci günde proliferasyonda ikinci günde birinci güne oranla hafif bir artış, maksimum sonucun ( $\% 51,0683 \pm 2,5353$ ) üçüncü gün elde edildiği ve üçüncü günden itibaren sitotoksik etkinin azaldığı ve tüm günlerde doza bağımlı bir etki görülmektedir (Şekil 22). HeLa hücrelerinde ilk gün hücrelerdeki metabolizmanın tüm dozlarda arttığı, ikinci günden itibaren 1 ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarda etkinin azaldığı, diğer dozlarda ise sabit devam ettiği ve dördüncü gün de devam ettiği gözlenmiştir. 250  $\mu\text{M}$  kersetin uygulanması ile maksimum etki dördüncü günde hücre metabolizmasına bağlı olarak ölçülen proliferasyon  $\% 27,0267 \pm 0,1934$  olarak bulundu (Şekil 23). HT-29 hücrelerinde ikinci günde 1-50  $\mu\text{M}$  dozlarda DMSO'ya göre hafif bir artış olduğu ancak daha yüksek dozlarda sitotoksik etki olduğu, üçüncü gün tüm dozlarda antiproliferatif etki gözlemlendiği ve 10  $\mu\text{M}$ 'ın üzerinde olan dozlarda dördüncü gün etkinin azalarak devam ettiği ve maksimum yanıtın ( $\%12,9717 \pm 0,1061$ ) dördüncü gün elde edildiği saptandı (Şekil 24). MCF-7 hücrelerinde ilk günden başlayarak dördüncü gün de devam eden uzun süreli doza ve zamana bağımlı bir etki gözlemlendi. Elde edilen maksimum yanıt, dördüncü günde proliferasyonu  $\%24,0067 \pm 0,3359$ 'a düşüren 250  $\mu\text{M}$  dozda gözlemlendi (Şekil 25). Kersetinin NIH3T3 hücrelerine uygulanması ile ilk gün elde edilen sonuçların dört gün boyunca doza bağımlı olarak devam ettiği, ikinci günden itibaren etkinin hafifçe azalmaya başladığı saptanmıştır. Maksimum yanıt olarak 250  $\mu\text{M}$  kersetin hücre  $\%$ 'sini  $\% 43,6017 \pm 0,4589$ 'a düşürmüştür (Şekil 26).

### 8.2.2. Kersetinin NR Sonuçları

Kersetinin NR testi uygulanması ile elde edilen sonuçlarında, A549 hücrelerinde ikinci gün 1  $\mu\text{M}$ , üçüncü gün 10 $\mu\text{M}$  dozlarda lizozomal enzim miktarının DMSO'ya ve kontrole göre arttığı, diğer dozların ise ikinci günden itibaren azaldığı görülmüştür. Maksimum inhibitör yanıt üçüncü günde  $\% 58,55 \pm 1,1916$  olarak elde edilmiş dördüncü gün bu etkinin azaldığı, daha düşük dozlarda ise ikinci yada üçüncü günde başlayıp dördüncü gün de devam eden daha geç bir

inhibitör yanıt alındığı gözlenmiştir (Şekil 27). HeLa hücrelerinde de lizozomal enzim miktarında ilk gün 1-50  $\mu\text{M}$  dozlarda arttığı, ikinci gün azaldığı ve üçüncü gün tekrar artarak dördüncü gün iyice azaldığı gözlenmiştir. 100 ve 250  $\mu\text{M}$  kersetin uygulanan hücrelerde lizozomal enzim miktarı ikinci gün en etkin görünmekte (maksimum yanıt ikinci gün %  $20,525 \pm 0,3196$ ) ve bu günden itibaren etki azalmaktadır (Şekil 28). HT-29 hücrelerinde etki sadece 100 ve 250  $\mu\text{M}$  dozlarda ilk günden dördüncü güne kadar süren uzun etki şeklinde görülmüştür. Maksimum yanıt dördüncü günde 250  $\mu\text{M}$  dozda %  $27,8783 \pm 1,5476$  olarak bulundu (Şekil 29). MCF-7 hücrelerinde doza ve zamana bağımlı ve kersetinin bu test için verdiği yanıtlar içinde maksimum sonuçlar alınmıştır. 250  $\mu\text{M}$  kersetin uygulanması ile lizozomal enzim miktarları dördüncü gün sonunda %  $15,5383 \pm 0,3163$  kadar azaldı (Şekil 30). NIH3T3 hücrelerinde en yüksek dozun ilk gün verdiği toksisite haricinde fazla bir toksisite gözlenmedi, 1  $\mu\text{M}$  kersetin uygulanması ile dördüncü günde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamsız çıkmıştır (Şekil 31).

### 8.2.3. Kersetinin Kristal Viyole Sonuçları

Kersetin uygulanmış hücrelerde yapılan kristal viyole testi sonucunda, A549 hücrelerinde, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarda DNA miktarı artmış, ancak üçüncü ve dördüncü gün DNA miktarlarında tüm dozlarda azalma gözlenmiştir. Dördüncü gün sonunda DNA miktarı üzerinden gösterilen canlılık açısından maksimum cevap olarak %  $49,645 \pm 0,3646$  alınmıştır (Şekil 32). HeLa hücrelerinde sadece 100 ve 250  $\mu\text{M}$  dozlarda DNA'nın önemli miktarda azaldığı saptanmıştır. 100 ve 250  $\mu\text{M}$  dozlarda ikinci gün ilk güne oranla DNA miktarı artmış, üçüncü gün tekrar azalmıştır ve bu dördüncü gün de devam etmektedir. Dördüncü gün maksimum cevap olarak elde edilen değer %  $21,27 \pm 0,6159$ 'dur (Şekil 33). HT-29 hücrelerinde 250  $\mu\text{M}$  dozda dramatik bir azalma gözlenirken diğer dozlarda günlere göre artış ve azalmalar gözlenmiştir (Şekil 34). MCF-7 hücrelerinde tüm dozlarda DNA miktarında azalma meydana geldi. Elde edilen maksimum değer dördüncü gün %  $11,5933 \pm 0,2968$ 'dur (Şekil 35). NIH3T3 fibroblastlarında 1-10  $\mu\text{M}$  dozlarda kersetin uygulanan hücrelerde DNA miktarı kontrole ve DMSO uygulanan gruba göre arttı, 50  $\mu\text{M}$  dozda DMSO ile yakın, 100-250  $\mu\text{M}$  dozlarda

ise azaldı . DNA miktarı olarak elde edilen en düşük değer, dolayısı ile maksimum etki üçüncü gün %  $60,1133 \pm 1,1442$  olarak bulundu (Şekil 36).

#### **8.2.4. Kersetinin Koloni Formasyon Sonuçları**

Kersetin uygulanan hücrelerde koloni formasyonu sonucunda kullanılan tüm kanser hücrelerinde koloni sayısında azalma meydana gelmiş, özellikle HeLa ve MCF-7 hücrelerinde bu etkinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 37).

#### **8.2.5. Kersetinin Akridin Oranj Boyama Sonuçları**

Akridin oranj ile floresan boyama sonucunda kersetin uygulanan A549 hücrelerinde 1-10  $\mu\text{M}$  dozlarda hücre çekirdeklerinin kenarlarının düzgünlüğünü kaybettiği görülmektedir, 50  $\mu\text{M}$  ve üstü dozlarda çekirdeğin kenarlarının bozulduğu ve hücrenin şeklini kaybettiği ve mikronükleus oluştuğu gözlemlendi (Şekil 38). HeLa hücrelerinde daha ilk dozdan itibaren çekirdeklerin parçalandığı, 1 ve 10 mM dozlarda hücrelerin hacminin azaldığı gözlemlendi, daha yüksek dozlarda ise hücrelerin özelliklerini tamamen yitirdiği gözlemlendi (Şekil 39). HT-29 hücrelerinde hücrelerin normal şekillerini kaybettiği, çekirdeğin merkezden hücre membranına yaklaştığı gözlenmekte ve tüm dozlarda sitotoksitenin olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 40). MCF-7 hücrelerinde artan dozla beraber hücrelerin giderek şekillerini kaybettikleri, 50  $\mu\text{M}$  dozda mikronükleuslar oluştuğu, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  dozlarda hücrelerin parçalandığı görüldü (Şekil 41). NIH3T3 fibroblastlarında 10  $\mu\text{M}$  dozda hücrelerin vakuollü ve mikronükleuslu, 50  $\mu\text{M}$  dozda mikronükleus ile beraber hücrenin fibroblastik özelliklerini yitirdiği ve şekillerinin bozulduğu ve uzantılarının azaldığı, 100  $\mu\text{M}$  dozda hücrelerde mikronükleusların arttığı dikkati çekmektedir. 250  $\mu\text{M}$  dozda hücrelerin sitoplazmalarının daha flu ve hücre sınırlarının belirsiz olduğu görüldü (Şekil 42).

### **8.3. Berberin Sonuçları**

#### **8.3.1. Berberinin MTT Sonuçları**

Berberin uygulanan hücrelerin MTT ölçümleri sonucunda, A549 hücrelerinde ilk günden itibaren dördüncü gün de devam eden antiproliferatif bir etki gözlemlenmiştir. Dördüncü günde 50 mM berberin uygulanması ile hücrelerde

maksimum etki olarak  $\% 42,2067 \pm 0,7267$  değerine ulaşılmıştır (Şekil 43). HeLa hücrelerinin metabolizmasında özellikle ikinci gün doza bağımlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Doza bağımlı olduğu gözlenen etkinin diğer hücrelerde elde edilen etkiden daha düşük olduğu ve ikinci günden itibaren cevapların aynı paralelde dördüncü gün de devam ettiği görülmektedir. Maksimum etki olarak ikinci gün  $\% 61,7117 \pm 1,9393$  değerine ulaşıldı (Şekil 44). HT-29 hücrelerinin metabolizmasında berberin tüm dozlarda azalma ve özellikle 25-50  $\mu\text{M}$  dozlarda dramatik bir azalma gözlenmiştir. HT-29 hücrelerinde üçüncü gün hücre metabolizması üzerinden elde edilen proliferasyon değerlerinde berberinin antiproliferatif olarak etki gösterdiği ve ikinci gün maksimum etki olarak hücre proliferasyonunun  $\% 7,8383 \pm 0,08076$ 'ya düştüğü görüldü (Şekil 45). MCF-7 hücrelerinde berberinin etkisi doza bağımlıdır ve 10-50  $\mu\text{M}$  dozda berberin uygulanan hücrelerde etki üçüncü gün dramatik bir şekilde azalmış, 50  $\mu\text{M}$  dozda dördüncü günde devam eden, 0,1 ve 1  $\mu\text{M}$  dozlarda azalan bir etki izlenmiştir (Şekil 46). NIH3T3 hücrelerinde ilk gün bir toksisite gözlenmiş, diğer günlerde bu toksisitenin azaldığı ve üçüncü gün düşük dozlarda metabolizmanın arttığı gözlenmiştir (Şekil 47).

### 8.3.2. Berberinin NR Sonuçları

Berberin uygulanan hücrelerde NR ölçümleri sonucunda, A549 hücrelerinde doza bağımlı bir azalma gözlenmektedir. Ancak bu azalma üçüncü gün ancak  $\%70,3467 \pm 1,6897$ 'ye kadar azalma göstermiştir (Şekil 48). HeLa hücrelerinde lizozomal enzimlerde ilk gün doza bağımlı  $\%80$  artış gözlenirken, ikinci günde 25-50  $\mu\text{M}$  dozlarda  $\%62$ 'ye kadar azalma gözlenmiş, daha düşük dozlarda ise DMSO'ya aykırı değerler elde edilmiştir (Şekil 49). HT-29 hücrelerinde tüm dozlarda berberin, lizozomal enzimlerde doza bağımlı, 0,1 ve 1  $\mu\text{M}$  dozlarda düşük etki, 10-50  $\mu\text{M}$  dozlarda oldukça anlamlı bir azalma sergilemiştir. Maksimum etki dördüncü günün sonunda  $\% 16,6217 \pm 0,7134$  olarak bulunmuştur (Şekil 50). MCF-7 hücrelerinde 0,1 ve 1  $\mu\text{M}$  dozlarda lizozomal enzimler üzerine berberinin etkisi değişkenlik gösterdi; üçüncü gün lizozomal enzim miktarlarında azalma gözlenirken dördüncü gün lizozomal enzim miktarlarında artışa sebep oldu. Berberinin özellikle 10-50  $\mu\text{M}$  dozları lizozomal

enzim miktarını doza ve zamana bağılı olarak azaltmıştır. Elde edilen maksimum yanıt üçüncü gün en yüksek doz ile %  $17,86 \pm 0,1149$  olarak bulunmuştur (Şekil 51). NIH3T3 hücrelerinde ise tüm dozlarda lizozomal enzimlerde ilk gün hafif bir azalma, ikinci günden itibaren artarak devam eden, DMSO uygulanan grubu geçen ve anlamlı bir artış göstermiştir. Dördüncü gün alınan maksimum cevap ara doz olan 10  $\mu\text{M}$  ile %  $122,1317 \pm 3,4515$ 'tir (Şekil 52).

### 8.3.3. Berberinin Kristal Viyole Sonuçları

Berberin uygulanan hücrelerin Kristal viyole ile değerlendirilmeleri sonucunda A549 hücrelerinde doza ve zamana bağımlı ve oldukça anlamlı bir azalma olmuştur. Maksimum etki ikinci gün 50 mM dozda %  $25,6033 \pm 1,3726$  olarak tespit edildi. İkinci günden itibaren berberinin etkisinin azaldığı görüldü (Şekil 53). HeLa hücrelerinde sadece 50  $\mu\text{M}$  dozda belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 54). HT-29 hücrelerinde tüm dozlarda ilk gün hafif bir azalma, ikinci gün artış, üçüncü günden itibaren oldukça anlamlı ve doza bağımlı bir inhibitör etki izlenmiştir. Maksimum yanıt hücrelerdeki DNA miktarını %  $31,6967 \pm 2,1042$ ' ye getiren 50  $\mu\text{M}$  berberin uygulanması ile alındı (Şekil 55). MCF-7 hücrelerinde tüm dozlarda doza bağımlı ve dört gün boyunca devam eden toksisite gözlenmiştir. 50  $\mu\text{M}$  dozda uygulanan berberin ile maksimum yanıt olarak dördüncü gün %  $20,4933 \pm 0,5217$  alındı (Şekil 56). NIH3T3 hücrelerinde DNA miktarı üçüncü güne kadar DMSO uygulanan gruba göre bir artış göstermiş, dördüncü gün etkinin azaldığı gözlenmiştir. Üçüncü gün elde edilen değerlerin tümü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve elde edilen maksimum değer 50  $\mu\text{M}$  berberin uygulanan grupta %  $131,9183 \pm 1,7036$ 'dır (Şekil 57).

### 8.3.4. Berberinin Koloni Formasyon Sonuçları

Berberin uygulanan hücrelerin koloni formasyonlarında berberinin koloni oluşumunu engellediği görüldü. A549 hücrelerinde doza bağımlı, HeLa hücrelerinde 1  $\mu\text{M}$  dozdan itibaren %50'nin altında değerler, HT-29 hücrelerinde özellikle 25 ve 50  $\mu\text{M}$  dozlarda oldukça düşük koloni sayısı olduğu, MCF-7 hücrelerinde ise doza bağımlı etki olduğu görüldü (Şekil 58).

### 8.3.5. Berberinin Akridin Oranj Sonuçları

Berberin uygulanan hücrelerin akridin oranj ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntülerden, A549 hücrelerinde ilk dozdan itibaren RNA sentesinin durduğu, 0.1  $\mu\text{M}$  dozda uygulanan berberinde mikronükleuslerin gözlendiği, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarda hücre çekirdeklerinin parçalı hal aldığı, 25 ve 50  $\mu\text{M}$  dozlarda ise hücrelerin ölüme gittiği tespit edilmiştir (Şekil 59). HeLa hücrelerinde ilk dozdan itibaren apoptotik olduğu düşünülen (küçülmüş, kenarları kabarcıklı (blebbing)) hücre görüntülerine rastlandı. Tüm dozlarda mikronükleus, vakuollenme, DNA fragmentasyonu, parçalı çekirdek görüntüleri tespit edildi (Şekil 60). HT-29 hücrelerinde daha ikinci dozda hücrelerin canlılıklarını yitirdiği gözlendi (Şekil 61). MCF-7 hücrelerinde de ilk dozdan itibaren RNA sentezinin azaldığı, üçüncü dozda hücrelerin kötüleştiği ve yüksek dozlarda hücrelerin tamamen parçalandığı görüldü (Şekil 62). Berberinin NIH3T3 fibroblastları üzerine toksik etkilerine 10  $\mu\text{M}$  dozdan itibaren başladığı ve yüksek dozda hücrelerin vakuollü hal aldıkları gözlenmektedir (Şekil 63).

## 9. TARTIŞMA

### 9.1. Paklitaksel

Çalışmalarımızda standart olarak kullandığımız paklitakselin test ettiğimiz hücreler ile değişik dozlarda yapılmış çalışmaları vardır. A549 hücrelerinde uyguladığımız testlerde elde edilen verilerde paklitakselin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerine olan etkisinde 50 nM dozun üzerindeki dozlarda yakın cevapların alındığını gözlemledik. Elde ettiğimiz bu sonuçlar daha önce de yapılan bir çalışmada izlendiği ve yüksek doz yerine düşük dozda paklitakselin yinelenen dozlarla verilmesinin daha yararlı olacağını savunduklarını tespit ettik , aynı çalışmada bu etkinin apoptotik etki olduğu da savunulmaktadır (Das ve ark., 2001). A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde paklitakselin 0.5-10 nM dozları sitotoksik etki için yeterli görüldü ve bu dozlarda NIH3T3 fibroblastlar üzerine de sitotoksik etkileri az olacağından daha spesifik bir terapi olanağı sağlayacaktır. Lizozomal enzimler özellikle katepsinler ve nükleazlar gibi hidrolitik lizozomal enzimlerin apoptozda önemli rol oynadıkları bilinmektedir, paklitakselin de apoptotik etkileri olduğu bilinmektedir, A549 hücrelerinde lizozomal enzim miktarlarının artması apoptosis ile ilişkilendirilebilir (Akay, 1996; Brunk, 1998). A549 hücrelerinde paklitakselin kristal viyole sonuçlarında 2. günde DNA miktarında gözlenen artış kromatin miktarında meydana gelen bir artışa bağlı olabilir ve bu bir çalışmada paklitakselin apoptotik etkisinden kaynaklanan bir etki şeklinde yorumlanabilir (Pucci ve ark.1999). Ayrıca akridin oranj ile boyama sonuçlarından elde ettiğimiz görüntülerde tüm hücrelerde nükleusların parçalanması ile başlayan apoptotik hücre görüntülerine rastlanmıştır.

Paklitakselin HeLa serviks adenokarsinomu hücrelerinde tüm dozlarda doza ve zamana bağlı bir toksisite göstermiştir. HeLa hücrelerinde paklitakseli genotoksik ve mikrotübüller üzerine stabilizan etkileri farklı deneylerle daha önce gösterilmiştir. Ancak dozlar farklı ve süre kısa tutulmuş ve takip dört gün sürdürülmemiştir (Preisler ve Ark, 2001, Abal ve Ark. 1999). Bizim de çalışmalarımızda bulduğumuz bulgular bu çalışmalar tarafından desteklenmektedir, ancak bulgularımızda paklitakselin HeLa hücrelerinde daha geniş bir doz aralığında etkili olduğunu ve bu hücreler için paklitakselin terapötik

penceresinin daha geniş olduğunu söyleyebiliriz. HeLa hücrelerinde de A549 hücrelerinde olduğu gibi lizozomal enzim artışları gözlenmektedir, bu da yine apoptoz belirtisi olarak yorumlanabilir, ancak enzimlerin tiplerini belirlemeye yönelik spesifik testler uygulanması gerekmektedir. Özellikle 5-50 nM dozlarda MTT, CV ve koloni formasyon testleri ile sitotoksik etkiler elde edilmiştir, bu dozlar ile elde edilen etkiler AO ile çekilen fotoğraflarda da gözlenmektedir (Şekil 18). HeLa hücreleri üzerine paklitakselin etkisi daha önce over kanserleri üzerine yapılan bir çalışma ile desteklenmektedir ve yapılmış olan bu çalışmada paklitaksel kombinasyonları önerilmektedir (Runowicz ve ark., 1993). HeLa hücreleri ve MCF-7 hücreleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda paklitakselin apoptotik etkileri, DNA fragmentasyonu, genotoksisitesi, tübülün polimerizasyonu gibi parametrelere bakılmış ve bunlardan paklitakselin etki mekanizmasına ait veriler elde edilmiştir. (Olah ve ark., 1996; Razandi ve ark., 2000; Huang ve ark., 1997; Charles ve ark. 2001; Nicholson ve ark., 1997; Saunders ve ark., 1997; Cocconi ve ark., 2000).

Paklitaksel HT-29 hücrelerinde dört gün boyunca süren bir etki göstermiştir, ayrıca Paklitakselin HT-29 hücreleri üzerine gözlediğimiz sitotoksik etkilerinin daha önce kanseröz kolon hücreleri ile elde edilen verilerle paralellik gösterdiğini saptadık (Sheppard ve ark., 1999). Paklitaksel HT-29 kolon adenokarsinomu hücrelerinde 1 ve 5 nM dozlarda dördüncü gün de devam eden bir sitotoksisite gösterdi. 10-100 nM dozlarda paklitakselin DNA üzerine gösterdiği etkilerin çok yakın olduğu görüldü. 1-10 nM dozlarda paklitakselin NIH3T3 hücreleri üzerine olan etkisinin HT-29 hücreleri üzerine olan etkilerinden çok daha düşük olduğundan hareketle paklitakselin kolon kanserlerine karşı da kombinasyonlar içinde düşük dozlarda kullanımının terapötik açıdan elverişli olacağı söylenebilir. Daha önce paklitaksel ile yapılan bir başka çalışmada da paklitakselin kolon kanserinde düşük dozlarda ve uzun süreli olarak kullanılabileceği savunulmuştur (Taylor ve Ark., 1999).

Paklitakselin MCF-7 meme adenokarsinomu hücreleri üzerine uygulanması ile de yine düşük dozlarda etki olduğu ve doz arttırılsa da daha yüksek bir terapötik etki alınamayacağı gözlemlendi. Saunders ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da paklitakselin MCF-7 hücreleri üzerine

apoptotik etkilerini düşük dozlarda gösterdiği rapor edilmiştir ( Saunders ve Ark. 1997). Bizim de çalışmalarımızda elde ettiğimiz bulgular bunu desteklemektedir ve düşük doz paklitaksel uygulanmasına oranla yüksek doz paklitaksel uygulanan hücrelerde doza bağımlı olarak daha iyi cevaplar alınmadığı, bu sebeple daha az toksisitenin gözleneceği düşük dozun yinelenerek verilmesi önerilebilir.

Paklitaksel kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdiği 1-10nM dozlarında akridin oranj ile boyama sonucunda çekilen fotoğraflarda NIH3T3 hücrelerinde diğer hücrelerde görülene oranla daha az sitotoksikite gözlenmektedir (Şekil 21). Paklitakselin etki süresi NIH 3T3 hücrelerinde de diğer hücrelerle benzerlik göstererek dört gün boyunca süren bir etki olmasına rağmen kullandığımız tüm kanser tiplerinden daha düşük bulunduğundan bu kanser tiplerinde paklitakselin özellikle 5 ve 10 nM *in vitro* dozları antikanser etki için elverişli bulunmuştur. NIH3T3 hücrelerinde paklitakselin gözlenen sitotoksik etkileri daha önce yapılmış olan bir çalışma ile de desteklenmektedir.

Sonuç olarak paklitaksel sonuçlarımız literatür ile paralellik göstermekle beraber, geniş doz aralığında, aynı koşullarda, birden fazla kanser türünün, dört gün süre ile çok sayıda parametre ile değerlendirildiği göz önüne alındığında farklı bir çalışma olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca elde ettiğimiz veriler kemoterapötik ajanların terapötik pencerelerinin dar olduğu gerçeği ile de bağdaşmaktadır ve tek doz uygulamak yerine yinelenen düşük doz uygulanması ile daha selektif ve başarılı terapiler elde edileceğini savunmaktayız.

## 9.2. Kersetin

Fitoöstrojen olarak bilinen ve yenilebilir sebze ve meyvaların çoğunda bulunan kersetin, A549 hücrelerinde %50 civarında maksimum etkinlik göstermiştir, lizozomal enzimlerde ikinci gün gözlenen artış paklitakselde olduğu şeklinde yorumlanabilir. MTT, NR ve CV sonuçlarından kersetinin A549 hücrelerinde kısa etkili olduğu görülmüştür.

Kersetin uygulanan HeLa hücrelerinde MTT, NR, CV ve koloniformasyon testlerinde belirgin ve doza bağımlı sitotoksik etkiler gözlenmiştir. AO boyaması ile elde edilen görüntülerde HeLa hücrelerinde kersetinin tüm dozlarında sitotoksik etkiler gözlenmektedir (Şekil 39). Özellikle 1-10  $\mu$ M kersetin

uygulanan hücrelerde hücrelerin küçüldüğü, üzeri dozlarda ise hücrelerin şekillerini kaybederek öldükleri gözlenmektedir.

HT-29 hücrelerinde kersetinin etkisi ancak yüksek dozlarda özellikle 250  $\mu$ M dozda gözlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde kersetin ile en iyi cevaplar alınmıştır. Uyguladığımız tüm testlerde kersetin MCF-7 hücrelerinde doza ve zamana bağımlı etkiler göstermiştir, AO boyama sonuçlarında mikronükleus bulgularına rastlanmaktadır ve bu bulgularımız daha önce yapılan çalışmalar ile de desteklenmektedir (da Silva ve ark. 2002).

NIH 3T3 hücrelerinde 50  $\mu$ M dozun üzerindeki dozlarda kersetin AO görüntülerinde hücrelerin uzantılarını kaybettiği ve mikronükleuslar içerdiği görülmektedir (Şekil 42).

Çalışmalarımızda kersetin özellikle HeLa ve MCF-7 kanserleri üzerine etkili bulunmuş ve bu etkisinin östrojene bağımlı çalışmayan hücrelerde etkilerinin az olması sebebi ile östrojene bağımlı olduğu sanılmaktadır. Ancak östrojenik karakterde olan bu maddenin MCF-7 ve HeLa hücrelerinde antiöstrojenik özellikler göstermesi, meme ve rahim kanserlerinde kullanılmasının mümkün olabileceğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada kersetinin de içinde bulunduğu bir grup fitoöstrojenin aromataz inhibitörü olabileceğini ve bu sebeple soya ile beslenmenin önemini vurgulanmaktadır (Krazeisen ve ark., 2001). Elde edilen bu veriler bizim elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Çalışmalarımızda tespit ettiğimiz apoptotik görüntülerin de doğruluğu pankreas kanserleri ile yapılan bir çalışma ile desteklenmektedir (Mouria ve ark., 2002). Yapılan bir çalışmada kersetinin anti östrojenik etkisinin MCF-7 ve HeLa hücrelerinde östrojen reseptörlerin m-RNA'larının down-regülasyonuna bağımlı olarak gösterdikleri saptanmıştır (Maggiolini ve ark., 2001). Bu da kersetinin östrojen pozitif hücrelerde gösterdiği etkileri açıklamakta ve bulgularımızı desteklemektedir.

### 9.3. Berberin

Berberin içeren bitkiler çin tıbbında yüzyıllardır bilinip kullanılmasına rağmen batının ilgisini ancak son yıllarda çekebilmiş ve berberin bilimsel

araştırmalarda yeni yeni yer almaktadır. Yaptığımız bu çalışma berberin ile bugüne kadar yapılan en kapsamlı çalışmadır. Genelde berberin içeren bitkiler araştırılmış ya da berberinin sadece bir tek hücrede az sayıda yöntem ile antikanser etkileri olduğu bildirilmiştir.

Berberinin A549 hücrelerinde sitotoksik etkileri özellikle CV ve AO sonuçlarında doza bağımlı olarak görülmektedir. Ancak bu değerlerin diğer kanser tipleri ile karşılaştırıldığında düşük değerler olduğu, ancak NIH3T3 hücrelerinde gözlenen çok düşük toksisite ile karşılaştırıldığında yine de kk hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde kullanılabilir olduğu söylenebilir, bu bulgular daha önce yapılan çalışmalar ile de desteklenmektedir (Mitani ve Ark., 2001).

Berberin HeLa hücrelerinde uygulanması ile AO boyamada hücrelerin daha ilk dozdan itibaren şekillerini kaybettiği, hücre çekirdeklerinin parçalanmaya başladığı, mikronükleusların varlığı ve vakuoller gözlenmektedir, diğer yöntemler ile elde edilen sonuçlarımız yapılan bir çalışma ile de desteklenmektedir (Orfial ve Ark., 2000).

HT-29 hücrelerinde berberin tüm dozlarda doza bağımlı ve oldukça etkili sitotoksik yanıtlar oluşturmaktadır, bu etkiler uygulanan tüm testlerde görülmektedir. HT-29 hücrelerinde MTT uygulaması ile nc gün %7.8, NR ile %16,62, CV ile %31.7 gibi değerlere dştği ve koloni formasyonu ve AO boyaması ile de doza bağımlı sitotoksik etkiler elde edildiği gözlenmektedir. Elde edilen bu veriler ile berberinin kolon kanserinde kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu, ancak bunu göstermek için çalışmaların *in vivo* testler ile de desteklenmesi gerekmektedir (Colombo ve Ark.).

MCF-7 hücrelerinde berberin HT-29 hücrelerinde gözlenen sitotoksisiyeye eşdeğer yanıtlar oluşturmuştur. Elde edilen verilerde berberinin özellikle nc gün maksimum etkiye ulaştığı ve dördüncü gün etkisini kaybetmeye başladığı görülmektedir, doza bağımlı olması ile de ilaç olma potansiyeli taşıdığını söylemek mümkündür. MCF-7 hücrelerinde berberinin sitotoksitesine dair literatürde bir veri tespit edilememiştir.

NIH3T3 hücreleri üzerine berberin tüm testlerde çok düşük toksisite göstermektedir. Bu bulgular berberinin güvenle kullanılabilir bir ilaç olabileceği hakkında bir basamak teşkil etmektedir.

Elde ettiğimiz verilerde berberinin doza bağımlı etkilerinin özellikle HT-29 ve MCF-7 hücreleri üzerinde yüksek olduğu, bu tip kanserlerin tedavisinde ilaç olarak önerilebileceğini savunmaktayız. Ayrıca NIH3T3 fibroblastları üzerine sitotoksik etkilerinin de yok denecek kadar az olması, bu maddenin değerini arttırmaktadır. HT-29 hücrelerinde gözlediğimiz etki kolon kanserleri ile yapılan bir çalışma ile desteklenmektedir (Fukuda ve ark., 1999). Bu madde ile yapılmış henüz yeterli sayıda makale bulunmadığından elde ettiğimiz veriler önem taşımaktadır.

## 10. KAYNAKLAR:

ABAL, M., SOUTO, A.A., ARNAT-GUERRI, F., ACUÑA, A.U., ANDREU, J.M., BARASCOIN, I.: Centrosome and spindle pole microtubules are main targets of a fluorescent taxoid inducing cell death. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 49 :1-15, 2001.

ADACHI, A., KOENIG, S., GENDELMAN, H.E., DAUGHERTY, D., GATTONI-CELLI, S., FAUCHI, A.S., MARTIN, M.A.: Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 61: 209-213, 1987.

ADAMS J.: Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* 8: S49-S54, 2002.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc., New York, 1994.

ALLEY, M.C., SCUDIERO, D.A., MONKS, A., HURSEY, M.L., CZERWINSKI, M.J., FINE, D.L., ABBOTTU B.J., MAYO, J.G., SHOEMAKER, R.H., BOYD, M. R.: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48: 589-601, 1988.

ANONİM: Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Plant Biology, Laboratory Practical 1-cell culture: <http://www-courses.vbiol.slu.se/bi0020/lablc.htm>, 2000A.

ANONİM: FRAME, <http://www.frame.org.uk/index.htm> veya <http://www.ib.amwaw.edu.pl/home/dslado/prot/3.htm>, 2000b.

ANONİM: AMERICAN TYPE OF CELL CULTURE (ATCC): <http://atcc.org>, 2002.

ANONİM: GIBCO Cell Culture Catalogue. Sayfa:4-10, 1998-1999.

ARENDS, M.J., WYLLIE, A.H.: Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International Reviews in Experimental Pathology* 32:223, 1991.

ASGARY, S., NADERI, GH., SARRAFZADEGAN, N., GHASSEMI, N., BOSHTAM, M., RAFIE, M., AREFIAN, A., Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 73: 223-6, 1999.

ALTINOZ, M., BILIR, A., OZAR, E., ONAR, F.D., SAV, A.: Medroxyprogesterone acetate alone or synergistic with chemotherapy suppresses colony formation and DNA synthesis in C6 glioma in vitro. *International Journal of Developing Neuroscience* 19: 541-7,2001.

AVILA, M.A., CANSADO, J., HARTEK, K.W., VELASCO, J.A., NOTARIO, V.: Quercetin as a modulator of the cellular neoplastic phenotype. Effects on the expression of mutated H-ras and p53 in rodent and human cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 401: 101-110, 1996.

BACUS, S.S., KIGUCHI, K., CHIN, D., KING, C.R., HUBERMAN, E.: Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. *Molecular Carcinogenesis* 3: 350-362, 1990.

BALINT, E., VOUSDEN, K.H.: Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *British Journal of Cancer*. 85: 1813-1823, 2001.

BARILE, F.A.: Continuous cell lines as a model for drug toxicity assessment. S: 32-43, Edt. CASTEL, J.V., GOMEZ-LECHON, M.J, *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research..*, London, Academic Press, 1997.

BARNETT, S.W., BARBOZA, A., WILCOX, C.M., FORSMARK, C.E., LEVY, J.A.: Characterization of human immunodeficiency virus type 1 strains recovered from the bowel of infected individuals. *Virology* 182: 802-809, 1991.

BARRET JM, ERNOULD AP, FERRY G, GENTON A, BOUTIN JA.: Integrated system for the screening of the specificity of protein kinase inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 46:439-448, 1993.

BELLET D, LAZAR V, BIECHE I, PARADIS V, GIOVANGRANDI Y, PATERLINI P, LIDEREAU R, BEDOSSA P, BIDART JM, VIDAUD M.: Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells. *Cancer Research* 57: 516-523, 1997.

BEN-ZE'EV, A.: Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Current opinion in cell biology* 9:99-108, 1997.

BİLALOĞLU, G.V., HARMANDAR, M.: *Flavonoidler*. Aktif Yayınevi, Erzurum, 1999.

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

BOSHART, M., GISSMANN, L., IKENBERG, H., KLEINHEINZ, A., SCHEURLLEN, W., ZUR HAUSEN, H.: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3: 1151-1157, 1984.

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

BRANDES LJ, HERMONAT MW.: Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Research* 43: 2831-2835, 1983.

BROWN, R., STRATHDEE, G.: Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trens in Molecular Medicine* 8: S43-S47, 2002.

BRUNK, U.T.: Lysosomal involvement in apoptosis. *Pathophysiology* 5(Suppl 1): 79, 1998.

BUTZOW, R., FUKUSHIMA, D., TWARDZIK, D.R., RUOSLATHI, E.: A 60-kD protein mediates the binding of transforming growth factor-beta to cell surface and extracellular matrix proteoglycans. *Journal of Cell Biology* 122: 721-727, 1993.

CABRAL, F.R. Isolation of Chinese hamster ovary cell mutants requiring the continuous presence of taxol for cell division. *Journal of Cell Biology* 97:22-29,1983.

CAMERON, E.E., : Synergy of demethylation and histon deacetylase inhibition in the re-expression genes silenced in cancer. *National Genetic* 21: 103-107, 1999.

CARMICHAEL, J., DEGRAFF, W., GAZDAR., MINNA, J.D., MITCHELL, J.B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47: 936-942, 1987.

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

CHANG, K., PASTAN, I.: Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proceeding of the Naional Academy of Sciences USA* 93: 136-140, 1996.

CHARLES, A.G., HAN, T.Y., LIU, Y.Y., HANSEN, N., GIULIANO, A.E., CABOT, M.C.: Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47:444-50, 2001.

CHEN, T.R., DRABKOWSKI, D., HAY, R.J., MACY, M., PETERSON, W. JR.: WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Cancer Genetic & Cytogenetic*. 27: 125-134, 1987.

CHEN, T.R.: Re-evaluation of HeLa, hela s3, and hep-2 karyotypes. *Cytogenetic and Cell Genetic* 48: 19-24, 1988.

CHUNG, D.: Histone modification: the "next wave" in cancer therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* 8: S10-S11, 2002.

COCCONI, G., MAMBRINI, A., QUARTA, M., VASINI, G., BELLA, M. A., FERROZZI, F., BERETTA, M. D., Vinorelbine combined with paclitaxel infused over 96 hours (v1-ta-96) for patients with metastatic breast carcinoma. *Cancer* 88: 2731-2738, 2000.

COLOMBO, M.L., BUGATTI, C., MOSSA, A., PESCALLI, N., PIAZZONI, L., PEZZONI, G., MENTA, E., SPINELLI, S., JOHNSON, F., GUPTA, R.C., DASARADHI, L.: Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. *Farmaco*. 56: 403-9. 2001.

COS, S., SANCHEZ-BARCELO, E.J.: Differences between pulsatile or continuous exposure to melatonin on MCF-7 human breast cancer cell proliferation. *Cancer Letters* 85: 105-109, 1994.

CRESTEIL, T., MONSARRAT, B., ALVINERIC, P., TRELUYER, J.M., VIEIRA, I., AND WRIGHT, M.: Taxol metabolism by human liver microsomes: identification of cytochrome P540 isoenzymes involved in its biotransformation. *Cancer Research* 54:386-392, 1994.

CURTIS, J.E., MINKIN, S., MINDEN, M.D., MCCULLOCH, E.A.: A role for paclitaxel in the combinatin chemotherapy af acute myeloblastic leukaemia: preclinal cell culture studies, *British Journal of Haematology*, 95, 354-363, 1996.

DAS, G.C., HOLIDAY, D., GALLARDO, R., HAAS, C.: Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Letters* 165: 147-153, 2001.

DA SILVA, J., HERRMANN, S.M., HEUSER, V., PERES, W., POSSA MARRONI, N., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., ERDTMANN, B.: Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology* 40: 941-947 2002.

DE BONO, J.S., ROWINSKY, E.K.: The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends in Molecular Medicine* 8: 19-26, 2002.

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

DEVEDJIAN, J.C., FARGUES, M., DENIS-POUXVIEL, C., DAVIAUD, D., PRATS, H., PARIS, H.: Regulation of the alpha 2A-adrenergic receptor in the HT29 cell line. Effects of insulin and growth factors. *Journal of Biological Chemistry* 266: 14359-14366, 1991.

DIDIER, E.S., ROGERS, L.B., ORENSTEIN, J.M., BAKER, M.D., VOSSBRINCK, C.R., VAN GOOL, T., HARTSKEERL, R., SOAVE, R., BEAUDET L.M. : Characterization of Encephalitozoon (Septata) intestinailis isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 43: 34-43, 1996.

DRUKER, B.J.: STI571 (Gleevec<sup>TM</sup>) as a Paradigm for Cancer Therapy. *Trends in Molecular Medicine* 8: ,2002.

DUCOMMUN, P., BOLZONELLA, I., RHIEL, M., PUGEAUD, P., VON STOCKAR, U., MARISON. I.W.: On-line determination of animal cell concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 72: 515-522, 2001.

DUFFY, M.J.: Cancer Metastasis: Biological and Clinical Aspects. *Irish Journal of Medical Science* 167: 4-8, 1998/a.

DUFFY, M.J., MAGURIE, T.M., HILL,, A., MCDERMOTT, E., O'HIGGINS, N.: Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Research* 2: 252-257, 2000.

DUFFY, M.J., MCCARTHY, K.: Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic and targets for therapy (review). *International Journal of Oncology* 12: 1343-1348, 1998/b.

DUVALL, E., WYLLIE, A.H.: Death and the cell. *Immunology Today* 7:115, 1986.

ERCOLI, A., SCAMBIA, G., FATTOROSSO, A., RASPAGLIO, G., BATTAGLIA, A., CICCHILITTI, L., MALORNI, W., RAINALDI, G., BENEDITTI PANICI, P., MANCUSO, S.: Comparative study on the induction of cytostasis and apoptosis by IC 182,780 and tamoxifen in an estrogen receptor-negative ovarian cancer cell line. *International Journal of Cancer* 76: 47-54 1998.

FANG, X., GIBSON, S., FLOWERS, M., FURUI, T., BAST, R.C. JR, MILLS, G.B.: Lysophosphatidylcholine stimulates activator protein 1 and the c-Jun N-terminal kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* 272: 13683-13689, 1997.

FANTINI, J., YAHY, N., BAGHDIGUIAN, S., CHERMANN, J.C.: Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion. *Journal of Virology* 66: 580-585, 1992.

FENTON R.G., LONGO, D.L.: Cell Biology of cancer. *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 14. Edition, CD-ROM, McGraw-Hill, 1998.

FOGH, J., ed.: Human tumor cells in vitro. S: 115-159, Plenum Press, New York, 1975.

FOGH, J., FOGH, J.M., ORFEO, T.: One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of National Cancer Institute* 59: 221-226, 1977/b.

FOGH, J., WRIGHT, W.C., LOVELESS, J.D.: Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of National. Cancer Institute*. 58: 209-214, 1977/a.

FRANKEL, A., BUCKMAN, R., KERBEL, R.S.: Abrogation of taxol-induced G<sub>2</sub>-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Research* 57:2388-2393, 1997.

FRANKS, L.M.: What is cancer? *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Editör: Franks, L.M., Teich, N.M., sayfa:1-19, Oxford University Press, Oxford, 1998.

FRESHNEY, I.: Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques. John Wiley & Sons Inc. Publication. New York, 1994.

FUKUDA, K., HIBIYA, Y., MUTOH, M., KOSHIJI, M., AKAO, S., FUJIWARA, H.: Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology* 66: 227-33, 1999.

GAO, S., SCOTT, R.E.: P2P-R protein overexpression restricts mitotoc progression at prometaphase and promotes mitotic apoptosis. *Journal of Cell Physiology* 193: 199-207, 2002.

GEIGER T, MULLER M, DEAN NM, FABBRO D.: Antitumor activity of a PKC-alpha antisense oligonucleotide in combination with standard chemotherapeutic agents against various human tumors transplanted into nude mice. *Anti-Cancer Drug Deseign* 13: 35-45, 1998.

GIANNONI, E., CIRRI, P., PAOLI, P., FIASCHI, T., CAMICI, G., MANAO, G., RAUGEI, G., RAMPONI, G.: Acylphosphatase is a strong apoptosis inducer in HeLa cell line. *Molecular and Cell Biology Research Communication* 3: 264-70, 2000.

GILLIES, R.J., DIDIER, N., DENTON, M.: Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry* 159: 109-13, 1986.

GLINSKY, G.V., MOSSINE, V.V., PRICE J.E., BIELENBERG, D., GLINSKY, V.V., ANANTHASWAMY, H.N., FEATHER, M.S., Inhibition of colon formation in agarose of metastatic human breast carcinoma and melanoma cells by synthetic glycoamine analogs, *Clinical and Experimental Metastasis* 14:253-67, 1996.

GRIFFIOEN, A.W., MOLEMA, G.: Angiogenesis: Potential for Pharmacologic intervention in the threatment of cancer, cardiovascular disease, and chronic inflamation. *Pharmacological Reviews* 52: 237-268, 2000.

GROH. V., BAHRAM, S., BAUER, S., HERMAN, A., BEAUCHAMP, M., SPIES, T.: Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12445-12450, 1996.

HANSKI, C., STOLZE, B., RIECKEN, E.O.: Tumorigenicity, mucin production and AM-3 epitope expression in clones selected from the HT-29 colon carcinoma cell line. *International Journal of Cancer* 50: 924-929, 1992.

HARDY, K., STARK, J.: Mathematical models of the balance between apoptosis and proliferation. *Apoptosis* 7: 373-381, 2002.

HART, I.R.: The spread of tumours. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Editör: Franks, L.M., Teich, N.M., sayfa:21-32, Oxford University Press, Oxford, 1998.

HAWKINS, D.S., DEMERS, G.W., GALLOWAY, D.A.: Inactivation of p53 enhances sensitivity

to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Research* 56:892-8, 1996.

HERRERA, R., SEBOLT-LEOPOLD, S.: Unraveling the complexities of the Raf/Map kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends in Molecular Medicine* 8: 27-31, 2002.

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

HONDERMARCK, H., LE BOURHIS, X.: Normal breast epithelial cells induce apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through a p53-mediated pathway. *Molecular Cell Biology Research Communications* 3: 338-344, 2000.

HORAKOVA, K., SOVCIKOVA, A., SEEMANNOVA, Z., SYROVA, D., BUSANYOVA, K., DROBNA, Z., FERENCIK, M.: Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine* 30: 650-64, 2001.

HUANG Y, RAY S, REED JC, IBRADO AM, TANG C, NAWABI A, BHALLA K.: Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 42:73-81, 1997.

HUBER, M., SELINKA, H.C., KANDOLF, R.: Tyrosine phosphorylation events during coxsackievirus B3 replication. *Journal of Virology* 71: 595-600, 1997.

IIZUKA, N., MIYAMOTO, K., OKITA, K., TANGOKU, A, HAYASHI, H., YOSINO, S., ABE, T., MORIOKA, T., HAZAMA, S., OKA, M.: Inhibitory effect of *Coptidis rhizoma* and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines. *Cancer Letters* 148: 19-25, 2000.

JAINCHILL, J.L., AARONSON, S.A., TODARO, G.J.: Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *Journal of Virology* 4: 549-553, 1969.

JAKUBOWICZ-GİL, J., PADUCH, R., GAWRON, A., KANDEFER-SZERSZEN, M.: The effect of heat shock, cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp27 expression in human normal and tumour cells. *Folia Histochemica at Cytobiologica* 40: 31-35, 2002.

JANG, S.I., STEINERT, P.M., MARKOVA, N.G.: Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *Journal of Biological Chemistry* 271: 24105-24114, 1996.

JIANG, Y., CUI, L., YIE, T.A., ROM, W.N., CHENG, H., TCHOU-WONG, K. : Inhibition of anchorage-independent growth and lung metastasis of A549 lung carcinoma cells by IkappaBbeta. *Oncogene* 20: 2254-2263, 2001.

JONES, H.W. JR, MCKUSICK, V.A., HARPER, P.S., WUU, K.D.: George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstetrics in Gynecology* 38: 945-949, 1971.

KACHHAP, S.K., DANGE, P.P., SANTANI, R.H., SAWANT, S.S., GHOSH, S.N.: Effect of omega-3 fatty acid (docosahexanoic acid) on BRCA1 gene expression and growth in MCF-7 cell line. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 16: 257-263, 2001.

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

KASTEN, F.H.: *Staining Procedures*. Edt: Clark, G., Chepter 3 Methods for flourescence microscopy, S: 57-58, Williams & Wilkins, 1981.

KAYAALP, S.O.: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Sayfa: 376-411, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 1998.

KENNY, M.T., BALISTRERI, F.J., TORNEY, H.L.: Flavonoid modulation of murine neutrophil cytokinesis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 12: 527-41, 1990.

KIM, J.H., KIM, S.H., ALFIERI, A.A., YOUNG, C.W.: Quercetin, an inhibitor of lactate transport and a hyperthermic sensitizer of HeLa cells. *Cancer Research* 44: 102-6, 1984.

KIRN, D., NICULESCU-DUVAZ, I., HALLDEN, G., SPRINGER C.J.: The emerging fields of suicide gene therapy and virotherapy. *Trends in Molecular Medicine* 8:68-73, 2002.

KOMAROVA EA, ZELNICK CR, CHIN D, ZEREMSKI M, GLEIBERMAN AS, BACUS SS, GUDKOV AV.: Intracellular localization of p53 tumor suppressor protein in gamma-irradiated cells is cell cycle regulated and determined by the nucleus. *Cancer Res.* 57: 5217-5220, 1997.

KORKMAZ, S., KOŞAR, M., BAŞER, K.H.C., ÖZTÜRK, Y.: Effects of berberine on C6 glioma and NIH 3T3 fibroblast cell lines. (3<sup>rd</sup> International Congress on Phytomedicine, 11-13 October 2000, Munich, Germany) *Phytomedicine* 7(Suppl.2): 123, (2000).

KORKMAZ, S., ÖZTÜRK, Y., BAŞER, K.H.C.: Antioxidant and proliferative effects of carvacrol on NIH3T3 fibroblast cell lines. 4<sup>th</sup> International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. (SCNC-2001 - P3) , Eğirdir-Isparta-Turkey, 6-8 June (2001).

KORKMAZ, S., TUNALIER, Z., ÖZTÜRK, Y., BAŞER, K.H.C.: Cytotoxic effects of cedrol and widdrol on FM3A breast cancer cells. (EPHAR 2001 – 9P214) *Fundamental and Clinical Pharmacology* 15(1): 148 (2001)

KOŞAR, M.: *Türkiye’de yetişen Berberis L. Türlerinin Alkaloitleri*. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, January 1999.

KRAZEISEN, A., BREITLING, R., MÖLLER, G., ADAMSKI, J.: Phytoestrogens inhibit human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Molecular and Cellular Endocrinology* 171: 151-162, 2001.

KUENG, W., SILBER, E., EPPENBERGER, U.: Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry* 182: 16-19, 1989.

KUMAZAWA, Y., ITAGAKI, A., FUKUMOTO, M., FUJISAWA, H., NISHIMURA, C., NOMOTO, K.: Activation of peritoneal macrophages by berberine-type alkaloids in terms of induction of cytostatic activity. *International Journal of Immunopharmacology* 6: 587-592, 1984.

KUO, C.L., CHOU, C.C., YUNG, B.Y.M: Berberine complexes with DNA in the berberine induced apoptosis in human leukemic HL-60. *Cancer Letters* 93: 193-200, 1995.

KUO, C.L., CHOU, C.C., YUNG, B.Y.M: Dose-dependent effects of berberine on cell cycle pause and apoptosis in Balb/c3T3 cells. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 354: 102-108, 1996.

KUO, S.-M., MOREHOUSE JR, H. F., LIN, C.-P.: Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Letters* 116 (1997) 131-137.

LANDERS, J.E., CASSEL, S.L., GEORGE, D.L.: Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res.* 57: 3562-3568, 1997.

LANE D.P., LAIN S.: Therapeutic exploitation of the p53 pathway. *Trends in Molecular Medicine* 8: S38-S42, 2002., Donehower L.A.:The p53 deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Seminars in Cancer Biology* 7: 269-78, 1996

LAN MS, HOLLINGSWORTH MA, METZGAR RS.: Polypeptide core of a human pancreatic tumor mucin antigen. *Cancer Research*. 50: 2997-3001, 1990

LEE JH, JANG SI, YANG JM, MARKOVA NG, STEINERT PM.: The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene. *Journal of Biological Chemistry* 271: 4561-4568, 1996.

LEIBICH, H.M., LEHMANN, R., DI STEFANO, C., HAERING, H.U., KIM, J.H., KIM, K.R.: Analysis of traditional Chinese anticancer drugs by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography* 795: 388-393, 1998.

LESUFFLEUR, T., PORCHET, N., AUBERT, J.P., SWALLOW, D., GUM, J.R., KIM, Y.S., REAL, F.X., ZWEIBAUM, A.: Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT- 29 cell subpopulations. *Journal of Cell Sciences* 106: 771-778, 1993.

LEUNG, S.Y., JACKSON, J., MIYAKE, H., BURT, H., GLEAVE, M.E.: Polymeric micellar paclitaxel phosphorylates Bcl-2 and induces apoptotic regression of androgen-independent LNCaP prostate tumors. *Prostate* 44: 156-63, 2000.

LEWIS, J.A., HUQ, A., NAJARRO, P.: Inhibition of mitochondrial function by interferon. *Journal of Biological Chemistry* 271: 13184-13190, 1996.

LIEBER, M., SMITH, B., SZAKAL, A., NELSON-REES, W., TODARO, G.: A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer* 17: 62-70, 1976.

LIEBMANN, J., COOK, J.A., FISHER, J., TEAGUE, D., MITCHELL, J.B.:Changes in radiation survival curve parameters in human tumor and rodent cells exposed to paclitaxel (Taxol). *International Journal of Radiation Oncology Biol Phys*. 29: 559-64, 1994.

LIN, H.L., LIU, T.Y., WU, C.W., CHI, C.W.: Berberine modulates expression of mdrl gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel. *British Journal of Cancer* 81: 416-22, 1999.

LITTLEWOOD-EVANS AJ, BILBE G, BOWLER WB, FARLEY D, WLODARSKI B, KOKUBO T, INAOKA T, SLOANE J, EVANS DB, GALLAGHER JA.: The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Research* 57: 5386-5390, 1997.

MAGGIOLINI M, BONOFIOLIO D, MARSICO S, PANNO ML, CENNI B, PICARD D, ANDO S.: Estrogen Receptor alpha Mediates the Proliferative but Not the Cytotoxic Dose-Dependent Effects of Two Major Phytoestrogens on Human Breast Cancer Cells. *Molecular Pharmacology*. 60: 595-602, 2001.

MAKINO, K., YU, D., HUNG, M.C.: Transcriptional upregulation and activation of p53Cdc via p34(cdc2) in Taxol-induced apoptosis. *Oncogene* 20:2537-2543, 2001.

MESSNER DJ, AO P, JAGDALE AB, BOYNTON AL.:Abbreviated cell cycle progression induced by the serine/threonine protein phosphatase inhibitor okadaic acid at concentrations that promote neoplastic transformation. *Carcinogenesis* 22: 1163-1172, 2001.

MEYN, R.E., STEPHENS, L. C., HUNTER, N. R., MILAS, L.: Induction of Apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 33:410-414, 1994.

MITANI, N., MURAKAMI, K., YAMAURA, T., IKEDA, T., SAIKI, I.: Inhibitory effect of berberine on the mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic implantation of Lewis Lung Carcinoma. *Cancer Letters* 165: 35-42, 2001.

MOLINARI, M.: Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation* 33: 261-274, 2000.

MORI, H., NIWA, K., ZHENG, Q., YAMADA, Y., SAKATA, K., YOSHIMI, N.: Cell proliferation in cancer prevention; effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on an in vitro model in human colorectal cells. *Mutation Research* 480-481: 201-207, 2001.

MORROW, D.M.P., FITZSIMMONS, P.E.E., CHOPRA, M., MCGLYNN, H.:Dietary supplementation with the anti-tumour promoter quercetin: its effects on matrix metalloproteinase gene regulation. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis .MutationResearch* 480-481:269-276, 2001.

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

MOURIA, M., GUKOVSKAYA, M., JUNG, A.S., BUECHLER, P., HINES, O.J., REBER, H.A., PANDOL S.J.: Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *International Journal of Cancer* 98: 761-9, 2002.

NECKERS, L.: Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine* 8: S55-S61, 2002.

NICHOLIS H.: Aromatase inhibitors continue their ATAC on tamoxifen. *Trends in Molecular Medicine* 8: S12-S13, 2002.

NICHOLSON, K.M., BIBBY, M.C., PHILLIPS, R.M.: Influence of drug exposure parameters on the activity of paclitaxel in multicellular spheroids. *European Journal of Cancer* 33:1291-8, 1997.

NOVAK, K.: Cell death: new targets come to the fore. 2<sup>nd</sup> International Conference on Mechanisms of Cell Death and Disease: Advances in Therapeutic Intervention, June 2-6, North Falmouth, Massachusetts, 2001.

OGRETMEN, B., MCCAULEY, M.D., SAFA, A.R.: Molecular mechanisms of loss of beta 2-microglobulin expression in drug-resistant breast cancer sublines and its involvement in drug resistance. *Biochemistry* 37: 11679-91, 1998.

OLAH E, CSOKAY B, PRAJDA N, KOTE-JARAI Z, YEH YA, WEBER G.: Molecular mechanisms in the antiproliferative action of taxol and tiazofurin. *Anticancer Research*. 16: 2469-2477, 1996.

ORFILA, L., RODRIGUEZ, M., COLMAN, T., HASEGAWA, M., MERENTES, E., ARVELO, F.: Structural modification of berberine alkaloids in relation to cytotoxic activity in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 71: 449-456, 2000.

PAN, H., YIN, C., VAN DYKE, T.: Apoptosis and Cancer Mechanisms. *Cancer Surveys* 29: 305-327, 1997.

PATER, M.M., PATER, A.: Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145: 313-318, 1985.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B., JAKUBOWICZ-GİL, J., RZMOWSKA, J., GAWRON, A.: The effects of quercetin on apoptosis and necrosis induction in human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Folia Histochemistry and Cytobiology* 39: 217-218, 2001.

PINARD, M.F., JOLIVET, J., RATNAM, M., KATHMANN, I., MOLTHOFF, C., WESTERHOFF, R., SCHORNAGEL, J.H., JANSEN, G.: Functional aspects of membrane folate receptors in human breast cancer cells with transport-related resistance to methotrexate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 38: 281-88, 1996.

POLLACK, M.S., HEAGNEY, S.D., LIVINGSTON, P.O., FOGH, J.: HLA-A, B, C and DR alloantigen expression on forty-six cultured human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute* 66: 1003-1012, 1981.

PRATT, S.E., POLLAK, M.N.: Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Research* 53: 5193-5198, 1993.

PREISLER, V.K., WÜCK, D., STOPPER, H.: Combination of paclitaxel and radiation: genotoxicity *in vitro* in four mammalian cell lines. *Cancer Letters* 145: 29-33, 1999.

PUCCI, B., BELLINCAMPI, L., TAFANI, M., MASCIULLO, V., MELINO, G., GIORDANO, A.: Paclitaxel Induces Apoptosis in Saos-2 Cells with CD95L Upregulation and Bcl-2 Phosphorylation. *Experimental Cell Research* 252: 134-143, 1999.

PUCHNER, M.J., GIESE, A.: Tamoxifen-resistant glioma-cell sub-populations are characterized by increased migration and proliferation. *International Journal of Cancer* 86: 468-73, 2000.

QIAN, X.C., BRENT, T.P.: Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Research* 57: 3672-3677, 1997.

RAZANDI, M., PEDRAM, A., LEVIN, E.R.: Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Molecular Endocrinology* 14: 1434-47, 2000.

REDDEL, R. R., MURPHY, L. C., HALL, R. E., SUTHERLAND, R. L.: Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth inhibitory effects of tamoxifen. *Cancer Research*, 45, 1525-1531, 1985.

REILE, H., BIRNBOCK H., BERNHARDT, G., SPRUSS, T., SCHONENBERGER, H.: Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture. *Analytical Biochemistry* 187:262-267, 1990.

REITER, L.S., KRUIHOF, E.K., CAJOT, J.F., SORDAT, B.: The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells. *International Journal of Cancer* 53: 444-450, 1993.

REYNOLDS, J.E.F.: *Martindale. The Extra Pharmacopoeia* s:594, Royal Pharmaceutical Society, London, 1996.

RODGERS, E.H., GRANT, M.H.: The effects of the flavonoids, quercetin, myricetin, epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF-7 human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* 116: 213-228, 1998.

ROGUET, R.: Cutaneous pharmacotoxicology *in vitro*. S: 256-258, Edt. CASTEL, J.V., GOMEZ-LECHON, M.J, *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research...*, London, Academic Press, 1997.

ROWINSKY EK, DONEHOWER RC.: Paclitaxel (taxol). *New England Journal of Medicine* 332: 1004-14, 1995.

RUNOWICZ, C.D., WIERNIC, P.H., EINZIG, A.I., GOLDBERG, G.L., HORWITZ, S.B.: Taxol in ovarian cancer. *Cancer Supplement* 71:1591-1596, 1993.

RUOHOLA, J.K., VIITANEN, T.P., VALVE, E.M., SEPPANEN, J.A., LOPONEN, N.T., KESKITALO, J.J., LAKKAKORPI, P.T., HARKONEN, P.L.: Enhanced invasion and tumor growth of fibroblast growth factor 8b-overexpressing MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Research* 61: 4229-4237, 2001.

SANTORO, I.M., GRODEN J.: Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation. *Cancer Research* 57: 488-494, 1997.

SATO, N., MAEHARA, N., MIZUMOTO, K., NAGAI, E., YASOSHIMA, T., HIRATA, K., TANAKA, M.: Telomerase activity of cultured human pancreatic carcinoma cell lines correlates with their potential for migration and invasion. *Cancer* 91: 496-504, 2001.

SAUNDERS, D.E., LAWRENCE, W.D., CHRISTENSEN, C., WAPPLER, N.L., RUAN, H., DEPPE, G.: Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast-cancer cells. *International Journal of Cancer*. 70:214-20, 1997.

SAUSVILLE, E.: Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends in Molecular Medicine* 8: S32-S37, 2002.

SCHEFFNER, M., MUNGER, K., BYRNE, J.C., HOWLEY, P.M.: The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 88: 5523-5527, 1991

SCHNEIDER-GADICKE, A., SCHWARZ, E.: Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO Journal* 5: 2285-2292, 1986.

SCHWARZ, E., FREESE, U.K., GISSMANN, L., MAYER, W., ROGGENBUCK, B., STREMLAU, A., ZUR HAUSEN, H.: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314: 111-114, 1985.

SEMENZE, G.L.: HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* 8: S62-67, 2002., Brown, J.M.: Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Molecular Medicine Today* 6:157-162, 2000.

SENARATNE, S.G., PIRIANOV, G., MANSI, J.L., ARNETT, T.R., COLSTON, K.W.: Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer* 82: 1459-1468, 2000.

SHABAHANG, M., BURAS, R.R., DAVOODI, F., SCHUMAKER, L.M., NAUTA, R.J., EVANS, S.R.: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptor as a marker of human colon carcinoma cell line differentiation and growth inhibition. *Cancer Research* 53: 3712-3718, 1993.

SHEELER, P., BIANCHI, D.E.: *Cell and Molecular Biology*. sf: 55-70, John Wiley & Sons, Inc., Singapore, 1987.

SHEN, Y.: In vitro cytotoxicity of BTEX Metabolites in HeLa cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34: 229-234, 1998.

SHEPPARD, B.C., RUTTEN, M.J., MEICHSNER, C.L., BACON, K.D., LEONETTI, P.O., LAND, J., CRASS, R.C., TRUNKEY, D.D., DEVENEY, K.E., DEVENEY, C.W.: Effects of paclitaxel on the growth of normal, polyposis, and cancerous human colonic epithelial cells. *Cancer* 85: 1454-1464, 1999.

SHAIK, M.S., IKEDIABI, O., TURNAGE, V.D., MCSWEEN, J., KANIKKANNAN, N., SINGH, M.: Long-circulating monensin nanoparticles for the potentiation of immunotoxin and anticancer drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53: 617-627, 2001.

SO, F.V., GUTHRIE, N., CHAMBERS, A.F., CARROLL, K.K.: Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters* 112: 127-33, 1997.

SOLEAS, G.J., GOLDBERG, D.M., GRASS, L., LEVESQUE, M., DIAMANDIS, E.P.: Do wine polyphenols modulate p53 gene expression in human cancer cell lines? *Clinical Biochemistry* 34:415-20, 2001.

SOULE HD, VAZGUEZ J, LONG A, ALBERT S, BRENNAN M.: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of National Cancer Insitute.* 51: 1409-1416, 1973.

SUGARMAN, B.J., AGGARWAL, B.B., HASS, P.E., FIGARI, I.S., PALLADINO, M.A. JR, SHEPARD, H.M.: Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943-945, 1985.

SWAMYNATHAN, S.K., VARMA, B.R., WEBER, K.T., GUNTAKA, R.V.: Targeted disruption of one allele of the Y-box protein gene, Chk-YB-1b, in DT40 cells results in major defects in cell cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 296: 451-7, 2002.

SZETO, S., YOW, C.M.N., FUNG, K.W.: Characterization of berberine on human cancer cells in culture. *Turkish Journal of Medical Science* 32: 363-368, 2002.

TAKAHASHI, G.W., MONTGOMERY, R.B., STAHL, W.L., CRITTENDEN, C.A., VALENTINE, M.A., THORNING, D.R., ANDREWS, D.F. 3<sup>RD</sup>, LILLY, M.B.: Pentoxifylline inhibits tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity and cytostasis in L929 murine fibrosarcoma cells. *International Journal of Immunopharmacology* 16: 723-736, 1994.

TAKAHASHI, K., STAMENKOVIC, I., CUTLER, M., DASGUPTA, A., TANABE, K.K.: Keratan sulfate modification of CD44 modulates adhesion to hyaluronate. *Journal of Biological Chemistry* 271: 9490-9496, 1996.

TAKAHASHI K, SUZUKI K.: Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. *International Journal of Cancer* 55: 453-458, 1993

TAYLOR, C.W., WANG, L.M., LIST, A.F.;FERNANDES, D., PAINE-MURRIETA, G.D., JOHNSON, C.S., CAPIZZI, R.L.: Amifostine protects normal tissues from paclitaxel toxicity

while cytotoxicity against tumour cells is maintained. *European Journal of Cancer* 33: 1693-1698, 1997.

TEDONE, T., CORREALE, M., PARADISO, A., RESHKIN, S. J.: Differential responsiveness of proliferation and cytokeratin release to stripped serum and oestrogen in the human breast cancer cell line, MCF-7. *European Journal of Cancer* 32A: 849-856, 1996.

THOMPSON, E. W., BRÜNNER, N., TORRI, J., JOHNSON, M. D., BOULAY, V., WRIGHT, J., LIPPMAN, M. D., STEEG, P. S., CLARKE, R.: The invasive and metastatic properties of hormone-independent but hormone-responsive variants of MCF-7 human breast cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis* 11: 15-26, 1993.

TIMOTY, C., BIRDSALL, N.D., GREGORY, S., KELLY, N.D.: Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Alternative Medical Reviews* 2: 94-103, 1997.

TOILLON, R.A., ADRIAENSSENS, E., WOUTERS, D., LOTTIN, S., BOILLY, B., HONDERMARCK, H., BOURHIS, X.L.: Normal breast epithelial cells induce apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through a p53-mediated pathway. *Molecular Cell Biology Research Communication* 3: 338-44, 2000.

TRAINER, D.L., KLINE, T., MCCABE, F.L., FAUCETTE, L.F., FEILD, J., CHAIKIN, M., ANZANO, M., RIEMAN, D., HOFFSTEIN, S., LI, D.J.: Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer* 41: 287-296, 1988.

TSAO H, BENOIT E, SOBER AJ, THIELE C, HALUSKA FG.: Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the Cyclin-dependent Kinase-4 gene. *Cancer Research*. 58: 109-113, 1998.

UMEKITA, Y., HIIPAKKA, R.A., KOKONTIS, J.M., LIAO, S.: Human prostate tumor growth in athymic mice: inhibition by androgens and stimulation by finasteride. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 11802-11807, 1996.

VAN DIJK, M.A., FLOORE, A.N., KLOPPENBORG, K.I., VAN'T VEER, L.J.: A functional assay in yeas for the human estrogen receptor displays wild-type and variant estrogen receptor messenger RNAs present in breast carcinoma. *Cancer Research* 57: 3478-3485, 1997.

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

VON HOFF, D.D., CLARK, G.M., STOGDILL, B.J., SAROSDY, M.F., O'BRAIN, M.T., CASPER, J.T., MATTOX, D.E., PAGE, C.P., CRUZ, A.B., SANDBACH, J.F.: Prospective clinical trial of a human tumor clonogenic system. *Cancer Research* 43: 1926-1931, 1983.

WANG, I.-K., LIN-SHIAU, S.-Y. AND LIN J.-K.: Induction of Apoptosis by Apigenin and Related Flavonoids Through Cytochrome c Release and Activation of Caspase-9 and Caspase-3 Leukaemia HL-60 Cells. *European Journal of Cancer* 35: 1517-1525, 1999.

WANG, R, KOBAYASHI, R., BISHOP, J.M.: Cellular adherence elicits ligand-independent activation of the Met cell-surface receptor. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 8425-8430, 1996.

WANI, M.C., TAYLOR, H.L., WALL, M.E., COGGON, P., MCPHAIL, A.T.: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of American Chemical Society* 93:2325-2327, 1971.

WAN, X.S., HAMILTON, T.C., WARE, J.H., DONAHUE, J.J., KENNEDY, A.R.: Growth inhibition and cytotoxicity induce by Bowman-Birk inhibitor concentrate in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Nutrition and Cancer* 31: 8-17, 1998.

WEISBURGER, J. H.: Mechanisms of Action of Antioxidants as Exemplified in Vegetables, Tomatoes and Tea. *Food and Chemical Toxicology* 37: 943-948, 1999.

WEISS, H., AMBERGER, A., WIDSCHWENDTER, M., MARGREITER, R., OFNER, D., DIETL, P.: Inhibition of store-operated calcium entry contributes to the anti-proliferative effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human colon cancer cells. *International Journal of Cancer* 92: 877-82, 2001.

WIE, Y., ZHAO, X, KARIYA, Y., FUKATA, H., TESHGAWARA, K., UCHIDA, A.: Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Research* 54:4952-4957, 1994.

WHITE, L.J., BALL, J.M., HARDY, M.E., TANAKA, T.N., KITAMOTO, N., ESTES, M.K.: Attachment and entry of recombinant norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *Journal Virology*. 70: 6589-6597, 1996.

WORLD HEALTH REPORT: Life in the 21<sup>st</sup> century. A vision for all. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998.

XIE, S. P., PIRIANOVIC G., COLSTON, K. W.: Vitamin D analogues suppress igf-1 signalling and promote apoptosis in breast cancer cells. *European Journal of Cancer* 35: 1717-1723, 1999.

YAMAMOTO, K., KIKUCHI, Y., KUDOH, K., NAGATA, I.: Modulation of cisplatin sensitivity by taxol in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology* 126: 168-172, 2000.

YEATES, L.C., POWIS, G.: The expression of the molecular chaperone calnexin is decreased in cancer cells grown as colonies compared to monolayer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238: 66-70, 1997.

YEE, C., KRISHNAN-HEWLETT, I., BAKER, C.C., SCHLEGEL, R., HOWLEY, P.M.: Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *American Journal of Pathology* 119: 361-366, 1985.

YOUNG SW, QING F, HARRIMAN A, SESSLER JL, DOW WC, MODY TD, HEMMI GW, HAO Y, MILLER RA.: Gadolinium(III) texaphyrin: a tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 6610-6615, 1996.

YU, W., ZHOU, J., QIU, H.: The correlation between DNA content and Fas antigen in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 25: 210-3, 2002.

ZAMORA-LEON, S.P., GOLDE, D.W., CONCHA, I.I., RIVAS, C.I., DELGADO-LOPEZ, F., BASELGA, J., NUALART, F., VERA, J.C.: Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 1847-1852, 1996.

ZHANG, R.X., DOUGHERTY, D.V., ROSENBLUM, M.L.: Laboratory studies of Berberine used alone and combination with 1,3 bis-2-chloroethyl-1-nitrosourea to treat malignant brain tumors. *Chinese Medical Journal (English Edition)* 103(8): 658-665, 1990.

ZHU X, KUMAR R, MANDAL M, SHARMA N, SHARMA HW, DHINGRA U, SOKOLOSKI JA, HSIAO R, NARAYANAN R.: Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 6091-6095, 1996.

ZOBEL, A.M., SCHELLENBERGER, S.E.: Paclitaxel in combination with coumarin as a potentially effective anticancer agent. *Pharmaceutical Biology* 38: 192-196, 2000.

## EK 1:

### BESİYERLERİ, KATKI MADDELERİ VE TAMPON ÇÖZELTİLER

#### DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium)

Bu solüsyon aşağıda kodu verilen toz D MEM şişesi üzerinde verilen bilgiler doğrultusunda hazırlanmıştır.

1 lt -1X veya 100ml -10X solüsyon hazırlamak için:

D MEM (toz)	13.42 g
Steril distile su	100ml veya 1 lt

#### HAZIRLANIŞI:

Steril olan toz steril kabinde daha önce darası alınmış kapaklı bir steril şişeye konur. Kapalı olarak steril kabinin dışına alınarak tartılır. Gerekli miktar suyun %90'ı steril kabinde ilave edilerek karıştırılır ve hacim tamamlanır.

#### STERİLİZASYONU:

Steril olarak hazırlanmayan solüsyon, steril kabinde steril malzeme ile vakum veya basınç uygulayarak 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir (enjektör ucu filtresi de kullanılabilir).

#### SAKLAMA ŞARTLARI:

Tozu ve solüsyonu buzdolabında saklanır.

**PH:** 7.2 – 7.4

**RAF ÖMRÜ:** 36 ay

#### NOT:

Rengi sarıya yakın turuncu... D MEM Sigma D 5648 kullanılıyor. Bu medyumun özellikleri; sodyum bikarbonatsız, 4500 mg/lt D-glukozlu, 2mM L-glutaminli, 0.005mg/lt fenol-red'li olmasıdır.

## **%10 FCS (FETAL CALF SERUMLU DMEM)**

**HeLa ve NIH3T3 Hücreleri için;**

100 ml %10 serumlu medyum hazırlamak için;

10X DMEM sol.	10ml
% 9.2 Sodyum bikarbonat	4 ml
Penisilin- Streptomisin sol.	%1
Fetal Calf Serum	10ml
Steril distile su	75ml

**HAZIRLANIŞI:** Steril kabinde steril pipet yardımı ile steril şişelere hazırlanır.

Solüsyonun pH'sı 1N HCl ve 1N NaOH ile ayarlanır.

### **STERİLİZASYONU:**

Steril hazırlanır. Solüsyonların her biri steril olmalıdır.

### **SAKLAMA ŞARTLARI:**

Buzdolabında saklanır. Uzun süre saklanacaksa derin dondurucu'da tutulmalıdır.

Mümkün olduğunca taze hazırlanıp kullanılmalıdır.

**RAF ÖMRÜ:** 3 ay

**PH:** 7.2 – 7.4

**NOT:** Primer kültürlerde %20 serum içeren medyum kullanılabilir. Düşük konsantrasyonlu medyumlarda(%1, %5, %7.5) su miktarı yeniden hesaplanmalıdır. DMEM L-glutaminsiz ise ayrıca 2mM L-glutamin ilave edilmelidir.

### **KULLANILAN MADDELER:**

DMEM Sigma D 5648

Fetal Calf Serum Biological Industries 04-121-1A veya Sigma F 2442, F 9665, F 4135, F3018

Heat inactive değilse 56 °C'de 1saat inaktif edilmelidir. Penisilin-streptomisin solüsyonu Biological Industries 03-031-1B veya Sigma P 0781, P 4333, L-glutamin kullanılıyorsa Sigma G 7513'ten %1 oranında kullanılır (Anonim, ATCC, 2002).

## **DMEM- F 12 MEDIUM**

**A549 Hücreleri için;**

100ml için:

10X DMEM	5ml
10X F 12 Ham Nutrient	5ml
Penisilin -streptomisin sol.	1ml
Amfoterisin B sol.	1ml
Fetal Calf Serum	10ml
%9.2 NaHCO	5.225ml
Steril distile su	73ml

### **STERİLİZASYONU:**

Steril olarak hazırlanmadıysa membran filtre ile steril edilir.

### **SAKLAMA ŞARTLARI:**

Formülde bulunan maddeler ayrı ayrı derin dondurucuda, hazırlanan medyum buzdolabında saklanır.

### **RAF ÖMRÜ:**

Hazırlanınca 6ay içinde kullanılmalıdır.

**PH = 7.2 - 7.3**

### **NOT:**

Hücrelerin durumlarına göre C6 glioma cell line hücrelerde FCS %5 veya %2.5'e düşürülebilir. Medyum olarak direkt DMEM nutrient F-12 HAM alınabilir (Anonim, ATCC, 2002).

### **KULLANILAN MADDELER:**

DMEM: Sigma D 5648

F-12 HAM: Sigma N 6760

Penisilin- streptomisin sol.: Sigma P 0781'den hazırlanmıştır.

Fetal Calf Serum: Sigma F 3018

### **10X MEM Eagle Besiyeri (Minimal Essential Medium Eagla)**

Bu solüsyon aşağıda kodu verilen toz MEM şişesi üzerinde verilen bilgiler doğrultusunda hazırlanmıştır.

100ml –10X solüsyon hazırlamak için:

MEM Eagle Besiyeri (toz)	1 lt için
Steril distile su	100ml

#### **HAZIRLANIŞI:**

Hazır olarak alınmış toz besiyeri steril kabinde, steril kaba konur. Steril su ilave edilerek hacim tamamlanır. Tam hacim ve steriliteden emin olunmak isteniyorsa bir mezür içine konulan toz besiyeri manyetik karıştırıcı ile suyun % 90'ının ilavesi ile hazırlanır. Hacim 100 ml'e tamamlanır.

#### **STERİLİZASYONU:**

Steril olarak hazırlanmayan solüsyon, steril kabinde steril malzeme ile vakum veya basınç uygulayarak 0.22µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir (enjektör ucu filtresi de kullanılabilir).

#### **SAKLAMA ŞARTLARI:**

Tozu ve solüsyonu buzdolabında saklanır.

**PH:** 7.2 – 7.4

**RAF ÖMRÜ:** 36 ay

#### **NOT:**

Rengi sarıya yakın turuncu... DMEM Sigma D 5648 kullanılıyor. Bu medyumun özellikleri; sodyum bikarbonatsız, 4500 mg/lt D-glukozlu, 2mM L-glutaminli, 0.005mg/lt fenol-red'li olmasıdır.

## MEM-Vit. BESİYERİ

### HT-29 Hücreleri için:

100 ml için;

10X MEM Eagle besiyeri	10 ml
FCS	10 ml
100X MEM vitamin solüsyonu	2 ml
Non-esansiyel amino asit sol.	1 ml
%7,5 Sodyum bikarbonat solüsyonu	2.9 ml

(Anonim, ATCC, 2002)

**HAZIRLANIŞI:** Kullanılan bütün solüsyonlar daha önce steril olarak hazırlandığı için, steril kabinde steril malzeme kullanılarak steril şişeye hazırlanır.

### **STERİLİZASYONU:**

Steril olarak hazırlanmayan solüsyon, steril kabinde steril malzeme ile vakum veya basınç uygulayarak 0.22µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir (enjektör ucu filtresi de kullanılabilir).

### **SAKLAMA ŞARTLARI:**

Buzdolabında saklanır.

**PH:** 7.2 – 7.4

**RAF ÖMRÜ:** 3 ay

**NOT:** Uzun süre bekletildiğinde aktivitesini kaybettiği için taze hazırlanıp kullanılmalı.

## MEM-İnsülin BESİYERİ

### MCF-7 Hücreleri için:

100 ml için;

10X MEM Eagle Besiyeri (Earle's BSS)	10 ml
100X L-glutamine (2 mM)	1 ml
7.5 gr/ml Sodyum bikarbonat çözeltisi	2 ml
100X Non-esansiyel amino asit çözeltisi	1 ml
100 mM Sodyum pirüvat çözeltisi	1 ml
1 mg/ml Bovine insülin	1 ml
FCS	10 ml
Steril Bidistile su	74 ml

(Anonim, ATCC, 2002)

**HAZIRLANIŞI:** Kullanılan bütün solüsyonlar daha önce steril olarak hazırlandığı için, steril kabinde steril malzeme kullanılarak steril şişeye hazırlanır.

### STERİLİZASYONU:

Steril olarak hazırlanmayan solüsyon, steril kabinde steril malzeme ile vakum veya basınç uygulayarak 0.22µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir (enjektör ucu filtresi de kullanılabilir).

### SAKLAMA ŞARTLARI:

Buzdolabında saklanır.

**PH:** 7.2 – 7.4

**RAF ÖMRÜ:** 1 ay

**NOT:** İçindeki insülinin aktivitesi azalacağı için uzun süre bekletilen besiyeri kullanılmamalıdır.

## 100X L-GLUTAMİN SOLÜSYONU

Hazır solüsyon üzerinde verilen değerlere göre hazırlanmış, sterilizasyon ve diğer şartlar laboratuvarımızda modifiye edilmiştir.

100 ml 100X için;

L-glutamin (toz)	2.922g
Steril distile su	km 100ml

### STERİLİZASYONU:

Steril olarak hazırlanır. Toz steril değilse 0.22µm por çaplı membran filtreden süzülerek sterilize edilir.

### SAKLAMA ŞARTLARI:

Solüsyon derin dondurucu'da saklanır.

### RAF ÖMRÜ:

Solüsyon 18 ay , toz 36 ay

**NOT:** L-glutaminin mol ağırlığı:146.1g., 29.22 mg/ml olarak 200mM hazırlanır ve %1 olarak medyuma ilave edilir.

Tozdan hazırlamak yerine hazır solüsyon da kullanılabilir.

### KULLANILAN MADDELER:

Toz L-glutamin Sigma G5763

200mM L-glutamin solüsyonu Sigma G 7513

## PENİSİLİN-STREPTOMİSİN SOLÜSYONU

100ml solüsyon için:

Penisilin (toz)	1.000.000 U
Streptomisin (toz)	1.000 mg
%0.9 NaCl çöz.	100 ml

### STERİLİZASYONU:

Steril olarak hazırlanır veya 0.22 µm por çaplı membran filtreden süzülerek sterilize edilir.

### SAKLAMA ŞARTLARI:

Derin dondurucu'da -20°C'de saklanır. Uzun süre saklanacaksa -80°C tercih edilmelidir.

### RAF ÖMRÜ:

12 ay

### NOT:

Solüsyon 50X olarak da hazırlanabilir ve medyuma %2 ilave edilebilir.

Bu solüsyon kültürü 3 gün süre ile korur.

Bu solüsyon liyofilize antibiyotiklerle (ilaç) hazırlandığında hafif bulanık görünümlü olmaktadır.

Antibiyotik solüsyonu fungusidli hazırlanacaksa: Penisilin 10.000 U/ml, Streptomisin 10.000 µg/ml ve Amfoterisin B 25µg/ml olacak şekilde serum fizyolojik içinde çözündürülerek hazırlanır.

Bu solüsyon hazır olarak alındığında: Biological Industries 03-031-1B veya Sigma P 0781, P 4333 kullanılabilir. Hazır bulunmadığı takdirde hücre kültürü kataloglarında verilen değerlere göre yukarıdaki şekilde hazırlanabilir.

## 10X TRİPSİN-EDTA

100 ml hazırlamak için:

Tripsin (Toz)	500mg
EDTA (toz)	1,86 g
Sodyum klorür (toz)	900mg
Distile su	100ml

### HAZIRLANIŞI:

Önce sodyum klorürü suyun %90'ında çözerek serum fizyolojik hazırlanır. Sonra tripsin ve EDTA ilave edilir. Manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşana kadar NaOH ilave edilir. 100ml'ye tamamlanır.

### STERİLİZASYONU:

0.22 µm por çaplı membran filtre ile steril edilir.

### SAKLAMA ŞARTLARI:

Derin dondurucu'da -80° C'de saklanır.

**RAF ÖMRÜ:** 18 ay

**PH:** 8

**NOT:** Enzim aktivitesi düşük tripsin olmamalıdır. Mümkünse hazır 10X tripsin-EDTA solüsyonu kullanılmalıdır. EDTA'sız tripsin solüsyonu kullanılıyorsa 300mM EDTA solüsyonu 1X tripsin solüsyonu hazırlanırken ilave edilir. Tripsin solüsyonu kalsiyumsuz ve magnezyumsuz olmalı.

### KULLANILAN MADDELER:

Toz tripsin Sigma T 2271

EDTA Merck

Hazır kullanılacaksa

10X Tripsin-EDTA Sigma T 4174

10X Tripsin solüsyonu Sigma T4549 veya Biological Industries 03-046-1B

Hazır bulunmadığı takdirde hücre kültürü katologlarında verilen değerlere göre yukarıdaki şekilde hazırlanabilir.

## 1X TRİPSİN SOLÜSYONU

100 ml için:

10X Puck's Saline A (PSA)	10ml
%5 Sodyum bikarbonat	0.7ml
10X Tripsin-EDTA	10ml
Steril Distile Su	79.3ml

### HAZIRLANIŞI:

Steril kabinde steril malzeme ile hazırlanır. Sterilizasyonu için membran filtre kullanılır.

### SAKLAMA ŞARTLARI:

Derin dondurucu'da  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır. Uzun süre saklanacaksa  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilir.

**RAF ÖMRÜ:** 18 ay

**PH:** 7.2

### NOT:

10X Tripsin çözeltisi EDTA'sız ise 0.33 ml 300 mM EDTA formüle ilave edilir.

(Freshney, 1994)

### STOK SOLÜSYONLARI:

1. 10X Tripsin-EDTA solüsyonu Sigma T 4174
2. %5  $\text{NaHCO}_3$  Çözeltisi (oda ısısında saklanır.)
3. 300mM EDTA (10X tripsinde yoksa)
4. 10X Puck's Saline A çözeltisi

## 10X PUCK'S SALINE A (PSA) TAMPON ÇÖZELTİSİ

100 ml için:

Potasyum klorür (4g/lt)	0.4 g
Sodyum klorür (80g/lt)	8 g
Sodyum bikarbonat (3.5g/lt)	0.35 g
D-glukoz (10g/lt)	1 g
Fenol-red (0.05g/lt)	0.005 g
Bidistile su	100 ml

(Anonim, Gibco, 1998-99).

### HAZIRLANIŞI:

Oda ısısında tüm maddeler tartılarak 90 ml su içinde çözündürülür, 100 ml'ye tamamlanır.

### STERİLİZASYONU:

Steril kabinde steril malzeme kullanılarak membran filtre ile yapılır.

### SAKLAMA ŞARTLARI:

Oda ısısında veya buzdolabında saklanır.

**RAF ÖMRÜ:** 24 ay

**PH:** 7.2 ± 0.2

### NOT:

Fenol-red Sigma P 0290 solüsyon olarak kullanılabilir. %1 ilave edilir. Tripsin için kullanılan tampon çözeltiler kalsiyum ve magnezyum içermemelidirler.

## 300 mM EDTA (ETİLENDİAMİNTETRAASETİK ASİT) SOLÜSYONU

100 ml için:

EDTA disodyum (toz)	11.166g
Bidistile su	100 ml
Sodyum hidroksit ~1.2g (veya 1N Sodyum hidroksit)	pH=8

### HAZIRLANIŞI:

90 ml su içinde EDTA çözündürülür. Manyetik karıştırıcı üzerinde solüsyon berrak hal alana kadar NaOH taneleri tek tek atılır. PH=8 olduğunda solüsyon berraklaşır. 100 ml'ye tamamlanır.

### STERİLİZASYONU:

Sıkı kapalı ve ısıya dayanıklı cam şişede 121 °C'de 1.1 atm. basınçta 30 dak'da yapılır.

### SAKLAMA ŞARTLARI

Oda ısısında + 20 °C'de saklanır.

**RAF ÖMRÜ:** 24 ay

**PH:** 8

### NOT:

Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu kullanılır. Anhidr çözünmez. PH=8 dışında EDTA yeterince çözünmediği için bulanıktır.

EDTA'nın formülü:  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$

Mol ağırlığı: 372.2 g

**YIKAMA ÇÖZELTİSİ**  
**10x PBS (FOSFAT TAMPON ÇÖZELTİSİ- PHOSPHATE BUFFER**  
**SALINE )**

10X 1 lt için:

Sodyum klorür (NaCl)	80g
Potasyum klorür (KCl)	2 g
Potasyum bifosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 g
Sodyum bifosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	11.4g
Bidistile su	1000ml

(Korkmaz, 1996; Kruse ve Patterson, 1973)

**HAZIRLANIŞI:**

Maddeler tartılarak 900 ml suda çözündürülür. 1lt'ye tamamlanarak pH ayarlanır.

**STERİLİZASYONU:**

Sıkı kapalı ve ısıya dayanıklı cam şişede 121 °C'de 1.1atm. basınçta 30 dak'da yapılır.

**SAKLAMA ŞARTLARI:**

Oda ısısında saklanır.

**RAF ÖMRÜ:** 24 ay

**PH = 7.3**

**NOT:**

Kullanılacağı zaman steril kabinde açılır ve 100ml için 10ml alınarak 90ml steril distile su ile 100ml'ye tamamlanır.

Primer kültür yapılırken: doku % 1-2 ml penisilin-streptomisin solüsyonu ilaveli PBS içinde 5-10 dakika bekletildikten sonra izolasyon işlemi uygulanır.

1X PBS içindeki madde konsantrasyonları: NaCl = 137mM, KCl = 2.7mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 1.5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 8mM.

## 1X HBSS (HANK'S BALANCED SALT SOLUTION)

1lt 1X için;

CaCl <sub>2</sub>	0.14g *
KCl	0.40g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.10g
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.10g
NaCl	8.00g
NaHCO <sub>3</sub>	0.35g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.09g
D-Glukoz	1.00g *
Phenol-red	0.01g
Distile su	985ml 'ye tamamlanır.

(Anonim, Gibco, 1998-1999)

### HAZIRLANIŞI:

\* CaCl<sub>2</sub> ve D-glukoz direkt formüle ilave edilmez. kalsiyum klorürün %1.4'lük ve D-glukozun %20'lik çözeltileri ayrı ayrı hazırlanır, kullanılacağı zaman 100 ml için: HBSS 98.5ml, D-glukoz çözeltisi 5ml ve CaCl<sub>2</sub> çözeltisi 10ml ilave edilir. Solüsyonlar karıştırıldığı zaman 24 saat içinde kullanılmalıdır.

**KULLANILIŞI:** Hücreler PBS içinde uzun süre bekletilemez. Doku alınmasında, hücrelerin serumsuz bekletilmesinde alternatif olarak kullanılır. Tripan mavisi diskalifikasyonu yönteminde hücreler için serumsuz besiyerine alternatif vasat olarak kullanılabilir.

### STERİLİZASYONU:

%20 D-glukoz, %1.4 CaCl<sub>2</sub> ve HBSS solüsyonlarının her biri sıkı kapalı ve ısıya dayanıklı cam şişede 121 °C'de 1.1atm. basınçta 30 dak'da steril edilir.

### SAKLAMA ŞARTLARI:

Buzdolabında saklanır.

**RAF ÖMRÜ:** Solüsyonlar ayrı ayrı 24 ay saklanabilir. Solüsyonlar birleştirildiği zaman HBSS 24 saat içinde kullanılmalıdır.

pH = 7.2

**NOT:** D-glukoz %20'nin altında otoklava verilirse karamelize olur.

## 1N HİDROKLORİK ASİT HAZIRLANMASI

	1000ml için	100ml için
%37'lik HCl	82.80ml	8.28ml
Distile su	917.2ml	91.72ml

### HESAPLANMASI VE HAZIRLANIŞI:

Litredeki ekivalen gram sayısı = 36.46/1

Konsantre HCl çözeltisi %37 liktir.

H = 1g

Cl = 35.46g

100g da 37g HCl varsa

X g da 36.46 g vardır

X = 98.54g'da 36.46g HCl vardır.

Dansitesi:

$d = 1.19 = 98.54/V$  ise  $V = 82.80$  ml %37'lik HCl alındığında 1lt için 1N 'i verecek miktar bulunur.

### STERİLİZASYONU:

0.22µm por çaplı membran filtreden süzülür.

### SAKLAMA ŞARTLARI

Buzdolabında saklanır.

**NOT:** Besiyerinin baza kayan pH'sını ayarlamak için kullanılır.

### RAF ÖMRÜ:

24 ay

## 1N SODYUM HİDROKSİT HAZIRLANMASI

Na = 23g

O = 16g

H = 1g

Ekivalen gram sayısı = 40/1g

NaOH 4g

Distile su 100ml

### HAZIRLANIŞI:

4g sodyum hidroksit 40-50ml suda iyice çözündürülür. Distile su ile 100ml'ye tamamlanır.

### STERİLİZASYONU:

Membran filtreden süzülür.

### SAKLAMA ŞARTLARI:

Buzdolabında saklanır.

**NOT:** Besiyerinin aside kayan pH'larını ayarlamak için kullanılır.

**RAF ÖMRÜ:** 24 ay

## EK 2.

### YÖNTEMLERDE KULLANILAN SOLÜSYON VE BOYA FORMÜLLERİ

**TRİPAN MAVİSİ:** Hazır olarak alınan %0.4 'lük çözeltisi kullanıldı.

**MTT STOK ÇÖZELTİSİ:** 500 mg MTT toz 100 ml PBS içinde çözündürülüp, membran filtresi ile steril edildi ve ışık geçirmez şişelere konuldu. Derin dondurucuda raf ömrü 6 aydır (Mosmann, 1983).

**MTT ÇALIŞMA ÇÖZELTİSİ:** 1 kısım stok çözeltisi + 9 kısım besiyeri (Mosmann, 1983).

**KRİSTAL VİYOLE ÇALIŞMA ÇÖZELTİSİ:** 500 mg toz kristal viyole + 26 ml absöü alkol + 74 ml distile su (%0.5'lik hazırlandı) (Yamamoto ve ark., 2000; Xie ve ark., 1999).

**0.1 KRİSTAL VİYOLE OKUMA SOLÜSYONU:** 0.1 m sodyum sitrat çözeltisi: 2.941 gr sodyum sitrat + 100 ml distile su (Xie ve ark., 1999).

**NÖTRAL KIRMIZI BOYA SOLÜSYONU:** 0.4 gr. Nötral kırmızı + 100 ml distile su (membran filtreden geçirilip steril edildi ve koyu renk şişede buzdolabında saklandı) (Xie ve ark., 1999).

**NÖTRAL KIRMIZI BOYAMA YÖNTEMİ İÇİN FİKSATİF SOLÜSYON:** Formaldehit/kalsiyum klorürü yıkama ve fiksatif çözeltisi kullanıldı. Taze olarak hazırlanıp hemen kullanılmalıdır. 1.3 ml %37'lik formaldehit + 10 ml %10'luk kalsiyum klorür çözeltisi + 89 ml distile su (Xie ve ark., 1999).

**NEUTRAL RED UP-TAKE OKUMA SOLÜSYONU:** %1 Asetik asit etanol çözeltisi kullanılır. 1 ml asetik asit + 99 ml %50'lik etanol (Xie ve ark., 1999).

**KOLONİ FORMASYONU İÇİN AGAR:** %3'lük agar distile su ile hazırlanıp, otoklav ile steril edilir (Altınöz ve ark, 2001, Korkmaz ve ark., 2001/b).

**KOLONİ FORMASYONU İÇİN ALT AGAR TABAKASI:** 1 kısım %3'lük agar + 4 kısım serumlu besiyeri (Altınöz ve ark, 2001, Korkmaz ve ark., 2001/b).

**KOLONİ FORMASYONU İÇİN ÜST AGAR TABAKASI:** 1 kısım hücre süspansyonu +2 kısım alt tabaka (1 kısım %3'lük agar + 4 kısım besiyeri) (Altınöz ve ark, 2001, Korkmaz ve ark., 2001/b).

**AKRIDİN ORANJ STOK ÇÖZELTİSİ:** 100 mg AO + 100 ml distile su. Buzdolabında ışık geçirmeyen kaplarda 6 ay saklanabilir (Kasten, 1981).

**AKRIDİN ORANJ ÇALIŞMA ÇÖZELTİSİ:** 1 kısım AO stok çözeltisi + 9 kısım PBS. Taze hazırlanıp kullanılmalıdır (Kasten, 1981).