

Murat ULUĞ

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yüksek Lisans Tezi

QUERCETİN VE QUERCETİN/POLİETİLENİMİN  
KOMPLEKSİNİN HELA VE FİBROBLAST  
HÜCRELERİNE ETKİSİ

Murat ULUĞ

KÜ 2010

OCAK 2010

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

QUERCETİN VE QUERCETİN/POLİETİLENİMİN  
KOMPLEKSİNİN HELA VE FİBROBLAST  
HÜCRELERİNE ETKİSİ

MURAT ULUĞ

OCAK 2010

**Biyoloji Anabilim Dalı** Murat ULUĞ tarafından hazırlanan QUERCETİN VE QUERCETİN/POLİETİLENİMİN KOMPLEKSİNİN HELA VE FİBROBLAST HÜCRELERİNE ETKİSİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Siyami KARAHAN \_\_\_\_\_

Üye (Danışman) : Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK \_\_\_\_\_

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN \_\_\_\_\_

19/01/2010

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### QUERCETİN VE QUERCETİN/POLİETİLENİMİN KOMPLEKSİNİN HELA VE FİBROBLAST HÜCRELERİNE ETKİSİ

ULUĞ, Murat

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Ocak 2010, 72 sayfa

Yapılan bu çalışmada, quercetin (Q), karboksilli quercetin (KQ) ve karboksilli quercetin/polietilenimin (KQ/PEI) kompleksinin HeLa ve L929 fibroblast hücre kültürlerinde etkisi araştırılmıştır. Öncelikle quercetin hidrosil grupları (OH) üzerinden kloro asetik asit ile karboksil gruplu quercetin elde edilmiştir. Karboksilli quercetin karboksil grubu üzerinden polietileniminin amin grupları ile elektron ortaklaşması yolu ile KQ/PEI kompleksi elde edilmiştir. Elde edilen KQ ve KQ/PEI F – TIR ve H – NMR metotları ile karakterize edilmiştir. Q, KQ ve KQ/PEI, HeLa ve fibroblast hücrelerine toksik etkisi MTT metodu ve tripan mavisi ile boyanarak hemositometre ile tespit edilmiştir. Hematoksilin – Eozin boyaması ile morfolojik değişiklikler, M30, Kaspaz-3 antikoru kullanılarak immünohistokimyasal boyama ve ikili boyama ile apoptotik indeks ve ikili boyama ile nekrotik indeks belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre quercetin toksik etkisinin düşük polietilenimin ile oluşturulan kompleksin toksisitesinin yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Quercetin apoptotik etkisi % 10 – 15 arasında elde edilirken, KQ/PEI kompleksinin apoptotik etkisi % 32 olarak elde edilmiştir. Quercetin, kanser ve normal hücrelerde düşük oranda nekroza neden olurken, KQ/PEI kompleksinin özellikle HeLa kanser hücrelerinde yüksek oranda nekroza neden olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, quercetin polietilenimin ile hücreye aktarılması neticesinde antikanserojen etkisinin de arttığı gözlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Flavonoid, Quercetin, Polietilenimin, Apoptoz, Nekroz,  
Toksosite, HeLa, Fibroblast

## ABSTRACT

### EFFECTS OF QUERCETIN AND QUERCETIN/POLYETHYLENEIMINE COMPLEX ON HELA AND FIBROBLAST CELLS

ULUĞ, Murat

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Mustafa TÜRK

January 2010, 72 pages

In this research, the effect of the complex of CQ, Q and CQ/PEI on HeLa and L929 fibroblast cell cultures was researched. First of all, chloroacetic acid and quercetin with carboxyl group were acquired through hydroxyl group of quercetin. The complex of CQ/PEI was acquired by the way of amin groups of polyethyleneimine and electron, collectiveness, through CQ carboxyl group. CQ and CQ/PEI obtained were characterised by F – TIR and H – NMR methods. The toxic effects of Q, CQ and CQ/PEI over the fibroblast and HeLa cells was determined by MTT method and heamocytometer which is staining by tripan blue. Staining; morphologic changes were determined by Hemotoxilen – Eosin staining, apoptotic indeks was determined by immunocytochemical staining by using M30, Kaspase-3 antibodies and double staining, necrotic indeks was determined by double staining. According to the results obtained it was determined that the toxic effect was low and the toxicity quercetin of the complex which was mode with polyethyleneimine was high. While the effect of quercetin apoptotic was % 10 – 15, apoptotic effect of CQ/PEI complex was % 32. While quercetin was causing low percent necrose a cancer and normal cells, It was determined that the complex of CQ/PEI cause high level necrose especially a HeLa cancer cells. Consequently it was observed that transition of quercetin to the cell by polyethyleneimine caused increase its anticarcinogenic effect.

**Key Words:** Flavonoid, Quercetin, Polyethyleneimine, Apoptosis, Necrose,  
Toxicity, HeLa, Fibroblast

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımcı esirgemeyen ve biz genç araştırmacılara büyük destek olan, bilimsel deney imkanlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren, tez yöneticisi hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK'e, bilimsel konularda daima yardımcı gördüğüm hocalarım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN'e ve Yrd. Doç. Dr. Kezban ADA'ya, tezimin birçok aşamasında yardımlarını esirgemeyen Nisa TANDOĞAN'a, tez çalışmalarım süresince, büyük fedakarlıklarla bana destek olan eşim Yasemin ULUĞ'a ve biricik kızım Gülsima Zeynep ULUĞ'a, teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	x
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Literatür Özeti .....	2
1.2. Flavonoidler .....	6
1.2.1. Flavonoidlerin Antikanserojen Özellikleri .....	10
1.2.2. Antioksidasyon .....	10
1.2.3. Detoksifikasyon Enzimlerinin İndüklenmesi .....	11
1.2.4. İmmün Fonksiyonunun Düzenlenmesi .....	11
1.2.5. Diğer Mekanizmalar .....	12
1.2.6. Flavonoidler ve Çoklu İlaç Direnci .....	13
1.3. Quercetin .....	17
1.4. Polikatyonik Bileşikler ve Polietilenimin (:PEI) .....	19
1.5. Kanser .....	22
1.6. Kanser Tedavisi .....	25
1.6.1. Radyoterapi .....	25
1.6.1.1. Radyoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar .....	26
1.6.2. İmmünoterapi .....	26
1.6.2.1. İmmünoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar .....	27
1.6.3. Kemoterapi .....	27
1.6.3.1. Kemoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar .....	28
1.7. Teşhis ve Tedavide Hedefleme Çalışmaları .....	29
1.7.1. Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistemler .....	29

1.7.2. Mikroapsüller .....	30
1.7.3. Mikroksreler .....	30
1.7.4. Nanotaşıyıcılar .....	31
1.7.5. Lipozomlar .....	32
<b>2. MATERİYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>34</b>
2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar .....	34
2.2. Quercetin / Polietilenimin (KQ / PEI) Kompleksinin Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu .....	35
2.3. Hücre Kültürü ve Kompleksin Hücreler ile Etkileşimi .....	35
2.4. Hematoksilen Boyama .....	36
2.5. Toksisitenin Belirlenmesi .....	37
2.5.1. MTT Testi .....	37
2.5.2. Tripan Blue Boyaması .....	37
2.6. Apoptozun Belirlenmesi .....	37
2.6.1. İmmünositokimyasal Kaspaz-3 Metodu ile Apoptozis Belirlenmesi	38
2.6.2. İmmünositokimyasal Protokolü M30 Antikor Tayini Apoptozis Belirlenmesi .....	39
2.6.3. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi .....	40
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>42</b>
3.1. Quercetin / Polietilenimin (KQ / PEI) Kompleksinin Elde Edilmesi .....	42
3.1.1. F – TIR Spektrumları Analizi .....	43
3.1.2. KQ ve KQ/PEI'ye Ait H – NMR Spektrumları .....	45
3.2. Quercetin (Q), Quercetin/Polietilenimin (KQ/PEI) Kompleksinin HeLa (Kanser) ve L929 Fibroblast (Normal) Hücrelerine Toksik Etki Sonuçları	47
3.3. Hematoksilen – Eozin Boyama Sonuçları .....	50
3.4. Apoptotik İndeks Sonuçları .....	53
3.5. Nekrotik İndeks Sonuçları .....	58
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Flavon Bileşiği .....	7
1.2. Farklı Flavonoid Türevleri .....	7-8
1.3.a. Quercetin Yapısı .....	17
1.3.b. Quercetin 4'-O- $\beta$ -D Glukosidin Yapısı .....	17
1.4. Lineer, Zincirli ve Polietilen Glikol ile Konjuge Edilmiş Polietileniminler .....	21
3.1. Karboksilik Asit Uçlu KQ/PEI Kompleksinin Sentezi .....	42
3.2. Elde Edilen Komplekslerin F – TIR Grafikleri .....	43
3.3. KQ ve KQ/PEI Kompleksinin H – NMR Spektrumu Grafikleri .....	45
3.4. Farklı Miktarlarda (0 – 600 $\mu$ g/mL) Quercetin (Q), Karboksil Gruplu Quercetin (KQ), KQ/PEI Kompleksi ve PEI Polimerlerinin L929 Fibroblast Hücrelerine Toksik Etkisini Gösteren Tablo.....	48
3.5. Farklı Miktarlarda (0 – 600 $\mu$ g/mL) Quercetin (Q), Karboksil Gruplu Quercetin (KQ), KQ/PEI Kompleksi ve PEI Polimerlerinin HeLa Tümör Hücrelerine Toksik Etkisini Gösteren Tablo.....	49
3.6. Kültüre Edilmiş Normal ve Kanser Hücre Fotoğrafları .....	50
3.7. Hematoksilen – Eozin ile Boyanmış L929 Fibroblast Hücrelerinin Fotoğrafları .....	51
3.8. Hematoksilen – Eozin ile Boyanmış HeLa Hücrelerinin Fotoğrafları.....	52
3.9. İkili Boyama Sonucu Elde Edilmiş HeLa Hücrelerinin Fotoğrafları .....	54
3.10. İkili Boyama Sonucu Elde Edilmiş L929 Fibroblast Hücrelerinin Fotoğrafları .....	55
3.11. M30 Cytodeath Antikoru Kullanılarak İmmünohistokimyasal Metot ile Boyanmış HeLa Hücreleri.....	56
3.12. Farklı Miktarlarda (0 – 600 $\mu$ g/mL) Quercetin (Q), Karboksil Gruplu Quercetin (KQ), KQ/PEI Kompleksi ve PEI Polimerlerinin HeLa Kanser Hücrelerinde Oluşturduğu Apoptotik İndeks .....	57

3.13.	Farklı Miktarlarda (0 – 600 µg/mL) Quercetin (Q), Karboksil Gruplu Quercetin (KQ), KQ/PEI Kompleksi ve PEI Polimerlerinin L929 Fibroblast Hücrelerinde Oluşturduğu Apoptotik İndeks .....	58
3.14.	Farklı Miktarlarda (0 – 600 µg/mL) Quercetin (Q), Karboksil Gruplu Quercetin (KQ), KQ/PEI Kompleksi ve PEI Polimerlerinin L929 Fibroblast (Normal) Hücrelerinde Oluşturduğu Nekrotik İndeks .....	59
3.15.	Farklı Miktarlarda (0 – 600 µg/mL) Quercetin (Q), Karboksil Gruplu Quercetin (KQ), KQ/PEI Kompleksi ve PEI Polimerlerinin HeLa (Kanser) Hücrelerinde Oluşturduğu Nekrotik İndeks .....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Karboksilik Asit Uçlu KQ ve KQ/PEI Komplekslerinin F – TIR Spektrumlarındaki Karakteristik Pikler .....	44
3.2. Karboksilik Asit Uçlu KQ ve KQ/PEI Komplekslerinin H – NMR Spektrumlarındaki Karakteristik Pikler .....	46

## SİMGELER DİZİNİ

$\beta$	beta
$\geq$	büyükeşit
Da	dalton
$\gamma$	gama
g/mol	gram/molekül
HCl	hidroklorikasit
CO <sub>2</sub>	karbondioksit
kDa	kilodalton
$\mu$ g	mikrogram
$\mu$ M	mikromolar
nm	nanometre
nM	nanomolar
°C	santigrat
NaOH	sodyumhidroksit
%	yüzde

## KISALTMALAR DİZİNİ

ATPaz	Adenozin Tri Fosfataz
ABC	Adenozin Tri Fosfat Bağlanma Kaseti
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AOM	Azoxymethane
BCRP	Breast Cancer Resistant Protein
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DMBA	Dimethylbenz(a)anthracene
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
EDTA	Etilendiamintetraasetat
EGCG	Epigallocatechingallate
PBS	Fosfat Buffer Saline
GST	Glutathione S-Transferase
NBD	İki Nükleotit Bağlanma Domaini
MDR	Multi Drug Resistance
MRP1	Multidrug Resistance Asscoiated Protein 1
NK	Natural Küller
ER	Östrojen Reseptör
P-gp	P-glikoprotein
PEI	Polietilenimin
PEG	Polietlenglikol
TMD	Trans Membran Domaini
UV	Ultra Viyole
UDP	Urasil Di Fosfat
QR	Quinone Reductase

## 1. GİRİŞ

Sunulan bu çalışmanın amacı doğal olarak bitkilerde bulunan ve izole edilmiş, antioksidan, antiviral ve antikanserojen etkisi olduğu bilinen flavonoidlerin pozitif yüklü taşıyıcılar ile in vitro HeLa kanser hücresi ve fibroblast hücresi kültürlerinde etkin dozda aktarımının sağlanması, kanser hücrelerine ve normal hücrelere etkisinin araştırılmasıdır.

Tez çalışmasında kullanacağımız quercetin hücresel ortamında kullanılan dozu 50 µM ile 750 µM arasında değişmektedir. Quercetin etkisi doz miktarına ve zamana bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada quercetin, polikationik polimerlere bağlanarak hücre kültürüne sunulacaktır. Polikationik bileşiklerle kompleks oluşturulmuş quercetin, in vitro ortamda HeLa ve L929 fibroblast hücre serilerine aktararak, bu hücre serilerinde etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Hücreye iyi tutunmaları, hücre zarı geçirgenliğini artırmalarından dolayı iyi bir transfeksiyon ajanı olan polikationlar, hücre içerisine çok düşük miktarda girmesinde dolayı quercetin kationik polietilenimin ile aktarılması hedeflenmektedir. Polikationik bileşikler aracılığıyla biyolojik moleküllerin transferi tercih edilen yaklaşımlardan biridir. Polikationik bileşikler hazırlanabilmeleri ve saflaştırılmalarının kolay olması, kimyasal modifikasyona açık olmaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedir.

Sentetik polimerler içerisinde en fazla tercih edilen polikationik bileşik yüksek transfeksiyon kabiliyeti nedeniyle polietilenimin (PEI)'dir. Bu tez çalışmasında dallanmış PEI (2000) kullanılacaktır. Polietilenimin hücreye endozom reseptör aracılığıyla, fagositoz ve pinositozla alınmaktadır. Etkinliği viral vektörlere göre düşük olan polietileniminin en önemli dezavantajı yüksek toksisiteye neden olmasıdır. Toksikitenin üstesinden gelebilmek için küçük molekül ağırlıklı polietileniminlerin çapraz bağlarla bir araya getirilerek kullanılması veya yalnızca



küçük molekül ağırlıklı polietileniminlerin kullanılması önerilmektedir. Bizim çalışmamızda da 2 kDa molekül ağırlıklı polietilenimin kullanılacaktır.

Bu çalışmada hücre içine etkin dozda quercetin aktarımı sağlanması için quercetin hidrosil (OH) gruplarından kloro asetik asit ile reaksiyona sokularak karboksil gruplu quercetin elde edilecektir. Karboksil gruplu quercetin, karboksil grupları üzerinden düşük molekül ağırlıklı dallanmış polietileniminin (PEI) amin grupları arasında fizyolojik şartlarda elektrostatik etkileşim ile quercetin/polietilenimin kompleksi oluşturulacaktır. Daha sonraki aşamada, tek başına quercetin, karboksil gruplu quercetin ve karboksil gruplu quercetin/polietilenimin kompleksi HeLa ve fibroblast hücrelerine in vitro ortamda aktarılarak etkileri araştırılacaktır.

### **1.1. Literatür Özeti**

Son beş yıl içerisinde tüm dünyada kanser, kalp damar hastalıklarından sonra en yüksek ikinci ölüm nedeni olmuştur (1). Doğalıktan uzak yaşam, şehir hayatı, kirlilik, yanlış beslenme, hareketsizlik, hazır yiyecekler ve kötü alışkanlıkların bu oranda büyük payı vardır. Bilim insanları bu büyük problemi çözmek için canla başla çalışmaktadırlar. Fakat günümüze kadar umut verici gelişmeler olsa da kesin çözüm henüz mevcut değildir. Tedavi amacı ile birçok metot kullanılmaktadır. Fakat bu metotlardan özellikle kemoterapötik ajanların kullanılması şiddetli yan etkilere neden olmaktadır (2).

Son yıllarda bu yan etkilerden hastaları kurtarmak için antikanserojen özellikleri olan, besinlerimiz içinde de bulunan bileşiklerin tedavi amaçlı kullanımı araştırılmaktadır. Bu doğal maddelerin başında da flavonoidler gelmektedir.

Flavonoidler, tüm karasal bitkilerde bulunan, çiçekli bitkilere renk veren, bitkinin büyüme, gelişme ve savunmasında rol alan sekonder metabolitlerdir. Bu bileşiklerin meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, fındıkta ve çayda bulunduğu bilinmektedir. Flavonoidlerin sayısının 6500'den fazla olduğu bildirilmiştir. Batı toplumunda bir insanın bu bileşiklerden ortalama günlük alımı 200 mg'dan 1 gr'a kadar

değişmektedir. Bu fitokimyasalların genel biyolojik aktivitelerini, antiinflamatuvar, antialerjik, antiplatelet ve antitümoral olarak belirtebiliriz. Flavonoidlerin, koroner rahatsızlıklarda, kemik kaybında, yaş ile ilgili rahatsızlıklarda ve özellikle kanserin önlenmesinde koruyucu rol oynayabileceği bilinmektedir (3).

Flavonoidler hücre yaşamı için önemli birçok biyolojik özelliğe sahiptir. Flavonoidler, hücre döngüsünü, hücre proliferasyonunu ve oksidatif stresi inhibe etmekte, apoptozisi, detoksifikasyon enzimlerini ve immün sistemini indüklemektedirler. Bu biyolojik özelliklerin, kanserin tedavisinde ve önlenmesinde etkili olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla daha iyi anlaşılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar meyve ve sebze tüketimi ile kanser sıklığı arasında zıt bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Flavonoidler kanserin önlenmesinde umut verici aday bitkisel bileşiklerdir.

Epidemiyolojik çalışmalar, flavonoidlerin kanser riskinin azaltılmasında etkili olduğunu göstermiştir. Hollandalı ve Finlandiyalı bilim insanlarının yaptıkları iki ayrı çalışmada flavonoidlerin kanser ve koroner arter hastalığında koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymuştur (4). Bu flavonoidlerden biri de quercetin (Q) olup çalışma kapsamında kullanılacak olan flavonoiddir. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), doğada yaygın olarak bulunan flavonoidlerden biridir (3,5). Quercetin'in 3. ve 4. pozisyonlarda bir şeker grubu içeren iki farklı formu vardır. Quercetin'in 3. pozisyonunda şeker grubu içeren 3-O- $\beta$ -glucosid formu 4. pozisyonunda bir şeker grubu içeren 4'-O- $\beta$ -diglukosid formuna göre doğada daha yaygın olarak bulunmaktadır (6). Quercetin'in, antiproliferasyon, antioksidan, antiülser, apoptoz indüklenmesi, protein kinaz C inhibisyonu, lipooksijenaz inhibisyonu, hücre siklusu düzenlenmesi, anjiyogenez inhibisyonu, antialerjik ve antikanser özellikleri bulunmaktadır (5-7). Avrupa, ABD ve Asya'da yaşayan halkın günlük quercetin alımı 4 – 68 mg arasında değişmektedir. Quercetin'in MDR ailesi üyelerini (P-gp, MRP1, BCRP) inhibe ettiği bildirilmiştir (8,9). Quercetin MDR proteinlerinin ATPaz bölgelerini tanımaktadır. Hücre içi serbest radikalleri ortadan kaldıracak ve çeşitli moleküllerin oksidasyonunu engelleyerek in vivo ve in vitro antioksidan aktivite gösterebileceği belirtilmektedir (3).

Oral yolla alınan quercetin'in absorpsiyon oranı % 20 dolaylarındadır. Quercetin'in antikanser aktivitesi için, serum konsantrasyonunun ortalama 10  $\mu\text{M}$  olması gerektiği belirtilmiştir. İnsanda, 100 mg tek doz quercetin'in serum konsantrasyonu 0.8  $\mu\text{M}$  olduğu için antikanser aktivite için 1500 mg günlük dozun alınması gerektiği önerilmektedir. İnsanda, 4 gr'a kadar olan quercetin alımının yan etkisi yoktur. Quercetin en mutajenik flavonoiddir. Ancak bu mutajenik etkisinin karsinogenetik etkisi yoktur. Quercetin'in kanser hücre serilerinde mutant p53 ekspresyonunu azalttığı ve hücre döngüsünde G2/M ve G1 duraklamalarına neden olduğu saptanmıştır (5).

Flavonoidlerin fizyolojik etkileri üzerine yapılan in vitro çalışmalarda, flavonoidler kültür besiyerinin içerisine eklenerek hücre kültürüne sunulmaktadır. Tez çalışmasında kullanacağımız quercetin'in hücre kültürü ortamında kullanılan dozu 50  $\mu\text{M}$  ile 750  $\mu\text{M}$  arasında değişmektedir. Quercetin'in etkisi doz miktarına ve zamana bağlı olarak değişmektedir. Bu tez çalışmasında, quercetin polikatyonik polimerlere bağlanarak hücre kültürüne sunulacaktır. Polikatyonik bileşiklerle kompleks oluşturulmuş quercetin, in vitro ortamda HeLa ve L929 fibroblast hücre serilerine aktarılarak, bu hücre serilerinde etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Hücre içerisine çok düşük miktarda girmesinden dolayı quercetin'in katyonik polietilenimin ile aktarılması hedeflenmektedir. Polikatyonlar hücreye iyi tutunmaları, hücre zarı geçirgenliğini artırmalarından dolayı iyi bir transfeksiyon ajanıdır. Özellikle polietilenimin gen tedavisi viral olmayan vektör olarak başarı ile kullanılmaktadır. Polikatyonik bileşikler aracılığıyla biyolojik moleküllerin transferi tercih edilen yaklaşımlardan biridir. Polikatyonik bileşikler hazırlanabilmelerinin ve saflaştırılmalarının kolay olması, kimyasal modifikasyona açık olmaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Polikatyonik bileşiklerin DNA ve diğer moleküllerle olan etkileşimi elektrostatik denge üzerine kuruludur. Polikatyonik bileşik+DNA kompleksi (+) yüklüdür ve iki molekül arasındaki bu pozitif negatif yük oranı büyüdükçe katyonik kompleksin hücreye transferi daha kolay olmaktadır. Polikatyonik bileşiklerin zayıf transfer etkisinin de bu elektrostatik dengeden kaynaklandığı düşünülmektedir. Polikatyonik bileşiklerle biyolojik molekül transferinde birinci basamak, polikatyonik bileşiğin DNA ve etken madde

ile kompleks oluşturmasıdır. Bu kompleks hücre membranına göre daha pozitif yüklü olduğu için hücre membranından içeri endositozla girmektedir. Kompleksin endozom aktivitesinden kaçması gerekmektedir. Bunun için, fizyolojik şartlarda düşük pK değerli katyonik bileşikler kullanılması önerilmektedir. Bu tür katyonik bileşikler proton sponge adı verilen mekanizmayı kullanmaktadır. Bu mekanizmaya göre, katyonik bileşik protonları amin gruplarına bağlamaktadır ve ardından organel içerisine salmaktadır. Polimerin, amin gruplarına proton bağlaması polimerin şişmesine neden olmaktadır. Ayrıca, endozom içinde yük farkı meydana gelmemesi için Cl<sup>-</sup> iyonları endozoma taşınmaktadır. Proton ve Cl<sup>-</sup> iyonları endozomun osmolaritesini artırmakta ve böylece endozoma su girişine neden olmaktadır. Polimerin ve endozomun şişmesi endozomun parçalanmasına ve polikatyonik/DNA veya polikatyon/flavonoid kompleksinin salınımına neden olmaktadır (10).

Sentetik polimerler içerisinde en fazla tercih edilen polikatyonik bileşik polietilenimin (PEI)'dir. Yukarıda anlatılan endozom kaynaklı süreç, polietileniminin yüksek transfeksiyon kabiliyetini açıklamak için önerilmiştir. Katyonik bir polielektrolit olan polietileniminin lineer, dallanmış ve dendrimerik formu bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında dallanmış PEI (2000) kullanılacaktır. Dallanmış polietilenimin ile oligonükleotit, plazmid DNA, RNA, etken madde aktarımı yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Polietilenimin hücreye endozom reseptör aracılığıyla, fagositoz ve pinositozla alınmaktadır. Etkinliği viral vektörlere göre düşük olan polietilenimin ile gen transferinin en önemli dezavantajı yüksek toksisiteye neden olmasıdır. Ancak etkinlik ve toksisite hakkında net bilgi halen bilinmemektedir (11). Toksisitenin polietileniminin moleköl ağırlığıyla ilişkili olduğu ve 25 kDa moleköl ağırlığındaki polietileniminin yüksek toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir. Toksisitenin üstesinden gelebilmek için küçük moleköl ağırlıklı polietileniminlerin çapraz bağlarla bir araya getirilerek kullanılması veya yalnızca küçük moleköl ağırlıklı polietileniminlerin kullanılması önerilmektedir (10). Bizim çalışmamızda da 2 kDa moleköl ağırlıklı polietilenimin kullanılacaktır.

Sunulan projenin amacı doğal olarak bitkilerde bulunan ve izole edilmiş, antioksidan, antiviral ve antikanserojen etkisi olduğu bilinen flavonoidlerin pozitif yüklü taşıyıcılar ile in vitro HeLa kanser hücresi ve fibroblast hücresi kültürlerinde etkin

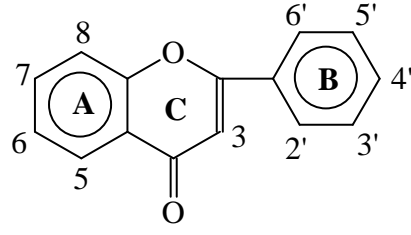
dozda aktarımının sağlanması, kanser hücrelerine ve normal hücelere etkisinin araştırılmasıdır.

Burada hücre içine etkin dozda quercetin (Q) aktarımı sağlanması için quercetin hidrosil (OH) gruplarından kloro asetik asit ile reaksiyona sokularak karboksil gruplu quercetin elde edilecektir. Karboksil gruplu quercetin (KQ) karboksil grupları üzerinden düşük molekül ağırlıklı dallanmış polietileniminin (PEI) amin grupları arasında fizyolojik şartlarda elektrostatik etkileşim ile quercetin/polietilenimin kompleksi oluşturulacaktır. Daha sonraki aşamada, tek başına Q, KQ ve KQ/PEI kompleksi, HeLa ve fibroblast hücrelerine in vitro ortamda aktarılarak etkileri araştırılacaktır.

## 1.2. Flavonoidler

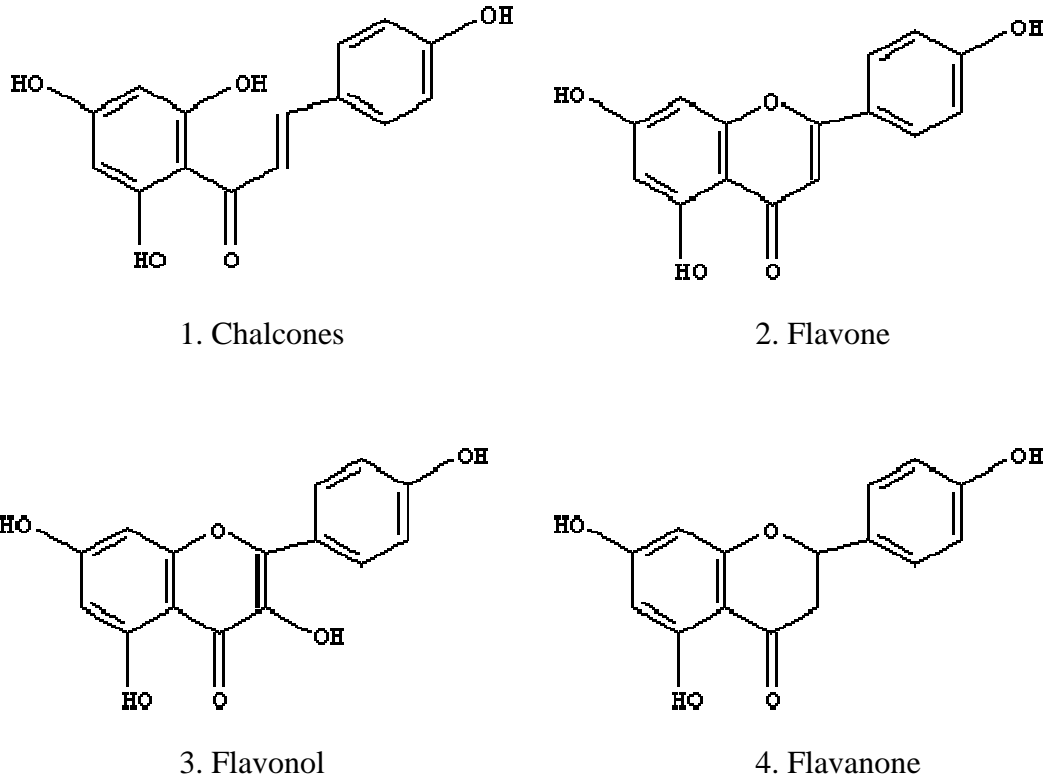
Flavonoidler, tüm karasal bitkilerde bulunan, çiçekli bitkilere renk veren, bitkinin büyüme, gelişme ve savunmasında rol alan sekonder metabolitlerdir. Bu bileşiklerin meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, fındıkta ve çayda bulunduğu bilinmektedir. Flavonoidlerin sayısının 6500'den fazla olduğu bildirilmiştir. Batı toplumunda bir insanın bu bileşiklerden ortalama günlük alımı 200 mg'dan 1 gr'a kadar değişmektedir. Bu fitokimyasalların genel biyolojik aktivitelerini, antiinflamatuar, antialerjik, antiplatelet ve antitümoral olarak belirtilebiliriz. Flavonoidlerin, koroner rahatsızlıklarda, kemik kaybında, yaş ile ilgili rahatsızlıklarda ve özellikle kanserin önlenmesinde koruyucu rol oynayabileceği bilinmektedir (3).

Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren difenilpropan (  $C_6 - C_3 - C_6$  ) yapısı teşkil etmektedir. Flavonoidlerin temel bileşiği flavon benzo- $\gamma$ -piron (kromon) halka sisteminin 2. konumunda bir fenil halkası içermektedir (Şekil 1.1) (12).

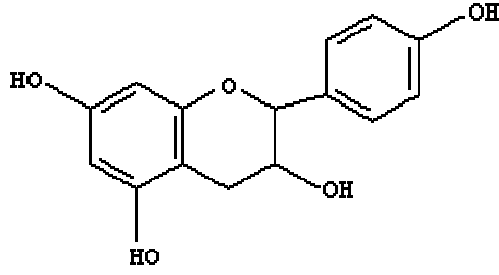


**Şekil 1.1.** Flavon bileşiği

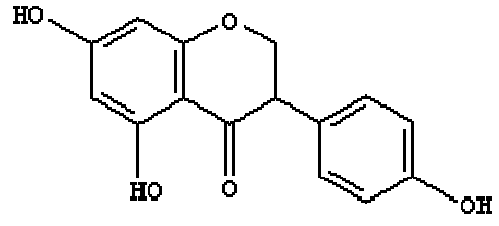
Flavon halka sisteminde C halkası olarak nitelenen  $\gamma$  - piron halkasının büyüklüğü, doymamışlık derecesi ve taşıdığı sübstitüentlere göre flavonoidler farklılaşmaktadır. Flavonoidlerin ana yapısına farklı sayı ve farklı pozisyonlarda -OH grubu eklenmesiyle flavonoidlerin alt sınıfları oluşturulmaktadır. Flavonoidler heterosiklik halkalarındaki çeşitlilik nedeniyle Flavanone, Flavanol, Flavone, Flavonol, Anthosiyanidin ve İzoflavonoid alt gruplarına ayrılmaktadır (Şekil 1.2) (13).



**Şekil 1.2.** Farklı flavonoid türevleri



5. Anthocyanins



6. Isoflavonoids

### Şekil 1.2. (devam)

Doğal flavonoidler 3, 5, 7, 3', 4' ve 5' konumlarından hidroksillenmiş yapıya sahiptir. Glikozitlerde glikozidik bağın 3. veya 7. konumlarda olduğu görülmektedir. Karbonhidrat olarak ise L-ramnoz, D-glukoz, glukoramnoz, galaktoz veya arabinoz taşıdıkları belirlenmiştir (14).

Flavonoid ve izoflavonoidler etanol, metanol ve asetonitril gibi çözücülerde su veya organik çözücülere göre çok daha iyi çözünmektedir. Flavonoid ve izoflavonoidler besinlerde glikozidik konjugatlar halinde bulunmaktadır. Bu glikozidik konjugatlar flavonoid ve izoflavonoidlerin aglycone formuna göre suda daha iyi çözünmektedir. Çünkü aglycone formunda, absorpsiyon öncesi memeli veya mikrobiyal glukozidazlarla şeker kısmının enzimatik olarak ayrılması gerekebilmektedir. Flavonoid ve izoflavonoidlerin fenolik kısmı glukorinidleri oluşturmak için UDP-glukuronosiltransferazlarla, sülfatları oluşturmak için de sülfotransferazlarla konjuge olabilmektedir. Bu glukuronid ve sülfat formları kanda, safrada ve ürinde aglyconlara göre daha kolay taşınmaktadır. Ayrıca, bu konjugatların toksisiteleri aglycone formlara göre daha düşüktür (13).

Flavonoidler hücre yaşamı için önemli birçok biyolojik özelliğe sahiptir. Flavonoidler, hücre döngüsünü, hücre proliferasyonunu ve oksidatif stresi inhibe etmekte, apoptozisi, detoksifikasyon enzimlerini ve immün sistemini indüklemektedirler. Bu biyolojik özelliklerin, kanserin tedavisinde ve önlenmesinde etkili olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla daha iyi anlaşılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar meyve ve sebze tüketimi ile kanser sıklığı arasında zıt bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, flavonoidlerin kanser

riskinin azaltılmasında etkili olduğunu göstermiştir. Hollandalı ve Finlandiyalı bilim insanlarının yaptıkları iki ayrı çalışmada flavonoidlerin kanser ve koroner arter hastalığında koruyucu etkisi olduğu ortaya konmuştur (4).

Çin ve Japonya gibi uzak doğu ülkelerinde, meme, prostat, kolon ve diğer birçok kanserin görülme sıklığı, Avrupa ve Amerika'ya göre daha düşüktür. Bunun nedeni olarak, bu bölgelerdeki beslenme alışkanlığı gösterilmektedir. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla, flavonoid ve izoflavanoid içeriği açısından zengin besinlerin tüketimiyle kanser oranlarındaki azalmanın ilişkili olduğu gösterilmiştir (15).

İn vivo ve in vitro çalışmalarda, flavonoidlerin ve birkaç izoflavonoidin kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır (16-18). Hesperetin, naringein, baicalein, galangin, genistein ve quercetinin insan meme kanseri hücre serisi MDA-MB-435'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, flavonoidler birlikte verildiğinde, daha düşük dozlarda bile hücre proliferasyonunda etkili bir inhibisyon gözlemlendiği belirtilmektedir (19).

İzoflavonoidlerden genistein ve daidzeinin kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkileri vardır. Genisteinin, fare neonatal döneminde, DMBA (dimethylbenz(a)anthracene) ile oluşturulmak istenen meme kanserinin oluşmasını geciktirdiği bildirilmektedir. Bu etkinin, genisteinin östrogen reseptör antagonisti veya agonisti özelliklerinden bağımsız olduğu belirtilmiştir (20).

Quercetin ve rutin flavonoidlerinin azoxymethane (AOM) ile indüklenmiş kolon kanserlerinde displazi ve hiperproliferasyonu inhibe ettiği, tümör insidansını azalttığı saptanmıştır (13).

Flavonoidlerin hücre biyolojik yaşamı üzerine olan tüm etkileri, birbirlerinden farklılık gösteren alternatif yollarla, doza ve zamana bağlı olarak değişebilmektedir. Dolayısıyla her hangi bir flavonoidin etkisini, flavonoid ve kanser hücresinin tipi belirlemektedir.



### **1.2.1. Flavonoidlerin Antikanserojen Özellikleri**

Flavonoidler, G1/S ve G2/M kontrol noktalarında hücre döngüsünü durdurmaktadırlar. Kansere hücrelerinde yapılan in vitro çalışmalarda bu gösterilmiştir (21,22). Zhou vd'leri (1998) tarafından yapılan bir çalışmada genistein, genistin, daidzein, biochanin A'nın değişik konsantrasyonlarda (0 – 50 µg/mL) kemirgen ve insan mesane kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi indüklediği belirtilmektedir (23). Lian vd'leri (1998) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre serisinde, genisteinin (30 µg/mL) p21 up regülasyonu üzerinden G2/M duraklamasını tetiklediği ve apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (24). Ayrıca, quercetin ve apigenin ile ilgili yapılan çalışmalarda, çeşitli kanser hücrelerinde G1/S'te (quercetin, 30, 100 µg/ml) ve G2/M (apigenin, 0 – 80 µg/mL) kontrol noktalarında hücre döngüsünün durdurulduğu, nükleer fragmentasyonun ve nükleer kromatin yoğunlaşmasının meydana geldiği, apoptozisin tetiklendiği bildirilmiştir. Flavonoidlerin bu etkilerinin p53 aktivasyonu ve/veya hücre döngüsü kinazlarının inhibisyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Apigenin (0 – 80 µg/mL), mutasyon açısından birbirinden farklılık gösteren SW480 (mutant Ras ve p53, truncated APC), HT-29 (mutant p53 ve truncated APC) ve Caco-2 (mutant p53 ve truncated APC) kolon kanseri hücrelerine uygulandığında, SW480 hücrelerinde proliferasyonun durdurulmasının ve G2/M noktasındaki blokajın diğer hücrelere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. SW480 hücre serisi kolon kanseri gelişiminde daha etkili olan mutasyonlara sahiptir. Bu durum, flavonoidlerin, belli bir tümörün gelişimine neden olabilecek mutasyonlara sahip hücrelerde daha etkili olabileceğini ortaya koymaktadır (13).

### **1.2.2. Antioksidasyon**

Flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri ve yapı-aktivite ilişkileri birçok çalışmada araştırılmıştır (25). Flavonoidler, oksidatif hasarı inhibe ederek kanser ve/veya kalp rahatsızlıklarının korunmasında etkili olabilmektedir (26). Besinlerde bulunan antioksidanlar, hücre içi oksidasyonu azaltarak, okside moleküllerin mutasyon

oluşturma riskini önleyebilmektedir. Flavonoidler kimyasal olarak bir elektron vericisi olarak görev yapmaktadır. Bu moleküllerin antioksidan etkilerinin taşıdıkları -OH gruplarının pozisyonuna ve sayısına bağlıdır. Quercetin, luteolin ve genisteinin, HL-60 hücrelerinde UV ile indüklenmiş DNA hasarını inhibe ettiği bildirilmiştir (27). Ayrıca, flavonoidler LDL oksidasyonunu da inhibe etmektedir (28). LDL oksidasyonu ile ilgili yapılan çalışma sonucunda, flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin onların proteine bağlanma özelliklerine ve indirgeyici kapasitelerine bağlı olduğu belirtilmektedir (29).

### **1.2.3. Detoksifikasyon Enzimlerinin İndüklenmesi**

HücreSEL detoksifikasyon mekanizması, karsinojenlerin toksik ve neoplastik etkilerine karşı korunmada en önemli mekanizmayı oluşturmaktadır. Faz I ve Faz II enzimleri bu detoksifikasyon mekanizması içerisinde yer alan en önemli enzim grubunu oluşturmaktadır. Hücrenin kanserojen maddelere karşı korunması için Faz I ve Faz II enzimlerinin aktiviteleri arasında bir denge bulunmaktadır. Faz I enzimlerince katalizlenerek bir elektron indirgenmesiyle oluşan serbest radikaller ve toksik metabolitler, Faz II enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla daha polar ve zararsız hale getirilip hücreden kolayca atılmaktadır. Apigenin, luteolin, kampherol, quercetin, myricetin ve naringenin, Faz I enzim ailesinden CYP1A izoformlarının inhibisyonunu sağlarken, genistein, morin, diadzein gibi flavonoidler de Faz II enzimlerinden GST (Glutathione S-transferase) ve QR(NAD(P)H:quinone reductase)'ı indüklemektedir (30).

### **1.2.4. İmmün Fonksiyonunun Düzenlenmesi**

Kanserin önlenmesinde immün fonksiyonun önemi büyüktür. Besinlerde bulunan antioksidan moleküller aracılığıyla konakçının immün sisteminin tetiklenmesi kanser tedavisinin bir parçasını oluşturmaktadır (31). Antioksidan özellikteki flavonoidler herhangi bir fizyolojik uyarı olmadan immün sistemin aktivasyonunu sağlayamamaktadır. Ancak, fizyolojik bir uyarı aracılığıyla immün sistemi aktive

olmuş sistemlere flavonoid uygulamasının immün sistem hücrelerinin aktivasyonlarını artırdığı belirtilmektedir (13). Wang vd'leri (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, daidzeinin (0.01 – 10 µg/ml) varlığında, mitojenle aktive olmuş kemirgen splenosit proliferasyonunun arttığı saptanmıştır (32). Bu bulguların klinik açıdan önemi net olarak bilinmemekle birlikte, daidzein ve genisteinin NK hücrelerinin aktivasyonunda yer aldığı belirtilmiştir (13).

### 1.2.5. Diğer Mekanizmalar

Flavonoidlerin karsinogenez inhibisyonuyla ilgili, yukarıda belirtilenler dışında da bir takım mekanizmalar önerilmektedir. Flavonoidler, kanser hücresinin proliferasyonunu inhibe ederken hücre içi protein fosforilasyonunda da bir takım değişiklikler meydana getirmektedir. Bu değişiklikleri, mitojen aktive protein kinazların inhibisyonu (Apigenin) (21), fosfoinositol 3 kinaz izoformlarının, protein kinaz C ve bunların aşağı elemanlarının bloke edilmesi (quercetin) (33), Topo izomeraz I ve/veya II'nin inhibisyonu (myricetin, quercetin, fisitin, kampherol, luteolin) şeklinde özetlenebilir (34,35). Ayrıca, bazı flavonoidlerin mutajen etki gösterebileceği (quercetin) (5) gibi bazılarının da östrojen agonisti (genistein, daidzein) olduğu belirtilmiştir (36).

Flavonoidlerin son yıllarda üzerinde en çok çalışılan özelliklerinden biri de kanser hücrelerinin gösterdiği çoklu ilaç direncinin (MDR) özelliklerini değiştirmesidir. Kanser hücrelerinde birçok ilaca karşı gelişen direnç nedeniyle kemoterapötik ilaçların tedavi etkinliği zayıflamaktadır. Flavonoidlerin, hücrel direncin kırılmasında önemli rollerinin olduğu artık bilinmektedir (37). Bu tez çalışmasında flavonoidlerin kanser tedavisinde çoklu ilaç direncine karşı gösterdiği etkiler araştırılacaktır.

Yukarıda belirtilen bilgiler ışığında, tek bir flavonoidin kanser tedavisinde tek başına etkili olabileceğini söylemek yanlıştır. Çünkü flavonoidlerin hücre üzerindeki etki yolları birbirinden bağımsız olabileceği gibi, örtüşen veya birbirini tamamlayan da olabilir. Bu nedenle, bu tür etki gösteren moleküllerin birlikte kullanımı veya

alternatif yollarla hücrelere aktarımı kanser tedavisinde alternatif bir yol oluşturabilir.

### **1.2.6. Flavonoidler ve Çoklu İlaç Direnci**

Kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı geliştirdiği çoklu ilaç direnci (MDR, Multi Drug Resistance) kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli problemlerden biridir. MDR, tek bir sitotoksik ajana maruz kalan kanser hücrelerinde, çapraz reaksiyon sonucu, birçok kemoterapötik ilaca karşı gelişen direnç mekanizmasıdır (38). MDR, ATP – bağlanma kaseti (ABC) protein ailesine ait membran proteinlerince düzenlenmektedir. Bu ailenin bilinen ve en çok çalışılan proteinleri, MDR1 genince kodlanan MDR1 (P-glikoprotein) ve MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) genince kodlanan MRP1 proteinleridir. Bu proteinlerin dışında MRP2, MRP3 ve BCRP/MXR1 proteinleri de MDR oluşumunda rol alan proteinlerdir. MDR proteinleri, ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak kemoterapötik ilaçların hücre dışına taşınmasını sağlayan ATPaz'lardır (39).

En önemli MDR proteinlerinden P-glikoprotein (P-gp) plazma membranında lokalizedir. Her bir MDR taşıyıcı proteini, yapısında hidrofobik iki transmembran domaini (TMD) ve iki nükleotit-bağlanma domaini (NBD) içermektedir. TMD, ilacın bağlanmasını ve atılımını sağlarken, NBD, ATP bağlanması ve hidrolizini sağlamaktadır. Proteinin N ve C terminal uçları sitozole bakmaktadır.

P-gp aşırı eksprese eden hücreler, çeşitli ilaçlara (antrasiklinler, antibiyotikler, taxanlar, peptitler, hormonlar) karşı direnç göstermektedirler. Direnç gösterilen bu substratların çoğunun üç ortak özelliği vardır. Bu özellikler, hidrofobisite, büyük hacim ve nötral pH'ta pozitif yüklü nitrojen atomu taşımalarıdır.

MDR proteinleri kanser hücrelerinde aşırı eksprese olmaktadır ve kanser hücrelerinde gelişen MDR aktivitesini ortadan kaldırmak için çeşitli MDR inhibitörleri geliştirilmektedir. Etkili bir kanser tedavisi için, MDR modülatörleri

olarak da adlandırılan inhibitör moleküllerle kemoterapötik ilaçların birlikte verilmesi önerilmektedir (40).

MDR proteinlerinin temel rolü, hücreyi toksik ajanlara karşı korumaktır. Bu proteinler, gastro – intestinal doku, böbrek proksimal tübülü, hepatosit yüzeyi ve kan – beyin bariyeri gibi normal dokularda da eksprese olmaktadır. Bu bölgelerde bulunan MDR proteinleri, vücuda oral yolla alınan ilaçların kandan intestinal lümene salınışlarını düzenleyerek absorpsiyon sınırını belirlemektedir. MDR proteinleri, yapısal olarak ilişkili veya ilişkisiz birçok molekülün (vinca alkaloidleri, etoposidler, taxenler ve antrasiklinler gibi) hücre dışına atılımını gerçekleştirebilir. Ancak, P-gp aracılı direnç mekanizmasını inhibe edebilen moleküller de vardır. Bu moleküllere örnek olarak, verapamil, quinidin, dihidropiridin analogları, kalsiyum kanal blokerleri, kalmodulin antagonistleri, hidrofobik peptidler, protein kinaz inhibitörleri, antibiyotikler, siklosporin A, flavonoidler ve diğer polifenoller verilebilir. Ancak, çoğu MDR modülatörleri de P-gp tarafından hücre dışına atılmaktadır. Bu durumun üstesinden gelebilmek için uygulanan modülatörlerin konsantrasyonunun artırılması, bir takım toksik yan etkilerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Örneğin, verapamil kardiyotoksisiteye neden olurken, siklosporin A immün sistemin baskılanmasına yol açmaktadır. Hormon karakterli modülatörlerin de klinik açıdan risk oluşturabileceği belirtilmiştir. P-gp'e bağlanan ve taşınmayan hidrofobik antiöstrojenik modülatörlerin ovaryum kanser hücrelerinde agonist gibi davrandığı bu yüzden de endometrial kanserler için kullanılmasının şüpheli olduğu belirtilmiştir (40). Kanserde gelişen ilaç direncinin kırılmasında etkili olabileceği düşünülen en önemli modülatörlerden biri de flavonoidlerdir.

Flavanoidlerin hücre içi fizyolojik rolleri yanında, çoklu ilaç direnci proteinlerinden MRP (multi drug resistant protein), BCRP (breast cancer resistant protein) ve P-gp'nin ATPaz aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir. Flavonoid ve izoflavonoidlerin, MDR üzerindeki inhibitör etkileri tiplerine göre dört sınıfta toplanabilmektedir. Bunlar:

a) MDR1, MRP1 veya MRP2 genlerinin ekspresyonunun inhibe edilmesi,

b) Flavonoidlerin taşıyıcı MDR proteinlerin NBD (26), TMD veya steroid bağlanma bölgelerine bağlanması (41), sayılır.

c) Proteinlerin ATP-az aktivitelerinin inhibe edilmesi,

d) MDR1'den bağımsız mekanizmalardır (26).

Flavonoidler, ayrıca plazma membran ATPaz, siklik AMP bağımlı protein kinaz ve protein kinaz C gibi birçok ATP bağlanma proteinlerini inhibe etmektedir (41). Flavonoidlerin düzlemsel yapıları onların P-gp ile ilişkilerini belirlemektedir. Flavonoidler, P-gp'nin ATP bağlanma bölgesine ve hidrofobik steroid bağlanma bölgesine bağlanmaktadır. Flavonoidlerin, proteinlerin ATP bağlanma bölgesine bağlanırken nasıl bir oryantasyon yaptıkları tam olarak anlaşılamamıştır (42).

Kitagawa vd'lerinin (2006), KB-32 MDR insan karsinoma hücrelerinde, P-gp substratı olarak Rhodamine 123 kullandığı çalışmada, yeşil çayda bulunan epigallocatechin gallate (EGCG)'nin, hücre içerisinde Rhodamine 123 birikimini 3.7 kat artırdığı, genisteinin çok az etki gösterdiği ve quercetin'in herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada EGCG'nin Rhodamine 123 birikimine olan etkisinin genisteinden ve P-gp inhibitörü verapamilden daha fazla olduğu belirtilmektedir (43).

Critchfield ve ark.'larının (1994) yaptığı bir çalışmada, quercetin, kaempferol, galanginin HCT – 15 kolon kanseri hücre serisinde, adriyamycin atılımını artırdığı bildirilmektedir (44). Ancak bir başka çalışmada, quercetin kökenli hidrofobik bir maddenin MCF-7 meme kanseri hücre serisinde, Rhodamine 123 atılımını ve hücrelerin MDR fenotipini ortadan kaldırdığı saptanmıştır (8). Yine değişik çalışmalarda, flavonollerin P-gp aşırı eksprese eden hepatositlerde ilaç atılımını inhibe ettiği bildirilirken, genistein BC19/3 (MDR1 transfekte edilmiş MCF – 7 hücreleri) hücrelerinde yüksek konsantrasyonda daunorubicin ve rhodamine 123 atılımını inhibe ettiği saptanmıştır (45,46).

Duraj vd'lerinin (2005) yaptığı bir çalışmada, HL – 60 insan lösemi hücre serisinde ve bu hücrelerinin MDR – 1 dirençli HL – 60/VCR klonlarında quercetin önemli bir takım değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir. Bu hücrelerde quercetin kullanımıyla, G2/M duraklamasının arttığı, Bcl – 2 ekspresyonlarının değiştiği, dirençli hücrelerde MDR – 1 ekspresyonunun azaldığı, apoptoza gidişin tetiklendiği ve p21 düzenlenmesinde her hangi bir değişikliğin olmadığı bildirilmiştir. Görülen bu etkilerin, aynı hücrelere apigenin ve luteolin verildiğinde saptanmadığı belirtilmektedir (26). Ancak, bir başka çalışmada ise, prostat kanseri hücrelerinde apigenin ve luteoninin p21 ekspresyonunu artırırken, quercetin herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (47).

Bu çalışmalar, flavonoidlerin MDR üzerindeki etkilerinin flavonoidlerin kimyasal yapılarına bağlı olduğunu göstermektedir. Kimyasal yapıları incelendiğinde, flavononların ve flavanollarin C halkasında 2. ve 3. pozisyonlar arasında çift bağ olmadığı, A ve C halkalarının B halkası ile ilişkisinin flavonol ve flavonollerden farklı olduğu görülmektedir. Flavoneller ve flavonoller 2. ve 3 pozisyonda çift halkaya sahiptirler. Bu çift halkalar flavoneller ve flavonollar için önemlidir. Bu moleküller daha düzlemsel yapıya sahip oldukları için P-gp'nin hidrofobik aminoasitleriyle daha kolay etkileşime girebilirler. Bu bağın, flavonoidlerin MRP1 ve MRP2 ile olan etkileşimi için de önemli olabileceği önerilmiştir (40).

Flavonoidlerin hidrofobik özellikleri, onların inhibitör etkilerini belirleyen bir diğer önemli noktadır. Flavonoidlerin P-gp'nin NBD2 parçasına bağlanmasında ve proteinin direnç aktivitesinin inhibisyonunda hidrofobik özellik kritik bir parametredir. Hidrofobik etki, flavonoidlerin taşıdığı -OH gruplarının sayısına ve pozisyonuna bağlıdır. Polifenollerin hidrofobik kısımlarının P-gp'lerle etkileşiminde önemli olabileceği bildirilmiştir (43). Ancak hidrofobik özellik tek başına P-gp ile olan ilişkiyi belirlemede yeterli değildir.

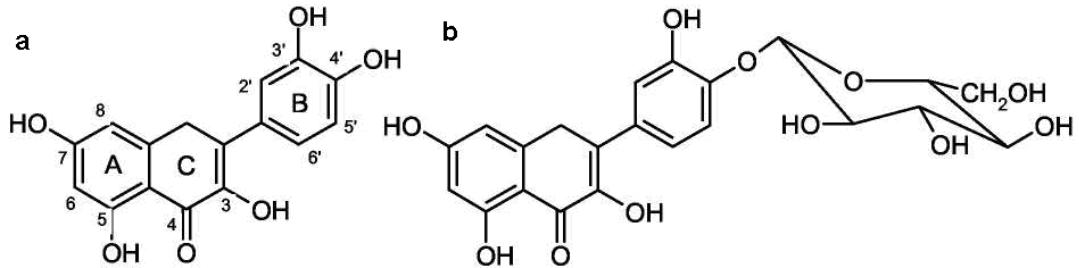
Flavonoidlerin MDR üzerindeki etkilerinin birbirlerinden farklı ve çok boyutlu olduğu anlaşılmaktadır. Flavonoidlerin kimyasal yapısı, hidrofobisiteleri, düzlemsel yapıları ve P-gp üzerindeki bağlanma bölgelerinin farklılığı onların MDR üzerine olan etkilerinde temel rol oynayan özelliklerdir (40,43). Flavonoidlerin biyoyararlılığı

sınırlıdır ve bu yüzden plazma konsantrasyonları çok düşüktür. MDR üzerinde flavonoidlerin sinerjistik etkilerinin değerlendirilmesi daha anlamlı olabilir (43).

Bu tez çalışmasında flavanoid olarak kullanılacak olan quercetin MDR fenotipi pozitif hücre serilerindeki etkileri araştırılacaktır.

### 1.3. Quercetin

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), doğada yaygın olarak bulunan flavonoidlerden biridir (3,5). Flavonoidlerin flavonol grubundadır. Yapısında 3,3',4' ve 5,7 pozisyonlarında -OH grubu bağlıdır (Şekil 1.3.a,b). Quercetin 3. ve 4. pozisyonlarda bir şeker grubu içeren iki farklı formu vardır. Quercetin 3. pozisyonda şeker grubu içeren 3-O- $\beta$ -glucosid formu 4. pozisyonda bir şeker grubu içeren 4'-O- $\beta$ -diglukosid formuna göre doğada daha yaygın olarak bulunmaktadır (6).



Şekil 1.3.a. Quercetin yapısı b. Quercetin 4'-O-  $\beta$ -D glukosidin yapısı

Quercetin Bileşiğinin Fiziksel Özellikleri:

Formülü	: C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
Molekül Ağırlığı	: 302,24 g/mol
Çerin	: % 65,19 C, % 3,34 H ve % 37,06 O
Safılığı	: $\geq$ 95%
Erime noktası	: 314 °C
uv maksimum	: 258, 375 nm (etanol)



Görünümü : Hardal sarısı renkte katı toz  
Çözünürlüğü : Alkolde çözünür. Suda hemen hemen hiç çözünmez.  
Asetik asit çözeltisinde yoğun sarı renk vererek çözünür.  
Saklama Koşulları : Güneş ışığından koruyarak +4 °C'de saklanmalıdır.

Quercetin, genellikle elma, çilek, kiraz, soğan ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır. Flavonol grubunun bir üyesi olan quercetin, toksik değildir ve hücre fizyolojisi açısından birçok önemli fonksiyona sahiptir. Quercetinin, antiproliferasyon, antioksidan, antiülser, apoptoz indüklenmesi, protein kinaz C inhibisyonu, lipooksijenaz inhibisyonu, hücre siklusu düzenlenmesi, anjiyogenez inhibisyonu, antialerjik ve antikanser özellikleri bulunmaktadır (5,36). Avrupa, ABD ve Asya'da yaşayan halkın günlük quercetin alımı 4 – 68 mg arasında değişmektedir. Quercetinin MDR ailesi üyelerini (P-gp, MRP1, BCRP) inhibe ettiği bildirilmiştir (8,9). Quercetin MDR proteinlerinin ATPaz bölgelerini tanımaktadır. Hücre içi serbest radikalleri ortadan kaldırabileceği ve çeşitli moleküllerin oksidasyonunu engelleyerek in vivo ve in vitro antioksidan aktivite gösterebileceği belirtilmektedir (3).

Oral yolla alınan quercetin absorpsiyon oranı % 20 dolaylarındadır. Quercetin antikanser aktivitesi için, serum konsantrasyonunun ortalama 10 µM olması gerektiği belirtilmiştir. İnsanda, 100 mg tek doz quercetin serum konsantrasyonu 0.8 µM olduğu için antikanser aktivite için 1500 mg günlük dozun alınması gerektiği önerilmektedir. İnsanda, 4 gr'a kadar olan quercetin alımının yan etkisi yoktur.

Quercetin en mutajenik flavonoiddir. Ancak bu mutajenik etkisinin karsinogenetik etkisi yoktur. Quercetin kanser hücre serilerinde mutant p53 ekspresyonunu azalttığı ve hücre döngüsünde G2/M ve G1 duraklamalarına neden olduğu saptanmıştır.

Tirozin kinaz aktivasyonunu inhibe eden quercetin, insanlarda Faz I çalışması yapılan ilk flavonoiddir. Quercetin, Tip I östrojen reseptör pozitif ve negatif meme kanseri hücre serilerinde, östrojen reseptör II (ER II)'nin bağlanma bölgesi ekspresyonunu artırdığı ve ER II'ye bağlanarak büyümeyi inhibe ettiği bildirilmiştir.

Ayrıca quercetin'in insan melanom hücrelerinde ER II'ye tamoksifen ve dietilsilbestrol ile aynı afinitede bağlandığı saptanmıştır. Quercetin'in, çeşitli in vitro çalışmalarda, heat-shock proteinlerini ve mutant ras onkogenini inhibe ettiği de gösterilmiştir. Quercetinle yapılan in vitro çalışmalarda, quercetin'in dozaj kullanım aralığı 7 nM – 100 µM arasında değiştiği gözlenmiştir (5).

Flavonoidlerin fizyolojik etkileri üzerine yapılan in vitro çalışmalarda, flavonoidler kültür besiyerinin içerisine eklenerek hücre kültürüne sunulmaktadır. Bu çalışmada kullandığımız quercetin'in hücre kültürü ortamında kullanılan dozu 10 µM ile 100 µM arasında değişmektedir. Quercetin'in etkisi doz miktarına ve zamana bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada, quercetin polikatyonik polimerlere bağlanarak hücre kültürüne sunulmuştur. Polikatyonik bileşiklerle kompleks oluşturulmuş quercetin, in vitro ortamda BCR-ABL + ve kemoterapötik ajan Gleevec'e dirençli hücre serilerine aktarılarak, bu hücre serilerinde direnç fenotipinin ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır.

#### **1.4. Polikatyonik Bileşikler ve Polietilenimin (:PEI)**

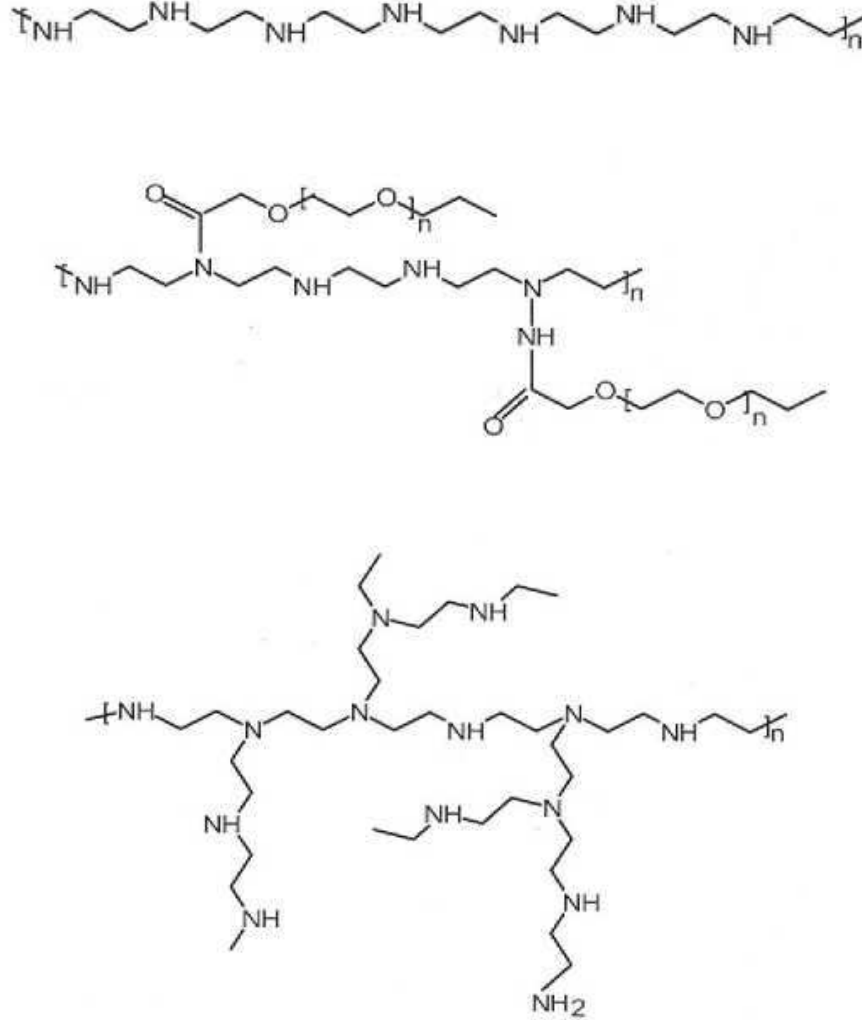
Gen tedavisi viral ve viral olmayan vektörler aracılığıyla yapılmaktadır. Viral vektörlerin kullanımı viral olmayan vektörlerin kullanımına göre daha yaygındır. Kullanılan gen tedavi yaklaşımlarının birbirlerine göre üstünlükleri ve dezavantajları bulunmaktadır. Viral vektörlerin kullanımıyla ilgili olarak biyogüvenlik tehdidi ön plana çıkmaktadır. Viral olmayan vektörler patojenik ve immünojenik değildir. Ancak transfeksiyon yetenekleri düşüktür (48). Bu nedenle, son yıllarda viral olmayan vektörlerin kullanımı ve bunların geliştirilmesi yaklaşımının arttığı görülmektedir. Polikatyonik bileşikler aracılığıyla biyolojik moleküllerin transferi tercih edilen yaklaşımlardan biridir. Polikatyonik bileşikler hazırlanabilmeleri ve saflaştırılmalarının kolay olması, kimyasal modifikasyona açık olmaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Polikatyonik bileşiklerin DNA ve diğer moleküllerle olan etkileşimi elektrostatik denge üzerine kuruludur. Polikatyonik bileşik+DNA kompleksi (+) yüklüdür ve iki molekül arasındaki bu pozitif negatif yük oranı büyüdükçe katyonik kompleksin hücreye transferi daha kolay olmaktadır.

Polikationik bileşiklerin zayıf transfer etkisinin de bu elektrostatik dengeden kaynaklandığı düşünülmektedir. Polikationik bileşiklerle biyolojik molekül transferinde birinci basamak, polikationik bileşiğin DNA ile kompleks oluşturmasıdır. Bu kompleks hücre membranına göre daha pozitif yüklü olduğu için hücre membranından içeri endositozla girmektedir. Kompleksin endozom aktivitesinden kaçması gerekmektedir. Bunun için, fizyolojik şartlarda düşük pK değerli kationik bileşikler kullanılması önerilmektedir. Bu tür kationik bileşikler proton sponge adı verilen mekanizmayı kullanmaktadır. Bu mekanizmaya göre, kationik bileşik protonları amin gruplarına bağlamaktadır ve ardından organel içerisine salmaktadır. Polimerin, amin gruplarına proton bağlaması polimerin şişmesine neden olmaktadır. Ayrıca, endozom içinde yük farkı meydana gelmemesi için Cl<sup>-</sup> iyonları endozoma taşınmaktadır. Proton ve Cl<sup>-</sup> iyonları endozomun osmolaritesini arttırmakta ve böylece endozoma su girişine neden olmaktadır. Polimerin ve endozomun şişmesi endozomun parçalanmasına ve polikationik+DNA kompleksinin salınımına neden olmaktadır (10). Bu kompleks nukleusa birlikte girmektedir. Etkili bir transfeksiyonun, hücrelerin döngüsüne ve mitotik indekslerine bağlı olduğu bildirilmiştir (48).

Polietilenimin (PEI) farklı hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde oligonükleotidlerin ve plasmid DNA'nın hücre sitozolüne geçişinde etkili rol oynayan sentetik polimerler grubunun bir bölümünü teşkil etmektedir. Lineer ve zincirli şeklindeki polietilenimin (PEI) DNA'yı nanoparçacıklara dönüştürmektedir. DNA kondenzasyonunda ve transfeksiyon etkinliğinde polietileniminin kullanılan şekli ve moleküler ağırlığı rol oynamaktadır. Fizyolojik pH'da PEI/DNA bileşiklerinin endozomal degradasyonu daha kolayca aşabildikleri gösterilmiştir. Ancak, bu nanopartiküllerin çok düşük olan çözünürlüğü gen naklinde kullanımları kısıtlamıştır (49).

Sentetik polimerler içerisinde en fazla tercih edilen polikationik bileşik polietilenimin (PEI)'dir. Yukarıda anlatılan endozom kaynaklı süreç, polietileniminin yüksek transfeksiyon kabiliyetini açıklamak için önerilmiştir. Kationik bir

polielektrolit olan polietileniminin lineer, dallanmış ve dendrimerik formu bulunmaktadır (Şekil 1.4).



**Şekil 1.4.** Lineer, zincirli ve polietilen glikol ile konjuge edilmiş polietileniminler

Bu çalışmada dallanmış PEI kullanılmıştır. Dallanmış PEI ile oligonükleoit, plazmid DNA, RNA aktarımı ile ilgili yapılan çalışmalar bulunmaktadır. PEI sahip olduğu amin grupları sayesinde DNA kondenzasyonuna neden olmaktadır. Polietilenimin hücreye endozom reseptör aracılığıyla, fagositoz ve pinositozla alınmaktadır. Böylece, polietileniminle yapılan DNA transferinde daha kondanse olan DNA, DNAaz enzimlerinden korunmakta ve etkili bir transfer olanağı sağlamaktadır. Etkinliği viral vektörlere göre düşük olan PEI ile gen transferinin en

önemli dezavantajı yüksek toksisiteye neden olmasıdır. Ancak etkinlik ve toksisite hakkında net bilgi halen bilinmemektedir (11). Toksisitenin PEI'nin molekül ağırlığıyla ilişkili olduğu ve 25 kDa molekül ağırlığındaki PEI'nin yüksek toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir. Toksisitenin üstesinden gelebilmek için küçük molekül ağırlıklı PEI'lerin çapraz bağlarla bir araya getirilerek kullanılması veya yalnızca küçük molekül ağırlıklı PEI'lerin kullanılması önerilmektedir (10). Bu çalışmamızda da 2 kDa molekül ağırlıklı PEI kullanılmıştır.

### **1.5. Kanser**

İnsan vücudu trilyonlarca hücreden oluşmaktadır. Büyüyebilmek, ölü hücreleri yenilemek ya da yaralanma sonucu zedelenmiş hücreleri onarmak amacıyla, sağlıklı vücut hücreleri istisnalar dışında bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Genler, hücrelerin işlevlerini yönlendiren parçalardır. Hücreler, bazı genlerden aldığı bilgi ve komutlara uygun olarak çoğalırlar. Fakat bu genetik yetenekleri sınırlıdır ve mütemadiyen bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır ve sağlıklı bir hücre gerektiği yerde ve gerektiği kadar bölüneceğini bilir. Bu olaya fizyolojide kontakt inhibisyon kuralı denir.

Kanser, yaşanan çevrede karşılaşılan ve/veya hücrede ortaya çıkan, fiziksel kimyasal ya da biyolojik etkenlere maruz kalınması nedeniyle normal hücre DNA'sının değişime uğraması sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Normal hücre DNA'sının değişime uğraması mutasyon olarak adlandırılır (50). Ölüm oranlarında % 23.3 ile ikinci sırada yer alan ve 100'den fazla değişik türü olan kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz olarak aşırı şekilde çoğalıp, vücudun çeşitli bölgelerine dağılmaları şeklinde de ifade edilebilir. Normal olarak hücreler ancak organizma onlara gerek duyduğunda çoğalırlar. Bu durum organizmanın belirli bir düzen içerisinde gelişmesini ve böylece sağlıklı kalmasını sağlar. Hücreler gerek olmadığı halde bölünüp, çoğalırlarsa o bölgede bir doku kitlesi oluşur. Fazladan oluşan bu kitle tümör (ur) olarak adlandırılır. Bu kitleler benign (selim) veya malign (habis) olabilirler. Benign (selim) tümörler kanser değildir. Onlar komşu dokulara ve vücudun diğer organlarına yayılmazlar. Benign tümörler genelde vücuttan

çıkarılabilirler. Malign (habis) tümörler kanser olarak adlandırılırlar. Bu tümörler komşu doku ve organlara sıçrayıp, onlara zarar verebilirler. Kanser hücreleri kanserli dokudan koparak kana karışabilirler veya lenf yollarına girebilirler. Kanser yayılması ve vücudun diğer bölgelerinde tümör oluşması bu yolla olmaktadır. Kanser yayılması ve yayılması metastaz olarak adlandırılır. Kanser vücudun diğer bir bölgesine yayıldığında, o bölgede yayıldığı yerdeki türden bir tümör oluştururlar ve aynı adla anılırlar (51,52).

Normal bir hücrenin malign transformasyon süreci kabaca inisiyasyon ve promosyon olmak üzere iki aşamadan oluşur. İnisiyasyon, hücrede tamiri imkansız DNA hasarı oluşmasına karşın hücrenin apoptozis adı verilen programlanmış hücre ölümüne gidemediği bir durumdur. Hücrede DNA hasarı olduğunda hücre ya bunu tamir eder ya ölümü seçer ya da hücresel döngüsünü durdurur. Hücresel döngü, sırasıyla G0, G1, S, G2, M fazlarından oluşmaktadır. Bu dönemlerin arasında hücre her şeyin yolunda olup olmadığını kontrol eder ve uygunsa o zaman bir sonraki döneme geçer. En önemli aşama G1'den S'e geçiştir. Çünkü hücre DNA'yı sentezlemeden önce DNA'nın bütünlüğü sağlanmalıdır. Bu sağlanmadan S dönemine geçerse kontrolsüz hücre büyümesi ortaya çıkar. Mesela iyonizan radyasyon G1'den S fazına veya G2'den M fazına geçişi durdurmaktadır (53).

Kanserler, hücresel genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak hücre proliferasyonunun kontrolünün kaybolması sonunda ortaya çıkmaktadır. Hücre üreme ve gelişmesindeki bu bozukluklardan, en az 40 hücresel genin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu bozukluklar, iki temel gen grubunda ortaya çıkan mutasyonlarla olmaktadır. Bunlardan stimülatör genler, hücre üremesini stimüle ederler. Bu genlerin hiperaktif olarak çalışması kansere neden olmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlar dominanttır. İkinci grup olan inhibitör genler ise hücre üremesini inhibe ederler. Bu genlerin baskılanması ya da kapanması kansere neden olmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlar ise resesiftir.

Karsinogenez çok faktörlü ve çok basamaklı bir olay olup, normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için çok sayıda genetik değişikliklerin olması gereklidir. Bunlar arasında; nokta mutasyonları, translokasyonlar, gen amplifikasyonları,

hücrel onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin (antionkogen) inaktivasyonu gibi mekanizmalar yer alır.

Hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını kontrol eden normal hücrel genler mevcuttur. Bunlardaki regülasyon bozukluğu ya da değişimler onkogenlere dönüşmelerine neden olmakta ve kanser gelişimiyle sonuçlanmaktadır. Onkogenler regülatör elementlerden yoksundurlar. Onkogenlerin kodladığı proteinler onkoprotein adını alırlar. Büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, sinyal iletim proteinleri, nükleer regülatör faktörleri, hücre döngüsü proteinleri onkoproteinlerdir. Rb (retinoblastoma) geni ve P53 geni gibi antionkogenlerin (tümör süpresör genler) kodladığı proteinlerin normal fonksiyonu, hücre döngüsünün ilerlemesini ve hücre bölünmesini inhibe etmektedir. Bunlardaki mutasyonlar resesif özellik göstermektedir (54).

Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve diferansiasyon gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Kanser gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur. Ayrıca, bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (55).

Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır (56). Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır. İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin % 20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır (57). Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır.

Sinyal iletiminde yer alan moleküllerin ve sinyal yollarının karsinogenezdeki rollerinin ortaya konması ve bu yollara özgül inhibitör ajanlar ile yapılan klinik çalışmalar, kanser tedavisinde yeni ufukların açılmasını sağlayabilir. Bu yaklaşımların ortak hedefi, en etkin kanser tedavisine ulaşmaktır (58).

## **1.6. Kanser Tedavisi**

Kanser hastalıkları, insanların yaşam standardını olağanüstü etkileyen ve hatta onların ölümüne yol açabilen en önemli rahatsızlıklardan biri olarak önemini korumaktadır. Kanser tedavisinde çok farklı yöntemler kullanılmakla birlikte kesin bir sonuç elde edilememiştir. Tedavide kullanılan bazı yöntemler aşağıda verilmiştir (59).

### **1.6.1. Radyoterapi**

Radyoterapi, radyoaktif ışınlarla tedavi demektir. Radyasyon, cerrahi müdahaleden önce kanserli bir tümörün küçültülmesi için, cerrahi müdahaleden sonra geriye kalan kanser hücrelerinin büyümesinin durdurulması veya antikanser ilaçları ile ölümcül bir durumda olan bir tümörün ortadan kaldırılması için kullanılabilir. Radyasyon özellikle lenf düğümleri veya ses tellerindeki habis tümörler gibi belli lokalize kanser çeşitlerinin tedavisinde etkilidir.

Radyasyon tedavisi, Co-60 ya da Lineer Hızlandırıcı gibi cihazlar aracılığıyla vücudun dışından radyoterapi veya vücut boşlukları ya da doku içine radyoaktif maddelerin yerleştirilmesi yoluyla içeriden radyoterapi gerçekleştirilir.

Radyoterapide kanser hücrelerinin bölünmesini engellemek amacıyla yüksek enerjili X ışınları kullanılır. Radyoterapi esnasında, uygulanan bölgeye X ışınları ile belirli oranda bir enerji verilmektedir. Hedef; hücrelerin genetik materyalin moleküler yapısını bozarak, bölünmelerini engellemektir. Radyasyon kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücreleri de yok etmesine rağmen sağlıklı hücreler kendilerini tamir



ederek tekrar fonksiyonel hale gelebilirler. Ameliyatlarda olduğu gibi radyoterapi de lokal bir tedavi olup sadece uygulanan bölgedeki hücreleri etkiler. Radyoterapi cilt, beyin, meme, prostat ve rahim kanseri tedavilerinde etkin olarak kullanılmaktadır.

#### **1.6.1.1. Radyoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar**

Radyoterapinin amacı kanserli hücreleri yok etmektir, ama bu arada tedavi alanı içinde kalan sağlıklı hücreler de etkilenmektedir. Radyoterapi bazen kan yapıcı sistemin ürettiği hücreleri etkileyebilir. Erişkin bir insanda kan hücrelerinin yapımı özellikle kemik iliği dokusunda gerçekleşir. Dolayısıyla radyoterapi alanı dahilindeki kemik dokusu hacmi arttıkça (omurga, kalça kemiği gibi) kanla ilgili yan etki riski de artar. Radyasyon tedavisinin uygulandığı her bölgede cilde ait birtakım yan etkiler gelişebilir. Bu yan etki riski, uygulanması planlanan toplam doz yükseldikçe artar. Yani daha çok 5 – 6 hafta süren uzun süreli tedavilerde ve tedavinin ileri dönemlerinde görülür. Koltuk altı, boyun gibi cilt dokusunun ince olduğu bölgelerde, anüs bölgesi, ağız içi gibi mukoza dokularında bu tip yan etki riski daha fazladır. Cilde ait yan etkiler, üzerine basmakla solan hafif kızarıklıklarla başlar (güneş yanığı gibi) ve sulu, açık yaralara kadar gidebilmektedir.

Radyoterapi sonrasında hastada uygulanan bölgeye yakınlığına göre yutma zorluğu, bulantı, kusma, iştahsızlık, ishal, öksürük gibi geçici bazen de uygulama dozuna göre nefes darlığı ve akciğer yetmezliği gibi kalıcı hasarlar oluşabilmektedir.

#### **1.6.2. İmmünoterapi**

Vücuttaki immün sistem, yabancı madde olarak adlandırılan maddelere karşı denetleyici bir sistem olarak hareket eder. Örneğin bir organ bağışçısından nakledilen bir organın varlığına verilen immün yanıt, bu organın reddedilmesi şeklinde olabilir.

Kanser hücreleri de yabancı olarak kabul edilirler. Yıllardan bu yana araştırmacılar kanser hücrelerine karşı doğal immün reaksiyonu artırmaya çalışmaktadırlar. Böylesi bir metot bir tedavi metodu olarak kullanıldığında, bu tekniğe immünoterapi denir. Beyaz kan hücreleri (lökosit) tarafından normal olarak üretilen ve lenfokinler olarak bilinen biyolojik aktif maddelerin kullanımı immünoterapiye dahildir. En iyi kanıtlanmış olan immünoterapi aktif maddesi, viral bir enfeksiyona cevap olarak vücut tarafından üretilen interferonlardır.

Araştırmacılar son zamanlarda interferon alfa denilen bir interferon çeşidi ile birkaç çeşit kanserin kontrol altına alınmasında başarı elde etmişlerdir (60). Özellikle interferon nadir görülen ve saçaklı hücreli lösemi olarak bilinen kanser rahatsızlığı olan kişilerde dikkate değer gelişmeleri ortaya çıkarmıştır. Bu, aynı zamanda belli tipte lenf dokusu kanserleri karşısında sınırlı yararları da ortaya çıkarmaktadır.

#### **1.6.2.1. İmmünoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar**

İmmünoterapi sonrası enjeksiyon yerinde meydana gelen bir takım kızarıklık ve şişmeler gibi lokal tepkiler gözlemlenmiştir. Daha az görülmekle birlikte, hırıltılı solunum, burun ve boğazda kaşıntı, burun tıkanıklığı ve/veya burun akıntısı, koroner damar yetersizliği, öksürük, deride kızarıklık ve kaşıntı, soluk darlığı, göğüste sıkışma duygusu, dudaklarda ve göz kapaklarında şişme ve yutkunma zorluğu gibi yan etkiler de bildirilmiştir (61).

#### **1.6.3. Kemoterapi**

Kanser hücrelerini tahrip eden kimyasal (kanseri) ilaçları kullanılarak yapılan tedaviye kemoterapi denir. Bu tedavilerde kullanılan ilaçlara antikanser ilaçlar da denir. Kanseri türüne göre kemoterapinin amaçları farklılaşabilmektedir.

a) Kanseri tedavi etmek; kanser hücrelerine ait izler tümüyle ortadan kalktığına kanser tedavi edilmiş sayılır.

b) Kanseri kontrol etmek; genel olarak kanserin yayılımını önlemek ve büyümesini yavaşlatmak, kanserin kontrol altında tutulması olarak kabul edilir.

c) Kanserin yol açtığı belirtileri gidermek, bazı kemoterapi uygulamalarının temel amacı hastanın yaşam niteliğini yükseltebilmek için ağrı ve benzeri belirtileri ortadan kaldırmak ya da hafifletmektir.

Bazen kanser hücreleri, tümörden ayrılarak kan dolaşımı veya lenf damarları yoluyla vücudun başka bir yerine gidebilirler. Kanser hücreleri vücudun başka bölümlerine ulaştığında orada yerleşerek yeni tümörler oluşturabilmektedir.

Kemoterapi ilaçları kana karışarak tüm vücuttaki kanser hücrelerine ulaşırlar ve bu hücreleri kanser hücresinin kendi kendine bölünmesini ve yenilenmesini engelleyerek etki ederler. Böylece ilaçlardan etkilenen kanser hücreleri zarar görür ve ölürlür.

### **1.6.3.1. Kemoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar**

Bu yaygın kullanıma rağmen kemoterapi ile uygulanan ajanların tedavi edilmesi gereken bölgeye ulaştırılmasındaki güçlükler, tolere edilmeleri oldukça zor olan toksik ajanların kullanılması, değişik yan etkiler, ilaç direnci gelişimi ve gelişen tümöral dokuların heterojen dinamik biyolojik yapıda oluşları gibi nedenlerle tedavideki başarı verimi oldukça düşük olmaktadır. Burada sözü edilen ve sıklıkla karşılaşılan yan etkiler; bulantı, kusma, saç dökülmesi, ağız ve diş eti problemleri, enfeksiyon ve anemi vb. şeklinde sıralanabilmektedir (62).

## **1.7. Teşhis ve Tedavide Hedefleme Çalışmaları**

Uzun yıllardır ilaç alanındaki çalışmaların başlıca amacı yeni ürünler geliştirmek veya çeşitli hastalıkların tedavi edilebilmesinde kullanılan ilaçları yenilemek olmuştur. Ancak yapılan araştırmaların çok zaman alması, ekonomik ve etik sınırlamaları ve özellikle beklenen sonucu vermemesi araştırmacıları yeni arayışlara itmiştir. İlaç dozunu azaltma, dozlama aralığını uzatma, yan ve zararlı etkileri daha da azaltma ve ilacı hedef bölgeye yönlendirme çalışmaları bu amaca yöneliktir. Son yıllarda hedefli ilaç taşıyım sistemleri hedefli dokuya olan doğrudan taşıyımaları, ilaçların terapötik alandaki kullanım yelpazelerini genişletmiştir. Ayrıca ilacın kullanılan efektif dozundaki ve hedefli olmayan bölgelerde ilaç konsantrasyonundaki azalış (yan etkileri azaltmak için önemli), ilaç toksikliğinin bu sistemler içerisinde azaltılabilmesi ve eşit plazma konsantrasyonlarında terapötik etkisinin geliştirebilir olması da diğer etkenlerdendir (63,64). Tüm bu özelliklerin azaltılmasında ve geliştirilmesinde en fazla rol oynayan ilaç taşıyıcı partiküler sistemlerdir. İlaç taşıyıcı sistemler; bir bileşenin bir başka kimyasal ile bir ilaç uygulama aygıtı ile ya da ilaç uygulama süreci ile salım hızını, dokulara salımı ya da her ikisini de kontrol eden sistemler olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda pek çok yeni ilaç taşıyıcı polimerik sistem geliştirilmiştir. İlaç taşıyıcı olan ve salımı kontrol eden partiküler sistemler şunlardır: mikrokapsüller, mikroküreler, nanopartiküller ve lipozomlardır (65,66).

### **1.7.1. Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistemler**

İlaçların hedefli olarak gerekli bölgeye ve gerekli olduğu kadar iletilebilmesi için spesifik olarak tasarlanmış taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi; hem tedavi etkinliğini arttırmak hem de antikanser ajanların sistemik toksisitesini azaltmak yönünden kazançlı olacaktır. Bu nedenle kanserin hastaları öldürmesinden önce söz konusu sistemlerin hızla geliştirilebilmesi büyük önem taşımaktadır (67).

Tümöral dokuya ulaşan kan damarları yoluyla hedeflenen bölgeye manyetik özelliğe sahip olan nanotaşıyıcıların yüzeyinde bulunan tümöre özel ligandlar sayesinde taşınır. Hedeflenen bölgeye ya da dokuya ulaşıldığında taşıyıcıya yüklenen etken

madde (örneğin; antineoplastik ajan veya diğer biyomoleküller) kanser hücreleri tarafından endositoz yoluyla alınır ve etken madde etkinlik göstererek tedavi gerçekleştirilir. Bir diğer alternatif tedavi rejimi ise, manyetik nanotaşıyıcı hedeflenen tümör dokusuna ulaştıktan sonra -ki bu ulaşım MRI sistemiyle kolaylıkla teyit edilebilecektir- canlı sistem dışından uygulanacak olan dış manyetik alan yardımıyla manyetik nanotaşıyıcılar içerisinde yer alan birimlerin moleküler hareketiyle ısı bir değişim, yani lokal sıcaklık artışı sağlanabilir. Klinikte hipertermi tedavisi olarak adlandırılan bu tedavi rejimi ile sadece kanser hücreleri yok edilmiş, sağlıklı hücre ve dokulara zarar verilmemiş olacaktır.

Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen yeni nesil tedavi edici ajanlar ve stratejiler sırasıyla; mikrokapsüller, mikroküreler, antibadiler, immünotoksinler, şimerik proteinler ve nanotaşıyıcılar ile antikanser ajanların taşınması şeklinde özetlenebilmektedir.

### **1.7.2. Mikrokapsüller**

Mikrokapsüller, bir çekirdeğin çeperle kaplanması sonucu oluşan dozaj şeklidir. Mikrokapsülleme ise katı, sıvı ve gazın inert polimerik bir madde ile film halinde kaplanması işlemidir. Genel olarak etkin madde çekirdek, kaplama maddesi ise çeper adını almaktadır. Çekirdek maddeleri olarak; etkin maddeler (antibiyotikler, antihistaminikler, vitaminler), proteinler, hormonlar, enzimler ve boyalar kullanılmaktadır. Çeper maddeleri olarak ise; doğal ve sentetik hidrofilik ve hidrofobik özellikteki polimerler kullanılmaktadır. Mikrokapsüller biyoteknoloji, fotoğrafçılık, ziraat, farmasötik alanlarda kullanılmaktadır. Farmasötikte; ilacın salımı ve tozların akış özelliklerinin geliştirilmesinde uygulanmaktadır.

### **1.7.3. Mikroküreler**

Çapları birkaç  $\mu\text{m}$ 'den birkaç yüz  $\mu\text{m}$ 'ye kadar çıkabilen, monolitik yapıda mikro taşıyıcılardır. Mikrokürelerin başlıca özellikleri; etkin maddeyi kontrollü bir şekilde

salması, etkin maddenin yapı ve aktivitesini değiştirmemesi, etkin maddeyi hedef organ, doku ve hücreye taşıması, in vitro ve in vivo koşullarda dayanıklı olmasıdır.

Mikroküreleri hazırlamada kullanılan sentetik ve doğal polimerler, PEG, stiren, albumin, protein, karbonhidratlardır. Mikroküre hazırlama yöntemleri ise emülsiyon polimerizasyonu, çözücü buharlaştırma yöntemi gibi yöntemlerdir.

Mikroküreler farmasötik uygulamalarının yanı sıra, lokal anestetikler, ortopedik implantlar gibi birçok değişik alanlarda da kendisine uygulama sahaları bulmuştur.

#### **1.7.4. Nanotaşıyıcılar**

Yeni nesil tedavi edici ajan uygulamaları nanoteknoloji ürünü olan kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler ya da akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Söz konusu taşıyıcılar genellikle uygun polimerik matrikslerden üretilen nano ölçekli partiküllerden oluşan sistemlerdir. Bu sistemleri akıllı kılan belirtilen taşıyıcıların hazırlanmasından sonra hedeflenecekleri tümöral bölgede yer alan uygun reseptörleri tanıyacak olan ligandlar ile donatılmış olmalarıdır. Bu mantık ile hareket edecek olan taşıyıcılar hücresel mekanizmayla hareket edecekleri için özellikle çoklu ilaç direnci gibi önemli bir sorunun üstesinden gelebilecek ve lokal tedavi etkinliği ile sağlıklı hücre ve dokulara herhangi bir zarar vermeden etkinlik gösterebilecektir (67). Öte yandan burada sözü edilen nano taşıyıcıların uygun büyüklük ve yüzey özelliklerine sahip olması da onları akıllı kılan diğer özellikler olacaktır. Kullanılan nanopartiküllerin her ne kadar boyutları hücre spesifik yönlendirme ve hücre içine alım prosedürlerinde önemli rol oynasa da, bu işlemi daha kolaylaştıracak ve verimi artıracak bir diğer önemli parametre de kullanılacak nanopartiküllerin yüzeylerinde elverişli fonksiyonel grup ve moleküllerin barınmasıdır.

Nanoparçacık ya da diğer deyişle nanopartiküller mikron skalası altında genellikle polimerlerden –özellikle biyobozunabilen cinsten– oluşturulmuş yapılarıdır. Nanoparçacıkların sınıflandırılmasında nanoküre ve nanokapsül olarak iki alt sınıf sayılabilmektedir.

Bunlardan nanokapsül diye tabir edilen alt sınıfta ilaç dış bir polimerik kabuk tarafından çevrelenmiştir ve bu kabuğun içerisinde özelliğine göre yağ ya da su içerisinde çözelti halinde yer alır. Nanoküre olarak adlandırılan diğer tipte ise parçacık çekirdekten dış kabuğa kadar aynı malzemeden oluşmuştur ve ilaç molekülleri bu polimerik zincirler üzerinde ya kovalent ya da fiziksel olarak tutuklanmıştır (68).

Nanoparçacık dizaynında kullanılacak polimer ve ilaçların uygulama yöntemi önemli yer tutar. Tedavide ilaçların ve taşıyıcı ajanların bozunmadan hedeflerine ulaşmaları ve yüksek verimli bir aktivite göstermeleri ancak ve ancak uygun dizayn edilmiş bir sistemle mümkün olabilmektedir.

Yüksek verimli bir başarı elde etmek amacıyla kullanılacak ilaç moleküllerinin nanoyapılardan uygun zaman aralıklarında ya da uygulamaya başladıktan bir zaman sonra pasif ya da aktif olarak ortama difüzyonu kontrol edilmelidir (69). Tümör alanındaki ilaç salım hızı nanopartikül yapısındaki polimerin molekül ağırlığı ve çapraz bağlanma konsantrasyonu ile ya da ilaç molekülünün parçacığa bağlanma şekli (kovalent adsorpsiyon ya da fiziksel adsorpsiyon) ile kontrol edilebilmektedir.

### **1.7.5. Lipozomlar**

Lipozomlar aynı hücre zarı gibi yapıda olan keseciklerdir. Bu keseciklerin içi ilaç taşınım tedavilerinde ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabilir. Baş ve kuyruk grupları içeren fosfolipidlerden oluşmuşlardır. Baş kısmı hidrofilik bir karaktere sahip olup suyu sever ancak fosfolipidlerin kuyruk diye adlandırılan kısmı hidrofobik olup yapılarda su tarafından itilir.

Tümörlü dokulardaki kan damarlarında endotel tabakasındaki hücreler arasında sağlıklı bir bireydeki kadar sıkı bağlantı noktaları bulunmaz ve genellikle 400 nm aşağısındaki lipozomal yapılar bu boşluklardan rahatlıkla geçebilir. Doxorubicin,

camptothecin ve daunorubicin gibi antikanser ilaçlarının taşınımı lipozomal sistemlerde günümüzde kullanılmaktadır (70).



## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

Sodyum bikarbonat (Sigma, ABD), etil alkol (Sigma, ABD), kloro asetik asit (Merck), tripan mavisi (Sigma, ABD), FBS (Fötal sığır serumu, Serva, İsrail), Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM, BD, USA), tripsin/10 mM EDTA (Etilendiamintetraasetat) (Sigma, ABD), PBS (Fosfat buffer saline) (Sigma, ABD), HCl (0,1 M) (Sigma, ABD), etüv (Ultralab U – 120), santrifüj (Ultralab), terazi (Scaltec), su banyosu (Memmert), manyetik karıştırıcı (Şimşek Labor teknik), UV / Visible Spektrofotometre (UNICAM UV2 – 100).

Spektrofotometre (Versa max tunable microplate reader, USA), Elisa pleyt okuyucu (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader), diyaliz ünitesi (Spectrumlab, USA).

Laminar akış kabin (Klas II Laminar Flow Cabinet, Labor ildam, Türkiye), UV sterilatör (Philips), karbondioksitli etüv (Nüve, Türkiye), ışık mikroskobu (Olympus CK2, Japonya), invert mikroskop (Leica, İsveç), dijital kamera (Olympus C-4000, Japonya), hemositometre (Bürker hemositometre, Almanya), 96 gözlü hücre kültür kabı (BD, USA), hücre kültürü flaskları (BD, USA), 0,2 µm filtreler (Sartorius), santrifüj tüpleri (Nunc, Almanya), MTT 3-(4, 5-dimetilthiazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür, (Sigma), Polietilenimin ve Flavonoid (Sigma-Aldrich, Almanya), L929 fare fibroblast hücresi (Şap Enstitüsü, Ankara), HeLa kanser hücresi (Hacettepe Temel Onkolojik Bilimler, Ankara), mikropipetler (Scaltec, Almanya), pipetler, petri kapları (Corning, İsrail), çeşitli cam malzeme ve çeşitli plastik malzeme analitik düzeyde kullanılmıştır.

## **2.2. Quercetin / Polietilenimin (KQ/PEI) Kompleksinin Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu**

40 mg/mL quercetin 3M sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde çözülerek üzerine 1:1 mol/mol quercetine karşılık kloro asetik asit (KAA) ilave edilmiştir. 70 dakika süre ile oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda reaksiyona bırakılmıştır. Süre sonunda ortama 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponundan ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Ortama 6 N HCl ilave edilerek ortamın pH'ı 7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra diyaliz membranı kullanılarak safsızlıklar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. 1 mg/mL polietilenimin (PEI, 2000 Da dallanmış) su içerisinde çözülmüştür. Daha sonra içerisine 1 mol polietilenimine karşılık 4 mol karboksil gruplu quercetin (KQ) ilave edilmiştir. 1 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak PEI'nin amin grupları ile quercetin karboksil grupları üzerinden polietilenimine elektron ortaklaşması yolu bağlanması gerçekleştirilmiştir. Daha sonrada por çapı 3500 Da diyaliz ünitesi (Spectrumlab, USA) kullanılarak reaksiyona girmeyen kısımlar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Böylece polietilenimine elektrostatik bağlı suda çözünebilir karboksil gruplu quercetin/polietilenimin (KQ/PEI) kompleksi elde edilmiştir. Elde edilen karboksil gruplu quercetin ve karboksil gruplu quercetin/polietilenimin kompleksi F – TIR ve H – NMR metotları ile karakterize edilmiştir.

## **2.3. Hücre Kültürü ve Kompleksin Hücreler ile Etkileşimi**

HeLa tümör hücreleri ve L929 fibroblast hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak hücre hatları hazırlanmıştır. Hücreler 10 % FCS, 1 % antibiyotik içeren DMEM-F12 kültür ortamında flasklarda 37 °C'de karbondioksit etüvünde inkübe edilmiştir. Hücreler yeterli sayıya ulaşmaya kadar 2 gün ara ile besiy ortamının vasatı değiştirilmiştir. Belli sayıya ulaşan kültürler tripsin ile kaldırılarak 24 well plakelere (50.000 hücre/well) ekimi yapılmıştır. 24 welllerdeki hücreler belli bir sayıya ulaştıklarında serum ve antibiyotik içeren vasatlar serum ve antibiyotik içermeyen vasatlar ile değiştirilmiştir. Tümör hücreleri 50 – 750 µg/mL miktarlarında quercetin, karboksil gruplu quercetin ve karboksil gruplu quercetin/polietilenimin kompleksler

ile 2 – 24 saat süre muamele edilmiştir. Daha sonra hücre mediumlarına serum ve antibiyotik ilave edilmiştir. Belirtilen süreler sonunda aşağıda belirtilen metotlarla komplekslerin etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubu olarak vellere sadece medium ilave edilmiştir.

#### **2.4. Hematoksilen Boyama**

6'lı platelerdeki ekili hücrelerin üzerindeki süpernatant falkona toplanır. Hücrelerin üzerine 1 mL PBS ilave edilir. Platelerdeki hücrelerin yüzeyine 200 mikrolitre tripsin ilave edilir. Tripsinin ilave edilmesindeki amaç, platelerde altta kalan hücrelerin çıkarılmasını sağlamaktır. Tripsin 4 dk 37 °C'de bekletilir. 2 mL medium ilave edilir ve buradan kopmuş hücreler falkona toplanır. Dip kısma bütün hücreler toplanır. 4 dk 800 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Sonra 1 mL sitosantrifüje yüklenir. 2200 rpm'de 4 dk santrifüj edilir. Preparatlar çıkarılır ve kurutulur. Preparatlar soğuk metanole daldırılıp 100 dk bekletilir. Metanol dökülür. Üzerine PBS konur. 2 defa 3'er dakikalık PBS'den geçirilir. 100 mikrolitre hematoksilende 15 – 20 dakika bekletilir ve distile suyla yıkanır. Bu 3 kez tekrarlanır. Lamlar teker teker sudan alınarak kurutulur. Üzerine 1 damla gliserol damlatılır ve lamelle kapatılır. 30 dakikadan sonra tırnak cilasıyla preparat lamelinin etrafı kapatılır. Bu, hücrelerin morfolojik yapısını incelememizi sağlar. Hücreler immünohistokimya protokolünde olduğu gibi sitosantrifüjle toplanır. Bir gecelik kurumaya maruz bırakmayı takiben soğuk metanolle fikse edilir. Ardından hematoksilen ile boyanır. Bir süre beklenir ve su ile yıkanarak eozinle muamele edilir. Daha sonra suyla tekrar yıkanır. Son olarak lamelle kapatılan preparatlar mikroskopta incelenir. Böylece Hematoksilen boyama hücrelerin morfolojik değerlendirilmesi yapılmıştır.

## **2.5. Toksisitenin Belirlenmesi**

### **2.5.1. MTT Testi**

HeLa ve L 929 fibroblast hücreleri 96 well platelere her bir kuyucuğa 5000 hücre ekimi yapılır. Farklı konsantrasyonlarda borlu bileşikler kuyucuklara ilave edilir ve 72 saat inkübe edilir. Süre sonunda her kuyucuğa 25 µL MTT çözeltisi ilavesi sağlanır. 37 °C'de 4 saat inkübasyondan sonra her kuyucuğa çözücü tampondan (10 % sodium dodesil sülfat (SDS) 0.01 N HCl içinde çözülür.) 100 µL ilave edilir. Bir gece inkübasyondan sonra, hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 96 kuyucuklu platelerin absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 570 nm'de okunur. Yaşayan hücreler koyu mavi formazan ürünü oluştururken, ölü hücrelerde boya gözlenmez. Kontrol (ilaçsız) hücreleriyle karşılaştırarak, ilaçsız hücrelerin yüzde ölüm oranları belirlenir.

### **2.5.2. Tripın Blue Boyaması**

HeLa ve L 929 fibroblast hücreleri 24 well platelere her bir kuyucuğa 50 000 hücre ekimi yapılır. Farklı konsantrasyonlarda borlu bileşikler kuyucuklara ilave edilir ve 2 - 48 saat sürelerde inkübe edilir. Tümör ve fibroblast hücrelerine borlu bileşiklerin toksik etkisi hücrelerin sayıca artışı ve canlılıkları tripan mavisi ile boyandıktan sonra hemositometre ile canlı ve ölü hücreler sayılarak hesaplanır. Ayrıca MTT yöntemi ile toksisite belirlenerek iki metodun sonuçları birlikte değerlendirilir.

## **2.6. Apoptozun Belirlenmesi**

HeLa kanser hücrelerinde apoptozun belirlenmesinde M30, Kaspaz-3 immünositokimyasal metodu ve ikili boyama metodu, L929 fibroblastlarda apoptozun belirlenmesinde ise sadece ikili boyama metodu kullanılmıştır. Ayrıca her iki tip hücrede de nekrozun belirlenmesinde ikili boyama metodu kullanılmıştır.

### 2.6.1. İmmünohistokimyasal Kaspaz-3 Metodu ile Apoptozis Belirlenmesi

24 well platelere her bir kuyucuğuna 2 mL medium içinde 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapılarak karbondioksit inkübatöründe inkübe edilmiştir. Bor içeren kompleksler ve polimerler belirtilen süre ve miktarlarda hücrelere uygulanır. Uygulama sonucunda öncelikle süpernatandaki yüzen kalkmış hücreler yapışan 15 mL'lik falcon tüpe toplanmıştır. Plate yüzeyinde yapışık olan hücreler süpernatanın alınmasını takiben, kuyucuklar 1 mL PBS ile 2 kez yıkanır, ardından 200 mikrolitre tripsin – EDTA eklenir, 5 dakika beklenir ve hücreler toplanıp aynı falcona ilave edilir. 4000 devir/dak santrifüj edilerek hücreler elde edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra süpernatanın aspire edilmesini takiben, pellet 1 mL PBS ile tek hücre süspansiyonu oluşturacak şekilde hazırlanır. Sitosantrifüj lamları (poli L lizimli) etiketlenir, hücrelerin toplanacağı bölge işaretlenir, santrifüj içine yerleştirilerek, ardından 1 mL'lik hücre süspansiyonunun tamamı eklenir. 2.200 rpm'de 4 dakika sitosantrifüj edilir. Lamalar çıkartılır ve oda sıcaklığında bir gece kurumaya bırakılır. Formalin ile fikse edilir. Lamalar önce % 0.2'lik Triton X 100 ile daha sonra PBS'de çözülmüş % 8'lik BSA ile 1 saat muamele edilir. BSA hafifce lamellerin kenarından aspire edilir. Üzerine yıkama yapılmadan primer antikor (10 µL sulanmış Kaspaz-3 alıp buna 990 µL PBS eklenir.) 100 µL pipetlenir. Buz üzerinde 1 saat bekletilir. Sekonder antikor uygulaması için her bir lamel üzerine Biotinden (link şişesi) 100 µL uygulanır ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilir. 2 mL PBS ile 2 x 3 dk yıkanır ve PBS aspire edilir. Her bir lamel üzerine Streptavidin HRP şişesinden 100 µL uygulanır ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilir. Lamellerin kenarından Streptavidin dikkatlice aspire edilir. 2 mL PBS ile 2 x 3 dk yıkanır ve PBS aspire edilir. 100 µL DAB ile lameller karanlıkta muamele edilir. Reaksiyon mikroskopta saat tutarak gözlenir. Kahverengi renkli boyanma gözlendiği zaman (yaklaşık 4 – 5 dk) DAB'lı lameller distile su ile yıkanır. 2 x 3 dk lameller üzerine 100 µL Hematoksilen uygulanır. 3 – 4 saniye kadar bekletip hemen önce çeşme suyu ile yıkanır ve daha sonrada 2 x 3 dk distile su ile yıkanır. Gliserol damlatılıp mikroskop altında incelenir.

## 2.6.2. İmmünotokimyasal Protokolü M30 Antikor Tayini Apoptozis Belirlenmesi

Kuyucuk başına, 2 mL medium içinde 400.000 – 500.000 hücre olacak şekilde altı kuyucuklulara ekilir, inkübatöre kaldırılır. Sonraki gün ilaçlar ile muamele edilir, süpernatandaki yüzen hücreler ile yapışan hücreler aynı 14 mL'lik falcon tüpe toplanır, santrifüj edilir. Yapışan hücrelerin toplanması için süpernatanın alımını takiben, kuyucuklar 1 mL PBS ile 2 kez yıkanır. Yıkama sıvılarında toplanan hücreler de aynı falcona alınır. Ardından 200 mikrolitre Tripsin – EDTA eklenir, 5 dakika beklenir ve hücreler toplanıp aynı falcon'a ilave edilir. Santrifüjü takiben hücreler sitosantrifüj edilir. Sitosantrifüj için: Santrifüj bittikten sonra süpernatanın aspire edilmesini takiben, pellet 1 mL PBS ile tek hücre süspansiyonu oluşturacak şekilde hazırlanır. Sitosantrifüj lamaları (poli L lizimli) etiketlenir, hücrelerin toplanacağı bölge işaretlenir, santrifüj içine yerleştirilir, ardından 1 mL'lik hücre süspansiyonunun tamamı eklenir. 2.200 rpm'de 4 dakika sitosantrifüj edilir. Lamalar çıkartılır ve oda ısısında bir gece kurumaya bırakılır. Formalin ile fikse edilir. Lamalar önce % 0.2'lik Triton X 100 ile daha sonra PBS'de çözülmüş % 8'lik BSA ile 1 saat muamele edilir. BSA hafifce lamellerin kenarından aspire edilir. Üzerine yıkama yapılmadan primer antikor (10 µL sulanmış Kaspaz-3 alıp buna 990 µL PBS eklenir.) 100 µL pipetlenir. Buz üzerinde 1 saat bekletilir. Sekonder antikor uygulaması için her bir lamel üzerine Biotinden (link şişesi) 100 µL uygulanır ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilir. 2 mL PBS ile 2 x 3 dk yıkanır ve PBS aspire edilir. Her bir lamel üzerine Streptavidin HRP şişesinden 100 µL uygulanır ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilir. Lamellerin kenarından Streptavidin dikkatlice aspire edilir. 2 mL PBS ile 2 x 3 dk yıkanır ve PBS aspire edilir. 100 µL DAB ile lameller karanlıkta muamele edilir. Reaksiyon mikroskopta saat tutarak gözlenir. Kahverengi renkli boyanma gözleendiği zaman (yaklaşık 4 – 5 dk) DAB'lı lameller distile su ile yıkanır. 2 x 3 dk lameller üzerine 100 µL Hematoksilen uygulanır 3 – 4 saniye kadar bekletip hemen, önce çeşme suyu ile yıkanır ve daha sonrada 2 x 3 dk distile su ile yıkanır. Gliserol damlatıp mikroskop altında incelenir.

### 2.6.3. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

Çekirdeği boyamaktır. Bu sayede apoptozu ve nekrozu gösteren bir boyama metodudur. Ribonükleaz A kullanılır. – 20 °C’de saklanır (Sigma R-500). Ribonükleaz A RNA’yı boyamaz. Bu sayede sitoplazmik RNA’yı yok eder. Hoechst (33342) boyama: +4 °C’da saklanır. Apoptozis hücreleri boyar. Bu sayede gerçek apoptozis hücreler bulunur. Propidium Iodide: +4 °C’de saklanır. DNA’yı ve RNA’yı boyar. Kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir. 6’lı platelere 500.000 hücre/2 ml olarak ekilir. Hücreler 37 °C’de CO<sub>2</sub> inkübatörde hücreler çoğaltılır. Çoğaltılan hücreler içinde bulunan mediumlar (üst solüsyon) alınır. Daha sonra üzerine ilaç eklenir. 48 saat 37 °C’de CO<sub>2</sub> inkübatörde hücreler bekletilir (Normalde hücre büyümesi 1 günlüktür ama burada 2 gün bekletilir.). Daha sonra boyama yapılır. Bu stok solüsyonların hazırlanışı şöyledir:

Ribonükleaz A’dan 1mL PBS’de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlanır.

Hoechst ise 1 mL PBS’de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlanır.

Propidium Iodide 1mL PBS’de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlanır.

Solüsyonlar kullanılana kadar – 20 °C’de saklanır.

Çalışma solüsyonunun hazırlanışı:

10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 mikrolitre

Hoechst stoktan 500 mikrolitre

Propidium Iodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlanır.

6’lı platelerdeki ekili hücrelerin üzerindeki süpernatant falkona toplanır. Hücrelerin üzerine 1 mL PBS ilave edilir. Platelerdeki hücrelerin yüzeyine 200 mikrolitre tripsin

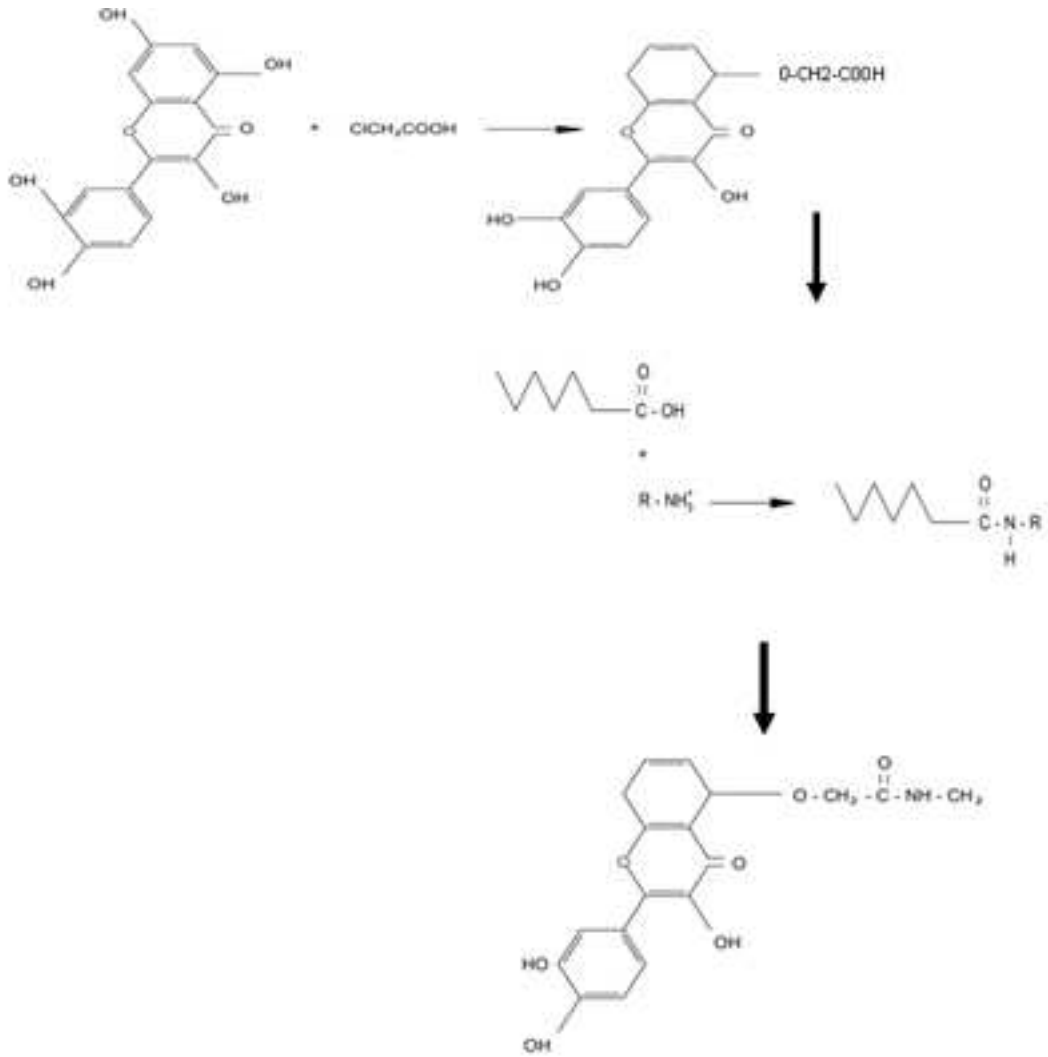
ilave edilir. Tripsinin ilave edilmesindeki amaç, platelerde altta kalan hücrelerin çıkarılmasını sağlamaktır. Üstteki hücrelerde ise apoptoz gözlemlenecektir. Tripsin 4 dk 37 °C'de bekletilir. 2 mL medium ilave edilir ve buradan kopmuş hücreler falkona toplanır. Dip kısma bütün hücreler toplansın 4 dk 800 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Üzerlerine 100 mikrolitre double staining solüsyonu pipetaj yapılır. Karanlıkta 15 – 20 dakika 37 °C'de inkübe edilir. Temiz lam üzerine bu karışımdan 17 mikrolitre konulup lamelle kapatılır. Lamelin kenarları tırnak cilasıyla kapatılır. Hazırlanan örnekler flouresan mikroskopta DAPI filitresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480 – 520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.



### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

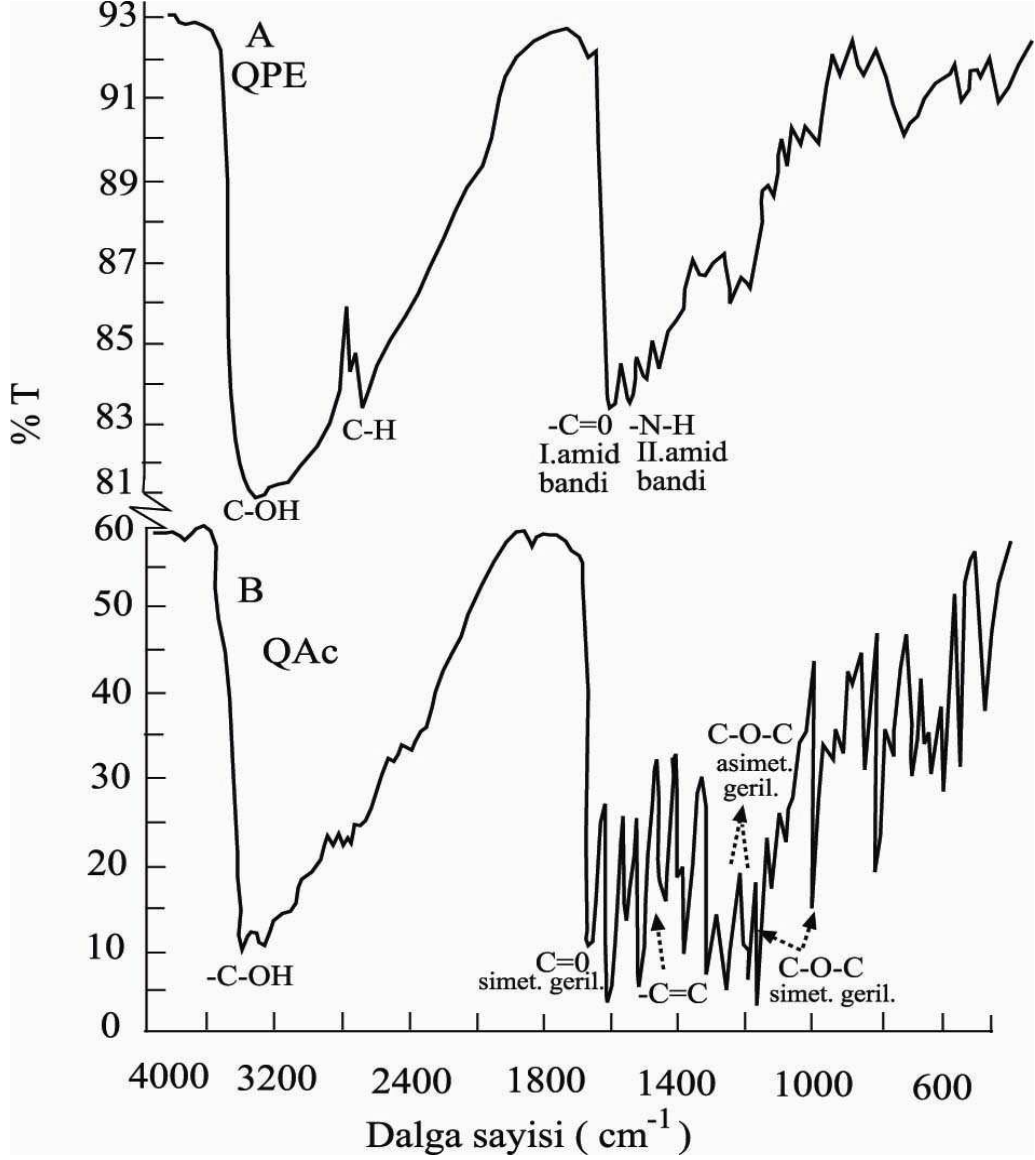
#### 3.1. Quercetin/Polietilenimin (KQ/PEI) Kompleksinin Elde Edilmesi

Quercetin'in OH grupları üzerinden kloro asetik asit Cl grubu arasında meydana gelen etkileşim sonucu ortaya HCl çıkarken, quercetin üzerinde karboksil grubu oluşturulmuştur. Reaksiyonun basamakları Şekil 3.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Karboksilik asit uçlu KQ/PEI kompleksinin sentezi

### 3.1.1. F – TIR Spektrumları Analizi



**Şekil 3.2.** Elde edilen komplekslerin F – TIR grafikleri

A. KQ/PEI (Karboksil gruplu quercetin ile polietilenimin) kompleksinin F – TIR grafiği

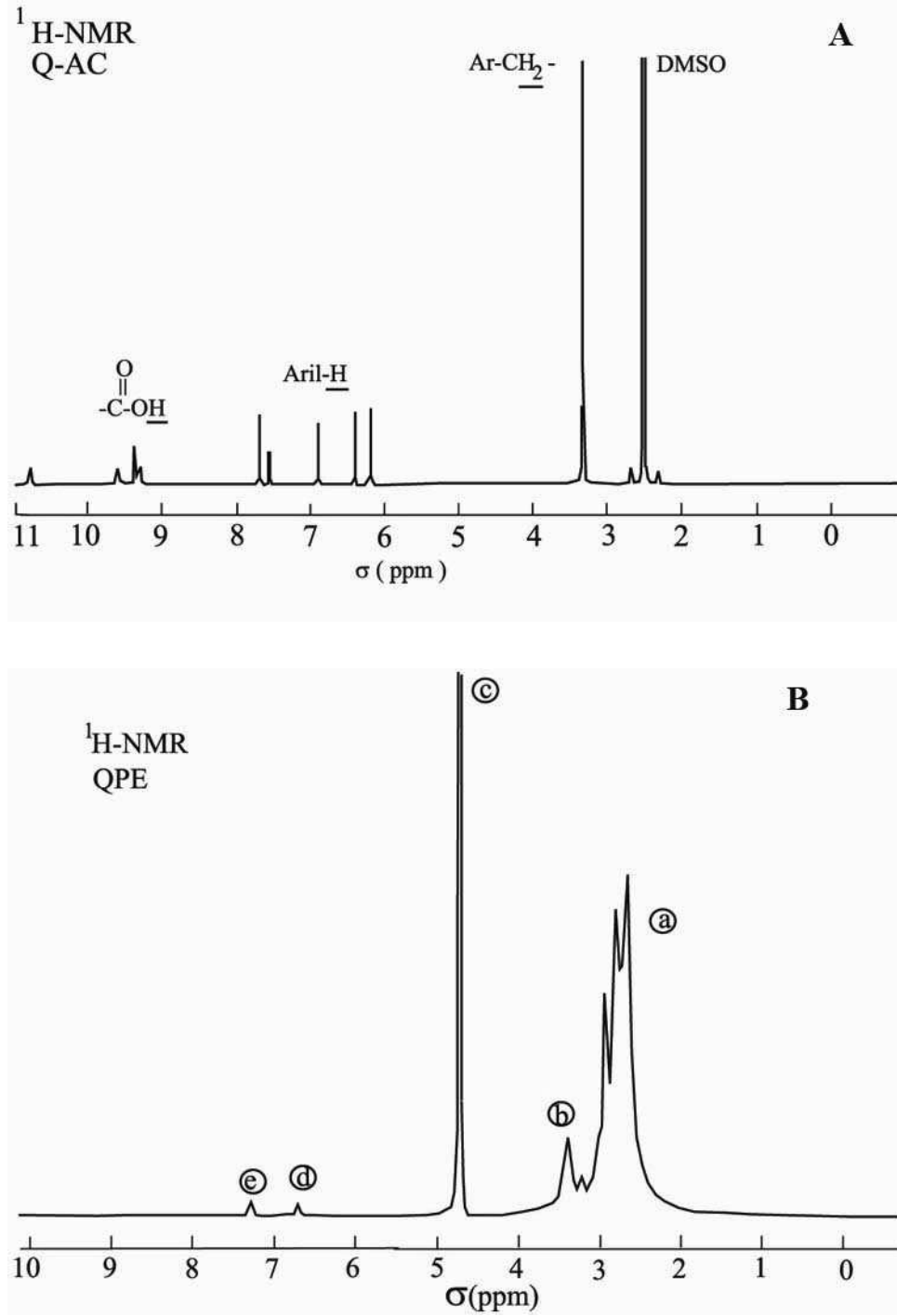
B. KQ (Karboksil gruplu quercetin) kloro asetik asit ile etkileştirildikten sonra oluşan karboksil gruplu quercetininin F – TIR grafiği

**Çizelge 3.1.** Karboksilik asit uçlu KQ ve KQ/PEI komplekslerinin F – TIR spektrumlarındaki karakteristik pikler

Karakteristik pik	KQ Dalga sayısı (cm <sup>-1</sup> )	Karakteristik pik	KQ/PEI ( v/cm <sup>-1</sup> )
- C – OH (gerilme)	3400	N – H (imi) (- C – OH)	3420
C = O (simetrik gerilme)	1664	C – H (gerilme, CH <sub>2</sub> )	2822
C = O (gerilme)	1450	C – H (eğilme, CH <sub>2</sub> )	1450
C – O – C (asimetrik gerilme)	1262 - 1168	C = O (gerilme, I. amid bandı)	1650 - 1660
C – O – C (simetrik gerilme)	1130 - 1014	N – H (eğilme, II. amid bandı)	1608 - 1561

Şekil 3.2'deki KQ ve KQ/PEI'ye ait F – TIR spektrumlarından görüldüğü gibi KQ'e ilişkin 1664 cm<sup>-1</sup>'deki C = O gurubuna ait pik, KQ/PEI'nin spektrumunda ortadan kalkmaktadır. Spektrumdaki karbonil pikinin olmayışı PEI'nin KQ ile kopolimerizasyonunun karboksilli asit uçları üzerinden bağlanarak gerçekleştiğini göstermektedir. PEI'nin yapısında çok sayıda bulunan amin gurubundan kaynaklanan 3420 cm<sup>-1</sup>'deki N – H gerilme piki ve alifatik karbona bağlı hidrojenlere (CH<sub>2</sub> protonları) ait C – H gerilme piklerinin şiddetindeki belirgin artış kompleks oluşumunun gerçekleştiğini ve KQ/PEI kopolimerinin sentezlendiğini doğrulamaktadır.

### 3.1.2. KQ ve KQ/PEI'ye Ait H – NMR Spektrumları



**Şekil 3.3.** KQ ve KQ/PEI kompleksinin H – NMR spektrumu grafikleri

A. KQ H – NMR spektrumu

B. KQ/PEI H – NMR spektrumu

**Çizelge 3.2.** Karboksilik asit uçlu KQ ve KQ/PEI komplekslerinin H – NMR spektrumlarındaki karakteristik pikler

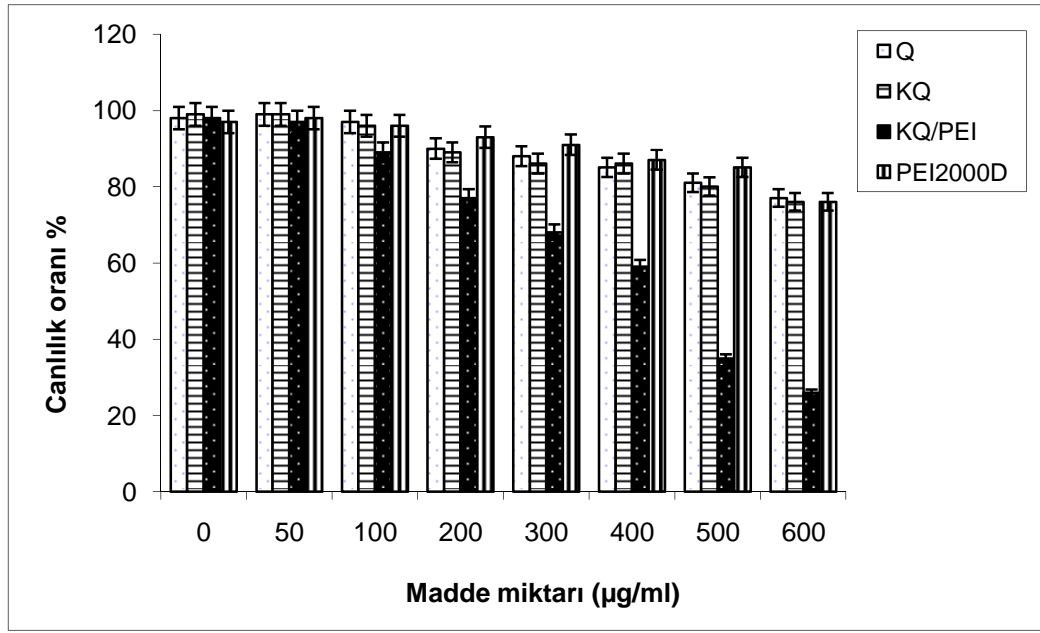
Fonksiyonel Grup	KQ Kimyasal kayma (ppm)	KQ/PEI Kimyasal kayma (ppm)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{Ar} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{b}) \end{array}$	3.30 – 3.40	3.30 – 3.50
Aril – H (d)	6.20 – 7.80	7.20 – 7.30
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{H} \end{array}$	9.30 – 9.40	–
NH – CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> (a)	–	2.50 – 2.90
Ar – OH (c)	–	4.60 – 4.80
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{NH} \text{ (Amid bağı)}(\text{e}) \end{array}$	–	6.60 – 6.80

KQ ve KQ/PEI'ye ait H – NMR spektrumları Şekil 3.3'de görülmektedir. Spektrumlar incelendiğinde; KQ spektrumundan farklı olarak KQ/PEI kompleksine ilişkin 2.50 – 2.90 ppm, 4.60 – 4.80 ppm ve 6.60 – 6.80 ppm'deki pik gurupları sırayla, amin guruplarına bağlı CH<sub>2</sub>, aril – OH ve C=O-NH amid guruplarını göstermektedir. Specktrumlarda görüldüğü gibi karboksil gruplu quercetin polietilenimin ile kompleks oluşturduktan sonra karboksil grubuna ait pik (9.30 -

9.40) ortadan kalktığı gözlenmektedir. Bu da kompleks oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir.

### **3.2. Quercetin (Q), Quercetin/Polietilenimin (KQ/PEI) Kompleksinin HeLa (Kanser) ve L929 Fibroblast (Normal) Hücrelerine Toksik Etki Sonuçları**

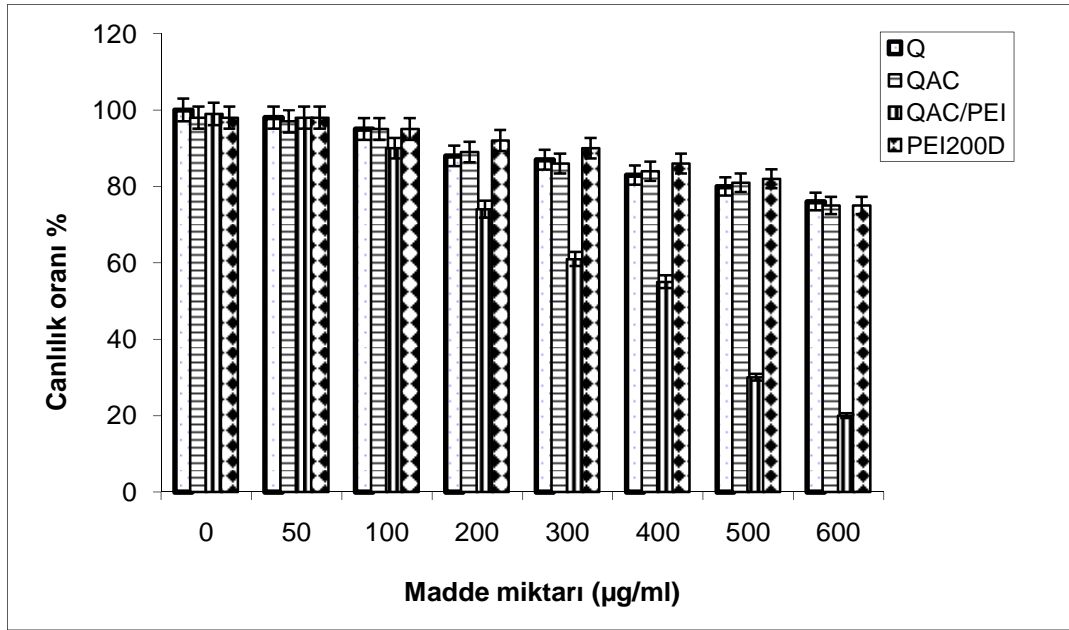
Yapılan çalışmada toksik etki iki şekilde belirlenmiştir. Birincisinde etken madde uygulanan hücreler tripan blue ile boyanarak canlı ve ölü hücrelerin sayısı ve % canlılık belirlenmiştir. İkincisinde ise MTT metodu ile hücrelerin yüzde ellisini öldüren inhibasyon konsantrasyonu (İK50) değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 3.4'de ve Şekil 3.5'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; quercetin (Q) düşük konsantrasyonlarda hem kanser hem de normal hücrelere toksik etkisinin düşük olduğu gözlenmiştir. Şekil 3.4'e ve Şekil 3.5'e bakıldığında 50 – 300 µg/mL konsantrasyonda toksik etkinin kontrol gruplarına yakın elde edilmiştir. Konsantrasyonun 400 – 500 µg/mL çıkarıldığında HeLa ve fibroblast hücrelerinde toksisitenin % 15 oranında arttığı gözlenmiştir. 600 µg/mL konsantrasyonda ise her iki hücre grubunda da hücrelerin yaklaşık % 20'sinin öldüğü gözlenmiştir. Quercetin modifikasyonu ile elde edilen karboksil gruplu quercetin (KQ) ve quercetini hücre içerisine aktarmada kullanılan polietilenimin (PEI 2000 Da) ile de aynı sonuçlar elde edilmiştir. MTT metodu ile elde edilen sonuçlarda ise toksisitenin tripan blue sonuçlarına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu metottan elde edilen Q'nin İK50 değeri 1 M/mL olarak, KQ için 850 µM/mL, PEI için 1.1 M/mL olarak elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin toksisite üzerine etkisine bakıldığında, kısa süreli inkübasyonlarda (2 – 6 saat) toksisite görülmez iken uzun süreli inkübasyonlarda (12 – 24 saat) toksisitenin gözlendiği ve arttığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre quercetin suda çok iyi çözünmemesi hücre içerisine yeterince giremediğinden toksik etkisinin düşük elde edilmesine sebep olduğu tahmin edilmektedir.



**Şekil 3.4.** Farklı miktarlarda (0 – 600 µg/mL) quercetin (Q), karboksil gruplu quercetin (KQ), KQ/PEI kompleksi ve PEI polimerlerinin L929 fibroblast hücrelerine toksik etkisini gösteren tablo (Tabloda etken maddelerin toksik etkisi yüzde (%) canlılık oranı olarak verilmiştir. Standart hata ±%3 olarak belirlenmiştir)

Karboksil gruplu quercetin polietileniminin (KQ/PEI) kompleksi kanser ve fibroblast hücreleri ile etkileştirildiğinde toksisite sonuçları diğerlerine göre çok farklı elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.5’de verilmiştir. KQ/PEI kompleksinin 50 µg/ml konsantrasyonunda toksisite gözlenmez iken, konsantrasyon artırıldığında toksisitenin de arttığı gözlenmiştir. Konsantrasyon 100 µg/mL’ye çıkarıldığında toksisitenin % 10 – 15 arasında arttığı gözlenmiştir. Özellikle HeLa kanser hücrelerine toksisitenin fibroblast hücrelerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 400 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin % 50 canlılığını kaybederken, 600 µg/mL konsantrasyonda HeLa hücrelerinin % 80’i, fibroblast hücrelerinin % 70’e yakınının canlılığını kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 3.4, Şekil 3.5). KQ/PEI kompleksi 2 – 4 saatlik inkübasyon süresinde toksik etkisinde çok fazla yükselme gözlenmez iken 6 – 12 saat, özellikle 24 saat etkileşim sürelerinde toksisite yüksek oranda elde edilmiştir. Bu sonuç, bize KQ/PEI’nin toksik etkisinin inkübasyon süresine

konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını göstermektedir. MTT sonuçlarına göre KQ/PEI kompleksinin hücrelerin yarısını öldürdüğü IK50 dozu 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'ye yakın elde edilmiştir. Bu verilere göre tripan blue ve MTT sonuçları birbiri ile uyumlu elde edilmiştir. KQ/PEI toksisitesinin yüksek eldesi beklenen bir sonuçtur. nk tek başına hücre zarından geçmekte zorlanan Q, PEI'nin yardımı ile hücre zarından yüksek oranda geçmiş olabileceği ve toksik etki göstediği tahmin edilmektedir.

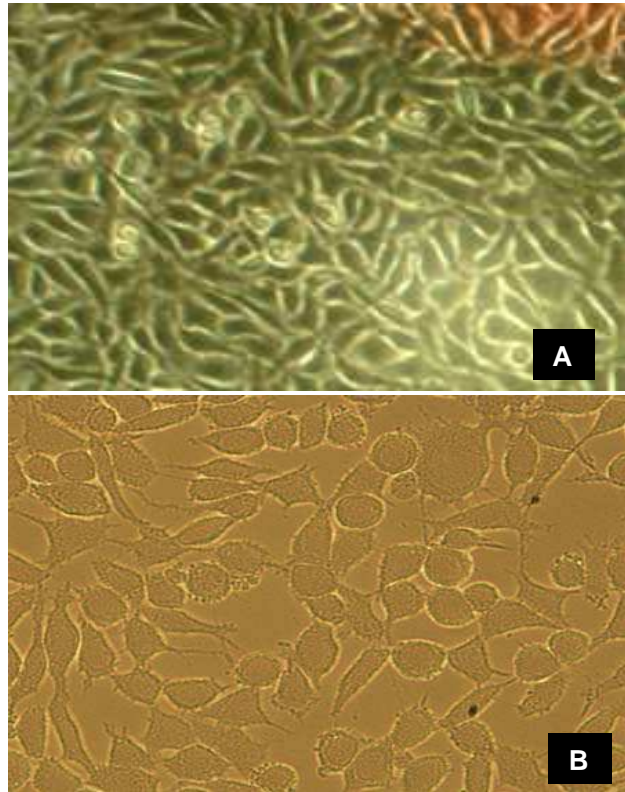


**şekil 3.5.** Farklı miktarlarda (0 – 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) quercetin (Q), karboksil gruplu quercetin (KQ), KQ/PEI kompleksi ve PEI polimerlerinin HeLa tümör hücrelerine toksik etkisini gösteren tablo (Tabloda etken maddelerin toksik etkisi yüzde (%) canlılık oranı olarak verilmiştir. Standart hata  $\pm\%3$  olarak belirlenmiştir)



### 3.3. Hematoksilen – Eozin Boyama Sonuçları

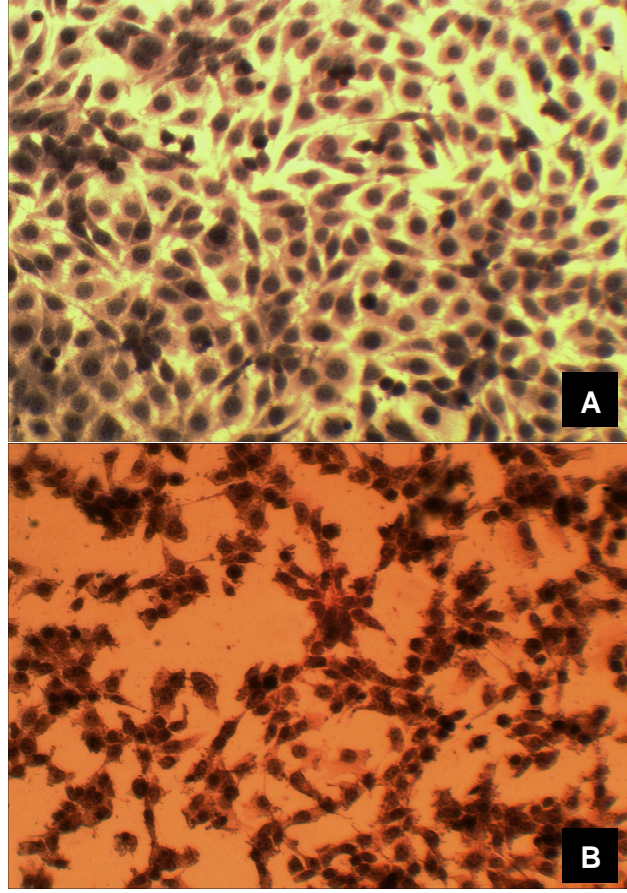
Q ve KQ/PEI ve PEI ile etkileştirilen kanser ve normal hücrelerin morfolojilerini göstermek maksadı ile hematoksilen – eozin ile boyanmıştır. Normal hücre fotoğrafları Şekil 3.6'da verilmiştir. Etken madde ile etkileştirilmiş hücrelerin morfolojisini gösteren fotoğraflar Şekil 3.7'de ve Şekil 3.8'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, quercetin (Q) tek başına düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında kontrol gruplarına göre hücre morfolojilerinde çok fazla değişim gözlenmemiştir. Fakat yüksek konsantrasyonlarda özellikle 600 µg/mL'de hücrelerin bir kısmının kültür tabağından kalktığı, az da olsa yayvan halde iken toparlandığı (yuvarlaklaştığı) gözlenmiştir. PEI ile de elde edilen sonuçlar çok farklı değildir.



**Şekil 3.6.** Kültüre edilmiş normal ve kanser hücre fotoğrafları

A. L929 fibroblast hücrelerinin fotoğrafı

B. HeLa kanser hücrelerinin fotoğrafı (Fotoğraflar Leica inverted mikroskopta X 200 büyütmede çekilmiştir)

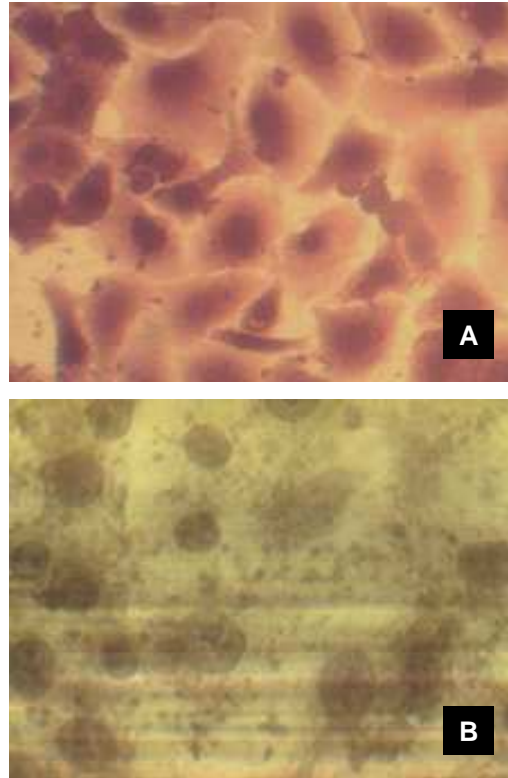


**Şekil 3.7.** Hematoksilen – Eozin ile boyanmış L929 fibroblast hücrelerinin fotoğrafları

A. Hematoksilen – Eozin ile boyanmış L929 fibroblast hücrelerinden oluşan kontrol grubunun görüntüsü

B. 600 µg/mL konsantrasyonda KQ/PEI ile etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Koyu boyanan bölgeler: çekirdekleri, açık renkte (pembemsi) bölgeler: sitoplazmayı göstermektedir. Fotoğraflar Leica inverted mikroskopta normal ışık altında, X 200 büyütmede çekilmiştir)

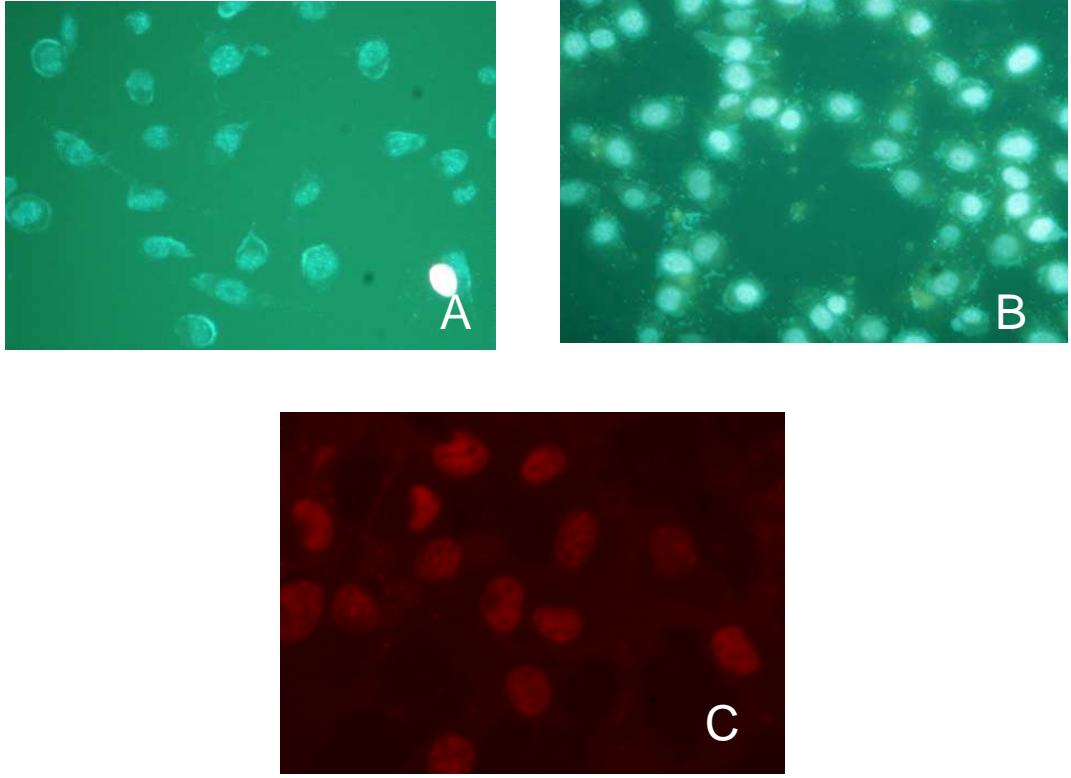
Ancak PEI yüksek molekül ağırlıklı olan türleri, özellikle 25000 dallanmış olan yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında hücre zarlarını tamamiyle parçaladığı gözlenmiştir. KQ/PEI kompleksi hücrelere uygulandığında düşük konsantrasyonlarda morfolojik farklılık düşük iken, yüksek konsantrasyonlarda hücrelerin kültür tabağından kalktığı, bir kısım hücrelerin zarlarının parçalandığı ve geri kalan hücrelerin yuvarlaklaştığı gözlenmiştir (Şekil 3.8). Özellikle bu kompleks, kanser hücrelerindeki morfolojik etkisi fibroblastlara göre daha şiddetli olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 3.8.** Hematoksilen – Eozin ile boyanmış HeLa hücrelerinin fotoğrafları  
A. Hematoksilen – Eozin ile boyanmış HeLa hücrelerinden oluşan kontrol grubunun görüntüsü  
B. 600 µg/mL konsantrasyonda KQ/PEI ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Koyu boyanan bölgeler: çekirdekleri, açık renkte (pembemsi) bölgeler: sitoplazmayı göstermektedir. Fotoğraflar Leica inverted mikroskopta normal ışık altında, X 400 büyütmede çekilmiştir)

### 3.4. Apoptotik İndeks Sonuçları

Quercetin ve KQ/PEI kompleksinin apoptotik etkisinin gösterilmesinde üç farklı metot kullanılmıştır. HeLa hücrelerinde M30 ve Kaspas-3 immunositokimyasal metot ve ikili boyama metodu ile apoptotik hücreler gösterilmiştir. L929 fibroblast hücreleri ise sadece ikili boyama metodu ile apoptotik hücreler gösterilmiştir. Elde edilen apoptotik indeks sonuçları Şekil 3.12'de ve Şekil 3.13'de ve apoptotik hücrelerin fotoğrafları Şekil 3.9'da, Şekil 3.10'da ve Şekil 3.11'de gösterilmiştir. M30 ve Kaspaz-3 boyama sonucu apoptoza uğramış hücrelerin sitoplazması kahverengi, sağlıklı hücrelerin sitoplazması ise mavi renkte görülmektedir. İkili boyama solüsyonu içerisinde bulunan Hoechst (33342) flouresan boyası DNA'ya bağlanarak mavi flouresan ışık altında hücre çekirdeklerinin mavi renge boyanmasını sağlar. Apoptotik hücre çekirdekleri, parçalanmış, daha parlak ve çekirdek sınırları bozulması vb. özelliklerinden diğer mavi boyanmış çekirdeklerden ayırt edilirler.

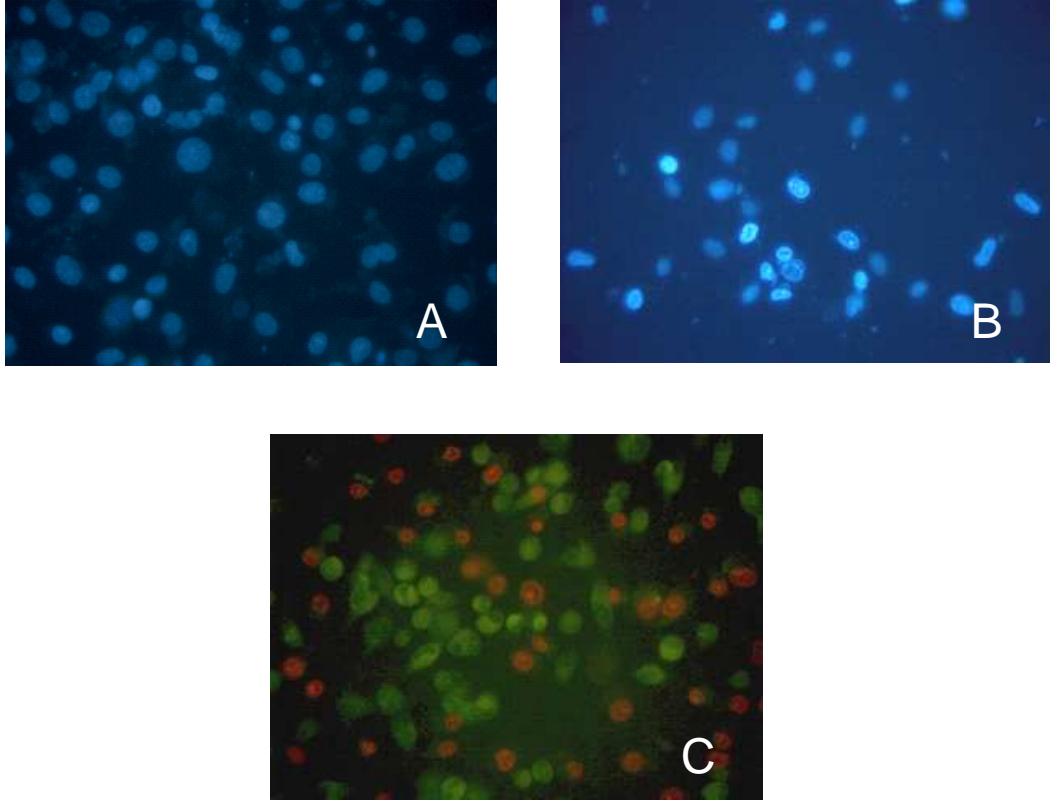


**Şekil 3.9.** İkili boyama sonucu elde edilmiş HeLa hücrelerinin fotoğrafları

A. Etken madde ile etkileştrilmemiş HeLa hücreleri, kontrol grubu

B. 600 µg/mL KQ/PEI ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin fotoğrafları (Parlak mavi hücre çekirdekleri apoptotik hücreleri, soluk mavi çekirdekler normal hücreleri göstermektedir)

C. 600 µg/mL KQ/PEI ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin fotoğrafları (Kırmızı hücre çekirdekleri nekrotik hücreleri göstermektedir. Fotoğraflar ikili boyama sonucu elde edilmiş olup, apoptotik hücreler Hoechst 33342 ile nekrotik hücreler propodium iyodid ile boyanmıştır. Fotoğraflar flouresan ataçmanlı olimpus inverted mikroskopta DAPI ve kırmızı flouresan filitreler kullanılarak X 200 büyütmede çekilmiştir)



**Şekil 3.10.** İkili boyama sonucu elde edilmiş L929 fibroblast hücrelerinin fotoğrafları

A. Etkin madde ile etkileştirilmemiş HeLa hücreleri, kontrol grubu,

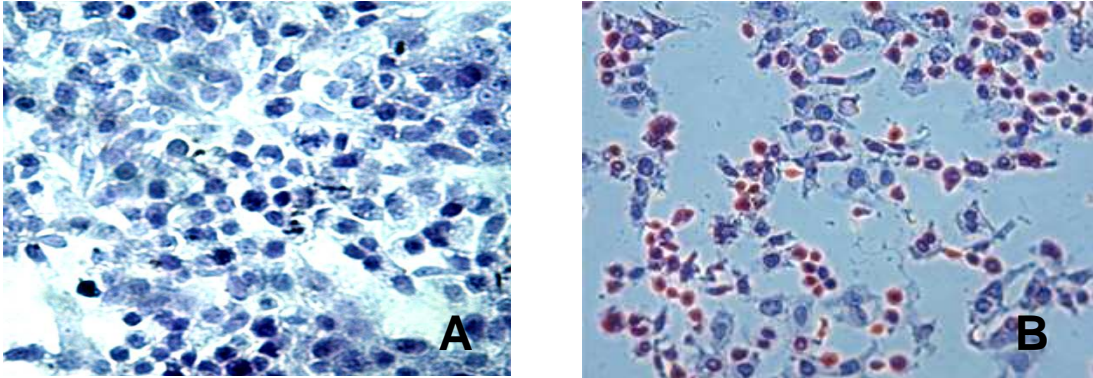
mavi renkte görülen hücre çekirdekleri normal hücreleri göstermektedir

B. 500 µg/mL KQ/PEI ile etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinin fotoğrafları, parlak mavi hücre çekirdekleri apoptotik hücreleri, soluk mavi çekirdekler normal hücreleri göstermektedir

C. 600 µg/mL KQ/PEI ile etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinin fotoğrafları, kırmızı hücre çekirdekleri nekrotik hücreleri, yeşil hücre çekirdekleri ise normal veya apoptotik hücreleri göstermektedir (495 – 520 nm dalga boyunda flouresan ışık altında çekilmiş olup aynı anda hem nekrotik hem de diğer hücreler görüntülenmiştir. Fotoğraflar ikili boyama sonucu elde edilmiş olup, apoptotik hücreler Hoechst 33342 ile nekrotik hücreler propodium iyodid ile boyanmıştır. Fotoğraflar flouresan ataçmanlı olimpus inverted mikroskopta DAPI ve 495 – 520 nm dalga boyunda flouresan filitreler kullanılarak X 200 büyütmede çekilmiştir)



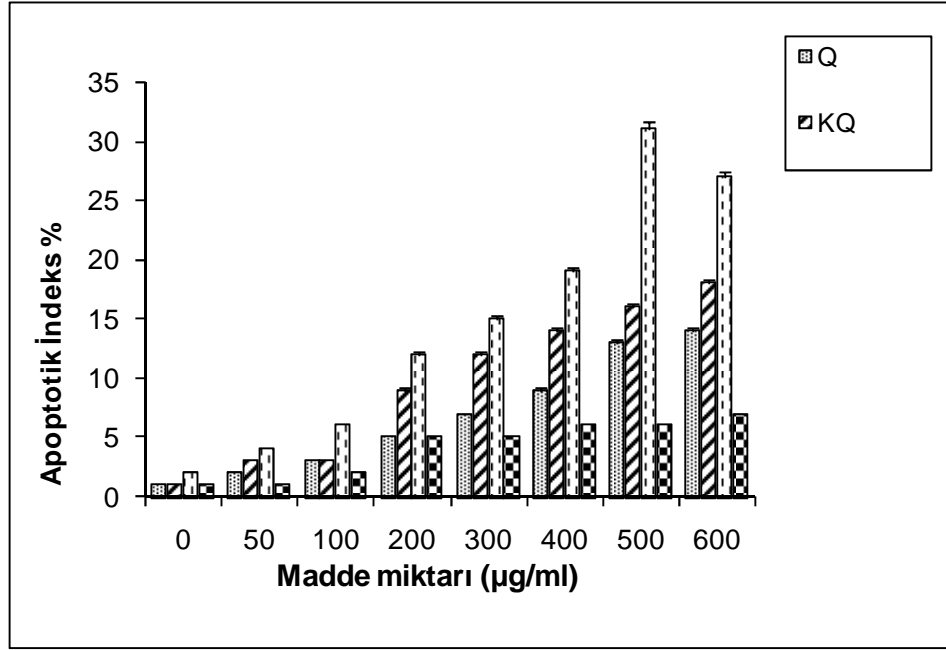
Genel olarak immünohistokimyasal ve ikili boyamadan elde edilen sonuçlar birbirine paralel elde edilmiştir. Sonuçlara göre quercetin tek başına kullanıldığında 50 – 200 µg/mL konsantrasyonda apoptotik indeksin her iki grup hücrede de düşük sayıda elde edilmiştir. Quercetin konsantrasyonunun artırılması ile apoptoz oranının da arttığı gözlenmiştir. Özellikle 500 – 600 µg/mL konsantrasyonda HeLa hücrelerinde % 14, fibroblast hücrelerinde % 9 apoptoz elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar PEI ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar görülmektedir. Karboksil gruplu quercetinde ise bu konsantrasyonlarda apoptozun % 12'lere kadar yükseldiği gözlenmiştir. Hücrelerin etken maddelerle kısa süreli ve uzun süreli etkileştirilmesi hem düşük konsantrasyonlarda hem de yüksek konsantrasyonlarda apoptotik indekste önemli değişikliklere neden olmamıştır. En yüksek apoptoz 24 saat süre ile inkübasyonda elde edilmiştir. Fakat KQ'nin yüksek konsantrasyonda apoptotik etkisinin HeLa hücrelerinde fibroblast hücrelerine oranla % 5 – 6 civarında daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.12, Şekil 3.13).



**Şekil 3.11.** M30 cytodeath antikoruna kullanılarak immünohistokimyasal metot ile boyanmış HeLa hücreleri

A. Etken madde ile etkileştirilmemiş HeLa hücreleri, kontrol grubu, hücrelerin hepsinin sitoplazması mavi renkte görülmektedir

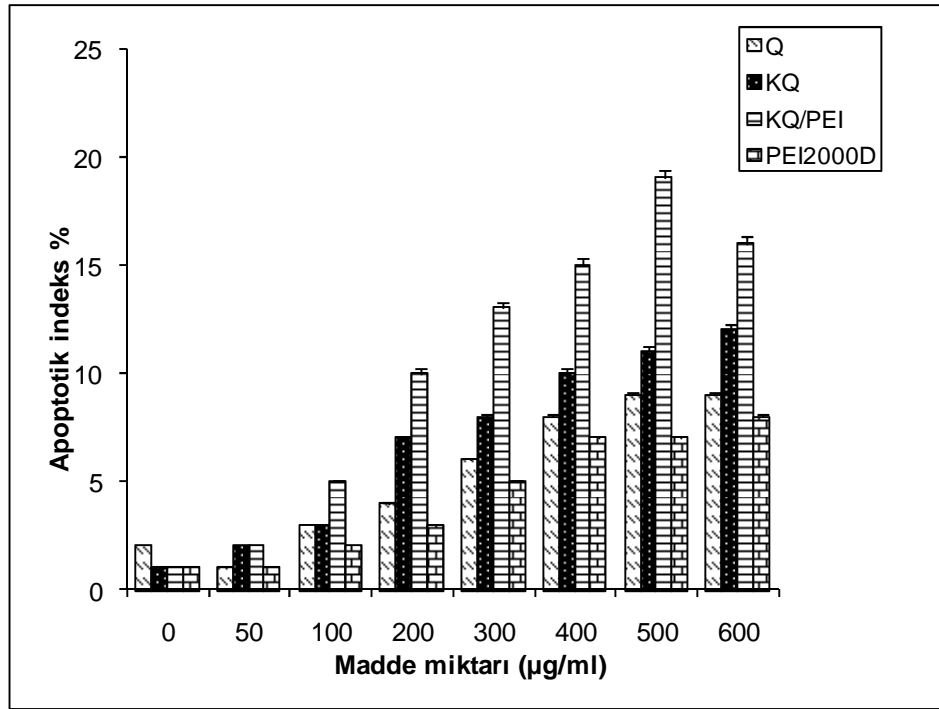
B. 500 µg/mL KQ/PEI ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin fotoğrafları (Kahverengi hücre sitoplazma apoptotik hücreleri, mavi renkte hücre sitoplazması normal hücreleri göstermektedir. Fotoğraflar, Zeiss marka araştırma mikroskopunda normal ışık altında, X 200 büyütmede çekilmiştir)



**Şekil 3.12.** Farklı miktarlarda (0 – 600 µg/mL) quercetin (Q), karboksil gruplu quercetin (KQ), KQ/PEI kompleksi ve PEI polimerlerinin HeLa kanser hücrelerinde oluşturduğu apoptotik indeks (Apoptotik indeks M30, Kaspaz-3 ve ikili boyamadan elde edilen değerlerin ortalaması alınarak elde edilmiştir. Standard hata % 2 olarak belirlenmiştir)

HeLa kanser ve fibroblast hücreleri karboksilli quercetin/polietileniminim (KQ/PEI) kompleksi ile etkileştirildiğinde sonuçlar diğer etken maddelerden farklı elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.12’de ve Şekil 3.13’de gösterilmiştir. Düşük konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde apoptotik indeks diğerlerine göre hem HeLa hem de fibroblast hücrelerinde birbirinden çok farklı değildir. Fakat konsantrasyonun artırılması ve inkübasyon süresinin uzatılması (24 saat) apoptozun özellikle HeLa hücrelerinde arttığı gözlenmiştir. KQ/PEI kompleksinin 400 µg/mL konsantrasyonda kanser hücrelerinde % 19, normal hücrelerde ise % 15 oranında apoptoza neden olduğu belirlenmiştir. KQ/PEI kompleksinin 500 µg/mL konsantrasyonda kanser hücrelerinde % 31, normal hücrelerde ise % 19 oranında apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.12, Şekil 3.13). Buradan elde edilen sonuçlara göre PEI quercetinini hücre içerisine girmesini artırmasından dolayı apoptotik etkinin de arttığı tahmin edilmektedir.



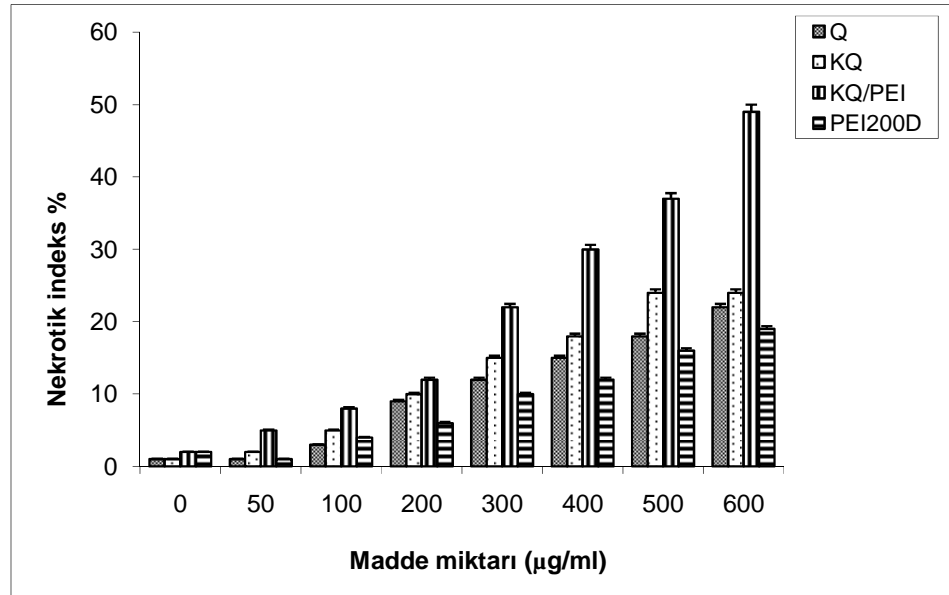


**Şekil 3.13.** Farklı miktarlarda (0 – 600 µg/mL) quercetin (Q), karboksil gruplu quercetin (KQ), KQ/PEI kompleksi ve PEI polimerlerinin L929 fibroblast hücrelerinde oluşturduğu apoptotik indeks (Apoptotik indeks ikili boyamadan elde edilen sonuca göre elde edilmiştir. Standart hata % 2 olarak belirlenmiştir)

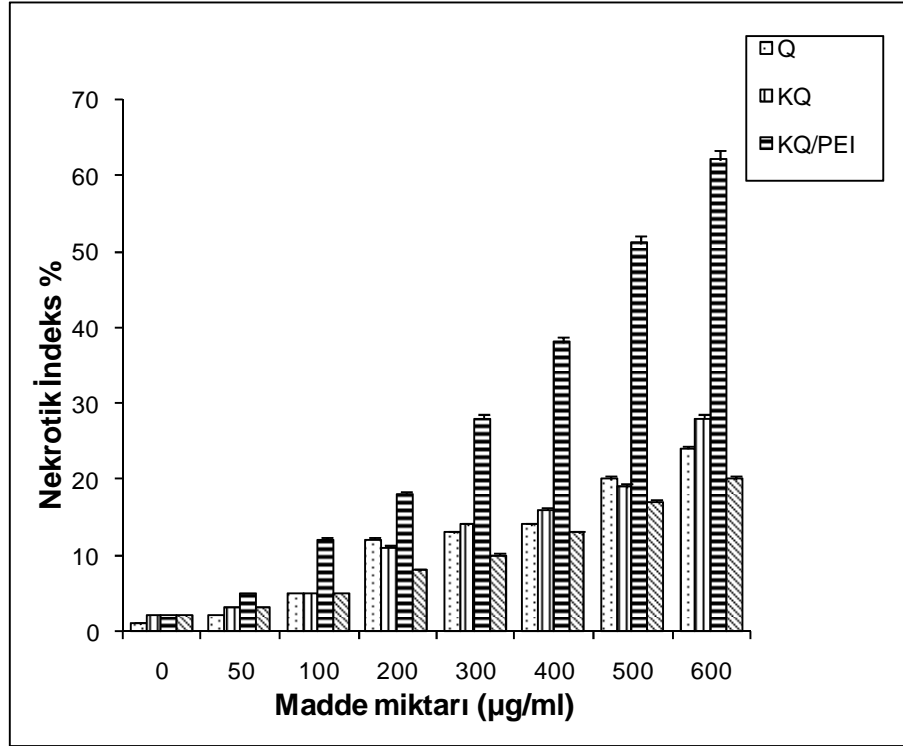
### 3.5. Nekrotik İndeks Sonuçları

Gerek HeLa hücreleri gerekse fibroblast hücreleri ikili boyama solüsyonu içerisinde bulunan propodium iyodid flouresan boyası ile boyandığında nekroza uğramış hücrelerin çekirdekleri kırmızı flouresan ve yeşil flouresan ışık altında kırmızı olarak görülmekte olup bize hücrelerin nekroza uğradığını göstermektedir. Elde edilen nekrotik indeks sonuçları Şekil 3.14’de ve Şekil 3.15’de ve fotoğrafları Şekil 3.9’da ve Şekil 3.10’da verilmiştir. Quercetin, karboksil gruplu quercetin ve polietilenimim tek başına 50 – 200 µg/mL konsantrasyonda nekrotik etkilerinin düşük olduğu yaklaşık % 10 civarında olduğu tespit edilmiştir. Toksikite, apoptotik etkide olduğu gibi quercetin konsantrasyonunun ve inkübasyon süresinin artması nekrotik etkinin

artmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 500 – 600 µg/mL konsantrasyonda nekrotik indeks HeLa hücrelerinde % 28, fibroblast hücreleri için ise % 20 – 25 arasında elde edilmiştir. Quercetin/polietilenimin kompleksi her iki tip hücreye uygulandığında, etken madde konsantrasyonu 200 µg/mL'den itibaren nekrotik etkinin yükseldiği, özellikle de kanser hücrelerinde % 18 olarak elde edilmiştir. Konsantrasyonun artması nekrotik etkinin diğer Q, KQ ve PEI'ne göre yüksek oranda elde edilmiştir. Özellikle 600 µg/mL konsantrasyonda nekrotik etki HeLa kanser hücrelerinde % 62, L929 fibroblast hücrelerinde % 49 oranında elde edilmiştir (Şekil 3.14, Şekil 3.15). Şekil 3.15'de görüldüğü gibi karboksil gruplu quercetin polietilenimin ile oluşturulan kompleks, HeLa hücre kültürlerinde oluşturduğu nekroz, fibroblast hücre kültürlerinde oluşturduğu nekroza göre yaklaşık % 13 oranında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebi ise daha önce bahsedildiği gibi hücre içerisine giren quercetin oranı ile ilgili olduğu tahmin edilmektedir.



**Şekil 3.14.** Farklı miktarlarda (0 – 600 µg/mL) quercetin (Q), karboksil gruplu quercetin (KQ), KQ/PEI kompleksi ve PEI polimerlerinin L929 fibroblast (normal) hücrelerinde oluşturduğu nekrotik indeks (Nekrotik indeks ikili boyama sonuçlarından elde edilmiştir. Standart hata % 2 olarak belirlenmiştir)



**Şekil 3.15.** Farklı miktarlarda (0 – 600 µg/mL) quercetin (Q), karboksil gruplu quercetin (KQ), KQ/PEI kompleksi ve PEI polimerlerinin HeLa (kanser) hücrelerinde oluşturduğu nekrotik indeks (Nekrotik indeks ikili boyama sonuçlarından elde edilmiştir. Standart hata % 2 olarak belirlenmiştir)

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Quercetin'in HeLa ve diğere bazı kanser hücre hatlarında etkileri in vitro ve in vivo araştırılmıştır. Quercetin hem tek başına hem de tedavide kullanılan kanser ilaçları ile kombine uygulanarak etkileri incelenmiştir. Ayrıca quercetin lipozom gibi taşıyıcılar ile hücre içerisine yüksek konsantrasyonda aktrarılarak apoptotik ve toksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, genel itibari ile aşağıdaki gibidir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi quercetin kanser ilacı olarak kullanılabilir doğa bir maddedir. Fakat quercetin'in suda az oranda çözünüyor olması, hücre içerisine girişine engel olmakta ve terapötik etkinin azalmasına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar özellikle bu engelleyici etkinin ortadan kaldırılmasına yöneliktir. Bu amaçla quercetin veya oluşturulan kompleksler polietilenglikol (PEG) gibi biyouyumluluğu artırıcı polimerler ile kompleks oluşturularak in vivo ve in vitro çalışmalar tasarlanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (71). Ayrıca nano yapılarla ve özellikle nano ve makro boyutta lipozomlarla yapılan in vivo ve in vitro çalışmaların sonuçları etkileyicidir (72).

Quercetin toksisitesi dikkate alındığında farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbiri ile çelişmektedir. Kang ve Liang (1997) tarafından yapılan çalışmada HL 60 Leukemia kanser hücre kültürlerinde 20 µM quercetin hücrelerin % 52.7'ni öldürdüğü tespit etmişlerdir (73). So vd'leri (1996) tarafından yapılan bir diğere çalışmada ise göğüs kanseri hücrelerine in vitro olarak quercetin uygulandığında 500 µM ve üzeri konsantrasyonda hücrelerin % 50'sini öldürdüğü tespit edilmiştir (74).

Quercetin in vitro HeLa hücrelerine tatbik edildiğinde 24 saat inkübasyon süresi sonunda apoptotik etkisinin yaklaşık % 17 olduğu, cisplatin ile birlikte in vitro aynı hücreye verildiğinde apoptotik etkinin % 37'ye yükseldiği bildirilmiştir (75). Diğere bir çalışmada ise yüksek sıcaklıkta quercetin etkisi araştırılmış olup, normalde FM3A fare meme kanser hücre hattında % 20 apoptotik etki gösterirken, toksik etkisinin sıcaklıkla 5 günlük inkübasyon süresi sonunda tümör hücrelerinin çoğalmasını %

100'e varan oranda inhibe ettiği bildirilmiştir (76). Quercetin lipozomlara yüklenerek in vivo yapılan bir çalışmada özellikle karaciğerde yüksek oranda biriktiği ayrıca pankreas, böbrek ve akciğerlerde de birim oranının yüksek olduğu rapor edilmiştir (77). Yine lipozomlarla yapılan bir çalışmada tümör dokusunda normal dokulara oranla daha yüksek oranda biriktiği, apoptozu artırdığı ve tümör dokusunda angiogenezi durdurduğu tespit edilmiştir (71,78). Gen ekspresyonu üzerine etkisi ile ilgili bir çalışmada ise zamana ve doza bağlı olarak tümör hücrelerinde P21, P53, MAP-kinaz ekspresyonunu düşürdüğü bildirilmiştir (79).

Yapılan bu araştırma sonucunda da yukarıda anlatıldığı gibi, quercetin suda çözünürlüğü düşük olduğundan tümör hücrelerinde istenilen etkiyi gösterememektedir. Dolayısı ile quercetini modifiye ederek suda çözünebilir, hücreye girebilir, polietilenimin gibi bir taşıyıcı ajan ile taşınması sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre quercetin tek başına suda çözünmez iken, kloro asetik asit ile yapıya karboksil grubu takılması suda çözünürlüğünü artırmıştır. Daha sonra polietileniminin amin grupları ile quercetin karboksil grupları arasında kurulan elektrostatik kompleks quercetini tamamen suda çözünür hale getirmiştir. Apoptotik, nekrotik ve toksisite sonuçlarına göre kompleks oluşturulması ile istenilen hedefe ulaşılmıştır. Ayrıca çok yüksek olmasa da tümör hücrelerine etkisinin normal hücrelerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- (1) Doll R., Peto R., The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* Jun, 66 (6): 1191 – 1308, 1981.
- (2) Maino D. M., Tran S., Mehta F., Side effects of chemotherapeutic oculo-toxic agents: a review, *Clinical Eye and Vision Care Dec.*, 12 (3-4): 113 – 117, 2000.
- (3) Sasaki M., Nakamura H, Tsuchiya S., Horie S., Kashiwayanagi M., Saito T., Murayama T., Quercetin-Induced PC12 Cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biol. Pharm. Bull.* 30 (4): 82 – 686, 2007.
- (4) Knekt P., Järvinen R., Seppänen R., Heliövaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa, A., Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J. Epidemiol.* 146: 223 – 230, 1997.
- (5) Lamson D.W., Brignall M.S., Antioxidants and cancer III: quercetin. *Alt. Med. Rev.* 5 (3):196 – 208, 2000.
- (6) Murota K., Terao J., Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 417 (1): 12 – 17. 2003.
- (7) Shin S.C., Choi J.S., Li X., Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International Journal of Pharmaceutics* 313: 144 – 149, 2006.
- (8) Scambia G., Ranelletti F. O., Panici P. B., De Vincenzo R., Bonanno G., Ferrandina G. et al., Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34: 459 – 464, 1994.

- (9) Van Zanden J.J., Wortelboer H.M., Bijlsma S., Punt A., Usta M., Bladeren P.J., Rietjens I.M., Cnubben N.H., Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochem. Pharmacol.* 69: 699 – 708, 2005.
- (10) Tiera M.J., Winnik F.M., Fernandes J.C., Synthetic and Natural Polycations for Gene Therapy: State of the Art and New Perspectives *Current Gene Therapy*, 6 (59): 59 – 71, 2006.
- (11) Lungwitz U., Breunig M., Blunk T., Göpferich A., Polyethylenimine – based non – viral gene delivery systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Jul.*; 60 (2): 247 – 266, 2005.
- (12) Bilaloğlu G.V., Harmandar M., *Flavonoidler*, Aktif Yayınevi, İstanbul, 2002.
- (13) Birt D.F., Hendrich S., Wang W., Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 90: 157 – 177, 2001.
- (14) Havsteen B.H., *Pharmacology and Therapeutics* 96: 67-202, 2002.
- (15) Bosetti C., Spertini L., Parpinel M., Gnagnarella P., Lagiou P., Negri E., Franceschi S., Montella M., Peterson J., Dwyer J., Giacose A., La Vecchia C., Flavonoids and breast cancer risk in Italy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15 (8): 1555 – 1558, 2006.
- (16) Kalra N., Seth K., Prasad S., Singh M., Pant A.B., Shukla Y., Theaflavins induced apoptosis of LNCaP cells is mediated through induction of p53, down-regulation of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinases pathways. *Life Sci.* May;16; 80 (23): 2137 – 2146, 2007.

- (17) Meeran S.M., Katiyar S.K., Grape seed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells through alterations in Cdk1-Cdk2-cyclin cascade, and caspase-3 activation via loss of mitochondrial membrane potential. *Exp. Dermatol.* May;16 (5): 405 – 415, 2007.
- (18) Beesley A.H., Palmer M.L., Ford J., Weller R.E., Cummings A.J., Freitas J.R., Firth M.J., Perera K.U., de Klerk N.H., Kees U.R., In vitro cytotoxicity of nelarabine, clofarabine and flavopiridol in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* Apr.;137 (2):109 – 116, 2007.
- (19) So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., Moussa M., Carroll K. K., Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr. Cancer* 26, 167 – 181, 1996.
- (20) Constantinou A.I., Krygier A.E and Mehta R.R., Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (suppl): 1426 – 1430, 1998.
- (21) Shukla S., Gupta S., Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle.* May 6 (9): 1102 – 1114, 2007.
- (22) Nguyen D.T., Hernandez-Montes E., Vauzour D., Schönthal A.H., Rice-Evans C., Cadenas E., Spencer J.P., The intracellular genistein metabolite 5,7,3',4'-etrahydroxyisoflavone mediates G2-M cell cycle arrest in cancer cells via modulation of the p38 signaling pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, Oct. 15; 41 (8): 1225 – 1239, 2006.
- (23) Zhou J.R., Mukherjee P., Gugger E.T., Tanaka T., Blackburn G.L. and Clinton S.K., Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *Cancer Research.* 58: 5231 – 5238, 1998.



- (24) Lian F., Bhuiyan M., Li Y.W., Wall N., Kraut M., Sarkar F.H., Genistein-induced G2-M arrest, p21 WAF1 upregulation and apoptosis in a non-small-cell lung cancer cell line. *Nutr. Cancer*, 31: 184 – 191, 1998.
- (25) Mei Y., Wei D., Liu J., Reversal of multidrug resistance in KB cells with tea polyphenol antioxidant capacity. *Cancer Biol. Ther.* 4 (4): 468 – 473, 2005.
- (26) Duraj J., Zazrivcova K., Bodo J., Sulikova M., Sedlak J., Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants. *Neoplasma*, 52 (4): 273 – 279, 2005.
- (27) Giles D., Wei H., Effect of structurally related flavones/isoflavones on hydrogen peroxide production and oxidative DNA damage in phorbol ester – stimulated HL – 60 cells. *Nutr. Cancer* 29: 77 – 82, 1997.
- (28) Hou L., Zhou B., Yang L., Liu Z.L., Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides. *Chem. Phys. Lipids*, May; 129 (2): 209 – 219, 2004.
- (29) Noroozi M., Angerson W.J., Lean M.E., Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* Jun; 67 (6): 1210 – 1218, 1998.
- (30) Moon Y., Wang X., Morris M.E., Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology In Vitro* Mar.; 20 (2):187 – 210, 2006.
- (31) Tsuda H., Ohshima Y., Nomoto H., Fujita K., Matsuda E., Iigo M., Takasuka N., Moore M.A., *Drug Metab. Pharmacokinet.* Cancer prevention by natural compounds. Aug.; 19 (4): 245 – 263, 2004.

- (32) Wang W., Higuchi C.M., Zhang R., Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the in vitro potentiation of lymphocyte activation. *Nutr. Cancer.* 29: 29 – 34, 1997.
- (33) Williams R. J., Spencer J. P. E., Rice-Evans C., Flavonoids: antioxidants or signalling molecules, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (7): 838 – 849, 2004.
- (34) Cantero G., Campanella C., Mateos S., Cortes F., Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin, *Mutagenesis*, September 1, 21 (5): 321 – 325, 2006.
- (35) Olaharski A.J., Mondrala S.T., Eastmond D.A., Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutat. Res.* 582: 79 – 86, 2005.
- (36) Minghetti P., Cilurzo F., Casiraghi A., Montanari L., Evulation of ex vivo human skin permeation of genistein and daidzein. *Drug Delivery*, Nov-Dec;13 (6): 411 – 415, 2006.
- (37) Hadjeri M., Barbier M., Ronot X., Mariotte A.M., Boumendjel A., Boutonnat J., Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues. *J. Med. Chem.* May 22; 46 (11): 2125 – 2131, 2003.
- (38) Wei D., Mei Y., Liu J., Quantification of doxorubicin and validation of reversal effect of tea polyphenols on multidrug resistance in human carcinoma cells. *Biotechnology Letters.* 25: 291 – 294, 2003.
- (39) Boumendjel A., Baubichon-Cortay H., Trompier D, Perrotton T., Di Pietro A., Anticancer Multidrug Resistance Mediated by MRP1: Recent Advances in the Discovery of Reversal Agents. *Medicinal Research Reviews.* Vol 25 (4): 453 – 472, 2005.

- (40) Di Pietro A., Conseil G., Pérez-Victoria J.M., Dayan G., Baubichon-Cortay H., Trompier D., Steinfels E., Jault J.M., de Wet H., Maitrejean M., Comte G., Boumendjel A., Mariotte A.M., Dumontet C., McIntosh D.B., Goffeau A., Castanys S., Gamarro F., Barron D., Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Feb; 59 (2):307 – 22, 2002.
- (41) Wong I.L.K., Chan K.F., Burkett A.B., Zhao Y., Chai Y., Sun H., Chan T.H., Chow L.M.C., Flavonoid Dimers as Bivalent Modulators for Pentamidine and Sodium Stibogluconate Resistance in Leishmania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol: 51 (3): 930 – 940, 2007.
- (42) Nissler L., Gebhardt R., Berger S., Flavonoid binding to a multi-drug-resistance transporter protein: an STD – NMR study. *Anal. Bioanal. Chem.*, 379: 1045–1049, 2004.
- (43) Kitagawa S., Inhibitory Effects of Polyphenols on P-Glycoprotein-Mediated Transport, *Biol. Pharm. Bull.*, 29 (1): 1 – 6, 2006.
- (44) Critchfield J. W., Welsh C. J., Phang J. M., Yeh G. C., Modulation of adriamycin in accumulation and efflux by flavonoids in HCT – 15 colon cells. Activation of P-glycoprotein as a putative mechanism, *Biochem. Pharmacol.* 48: 1437 – 1445, 1994.
- (45) Chieli E., Romiti N., Cervelli F., Tongiani R., Effects of flavonols on P-glycoprotein activity in cultured rat hepatocytes, *Life Sci.* 57: 1741 – 1751, 1995.
- (46) Castro A. F., Altenberg G. A., Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein, *Biochem. Pharmacol.* 53: 89 – 93, 1997.

- (47) Kobayashi T., Nakata T., Kuzumaki T., Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Lett.*, 176: 17 – 23, 2002.
- (48) Thomas M., Klibanov A. M., Non – viral gene therapy: polycation – mediated DNA delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62: 27 – 34, 2003.
- (49) Süleymanoğlu E., Paclitaxel (Taxol'un) anti – kanser etki mekanizmasının model langmuir – blodgett biyomembran sistemi ile moleküler düzeyde incelenmesi, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Merkez Lab. Ve Farmasötik Kimya ABD, 02/2005-15, 2007.
- (50) Gruijl F.R., Skin cancer and solar UV radiation. *Eur. J. Cancer*, 35: 2003-2009, 1999.
- (51) Karlıbaş H., Kanserli Hastalarda Kolesterol Düşüklüğü Arasında Sebep Sonuç İlişkisi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Uzmanlık Tezi, 1 – 39, 2008.
- (52) [http:// www.serdarturhal.com.tr/Kolon%20Ca.pdf](http://www.serdarturhal.com.tr/Kolon%20Ca.pdf) (Erişim tarihi: 05.11.2009)
- (53) Valenzuela M.T., Mateos S., Ruiz de Almodovar J.M., McMillan T.J., Variation in sensitizing effect of caffeine in human tumour cell lines after gamma-irradiation. *Radiother Oncol.*, 54: 261 – 271, 2000.
- (54) <http://www.medinfo.hacettepe.edu.tr/ders/TR/D3/2/5152.doc> (Erişim tarihi: 06.11.2009)
- (55) McCormick F., Signalling Networks that cause cancer. *Trends Cell Biol.* 12: 53 – 56, 1999.
- (56) Hanahan D., Weinberg R.A., The hallmarks of cancer, *Cell* 100: 57 – 70 , 2000.

- (57) Blume-Jensen P., Hunter T., Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411: 355 – 364 , 2001.
- (58) Doğan A. L., Güç D., Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 35: 34 – 42, 2004.
- (59) Jain R.K., Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Mar. 46 (1): 149 – 168, 2001.
- (60) Tagliaferri P., Caraglia M., Budillon A., Marra M., Vitale G., Viscomi C., Masciari S., Tassone P., Abbruzzese A., Venuta S., *Cancer Immunology Immunotherapy*. 54 (1): 1 – 10 , 2005.
- (61) Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., Mortarini, R., Rivoltini, L., Marincola, F. M., Anichini, A., *Cancer Immunotherapy With Peptide-Based Vaccines: What Have We Achieved? Where Are We Going?.* *J.N.C.I. J. Natl. Cancer Inst.* 94 (11): 805 – 818, 2002.
- (62) Jang S.H., Wientjes M.G., Lu D., et al., Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharmaceutical Research*, 20, 9, 1337, 2003.
- (63) Arruebo M., Fernandez-Pacheco R., Ibarra M.R., Santamaria J., *Magnetic Nanoparticles for drug delivery.* *Nanotoday* 2 (3): 22 – 32, 2007.
- (64) Ritter J. A., Ebner A.D., Daniel K.D., Stewart K. L., Application of high gradient magnetic separation principles to magnetic drug targeting. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 280 (2/3): 184 – 201, 2004.
- (65) Gupta Y., Jain A., Jain P., Jain S.K., Design and development of folate appended liposomes for enhanced delivery of 5-FU to tumor cells. *Journal of Drug Targeting*, 15 (3): 231 – 240, 2007.

- (66) Jain S.K., Chaurasiya A., Gupta Y., Jain A., Dagur P., Joshi B., Katoch V.M., Development and characterization of 5-FU bearing ferritin appended solid lipid nanoparticles for tumour targeting. *J. Microencapsul.*, Aug.; 25 (5): 289 – 297, 2008.
- (67) Vasir J.K., Labhasetwar V., Targeted drug delivery in cancer therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 4, 4, 363, 2005.
- (68) Letchford K., Burt H., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal Of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65 (3): 259 – 269, 2007.
- (69) Maeda, H ., The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.*, 41: 189 – 207, 2001.
- (70) Chen Q., Krol A., Wright A., Needham D., Dewhirst M. W., Yuan F., Tumor microvascular permeability is a key determinant for antivascular effects of doxorubicin encapsulated in a temperature sensitive liposome. *International Journal Of Hyperthermia*, 24 (6): 475 – 482, 2008.
- (71) Wattanathorn R.J., Phachonpai W., Priprem A., Suthiparinyanont S., Intranasal administration of quercetin liposome decreases anxiety-like behavior and increases spatial memory. *American Journal Of agricultural and biological Science*, 2 (1): 31 – 35, 2007.
- (72) Yu-Quan Wei et al, Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin. Cancer Res.* 12 (10): May 15, 3193 – 3199, 2006.

- (73) Kang, T.B., Liang N.C., Studies on the inhibitory effect of quercetin on the growth of HL – 60 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 54: 1013 – 1018, 1997.
- (74) So, F.V., Guthrie N., Chambers A.F., Moussa M., Carroll K. K., Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr. Cancer.* 26: 167 – 181, 1996.
- (75) Jakubowicz-Gil J., Paduch R., Piersiak T., Glowniak K., Gawron A., Kandefer-szerszen M., The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells. *Biochemical Pharmacology* 69: 1343 – 1350, 2005.
- (76) Lee J. B., Bae J. S., Choi J. H., Ham J. H., Min Y. K., Yang H. M., Othman T., Shimizu K., Anticancer efficacies of doxorubicin, verapamil and quercetin on fm3a cells under hyperthermic temperature. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9: 261 – 266, 2004.
- (77) Zhang Y., Zhang Y., Pan Y., Wang J., Zhang L., Long B., Liu X., Study on distribution of liposome nanoparticles loaded quercetin in mice. *Nanoscience.* June, 11 (2): 89 – 94, 2006.
- (78) Yu-Quan Wei et al., Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin. Cancer Res.* 12 (10) May 15: 3193 – 3199, 2006.
- (79) Mertenese-Talcott S. U., Bomser J.A., Romero C., Talcott S.T., Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21, p53, and map-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro. *J. Nutr.* 135: 609 – 614, 2005.