



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İNSAN SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDE
ÇÖREKOTUNUN (NİGELLA SATİVA-THYMOQUINONE)
RADYODUYARLAŞTICI ETKİSİ**

Dr. M. Fatih DEMİRCİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Özlem ATA

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İNSAN SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDE
ÇÖREKOTUNUN (NİGELLA SATİVA-THYMOQUINONE)
RADYODUYARLAŞTICI ETKİSİ**

Dr. M. Fatih DEMİRCİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Özlem ATA

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 13102009 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2013

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı' na

Mehmet Fatih Demirci tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı: Doç.Dr.Özlem Ata
Selçuk Üniversitesi

Üye: Doç.Dr. Sema Yılmaz
Selçuk Üniversitesi

Üye: Doç.Dr. Mehmet Dağlı
Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mezuniyet Sonrası Eğitim Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca; yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Oktay Sarı
Dekan

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimin her aşamasını borçlu olduğum, İç Hastalıkları Bölüm Başkanı ve tez hocam sayın Doç. Dr. Özlem Ata' ya; laboratuvar çalışmalarında bana bütün imkanları sağlayan ve teorik ve pratik anlamda kendisinden paha biçilemez şeyler öğrendiğim sayın Prof. Dr. Sema Hakkı' hocama; ışınlama konusunda teorik ve pratik destekleri ile sayın Yrd. Doç. Dr. Güler Yavaş hocama; laboratuvar da benim için uygulamaları yaparak günlerini harcayan ve laboratuvar da çalışma disiplininin öğrenilebileceği belki de en doğru insanlardan biri olan sayın Buket Bozkurt' a; mesai saatleri dışında bile deneyler için bizden yardımını esirgemeyen fizik mühendisi sayın Vefa Gül' e; yorum ve fikirleri ile bana destek olan sayın Prof. Dr. Hasan Acar ve sayın Yrd. Doç. Dr. Nadir Koçak hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, uzmanlık eğitimim boyunca öğrendiğim her şey için emeği geçen; başta bölüm hocalarım olmak üzere, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyelerine, araştırma görevlisi arkadaşlarıma, tüm hemşire ve hastane personeline teşekkürü borç bilirim.

Dr. M. Fatih Demirci
Aralık 2013, Konya

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR

iv.

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Terminoloji	2
1.3. Normal Hücre Döngüsü ve Doku Gelişimi	3
1.4. Karsinogenez, Neoplazi Gelişimi	10
1.5. Servikal Kanser	16
1.6. Radyoterapi	19
1.7. Kemoterapi ve Sisplatin	20
1.8. Çörekotu ve Thymoquinone	21

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürleri	25
2.2. Kimyasallar	25
2.3. Hücre Proliferasyon ve Viabilite Değerlendirmesi	25
2.4. Hücrelere Thymoquinone ve Sisplatin Uygulanması	25
2.5. Hücrelerin Işınlanması	26
2.6. İstatistiksel Analiz	26

3. BULGULAR

3.1.1. Radyoterapi Öncesinde HGF ve SiHa Hücreleri Üzerinde Thymoquinone ve Sisplatinin IC50 Değerleri	27
3.1.2. Radyoterapi Öncesinde HGF Hücrelerine Sisplatinin Etkileri	29
3.1.3. Radyoterapi Öncesinde HGF Hücrelerine Thymoquinone' nun Etkileri	31
3.1.4. Radyoterapi Öncesinde SiHa Hücrelerine Sisplatinin Etkileri	32
3.1.5. Radyoterapi Öncesinde SiHa Hücrelerine Thymoquinone' nun Etkileri	33
3.2. Radyoterapi Sonrası HGF ve SiHa Hücrelerinde Gözlenen Etkiler	34

3.2.1. Radyoterapi Sonrasında HGF ve SiHa Hücrelerinde Sisplatinin ve Thymoquinone' un IC50 Değerleri	34
3.2.2. Radyoterapi Sonrasında HGF Hücrelerine Sisplatinin Etkileri	36
3.2.3. Radyoterapi Sonrasında HGF Hücrelerine Thymoquinone' nun Etkileri	38
3.2.4. Radyoterapi Sonrasında SiHa Hücrelerine Sisplatinin Etkileri	39
3.2.5. Radyoterapi Sonrasında SiHa Hücrelerine Thymoquinone' nun Etkileri	40
3.2.6. Çözücü Olarak Kullanılan DMSO' nun Etkileri	41
4. TARTIŞMA	43
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
6. KAYNAKLAR	47
7. ÖZET	53
8. SUMMARY	54
9. ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

TQ: Thymoquinone

SPSS: Statistical Packages for the Social Sciences
SBK: Siklin bağımlı kinaz
RB: Retinoblastoma
DNA: Deoksiribonükleik asit
TGF: Transforming growth factor
ATM: Aataxia-telangiectasia mutated
ATR: Ataxia-telangiectasia and Rad3 related
MDM2: Mouse double minute 2 homolog
rNTP: Ribonucleoside tri-phosphate
HDAC: Histon deasetilaz
GADD: Growth arrest and DNA damage
FIGO: Federation of Gynecology and Obstetrics
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptors
EGF: Epidermal growth factor
HGF: Hepatocyte growth factor
PDGF: Platelet-derived growth factor
VEGF: Vascular endothelial growth factor
FGF: Fibroblast growth factor
MAP: Mitogen-activated protein
IL: İnterlökkin
JAK: Janus kinaz
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor
DAG: Diaçilgliserol
IP3: İnoзитol trifosfat
PI3: Fosfotidilinozitol tri
PLC: Fosfolipaz C
Gy: Grey
PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog
APC: Adenomatous Polyposis Coli
HGF: İnsan Gingival Fibroblast
EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS: Fetal Bovine Serum

PSG: Penisillin, Streptokinaz, Glutamin

DMSO: Dimetil Sulfoksid

ANOVA: Analysis of Variance

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Tıp, bilim ve sanatın buluştuğu noktada insan sağlığı için verdiği savaşını ilk çağlardan beri sürdürmektedir. Bu savaşta tarih boyunca karşısına çıkan belki de en büyük düşmanlardan biridir kanser.

Kanser, bilinen 200' den fazla türü olan geniş bir hastalık grubunu ifade eder. Bütün kanserlerin ortak iki karakteristik özelliği, kontrolsüz hücre çoğalması ve diğer dokulara yayılma eğiliminin olmasıdır¹.

2008 yılı verilerine göre, dünya çapında 12.7 milyon kişiye kanser tanısı koyulmuş ve 2010 yılında 8 milyon insan kanser nedeni ile yaşamını yitirmiştir. Bu sayı bütün ölüm sebeplerinin % 13' ünü oluşturmaktadır.² Üstelik her yıl kanser nedeni ölümlerin 4 milyonu 30-69 yaş arasında erken ölüm kabul edilen yaşlarda olmaktadır. Eğer gerekli önlemler alınmazsa bu sayının 2025 yılında 4 milyondan 6 milyona çıkması beklenmektedir³.

Kanserli bölgeye göre sağ kalım oranları büyük değişkenlik göstermekle birlikte, tanı koyulmuş bir kişinin %40-50 ihtimalle hastalığın kendi seyri sırasında veya tedavi komplikasyonları nedeni ile hayatını kaybedecek olması, toplumda oldukça sık görülen kanseri dünyada en önde gösterilen sağlık sorunlarından biri haline getirmiştir.

Ayrıca kanseri bu kadar çok korkulan bir hastalık yapan etkenlerden biri de insan psikolojisi üzerindeki özel etkileridir. Diğer hastalıklarda, durum kanserden daha ölümcül seyretilse bile kişi öz imajı ile ilgili bir sorun yaşamaz. Sadece hastalanan organın problemleri ile ilgilenir. Kanserde ise kendisini bir bütün olarak hasta hisseder. Hastalığın vücudun herhangi bir bölgesinde kendini göstereceği endişesini yaşar. Ayrıca tedavi sürecinin uzun olmasından, yaşanacak yan etkilerin dramatik seyretilmesinden korkar. Bu nedenle her türlü semptomu karşı daha hassas olur. Üstelik toplumdaki imajı da aynı şekilde etkilenir. Kendisi gibi toplum da kişiyi

bütün olarak hasta ve işlevini kaybetmiş olarak görmeye başlar. Kişi kendini toplumdan ve işinden soyutlamaya başlar. Bu nedenlerle kanser tanısı almak kişi için belki de yaşadığı en büyük travmalardan biridir.

Dünyada yaklaşık olarak her 8 ölümden biri kanser veya tedavi komplikasyonları nedeni ile olurken henüz birçok kanser türüne kesin bir tedavi bulunamamıştır. Kanser araştırmalarına büyük parasal fonlar ayrılmakta ve sayısız bilim insanı sadece bu konu üzerine yoğunlaşmaktadır. Uygulanacak en ideal tedavide, sağlıklı hücrelere zarar verilmemeli, sadece neoplastik hücreler bulunup yok edilmeli ve yan etki olmamalıdır.

2008 yılında dünya çapında serviks kanseri insidansı 529.800; ölüm oranı ise 275.000 olarak belirlenmiştir. Kadınlarda ikinci en sık görülen kanser türü olarak tespit edilmiştir. Halen servikal kanser tedavisinde kemo-radyoterapide kullanılan sisplatinin yüksek yan etki potansiyeli nedeni ile uygulamada kısıtlamalar vardır.

Biz bu çalışmamızda, daha önce servikal kanser hücre kültürlerinde antitümoral etkisi⁴, meme kanseri hücre kültürlerinde de radyo duyarlaştırıcı etkisi⁵ gösterilmiş olan thymoquinone (TQ)' nun, serviks kanseri standart tedavi olan kemo-radyoterapide sisplatinin yerine kullanılabilme potansiyelini araştırdık.

1.2. Terminoloji

Kanser ile ilgili bilinen ilk yazılı kayıt meme kanserini tarif eden, milattan önce 3000 yıllarından kalma bir Mısır papirüsüdür. O dönemden yaklaşık 2500 yıl sonra yaşamış olan Hipokrat tarafından birçok kanser türü tarif edilmiştir.⁶ İncelediği kanser dokularını ve etrafındaki damarları bir yengece benzettiği için, bu hastalığı Yunanca “yengeç” anlamına gelen “carcinos” kelimesi ile adlandırmıştır. Daha sonra bu kelime Latince’ ye de, yine “yengeç” anlamına gelen “cancer” olarak geçmiş ve Türkçe’ ye “kanser “ olarak çevrilmiştir. Neoplazi ise kanser için kullanılan başka bir tanımdır. “ yeni büyüme” ya da “yeni oluşma” anlamlarına gelen neoplaziyi, İngiliz onkolog R. A. Willis, “Normal dokuyu aşan ve onunla koordine olmayan; değişime yol açan uyarı durduktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye

devam eden anormal doku kütlesi” olarak tanımlamıştır. Normal dokuyu aşarak, bir organ yada bir bölümden başka bir organ yada bölüme hastalığın yayılmasına “metastaz” denir. Terminolojide kullanılan bir başka kelime olan “Tümör” ise başlangıçta inflamasyonun yol açtığı şişliği tanımlamak için kullanılsa da sonraları bu anlamı unutulup “neoplazm” ile eş anlamlı olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Benign tümörler; lokalize kalma eğiliminde, metastaz yapmayan, nispeten daha masum karakterlidirler. Malign tümörler ise uzak bölgelere metastaz yapan, yayıldığı dokularda hasar oluşturan, tedavi edilemediği takdirde ölümle sonuçlanan hastalıklardır.

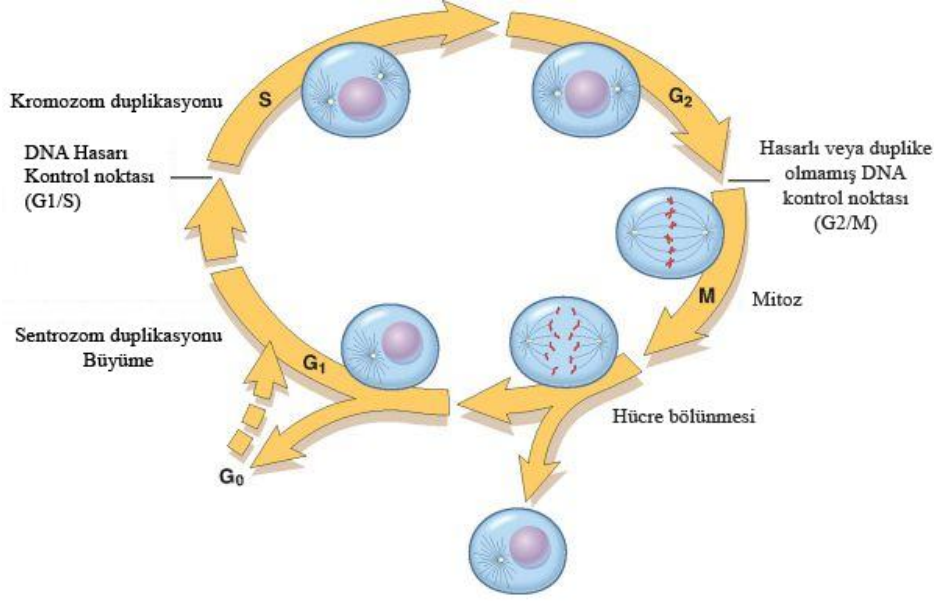
Malign yada benign bütün tümörler iki temel bileşenden oluşur. İlki, klonal neoplastik hücrelerden oluşan tümörün parankim dokusu; ikincisi, parankim dokuya destek olan, bağ dokusu, kan damarları, makrofaj ve lenfositlerden oluşan stromal dokudur. Bazen bu stromal doku yoğun ve kollajen ağırlıklı çok sert bir yapıda olabilir. Bu durum “desmoplezi” olarak adlandırılır. Stromal doku daha zayıf olduğunda, daha yumuşak kıvamlı bir tümör dokusu oluşur.

Bazı istisnalar olsa da genel olarak benign tümörler köken aldıkları dokunun adının sonuna “-oma” eki getirilerek isimlendirilir. Örnek olarak, fibröz dokudan köken alan benign tümörlere “fibroma” ; salgı bezlerinden köken alan benign epitelial tümörlere “adenoma” denilir. Malign tümörler de bazı ek kurallarla birlikte benzer şekilde adlandırılır. Mezenkimal dokudan köken alan malign tümörler “-sarkom” ekini alır. (Yunanca’ da “sar”; etli, et gibi, anlamına gelir. Sarkomlar daha zayıf bir stromal dokuya sahiptir. Bu nedenle daha yumuşak kıvamlı tümörlerdir.) (Örnek olarak; fibrosarkom, rhabdomyosarkom) Epitel dokudan köken alan malign tümörler ise “-karsinom” ekini alır. (Örnek: adenokarsinom, yassı hücreli karsinom)

1.3. Normal Hücre Döngüsü ve Doku Gelişimi

Erken embriyolojik dönemde hücre bölünmesi büyük bir hızla meydana gelir. Bölünme için gerekli olan DNA sentezinin yapıldığı “S” (Sentez) fazı ve mitoz bölünmenin yaşandığı “M” (Mitoz) fazı ardı ardına gerçekleşir. İlerleyen dönemlerde embriyo kompleks bir yapı kazandıkça “S” fazından önce “G1” (Gap1)

ve “M” fazından önce “G2” (Gap2) fazı belirginleşir. Bu boşluklar hücreyi bir nevi bekleme konumunda tutar veya oluşan olası DNA hasarlarının tamir edilmesi için hücreye gereken zamanı sağlar. (şekil 1.1)



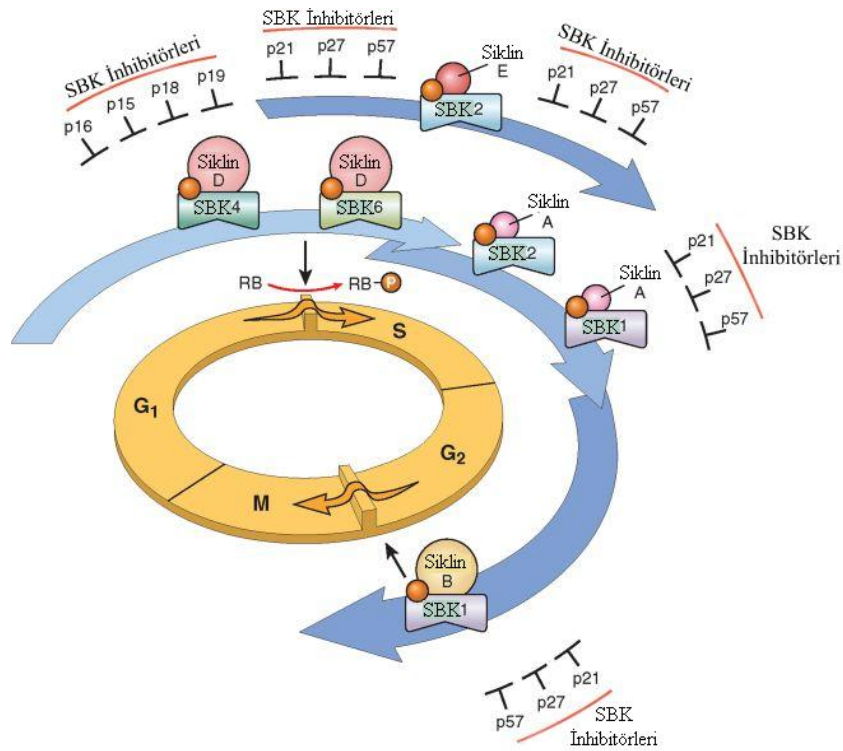
Şekil 1.1 (kaynak: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease)

G1 fazında bulunan bir hücrenin S fazına geçişi çeşitli mekanizmalarla çok sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu geçiş hücre döngüsünün hız kısıtlayıcı basamağı olarak kabul edilir. Bir kök hücrenin barsak mukozasını yenilemeye başlaması için veya bir lenfositin antijen uyarısı ile aniden çoğalmaya başlaması için G1 fazından S fazına geçişi sağlayan mekanizmaların devreye girmesi gerekmektedir. Bir başka deyişle, hücreyi bekleme durumundan çıkartıp, hücre proliferasyonunu arttıran her türlü etken (örneğin; büyüme faktörleri) G1/S fazı geçişini sağlamalıdır. Bu çeşitli etkilerin nihai olarak birleştiği ortak nokta “Siklin Bağımlı Kinaz” ları (SBK) aktive edilmesidir⁷. Siklin Bağımlı Kinazlar, aktif forma dönüşebilmek için “siklin” alt birimleri ile bağlanması gereken protein kinazlardır.⁸

S fazında DNA replikasyonu için Sbk2-siklin E aktivitesine ihtiyaç vardır. Siklin E ise E2F ailesi transkripsiyon faktörleri aracılığı ile eksprese edilir. Erken G1 fazında E2F, Histondeasetilaz, histonmetiltransferaz, retinoblastoma proteini ile birlikte kompleks halinde inaktif formda bulunur. Mitojenik sinyaller siklin D ekspresyonunu ve dolayısı ile siklin D – Sbk4 ve 6 komplekslerinin aktivasyonunu

sağlarlar. Daha sonra bu kompleksler RB proteinini fosforile ederek E2F-RB kompleksinden RB nin ayrılmasına neden olur⁹. Serbest hale geçen aktif E2F, siklin E ve diğer S fazı genlerinin transkripsiyonunu yapar. Böylece hücre S fazına girerek DNA replikasyonu başlamış olur⁸.

S fazını takip eden G2 fazından M fazına geçişte G2/M kontrol noktası bulunur. Burada mitoz öncesinde DNA hasar ve eksiklikleri kontrol edilir. Siklin A – Sbk 2 ve 1 kompleksleri S fazında; siklin B-Sbk1 kompleksi G2/M kontrol noktasında görev yaparlar.(şekil 1.2)

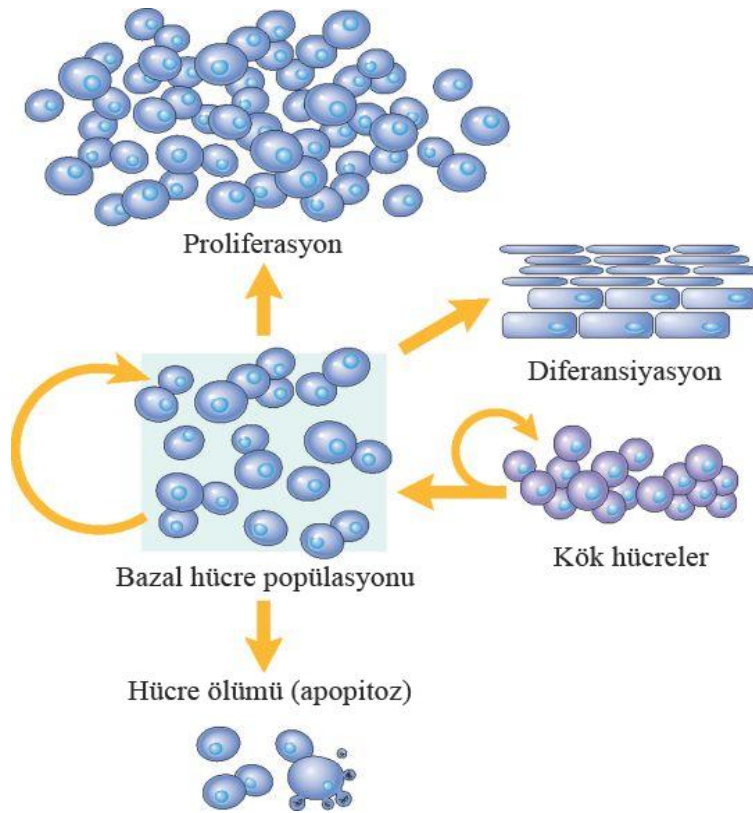


Şekil 1.2 (kaynak: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8/E)

Mitojen faktörler tarafından aktive edilen Siklin Bağımlı Kinazlar hücre siklusunun ilerlemesi yönünde görev yaparken; hücre çoğalmasını durdurucu mekanizmalar da Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörlerini aktif hale getirerek büyümeyi kontrol altında tutarlar. CIP/KIP ailesinden p21, p27,p57 proteinleri; Siklin Bağımlı Kinazları genel olarak inhibe eder. P21, p53 tümör baskılayıcı proteini tarafından aktive edilirken; p27, TGF-Beta gibi büyüme baskılayıcı faktörler tarafından aktive edilir. INK4/ARF ailesinden p15, p16, p18, p19 proteinleri siklin D-Sbk 4 ve 6' yı

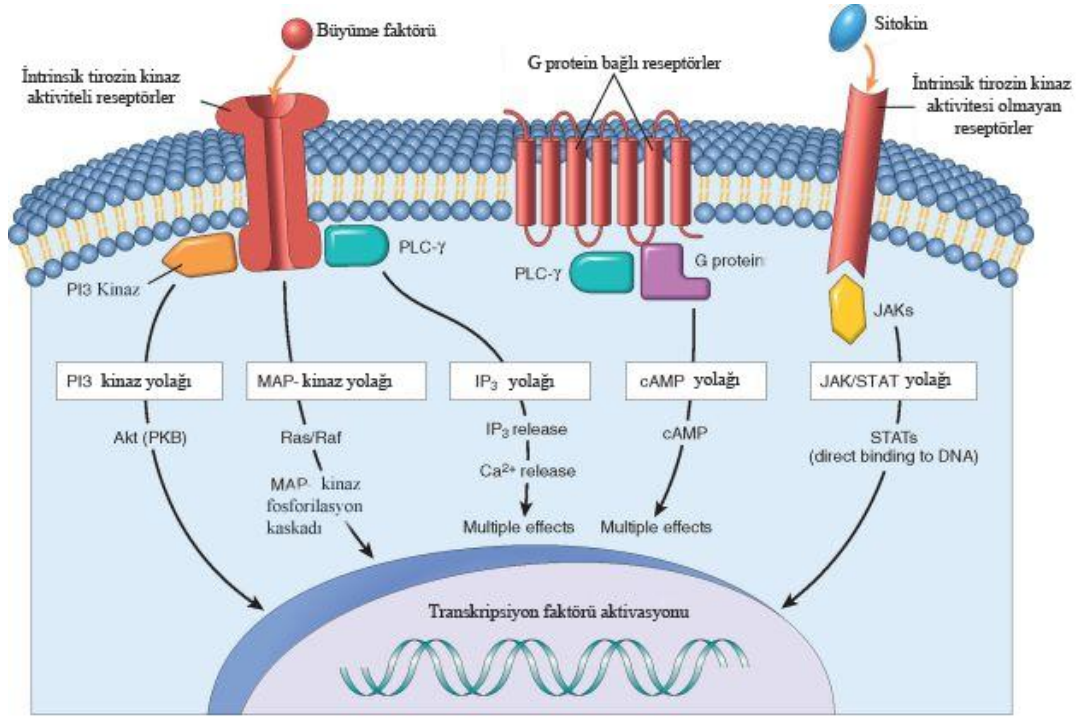
inhibe eder. Ayrıca G1/S ve G2/M geçişlerinde “p53” ve “Ataxia-telangiectasia mutated” proteinleri siklusun devamlılığı konusunda önemli ölçüde söz sahibidir¹⁰.

Mitojenik uyarılarla dokudaki kök hücreler ve farklılaşmamış, bölünme yeteneğini kaybetmemiş hücreler çoğalır. Bunlar arasından gerekli sayıda hücre diferansiasyona uğrayarak dokuya özgü özelleşmiş, işlevsel hücreler haline gelir. En son noktaya kadar diferansiasyona uğramış hücreler bölünme yeteneğini kaybederler. Yetişkin dokularda hücre popülasyonlarının homeostazı, hücrelerin proliferasyon, diferansiasyon ve apoptoz dengeleri ile korunur¹¹. (şekil 1.3)



Şekil 1.3 (kaynak: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8/E)

Çoğu hücrenin proliferasyonu “büyüme faktörleri” adı verilen polipeptid yapıda ligandlar ile kontrol edilir. Bütün büyüme faktörleri hücrelerde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak proliferasyon, anjiojenez, diferansiasyon gibi sinyalleri hedef hücrelere ulaştırır. Hücrelerde bulunan reseptörler çeşitli mekanizmaları çalıştırarak hedef genlerin ekspresyonu sağlar. (Şekil 1.4)



Şekil 1.4 (kaynak: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8/E)

Kendi yapısında tirozin kinaz aktivitesi olan reseptörler, hücre membranında bulunur. EGF, TGF- α , HGF, PDGF, VEGF, FGF, c-KIT ligand, ve insulin gibi büyüme faktörlerinin birçoğu bu reseptörlere bağlanır. Ligandın bağlanması ile reseptör tirozin kinazı aktive olur ve hücre memranı iç tarafındaki adaptör moleküller aracılığı ile veya direkt olarak PI3 kinaz, MAP kinaz veya IP₃ yolakları aktive olur.

RAS/RAF-MAP kinaz fosforilasyon kaskadı sonucunda JUN, FOS gibi transkripsiyon faktörleri uyarılır. Sonuç olarak büyüme faktörü üretimi, büyüme faktörü reseptör üretimi veya direkt hücre siklusuna giriş sağlanır.

IP₃ yolağında, membran inositol fosfolipidleri, fosfolipaz C (PLC) tarafından inositol 1,4,5 trifosfat (IP₃) ve diaçilgliserol (DAG) a parçalanır. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artışı ve serin-treonin kinaz protein kinaz C aracılığı ile birçok transkripsiyon faktörü aktive edilir.

PI3K yolağında protein kinaz B olarak da bilinen Akt aktive edilir. Hücre proliferasyonu ve apoptoz inhibisyonu ile ilgili transkripsiyon faktörleri eksprese edilir.

Kendi yapısında tirozin kinaz aktivitesi olmayan ve hücre içindeki kinazları aktive eden reseptörler; IL-2, IL-3, interferon α , β , ve γ ; eritropoetin, G-CSF, büyüme hormonu ve prolaktin gibi ligandların hedef reseptörleridir. Reseptörün ekstraselüler bölgesine ligand bağlandığında sinyal intraselüler bölgeye aktarılarak Janus Kinaz ailesine ait proteinler (JAK) aktive edilir. JAK lar da STAT adı verilen sitoplazmik transkripsiyon faktörlerini aktive eder. STAT' lar nükleusa giderek gen transkripsiyonu başlatır.

Hücre membranında bulunan bir diğer reseptör grubu ise G-protein bağımlı reseptörlerdir. Kemokinler, vasopressin, serotonin, histamin, epinefrin, norepinefrin, kalsitonin, glukagon, paratiroid hormon, kortikotropin, rodopsin ve bir çok ilaç bu reseptörler aracılığı ile sinyal iletir.

Steroid hormon reseptörleri genel olarak ligand bağımlı transkripsiyon faktörleri olarak görev yapar ve nükleusta bulunurlar. Steroid hormonlar, tiroid hormonları, D vitamini ve retinoidler bu reseptör ailesine bağlanır. PPAR'ler bu aileye ait reseptörlerdir ve adipogenez, inflamasyon ve aterosikleroz ile ilişkidirler.

Doku homeostazının korunmasında bir diğer mekanizma da apoptozdur. Gereksiz, yaşlanmış ya da zararlı olan hücrelerin kontrollü şekilde kendi kendini imha ederek, plazma membranı intakt olarak fagosit edilebilecek kadar küçük parçalar şeklinde makrofajlara sunulmasıdır. Hücre içi yapılar ve enzimler etkisiz hale getirildiği ve membran bütünlüğü korunduğu için inflamatuvar yanıt oluşturulmaz.

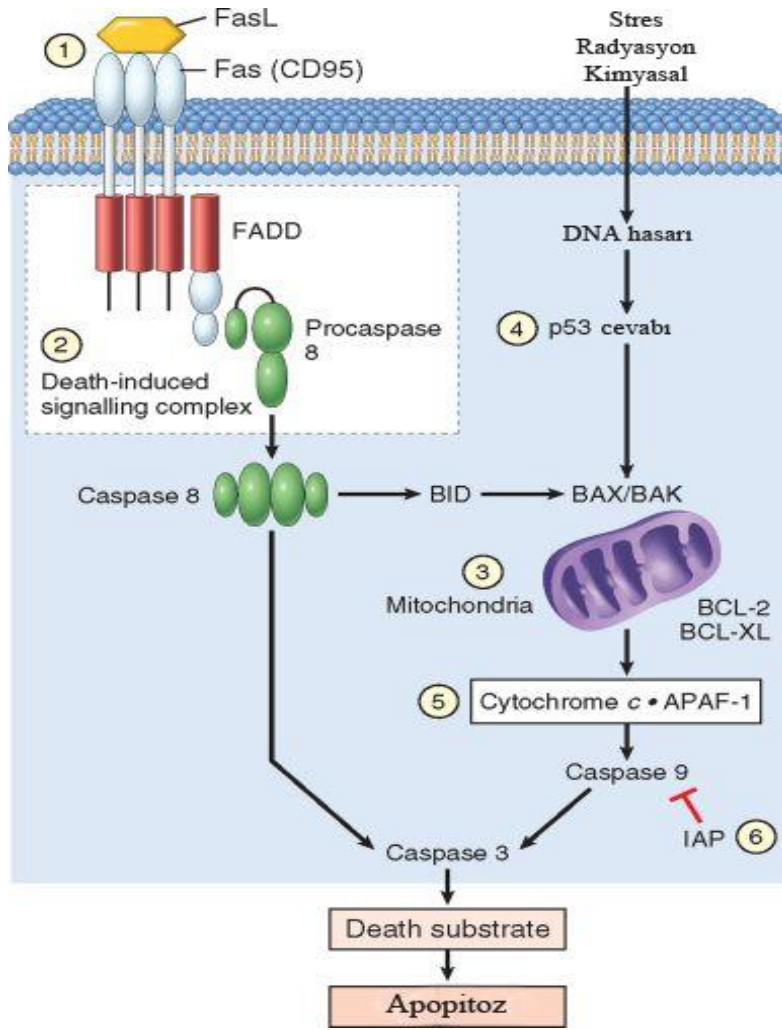
Hücre proliferasyonunu destekleyen büyüme faktörlerinin eksikliği söz konusu olduğunda veya hücrenin immün sistem tarafından zararlı olduğu tespit edildiğinde apoptoz mekanizmaları fizyolojik olarak devreye girer. Apoptoza neden olan patolojik durumlar ise; DNA hasarı, fazla miktarda hatalı protein yapımı veya bazı enfeksiyonlardır.

Apoptoz mekanizmaları intrinsik ve ekstrinsik olarak ikiye ayrılır. Bu yollarla görev alan 10' dan fazla üyesi olan kaspaz adı verilen özel bir proteaz ailesi vardır. İntrinsik ve ekstrinsik yollar apoptozun uygulanması basamağında

ortak yolla devam ederler. Bu ortak yolakta uygulayıcı yada infaz edici kaspaz denilen kaspaz 3 ve 6 aktif hale geldikten sonra DNA ve proteinler parçalanır.

İntrinsik yol aynı zamanda mitokondriyal yol olarak da ifade edilir. Mitokondride enerji üretiminde hayati öneme sahip sitokrom c gibi bir çok protein vardır. Fakat bu proteinlerin mitokondri dışına çıkmaları kaspaz kaskadını aktive ederek apoptoza neden olur. Bu nedenle mitokondri membranının bu proteinlere geçirgenliği, Bcl-2 protein ailesinin pro apoptotik ve anti apoptotik üyeleri tarafından sıkı şekilde kontrol edilir. Büyüme faktörleri gibi hücre devamlılık sinyallerinin uyarısı ile, bu ailenin keşfedilen ilk üyesi olan bcl-2, bcl-x, mcl-1 proteinleri artırılır ve mitokondri membran geçirgenliği azaltılarak anti apoptotik etki elde edilir. Büyüme faktörlerinin azlığı veya DNA hasarı, hatalı proteinlerin varlığı gibi hücrel stres durumlarında ise yine bcl-2 ailesinin üyelerinden bim, bid, bad sensör proteinleri (BH3 proteinleri) artar. Bunlar hem bcl-2 proteinine bağlanarak etkisiz hale getirir hemde bax ve bak isimli efektör proteinleri aktive eder. Bax ve bak mitokondri membranında kanalların porlar açarak membran geçirgenliğini artırır. Bunu sonucunda sitokrom c stoplazmaya çıkarak Apoptoz aktive edici faktöre (Apaf-1) bağlanır. Bu kompleks, tetikleyici kaspazlardan kaspaz 9 ile bağlanarak aktivasyonunu sağlar. Kaspaz 9 da kaspaz 3' ü aktive ederek apoptozun intrinsik yolu gerçekleşir.

Ektrinsik yolak ise plazma membranında bulunan TNF reseptör ailesine ait Fas (CD95) reseptörü görev alır. T hücreleri yabancı yada zararlı gördükleri hücreleri elimine ederken kendi yüzeylerinde eksprese ettikleri Fas Ligandı aracılığı ile Fas reseptörünü aktive eder. Membran iç yüzündeki FADD adaptör proteini aracılığı ile ektrinsik yolağın tetikleyici kaspazı, kaspaz 8 aktive edilir. Kaspaz 8 de yine kaspaz 3' ü aktive ederek apoptozun ektrinsik yolu gerçekleşir. (şekil 1.5)



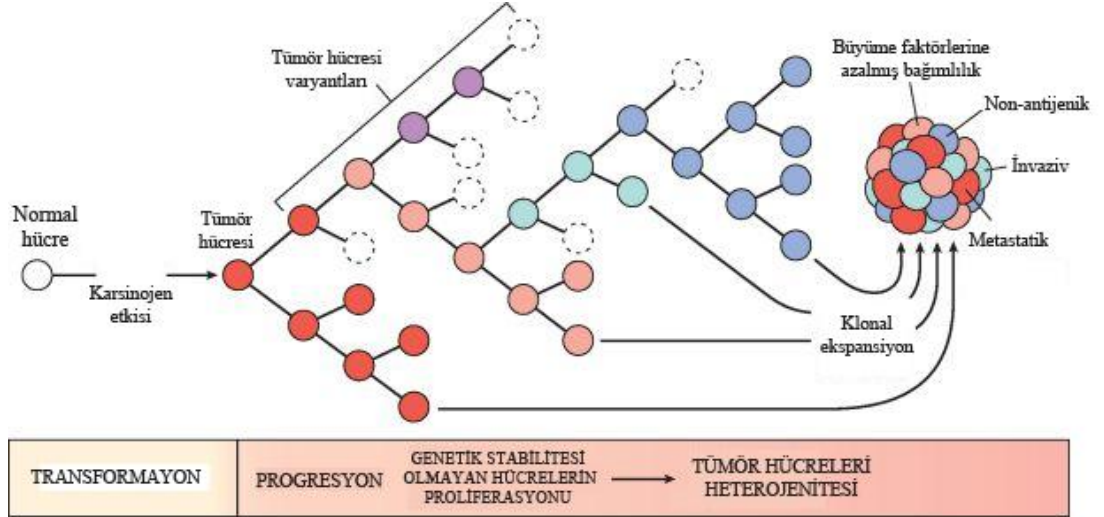
Şekil 1.5 (kaynak: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease)

1.4. Karsinogenez, Neoplazi Gelişimi

Kanser temel olarak büyümeyi sağlayan proto-onkogenlerde, büyümeyi durduran tümör baskılayıcı genlerde, apoptozu regüle eden genlerde ve DNA tamir genlerinde meydana gelen hatalar nedeni ile oluşur¹².

Bununla birlikte oluşan genetik hasarın yada mutasyonun hücre için ölümcül olmaması gerekir ki hücre klonal olarak çoğalabilsin. Karsinogenezin bir başka önemli özelliği ise, tek hücreden başlayan klonal çoğalma sırasında yeni mutasyonlarla fenotipik ve genotipik olarak değişmesi ve gelişmesidir. Bu değişiklikler sebebi ile zaman ilerledikçe kanserli dokunun daha malign özellikler kazandığı klinik olarak da gözlemlenen bir durumdur. Bu bahsedilen malign özellikler; büyüme faktörüne ihtiyaç duymadan çoğalma, büyüme baskılayıcı

faktörlere duyarsızlaşma, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon, anjiogenez, invazyon ve metastaz yapabilme olarak özetlenebilir. Bu özellikler aynı zamanda kanserin 6 karakteristik özelliğini oluşturur¹³. (şekil 1.6)



Şekil 1.6 (kaynak: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8/E)

Proto onkogenler, normal büyüme faktörlerini, reseptörlerini, reseptör sonrası sinyal ileticileri, transkripsiyon faktörlerini veya hücre siklusunu devam ettiren proteinleri kodlayan genlerdir. Nokta mutasyonları, DNA amplifikasyonları veya kromozomal kırıkların oluşması, protoonkogenleri, sürekli aktif hale getirerek tümör gelişimine neden olan onkogenlere dönüşmesine neden olabilir. Sonuç olarak malign hücre büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadan kendi kendine çoğalma özelliği kazanır. (tablo 1.1)

Tümör süpresör genler hücre siklusunun fren mekanizmalarıdır. TGF Beta reseptörü, SMAD 2-4, E-kaderin, NF 1-2, APC/Beta kadenin, PTEN, RB1, p53, WT, p16, BRCA 1-2 gibi hücre proliferasyonunu kontrol altında tutan genlerde meydana gelen mutasyonlar fren mekanizmasını devreden çıkartarak hücrenin malign özellik kazanmasına neden olur.

Tablo 1.1

BÜYÜME FAKTÖRLERİ			
PDGF- β zinciri	<i>SIS</i> (<i>PBGF</i>)	overekspresyon	Astrositom
			Osteosarkom
Fibroblast büyüme faktörleri	<i>HST1</i>	overekspresyon	mide kanseri
	<i>INT2</i> (<i>FGF3</i>)	amplifikasyon	Mesane kanseri
			Meme kanseri
TGF- α	<i>TGFA</i>	overekspresyon	Melanom
			Astrositom
HGF	<i>HGF</i>	overekspresyon	Hepatoselüler karsinom
BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRLERİ			
EGF-reseptör ailesi	<i>ERBB1</i> (<i>EGFR</i>), <i>ERBB2</i>	overekspresyon	Tiroid kanseri
FMS-benzeri tirozin kinaz 3	<i>FLT3</i>	amplifikasyon	Akciğer yassı hücreli karsinom, glioma
Nerotrofik faktör reseptörü	<i>RET</i>	Nokta mutasyonu	Meme ve over kanseri
		Nokta mutasyonu	lösemi
		Nokta mutasyonu	Multipl endokrin neoplazi 2A ve B, ailesel medüller tiroid karsinomu
PDGF reseptörü	<i>PDGFRB</i>	overekspresyon, translokasyon	Glioma, lösemi
Kök hücre faktör reseptörü	<i>KIT</i>	Nokta mutasyonu	Gastrointestinal stromal tümör, seminoma, lösemi
SİNYAL İLETİMİNDE GÖREV ALAN PROTEİNLER			
GTP-bağımlı	<i>KRAS</i>	Nokta mutasyonu	Kolon, akciğer, pankreas
	<i>HRAS</i>	Nokta mutasyonu	Mesane, böbrek tümörü
	<i>NRAS</i>	Nokta mutasyonu	Melanom, hematolojik maligniteler
Nonreseptör tirozin kinaz	<i>ABL</i>	translokasyon	Kronik myeloid lösemi
			Akut lenfoblastik lösemi
RAS sinyal iletimi	<i>BRAF</i>	Nokta mutasyonu	Melanoma
WNT sinyal iletimi	β -catenin	Nokta mutasyonu	Hepatoblastoma, hepatoselüler karsinom
		Overekspresyon	

NÜKLEER REGÜLASYON PROTEİNLERİ			
Transcriptional activators	C-MYC	translokasyon	Burkitt lenfoma
	N-MYC	amplifikasyon	nöroblastom, küçük hücreli akciğer kanseri
	L-MYC	amplifikasyon	küçük hücreli akciğer kanseri
HÜCRE DÖNGÜSÜ REGÜLATÖRLERİ			
siklinler	siklin D	translokasyon	Mantle cell lenfoma
		amplifikasyon	Meme ve özofagus kanseri
	siklin E	Overeksprasyon	Meme kanseri
Siklin bağımlı kinaz	CDK4	amplifikasyon Nokta mutasyonu	Glioblastoma, melanoma, sarkoma

Tablo 1.1 devamı. (kaynak: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease)

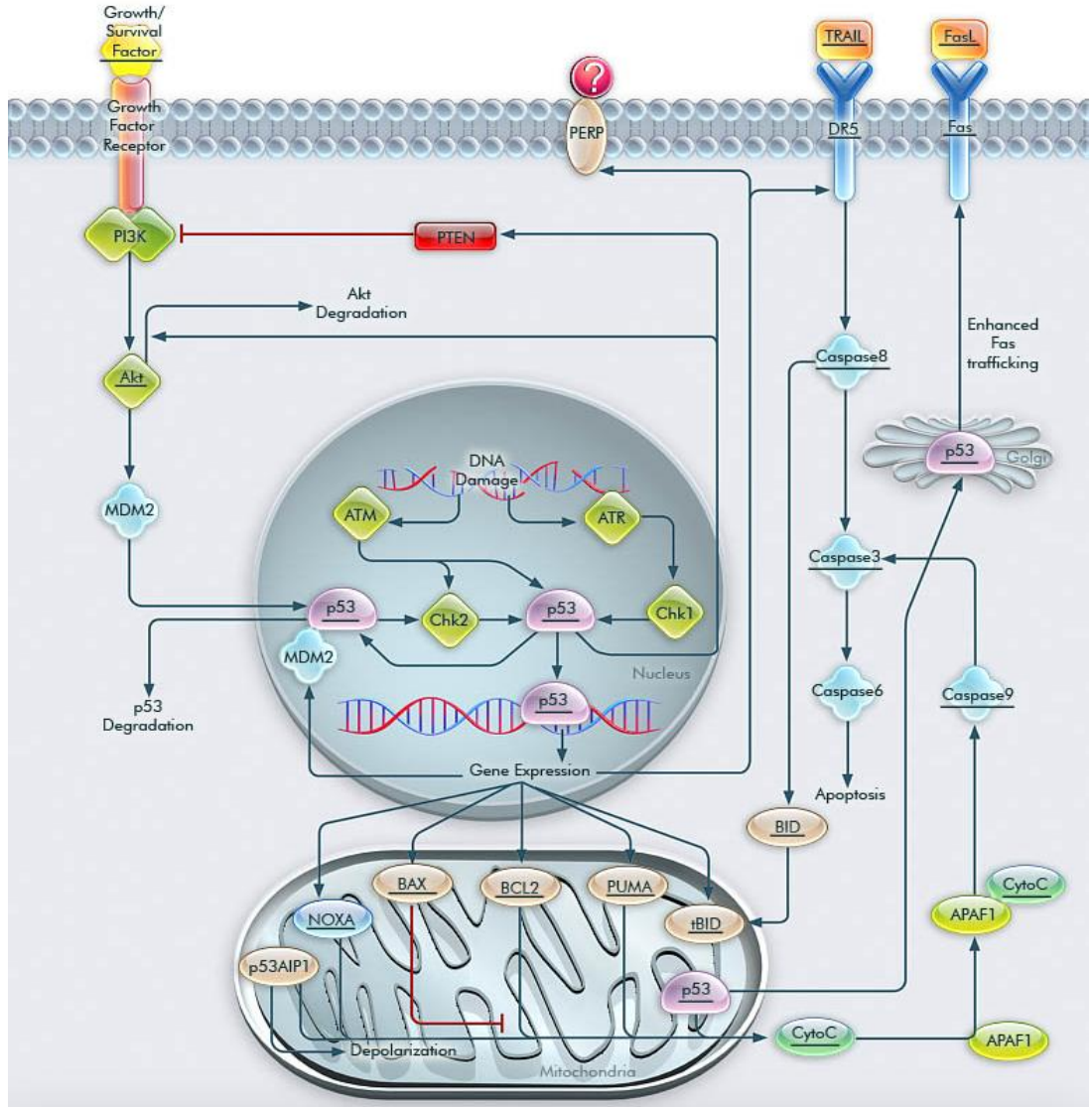
TP53 geni ekspresyon ürünü olan p53 proteini genomun gardiyanı olarak bilinir. p53 bir transkripsiyon faktörüdür. Genetik olarak hasarlı hücrelerin çoğalmasına engel olur. Yüzlerce genin regülasyonunda görev alır.

MDM2 ve MDMX isimli proteinlerle yakın ilişkidir. MDM2 ubikutin ligaz özelliği ile, p53 proteinini hem direkt olarak hem de ubikutinasyon yolu ile yıkımını sağlayarak ortamdan uzaklaştırır, yarı ömrünü kısaltır. MDMX ise ligaz özelliği olmasa da p53 e bağlanarak direkt olarak inaktif hale getirir.¹⁴ p53 ise MDM2 düzeyini arttırarak otokontrolünü sağlar. Bu nedenle normal hücrelerde p53 ‘ün yarı ömrü 6 ile 20 dakika arasındadır.

DNA hasarı, hipoksi, enerji kaynaklarının ve rNTP gibi yapı taşlarının azalması, NO, mitotik iğcik hasarları, telomer kısalması, sıcak veya soğuk şoku, onkogen aktivasyonu gibi hücresel stresleri algılayan çok büyük bir ağın merkezinde bulunur. Hücresel stres sinyalleri, ATM, ATR, p14ARF gibi bir grup sinyal mediatörleri tarafından algılanır ve p53 fosforile edilerek aktif hale getirilirken MDM2 baskılanır. p53’ ün düzeyi ve yarı ömrü artar. Çeşitli modifiye edici proteinlerle metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ribozilasyon, glukolizasyon gibi modifikasyonlarla p53 aktivitesi değişik şekillerde arttırılır. (Bu noktada histondeasetilazlar da p53 aktivitesini baskılar.)^{9,14}

Düzei ve aktivitesi artan p53, siklin bağımlı kinazların genel inhibitörlerinden p21' i arttırarak hücre siklusunu G1/S geçişinde durdurur. DNA hasarının tamir edilmesi için hücreye zaman kazandırır. Aynı zamanda GADD45 gibi proteinleri arttırarak DNA tamirine yardım eder. Eğer tamir başarılamiyorsa siklusu kalıcı olarak durdurulur (senescence) veya apoptoza gidilir⁹. (

Hücrenin maruz kaldığı stresin çeşidine, şiddetine ve süresine göre verilen cevap değişir. Yapılan modifikasyona göre p53' ün hedef genlerine afinitesi değişir. Bu sayede, örnek olarak, Bax ve Puma gibi pro-apopitotik genlerinin transkripsiyonu artarsa hücre apoptoza gider. p21 ekspresyonu artarsa hücre siklusu durdurulur¹⁴. Bunlar gibi daha birçok genle ilişkisi olan p53 genomu koruyarak DNA hasarının sonraki kuşaklara aktarılmasına engel olur. (şekil 1.7)



Şekil 1.7 (kaynak: www.ebioscience.com)

Sonuç olarak, pek de şaşırtıcı olmayan bir şekilde insan tümörlerinin %50 sinden biraz fazlasında bu gende mutasyon görülür. Mutasyonlara ek olarak p53 aktivitesini baskılayan başka mekanizmalar da benzer sonuçlar doğurur. Önemli örneklerinden biri HPV virüsünün E6 proteinidir. E6, p53' e bağlanarak inhibisyonuna neden olur¹⁵

PTEN (Phosphatase and tensin homologue), PI3K/AKT yolağının frenleri olarak görev yapan bir fosfatazdır. Gen mutasyonunda Cowden sendromu görülür. Tiroid, endometrium, meme gibi epitelyum kökenli kanserlerin görülme sıklığı artar¹⁶.

Hücre çoğalmasını destekleyen proteinlerle, tümör süpresör proteinlerin iç içe geçtiği bir başka sistem ise WNT sinyal yolağıdır. c-Myc, siklin D1 gibi hücre çoğalmasını sağlayan genlerin transkripsiyonunda görevli faktör TCF' nin aktif hale geçmesinden sorumlu protein olan Beta-catenin sitoplazmada bulunur. Bu protein ile kompleks hale gelip onu parçalayan APC (Adenomatous polyposis coli) proteini Beta-catenin düzeylerini kontrol altında tutar. Hücre membranında bulunan WNT reseptörüne gelen uyarı sonucunda APC' yi kompleksten ayrılarak B-catenin miktarının artmasını sağlar¹⁷. Hücre içinde B-catenin düzeyini arttıran bir başka mekanizma ise; membranda bulunan ve komşu hücrelerle adezyondan sorumlu e-cadherin proteinidir. Proteinin hücre içinde bulunan ucu Beta-catenin ile ilişkili durumdadır ve bu konumda iken Beta-catenin çekirdeğe giderek transkripsiyonu başlatamaz. Bu durum “kontakt inhibisyon” olarak adlandırılır. Doku zedelenmesi söz konusu olduğunda komşu hücre ile kontağını kaybeden hücrede Beta-catenin serbest kalır ve kontakt inhibisyonu ortadan kalkar. Özofagus, kolon, meme, prostat, over gibi kanserlerde E-cadherin ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir¹⁸

Serin/treonin kinaz kompleksinden oluşan TGF Beta 1 ve 2 reseptörleri bir çok normal epitel, endotel ve hematopoetik hücrelerde bulunur. Reseptör aktive olduğunda R-SMAD' lar fosforillenerek çekirdekte SMAD4' e bağlanır. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri p21 ve p15 genleri eksprese edilir. Ayrıca c-Myc, siklin bağımlı kinaz 2 ve 4, siklin A ve E baskılanır. Bu sayede TGF-Beta potent bir proliferasyon inhibitörü olarak görev yapar. Bu sinyal yolağında meydana gelen mutasyonlar sonucu inaktivasyon bir çok kanser türünde görülür. Özellikle pankreas

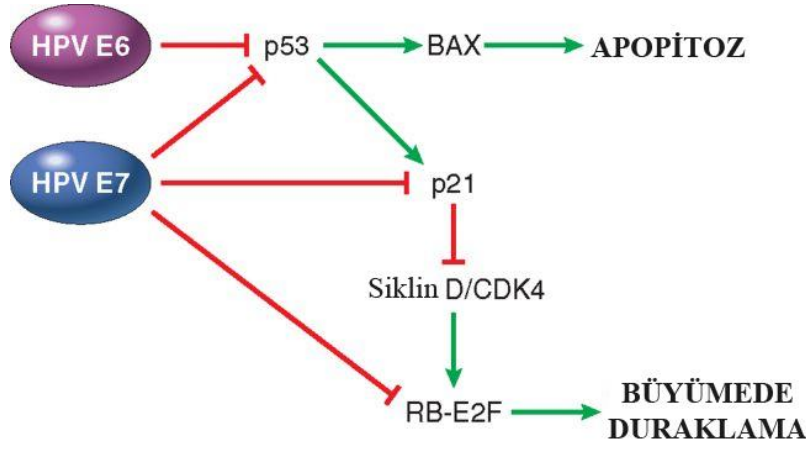
kanserlerin tamamında ve kolon kanserlerin %83' ünde TGF-beta sinyal yolağında mutasyon tespit edilmiştir¹⁹.

Ayrıca kanser dokusunun diğer temel özellikleri; sınırsız replikasyon özelliği göstermesi, anjiogenez için gerekli uyarıyı yaparak kendi beslenmesini sağlayabilmesi ve invazyon ve metastaz yapabilme yeteneği kazanmasıdır. Bu özelliklerin ayrıntılarına bu yazıda girilmeyecektir.

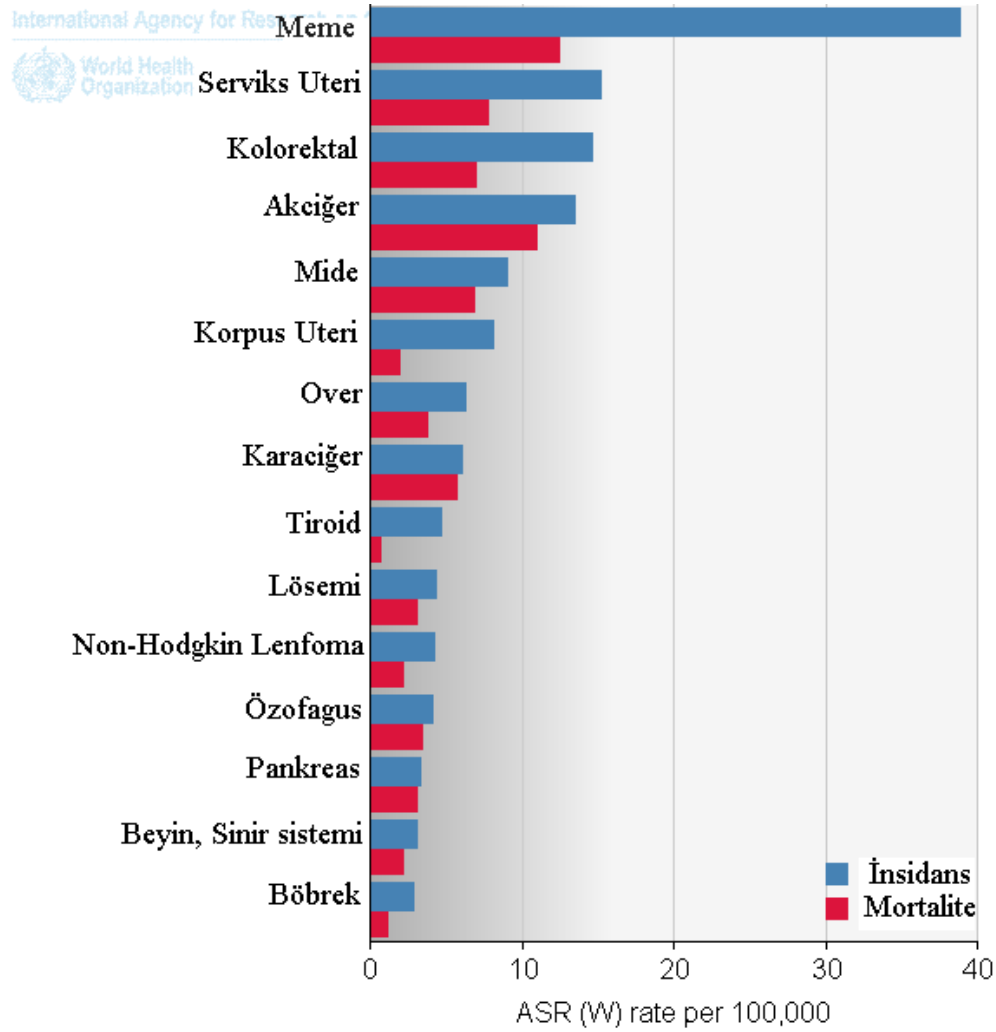
1.5. Servikal Kanser

Servikal kanser, önde gelen kadın sağlığı problemlerinden biridir. 2008 yılında dünya çapında servikal kanser insidansı 529.800; ölüm oranı ise 275.000 olarak belirlenmiştir.²⁰ Gelişmiş ülkelerde kadın kanserleri arasında en sık görülen üçüncü^{21,22}; dünya çapında ise ikinci sıradaki kanser türüdür. Servikal kanserlerin %85' i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir²⁰. Ölüm oranı olarak değerlendirildiğinde ise; kadınlar arasında meme ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sırada bulunur²³. (tablo 1.2) Türkiye istatistikleri ise biraz farklılık gösterir. Yedinci sırada görülen Servikal kanserin yaşa göre standardize edilmiş insidans hızı 4.2; mortalite hızı 1.6 olarak hesaplanmıştır²⁴.

Servikal kanser gelişiminde risk faktörlerinden bazıları; sigara kullanımı, erken yaşta cinsel ilişki, çok sayıda cinsel partner, kronik immünsüpresyon olarak sıralanabilir²⁵. En önemli risk faktörlerinden biri ise inatçı Humanpapilloma virus (HPV) enfeksiyonudur. Özellikle HPV tip 16 başta olmak üzere HPV tip 18, 31 ve 33 enfeksiyonları servikal kanser gelişimi ile yakından ilişkilidir²⁶. E6 ve E7 HPV genomu tarafından eksprese edilen iki onkoproteindir. E6 proteini p53' ü inhibe ederek apoptozu engeller. E7 ise RB' yi inhibe ederek hücre siklusunun devam etmesine neden olur^{15,27,28}. (şekil 1.8)



Şekil 1.8 (kaynak: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8/E)



Tablo 1.2 (kaynak: GLOBOCAN 2008)

Servikal kanserlerin yaklaşık %80 i skuamoz hücreli kanser; %20 si adenokanserdir. Son dönemlerde gelişmiş ülkelerde özellikle skuamoz hücreli kanserin görülme sıklığı gitgide düşmektedir. Bu sonucun tarama testlerinin efektif bir şekilde uygulanması ve HPV aşısının yaygınlaşması ile bağlantılı olduğu kabul edilmektedir²⁹⁻³².

Servikal kanserin en erken evrelerinde hastalık asemptomatik veya sulu kıvamda bir vajinal akıntı ile birlikte olabilir. Bu semptomlar çoğu zaman hasta tarafından fark edilmez. Bu aşamada servikal sitoloji (Papanicolaou yayması) ile tanı koyulabilir. Bu yöntemin sensitivitesi servikal adenokarsinom için daha düşüktür. Çünkü adenokarsinom daha sıklıkla örneklem yapılmasının zor olduğu endoservikal kanalda görülür³³.

Evreleme klinik olarak yapılır. FIGO sınıflamasına göre; lezyonun mikroskopik olarak ölçülen stromal invazyonu 3 mm' den küçükse ise Evre IA1; 3 mm ile 5 mm arasında ise Evre IA2 kabul edilir. Eğer lezyon makroskopik olarak görülebilecek kadar büyükse ve boyutları 4 cm' den küçükse Evre IB1; 4 cm'den büyükse Evre IB2 kabul edilir. Lezyon uterus dışına çıkmış fakat pelvik duvara yada vajen alt 1/3 bölgesine kadar ilerlememişse Evre II, bu bölgelere ilerlemişse veya böbrek fonksiyon bozukluğu gelişmişse Evre III hastalık söz konusudur. Eğer Servikal kanser mesane veya rektum duvarına invazyon yapmışsa Evre IVA; uzak metastaz yapmışsa veya supraklavikular, mediastinal, paraaortik lenf nodu metastazı yapmış ise Evre IVB olmuş demektir.

Evre IA, IB1 ve IIA1 (uterus dışına çıkmış, parametrium tutulumu olmayan 4 cm' den küçük tümör) gibi erken evrelerde tedavi cerrahidir³⁴. Evre IB2 den evre IVA ya kadar tedavide ilk seçim konkomitan kemoradyoterapidir.³⁵⁻³⁷ Ayrıca cerrahi için uygun olmayan ve cerrahi sonrası incelmede patolojik risk faktörleri tespit edilen hastalar içinde kemoradyoterapi uygulanır³⁸.

Burada radyoduyarlayıcı olarak ilk tercih olarak sisplatin kullanılmaktadır. Konkomitan kemoradyoterapi iyi tolere edilse de akut ve uzun dönemde önemli yan etkileri vardır^{39,40}. Sisplatin ototoksisite, nefrotoksisite, nörotoksisite ve kemik iliği

toksisitesi gibi yan etkilere neden olur. Bu nedenle radyoterapi sırasında güçlü bir radyoduyarlaştırıcı olarak kullanılabilecek, daha az yan etkili ajanlara ihtiyaç vardır.

1.6. Radyoterapi

Elektromanyetik dalgalar enerji taşıyan fotonlardan oluşur. Sahip oldukları enerji dalga boyu kısaldıkça artar. Spektrumda düşük enerjiden yüksek enerjiye doğru sıralandığında; radyodalgaları, mikrodalgalar, kızılötesi dalgalardan sonra 700-400 nm dalgaboyu aralığında görünür ışık bulunur. 400 nm’ den daha kısa dalga boyunda morötesi (ultraviyole), X ve gama ışınları vardır. Bu yüksek enerjili ışınlar iyonize radyasyon olarak da adlandırılır. İyonize radyasyonun enerji ölçü birimi Gray (Gy) ‘ dir. 1 kg madde tarafından absorbe edilen 1 joule miktarında enerjiyi ifade eder.

Radyoterapi kanser hücrelerinde DNA hasarı oluşturarak etki gösterir. Bu hasar DNA’ nın direkt veya indirekt yolla iyonizasyonu ile olur. Yüksek enerjili gama ışınları su ve oksijen moleküllerini iyonize ederek serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşturur. Özellikle en potent ROS olan hidroksil radikalleri meydana gelir. Sonuçta oluşan DNA hasarını kanser hücreleri tamir etmekte yetersiz kalır. Biriken hasar kanser hücrelerinin ölmesini veya daha yavaş çoğalmasını sağlar.

Radyoterapinin etkili olabilmesi için ortamın oksijenden zengin olması gerekir. Perfüzyonu bozuk solid tümörlerde oksijen seviyesi düşük olduğu için radyoterapi duyarlılığı azalır. Benzer sebeple, hastanın hemoglobin değerinin düşük olması radyoterapi etkinliğini azaltır⁴¹. Tümör hücrelerinin direncinin kırıldığı minimum radyasyon dozu ile, sağlıklı dokuların tolere edebildiği maksimum radyasyon dozu radyoterapinin başarısını kısıtlayan iki ana faktördür⁵ Bu nedenle eşzamanlı olarak sisplatin gibi radyoduyarlılaştırıcı veya sinerjik etkili ilaçlar kullanılmaktadır.

Radyoterapinin yan etkileri uygulandığı bölgeye, şiddetine ve uygulama süresine göre değişir. Akut yan etkilerinde özellikle epitel hücre hasarına bağlı bulantı, kusma, kızarıklık, şişlik, ağrı, ödem gelişebilir. Kronik olarak fibrosiz, kılırlarda dökülme, cilt kuruluğu, lenfödem gibi yan etkiler gelişebilir. Ayrıca ışın alan

bölgeye göre organ hasarları gelişebilir. Örneğin meme kanserinde kalp hastalığı riski yükselir⁴².

Radyoterapi ile eş zamanlı kullanılacak en ideal ilaç tümör hücrelerinde radyoterapi etkisini arttırırken, sağlıklı hücelere karşı toksik olmayıp hatta radyoterapinin yan etkilerine karşı sağlıklı hüceleri korumalıdır.

1.7. Kemoterapi ve Sisplatin

Yaklaşık 150 yıl önce keşfedilen bir molekül olan sisplatin, 1978 de FDA onayı verildiğinden beri kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Etki mekanizması genel olarak DNA hasarı oluşturarak hücreyi apoptoza götürmektir⁴³. Sistematik ismi ile *cis*-diamminedichloridoplatinum(II) bir platin atomuna *cis*- formda iki klor, iki amin grubu bağlanması ile oluşur $[PtCl_2(NH_3)_2]$. Molekül ağırlığı 301.1 gr/mol' dur. İntravenöz yolla uygulanır. Uygulama sonrası hücre içine pasif difüzyon yolu ile girdikten sonra klor bağları su molekülü ile yer değiştirerek pozitif yüklü aktif iyonize hale geçer ($[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$). DNA hedefi pürinler, özellikle guanin bazlarıdır. Moleküldeki H_2O yerine guaninle bağlanarak $[PtCl(guanine-DNA)(NH_3)_2]^+$ halini alır. DNA nın bu şekilde hasarlanması sonucunda G2 fazında hücre siklusu durur ve apoptoz mekanizmaları başlatılır⁴⁴.

DNA hasarını algılayan Fas/FasL, ATR, Chk2, p53, c-abl gibi proteinler aracılığı ile p53 düzeyleri artar, MDM2 düzeyleri azalır. Zincirleme reaksiyonlarla p21 düzeyi artar hücre siklusu durur. GADD45 ile DNA tamir mekanizmaları aktive edilir. Veya Bax aracılığı ile intrinsik; Fas/FasL aracılığı ile ekstrinsik caspase yolu aktive edilir, caspase 9 ve caspase 3 ile apoptoz başlatılır⁴⁵.

Zaman içinde hücreler bu etkilere uyum sağlayarak kendi savunma tekniklerini geliştirirler. Sisplatinin hücre içine girişi engellenir. Hücreye girmeyi başaran ve iyonize hale geçen sisplatin moleküllerinin glutatyon ile detoksifiye edilerek hücre dışına atılması hızlandırılır. Anti apoptotik mekanizmalar devreye girer. DNA tamir mekanizmaları güçlendirilir. Ve sonuç olarak sisplatin direnci gelişir⁴⁶.

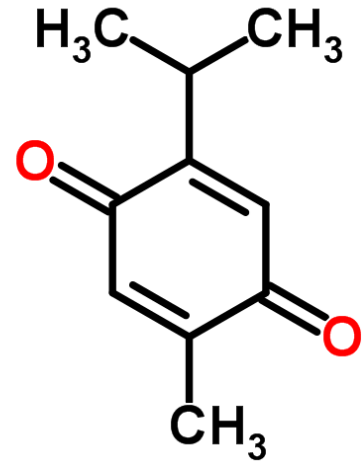
Sisplatin önemli yan etkilere sahiptir. Bulantı şikayetine en çok yol açan kemoteropatik ilaçlardan biridir. Bulantı hasta konforunu ve hasta uymunu ciddi şekilde bozan bir yan etkidir. Ayrıca nefrotoksisite, ototoksisite, nörotoksisite, kemik iliği süpresyonu en ciddi yan etkileridir. Klinik uygulamada bu yan etkiler tedavinin kısıtlanmasına neden olur.

1.8. Çörekotu ve Thymoquinone

Botanik nomenklatürde Ranunculaceae ailesinden *Nigella sativa* adı verilen çörekotu birçok kültürde şifalı olarak kabul edilmiştir. Doğu Avrupa, Kuzey Afrika, Güney Batı Asya ve Ortadoğu’ da yüzyıllardır bilinmekte ve kullanılmaktadır. Unani, Ayurveda ve Siddha gibi Hindistan geleneksel tıp sistemlerinde çörekotu yağı önemli bir ilaç olarak kullanılmıştır^{47, 48}. Eski Latince’ de “her derde deva”; Arapça’ da “kutsanmış tohum” anlamlarına gelen isimler verilmiştir⁴⁹. İslam inancında da İslam dini peygamberi Hz. Muhammed’ in bir hadisinde “Ölüm dışında hiçbir hastalık yoktur ki, çörek otunda onun için bir deva bulunmasın.” [Buhârî, Tıbb 7; Müslim, Selam 89, (2215); Tirmizî, Tıbb 5, (2042),22,(2071)] dediği aktarılmıştır. İbn-i Sina, Tıbbın Kanunu (El-Kanun fi't-Tıb) adlı eserinde “Çörekotu vücudun enerjisini arttırır, bitkinlik ve keyifsizliğe iyi gelir.” şeklinde bahsetmiştir.

Birçok çalışmada çörekotunun antibakteriyel, antifungal, antihelmintik, antioksidan, antidiyabetik, antiinflamatuvar, analjezik, kardiyovasküler, gastroprotektif, hepatoprotektif, renoprotektif, anti-konvülzan, antiastmatik ve antineoplastik etkileri gösterilmiştir^{4,47,50}.

Çörekotunundan izole edilen birçok aktif bileşen vardır. Bunlardan, sistematik ismi, “2-Isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinon” olan Thymoquinone (TQ) % 30-48 oranı ile en önemli olandır. Formülü $C_{10}H_{12}O_2$; molekül ağırlığı 164.2 gr/mol’ dur (şekil 1.9). Büyük ölçüde apolar moleküler yapısı ile yağda çözünür. Hücre içine pasif difüzyon ile girer.



şekil 1.9

Hücre kültürü çalışmalarında TQ nun anti tümoral, anti anjiojenik özellikleri⁵¹ öne çıkmıştır. Meme, kolon, larinks, over, akciğer, kemik, prostat, serviks ve daha birçok tümör hücrelerinde antiproliferatif etkileri gösterilmiştir^{49,50}. Bu etkinin p53, bax, caspase 3-8-9 gibi proapoptotik mekanizmaların aktivasyonu ve/veya bcl-2 gibi anti apoptotik mekanizmaların baskılanması aracılığı ile olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda antioksidan ve sitoprotektif etkileri tespit edilmiştir^{47,52,53}. Kanser hücrelerine toksik etki gösterirken, keratinosit, böbrek hücreleri, fibroblastlar gibi bir çok normal doku hücresine toksik olmadığı gösterilmiştir⁵⁴.

HCT-116 insan kolon kanseri hücrelerinde TQ ‘nun hücre siklusunu G1 fazında durdurduğu; p53, p21 mRNA larının 2.5-4.5 kat arasında arttığı, bcl-2 miktarının belirgin derecede baskılandığı; pifithrin-alpha isimli spesifik p53 inhibitörünün eklenmesi ile TQ’ nun bu etkilerinin kaybolduğu gözlemlenmiştir⁵⁵.

MCF-7/DOX doksorubisin dirençli insan meme kanseri hücrelerine 48 saat süre, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda TQ uygulamasından sonra hücre siklusunun G2/M geçişinde durduğu, Bax/bcl-2 oranının yükseldiği, kaspaz aktivitesinin artarak hücrelerin apoptoza gittiği; ayrıca PTEN mRNA düzeylerinin 24 saat sonunda 7.9 katına çıktığı fakat siRNA ile Pten susturulduktan sonra TQ’ nun apoptotik etkisinin kaybolduğu gözlemlenmiştir⁵⁴

Fare papilloma SP-1 hücreleri, I7 hücreleri ve primer fare keratonisit hücreleri besi yerinde üretildi. TQ metanolde çözüldükten sonra metanol konsantrasyonu besi yerinde %0.1’ i geçmeyecek şekilde, hücreler TQ ile birlikte çeşitli konsantrasyonlarda 24 veya 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İşlemden geçirildikten sonra PI ile boyanarak, akım sitometrisi, TUNEL assay, RNase protection assay, radyoanalitik görüntüleme, westernblot teknikleri ile hücre siklusu, mRNA, apoptoz analizleri yapılmış; PMK’ lerin 12 saat sürede TQ 80 mM konsantrasyonlarına kadar etkilenmediği, IC50 konsantrasyonları SP-1 hücreleri için 30mM; I7 hücreleri için 60mM olarak hesaplanmıştır. SP-1 hücrelerinde 4 saatte; I7 hücrelerinde 8 saatte görülebilir değişiklikler meydana gelmiştir. 24 saatlik TQ uygulaması sonrası SP-1 hücrelerinin G1/S fazında; I7 hücrelerinin G2/M fazında ağırlıklı olarak durakladığı, uzayan sürelerde ise iki grubunda apoptoza uğradığı

gözlemlenmiştir. SP-1 hücrelerinde p53 ve p21 düzeylerinin değişmediği fakat p16 düzeylerinin dramatik şekilde yükseldiği; bu yükselişin TQ uygulamasından 2 saat sonra başladığı, 24 saat boyunca devam ettiği, 48 saat sonra ise tekrar ölçülemez değerlere indiği izlenmiştir. I7 hücrelerinde ise TQ uygulamasından 4 saat sonra p53, 8 saat sonra da siklin B proteinin arttığı, p21 in değişmediği; her iki hücre kültüründe de TQ uygulamasında 8 saat sonra bcl-2 seviyelerinde belirgin düşüş görülmüştür⁵⁶.

MC3T3-E1 osteoblast hücreleri 24 ve 48 saat süre ile 10-40 μ M konsantrasyonlarda TQ uygulanmasından sonra %20 oranında proliferasyonda artış görülmüştür. Ayrıca 10 μ M konsantrasyonda TQ uygulanmış MC3T3-E1 osteoblast ve 3T6 fibroblast hücrelerinin xCelligence sistemi ile analizinde TQ' nun hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir⁵⁷

TQ' nun antioksidan ve anti artritik etkileri Wistar ratlarında araştırılmıştır. TQ ile tedavi sonrası doz bağımlı olarak artrit baskılandığı gözlemlenmiştir. Artiküler elastaz ve myeloperoksidaz seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir. Lipid peroksidasyonunu azaldığı, glutatyon, süperoksitdismutaz ve katalaz seviyelerinin artış tespit edilmiştir⁵⁸.

Bir başka çalışmada, MFC7 meme adenokarsinom ve T47D meme duktal karsinom hücrelerinde iyonize radyasyon ile birlikte, 1-250 μ M arasında değişen konsantrasyonlarda TQ nun etkileri araştırılmıştır. Tek başına TQ uygulandığında IC50 değerleri MCF7 hücrelerinde 104 μ M, T47D hücrelerinde 37 mM olarak hesaplanmıştır. Yine değişik dozlarda TQ uygulamasından 6 saat sonra 0.581 Gy/dk (toplam 2.5 Gy) dozda gama ışını verilmiş ve MCF7 hücreleri için IC50 konsantrasyonu 72 μ M, T47D hücreleri için ise 18 μ M değerlerine düşmüştür. Daha sonra 50 μ M TQ ile birlikte 2.5 Gy gamma ışını uygulaması sonrası hücre siklusu ve apoptoz akım sitometresi ile değerlendirilmiş, 24 saatlik tedavi sonrasında %55-68 oranlarında apoptoz geliştiği ve hücrelerin G1 fazında toplandığı gözlemlenmiştir⁵

Skuamöz hücreli serviks kanseri hücre hattında (SiHa), 3T3-L1 fibroblast hücrelerinde ve Vero epitel hücrelerinde sisplatinin etkisinin TQ ile karşılaştırıldığı bir çalışmada; servikal kanser hücrelerine karşı TQ nun sisplatinden daha etkili olmasına karşın fibroblast ve epitelyum hücrelerine toksik olmadığı gösterilmiştir⁴.

Hücreler TQ 1, 3, 10 ve 30 µg/mL (6, 18, 60, 180 µM), veya sisplatin 1, 3, 10, 30 µg/mL (3.3, 10, 33, 100 µM) dozlarda 24,48 ve 72 saat sürelerde uygulanmış ve hücre toksisitesi MTT ve trypan blue testleri ile değerlendirilmiştir. 72 saat sonunda SiHa hücrelerinde IC50 konsantrasyonu TQ için 10.6 µg/mL ve sisplatin için 12.3 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Fakat 3T3-L1 fibroblast hücrelerinde IC50 konsantrasyonları TQ için 18.2 µg/mL ve sisplatin için ise 2.8 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Daha sonra aynı konsantrasyonlarda TQ uygulanmış hücrelerde 72 saat sonra p53, bcl-2 ve bax ekspresyonları ELISA kitleri ile ölçülmüş. Artan dozlarda p53' de belirgin artış, bcl-2' de belirgin inhibisyon görülürken bax ekspresyonunda değişiklik gözlenmemiştir⁴.

Özet olarak literatürde yer alan bilgilere göre, çörekotu ekstraktının servikal kanser hücre kültürlerinde anti-apoptotik etki gösteren bcl-2 geni ekspresyonunda belirgin inhibisyon ve pro-apoptotik etkili p53 ve caspase 3,8,9 ekspresyonlarında belirgin artış sağladığı gösterilmiştir.^{4,48} SiHa hücre kültüründe sisplatinden daha fazla apoptotik etkisi olurken, sağlıklı hücrelere karşı daha az toksik gösterilmiştir.⁴ Ayrıca meme kanseri hücrelerinde de radyoterapi etkisini belirgin derecede arttırdığı gözlemlenmiştir.⁵

Bu veriler ışığında servikal kanserin tedavisinde kullanılan sisplatin ve radyoterapi kombinasyonundan daha etkili fakat yan etki potansiyeli daha düşük bir tedavi alternatifi olarak thymoquinone ve radyoterapi etkisini SiHa servikal skuamöz kanser hücre kültürlerinde araştırmayı planladık.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürleri

İnsan servikal skuamoz karsinom hücreleri (SiHa) American Type Culture Collection (ATCC) den satın alındı. 55 yaşında Asyalı bir hastadan cerrahi sonrasında izole edilen hücrelerin histolojik derecesi 2 ve her hücre 1-2 kopya HPV tip 16 ile enfekte; ayrıca p53 ve pRB pozitif. İnsan gingival fibroblast (HGF) hücreleri Prof. Dr. Sema Hakkı tarafından temin edildi.

SiHa hücreleri Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM); HGF hücreleri Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içinde üretildi. Her iki medyaya da %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penisilin, Streptokinaz, Glutamin (PSG) ilave edildi. 37 C 'de %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda inkübe edildi.

2.2. Kimyasallar

Thymoquinone (TQ), Sisplatin Sigma-Aldrich Cehmicals' dan satın alındı.

2.3. Hücre Proliferasyon ve Viabilite Değerlendirilmesi

xCELLigence ve E-Plate 96 (Roche Applied Sciences) cihazı ile hücre canlılığı ölçüldü. Sistem aracılığı ile, hücre kültürü E-Plate'lerinin zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrotlar sayesinde her 10 dakikada bir kez empedans ölçümleri yapıldı. Zemine tutunan canlı hücrelerin sayısı ve tutunma şekli ölçülen empedansı değiştirdiği için; hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi hakkında gerçek zamanlı olarak kantitatif bilgi elde edildi. Bu yöntemle hücrelere hiçbir işaretleme yapılmadığı için karıştırıcı faktörler minimumda tutuldu.

2.4. Hücrelere Thymoquinone ve Sisplatin Uygulanması

Dimetil Sulfoksit (DMSO) düşük toksisiteli, hem polar hem de apolar maddeleri çözme özelliğine sahip polar aprotik bir çözücüdür. Aynı zamanda embriyonik ve hematopoetik kök hücrelerin dondurulmasında %10' luk

konsantrasyonlarda kullanılır. TQ ve sisplatin ayrı olarak DMSO içinde çözüldü. DMEM veya EMEM ile seyreltilerek 5,10,50 ve 100 μM 'lık taze çözeltiler hazırlandı. Çözeltilerdeki DMSO oranı en fazla %1 olacak şekilde tutuldu. Bütün çözeltilerin pH değerleri 8 ile 10 arasında ölçüldü.

Daha önceden inkübe edilen SiHa ve HGF hücrelerinden süspansiyon hazırlanarak, 96 kuyucuklu E-plate' e kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. E-plate xCelligence cihazına yerleştirilerek 37 C 'de %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda inkübe edildi. 18 saat sonra cihaz verilerinden hücre proliferasyonunun uygun değerlerde olduğu görüldü. 4' er kuyucuklu gruplar halinde 5,10,50 ve 100 μM konsantrasyonlarda TQ veya sisplatin içeren DMEM + % 10 FBS + PSG çözeltileri HGF hücrelerine uygulandı. Aynı şekilde EMEM içeren çözeltiler ise SiHa hücrelerine uygulandı. İlaçsız kontrol grupları ve hücre içermeyen medyalardan oluşan kontrol grupları da oluşturuldu. İzleme devam edildi.

2.5. Hücrelerin Işınlanması

Hücrelere ilaç uygulamasını takiben 6. saatte E-plate' in tamamını içine alacak şekilde Varian Linac DHX lineer hızlandırıcı aracılığı ve 6 MV enerji ile toplam 4 gray X ışını uygulandı. Cihaz kaynak-cilt mesafesi 100 cm olacak şekilde ayarlandı. 1 cm'lik bolus materyali kullanıldı. Uygulamanın ardından hücrelerin empedans değerlerinin izlemine devam edildi.

2.6. İstatistiksel Analiz

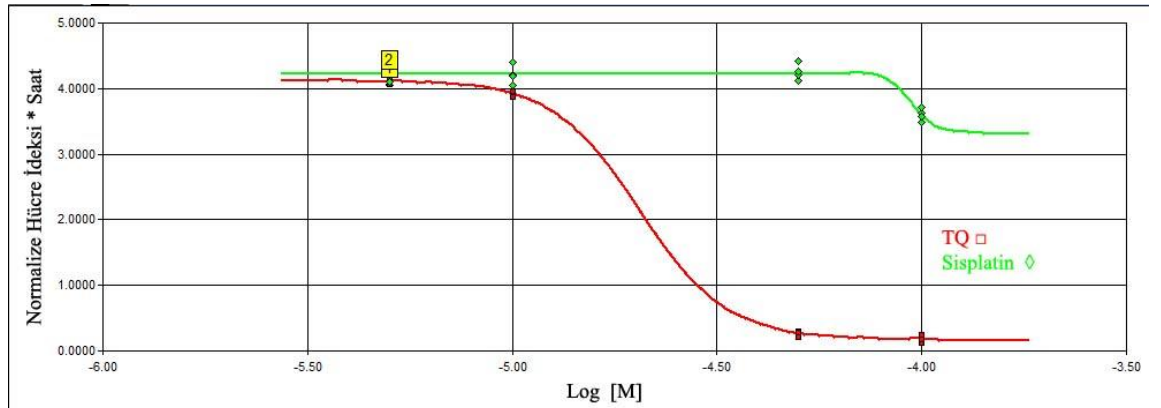
xCELLigence cihazının yazılımı olan RTCA v 1.2.1.1002 ile doz-cevap eğrileri elde edildi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. GraphPad Prism v6.03 ile analysis of variance (ANOVA) ve student's t test hesaplamaları yapıldı. Güven aralığı %95, anlamlı p değeri <0.05 seçildi.

3. BULGULAR

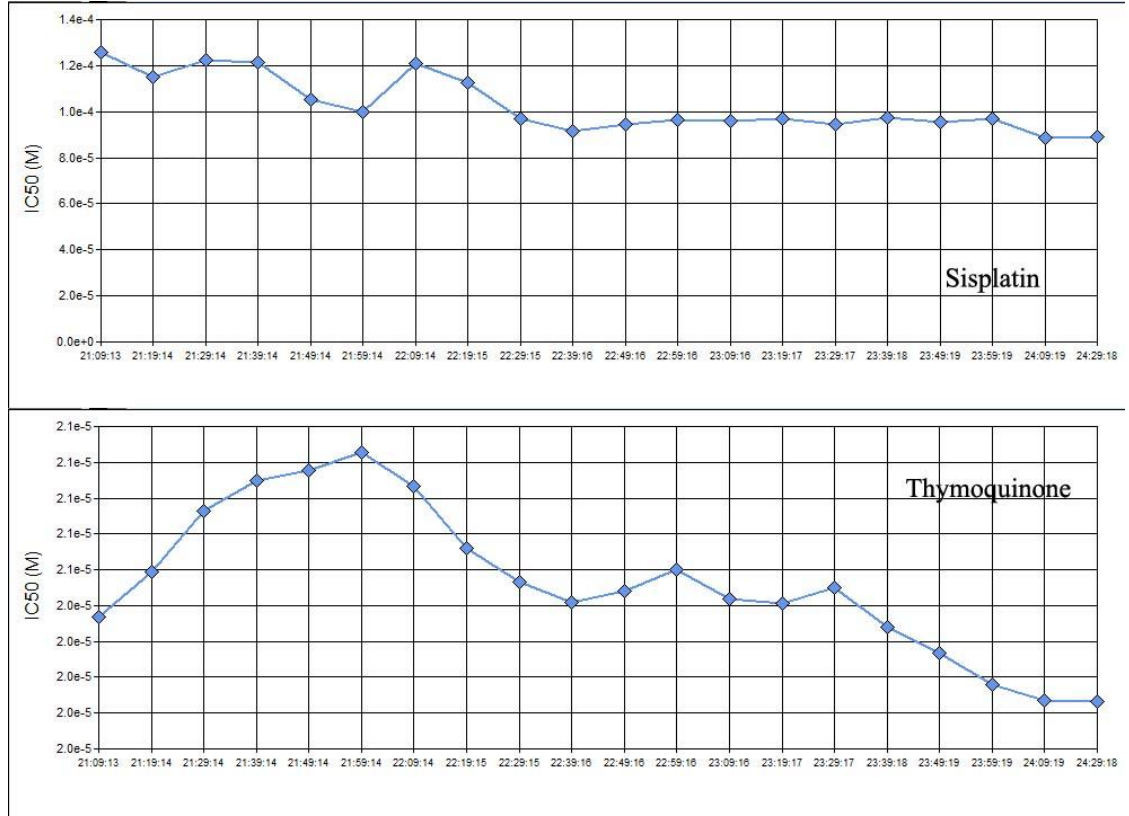
Toplam 145 saat süren deneyin 18. saatinde ilaç uygulamaları (yaklaşık 30 dakika süren) ve 24. saatinde ise radyoterapi uygulaması (yaklaşık bir saat süren) yapıldı. Bulgular aktarılırken deney süreci “radyoterapi öncesi” ve “radyoterapi sonrası” olarak iki ana parçaya bölünerek incelendi. “Radyoterapi öncesi” olarak tanımlanan birinci parçada, deneyin 18. saatinde ilaç uygulamasının hemen ardından başlayıp; deneyin 24. saatinde uygulanan ışınlamanın hemen öncesine kadar geçen 6 saatlik süreç incelendi. “Radyoterapi sonrası” olarak tanımlanan ikinci parçada ise deneyin 24. saatinde uygulanan ışınlamanın hemen ardından başlayıp; deney sonuna kadar olan süreç incelendi. İncelenen her zaman diliminde sırası ile HGF ve SiHa hücreleri üzerinde sisplatin ve TQ’ nun artan dozlarda etkileri aktarıldı.

3.1.1. Radyoterapi Öncesinde HGF ve SiHa Hücreleri Üzerinde Thymoquinone ve Sisplatinin IC50 Değerleri

HGF hücrelerine sisplatin ve TQ uygulamasından sonraki 6 saat içinde elde edilen verilerle; sisplatin için IC50 değeri 94.856 μ M ($R^2=0.88$) , TQ için IC50 değeri 20.498 μ M ($R^2=0.99$) olarak hesaplandı. Ayrıca 21. ve 24 saatler arasında zamana karşı IC50 değerleri aşağıdaki gibi gözlemlendi. (Şekil 3.1. - 3.2)

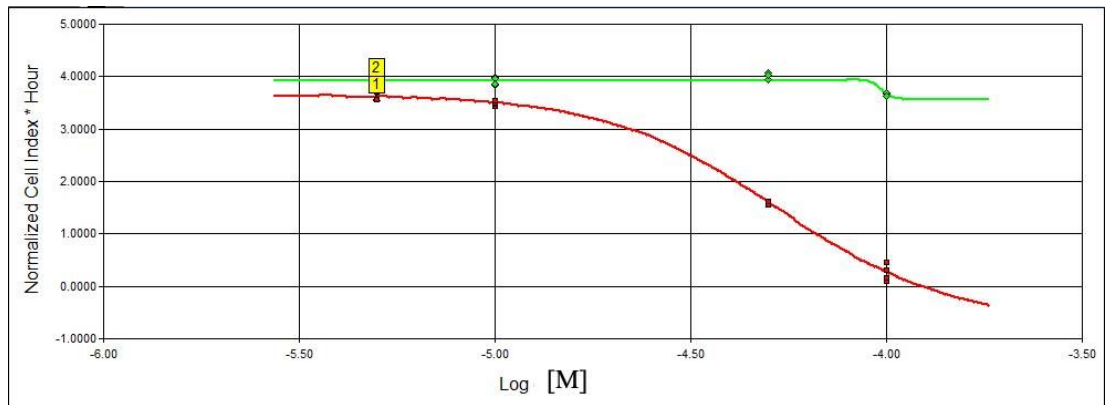


Şekil 3.1. HGF hücrelerinde 21. ve 24. Saatler arasında hücre indeksi-zaman eğrisi altında kalan alana karşı konsantrasyon logaritması

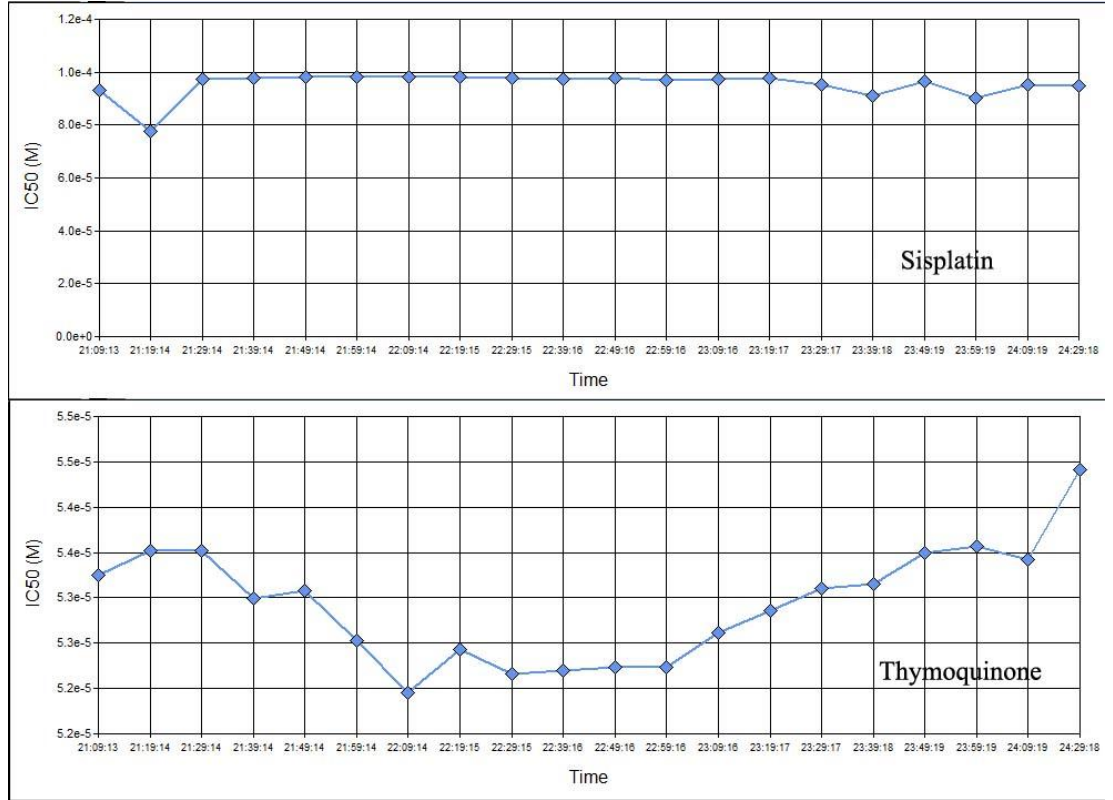


Şekil 3.2 HGF hücrelerinde cisplatin ve thymoquinone için IC50 değerlerinin zamana karşı değişim grafiği

SiHa hücreleri için hesaplanan IC50 değerleri ise; 21. ve 24. saatler arasında cisplatin için 97.355 μM (R^2 : 0.60), TQ için 53.619 μM (R^2 : 0.99) oldu. (Şekil 3.3 - 3.4)



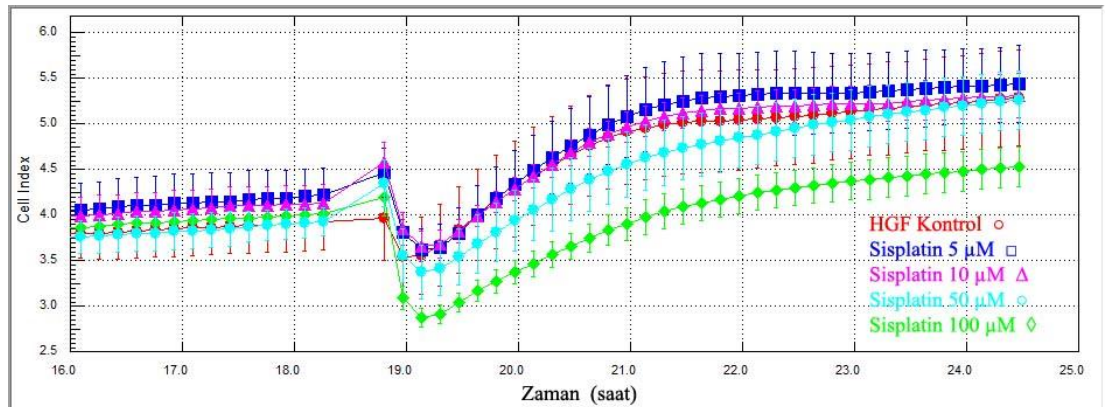
Şekil 3.3 SiHa hücrelerinde 21. ve 24. Saatler arasında hücre indeksi-zaman eğrisi altında kalan alana karşı konsantrasyon logaritması



Şekil 3.4. SiHA hücrelerinde sisplatin ve thymoquinone için IC50 değerlerinin zamana karşı değişim grafiği

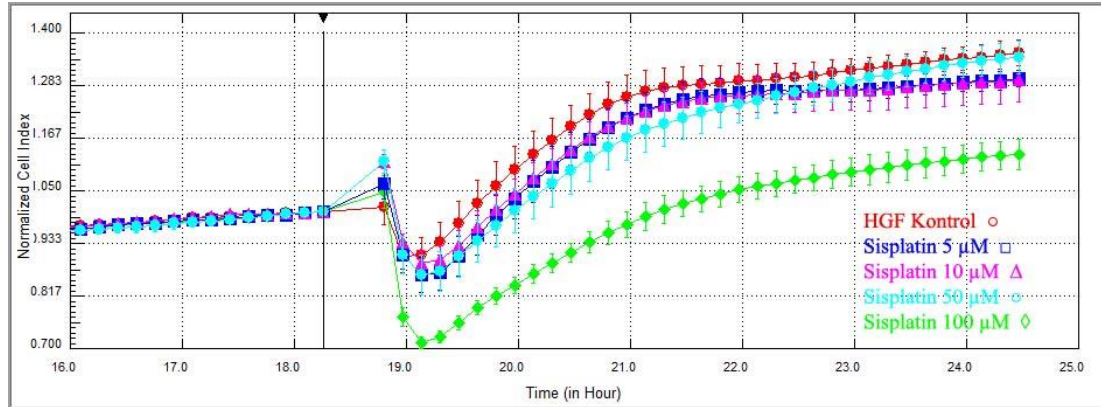
3.1.2. Radyoterapi Öncesinde HGF Hücrelerine Sisplatinin Etkileri

Deneyin 18. saatinde HGF hücrelerine sisplatin 5, 10, 50 ve 100 μM dozlarda uygulandı. Deneyin 24. saatinde, dört farklı doz için de hücre indeksi ölçümlerinde kontrol gruplarına göre anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. (şekil 3.5.)

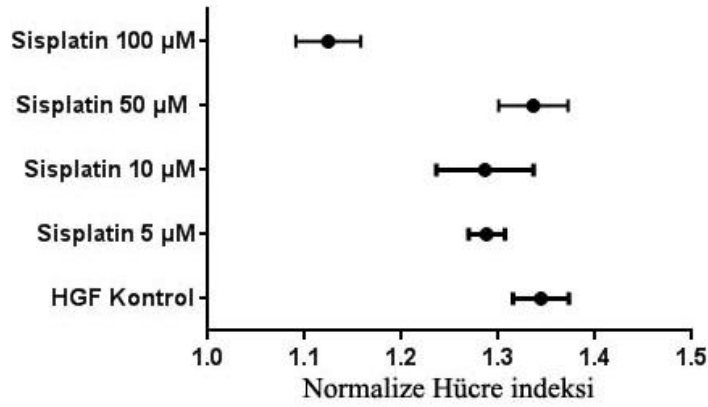


Şekil 3.5. HGF hücrelerine sisplatin uygulanması ve radyoterapiye kadar geçen süre

Ancak veriler deneyin 18. saatindeki ilaç uygulamasından hemen önceki ölçümlere göre normalize edildiğinde ise; HGF hücrelerinde sisplatinin 100 μ dozda baskılayıcı etkisi açığa çıktı ($p= 0.0001$). HGF kontrol grubunun 24. saatteki hücre indeksi ortalaması 1.38 ± 0.01 ; sisplatin 100 μ M grubun ortalaması ise 1.16 ± 0.01 olarak hesaplandı.(Şekil 3.6. - 3.7.)



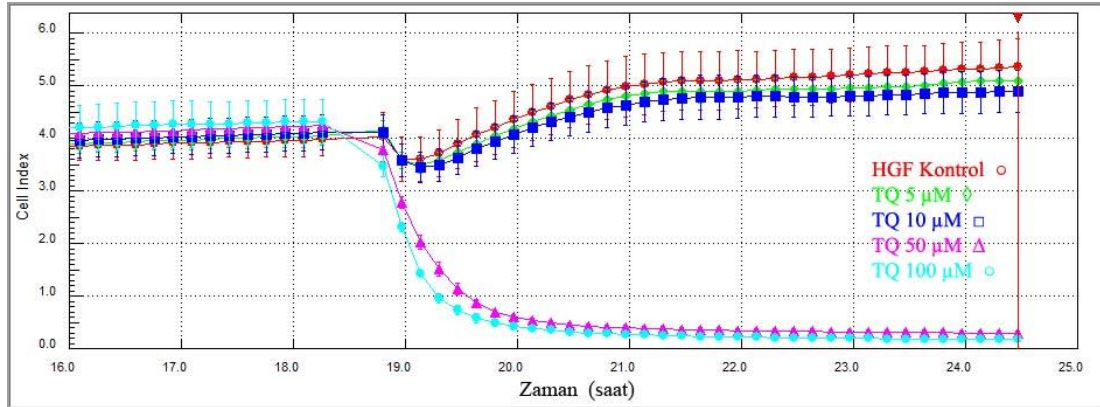
Şekil 3.6. HGF hücrelerine sisplatin uygulanması ve radyoterapiye kadar geçen süre. Veriler 18. Saatte ilaç uygulaması öncesi değerlere göre normalize edilmiştir.



Şekil 3.7. HGF hücrelerine sisplatin uygulanması ile radyoterapiye kadar geçen süre içinde normalize hücre indeksleri arasındaki farklar.

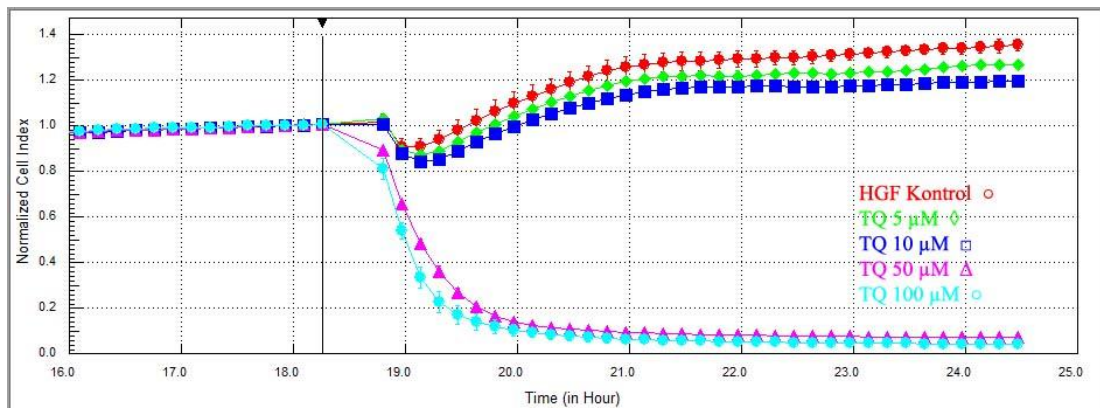
3.1.3. Radyoterapi Öncesinde HGF Hücrelerine Thymoquinone' nun Etkileri

Deneyin 18. saatinde HGF hücrelerine TQ 5 ve 10 μM dozlarda uygulanmasının ardından, deneyin 24. saatine kadar geçen sürede, hücre indeksinde kontrol gruplarına göre anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Fakat, 50 ve 100 μM dozlarda TQ uygulamasının hemen ardından hücre indeksleri sıfıra yakın değerlere kadar düştü (Şekil 3.8.)

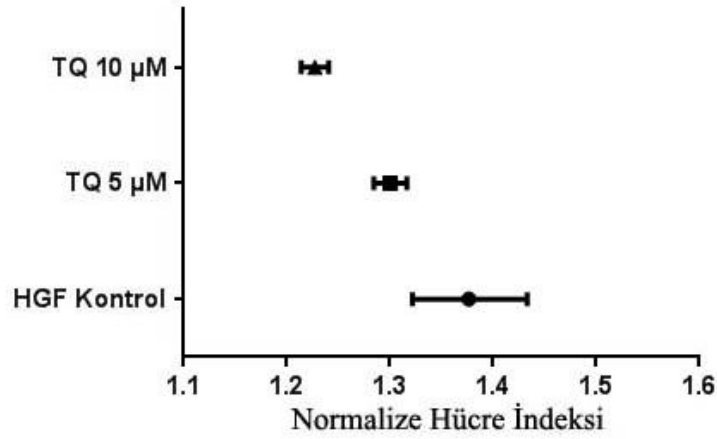


Şekil 3.8. HGF hücrelerine thymoquinone uygulanması ve radyoterapiye kadar geçen süre

Veriler deneyin 18. saatindeki ilaç uygulamasından hemen önceki ölçümlere göre normalize edildiğinde ise; deneyin 24. saatindeki hücre indeksleri değerlendirildiğinde TQ' nun 10 μM dozda uygulanmasının HGF hücreleri üzerinde anlamlı baskılayıcı etkisinin olduğu izlendi. ($p=0.009$) HGF kontrol grubu hücre indeksi ortalaması 1.38 ± 0.01 ; TQ 10 μM grubunun ortalaması $1,23 \pm 0.01$ olarak hesaplandı. (Şekil 3.9. - 3.10.)



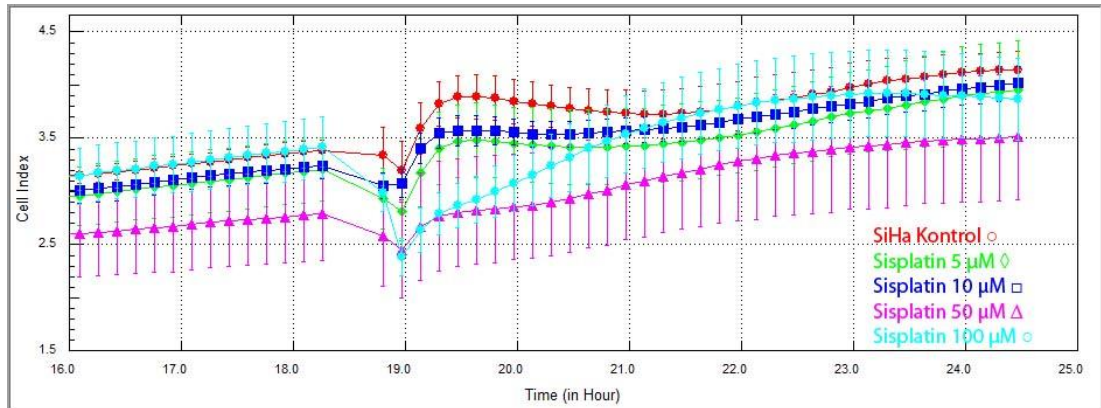
Şekil 3.9. HGF hücrelerine thymoquinone uygulanması ve radyoterapiye kadar geçen süre. Veriler 18. Saatte ilaç uygulaması öncesi değerlere göre normalize edilmiştir.



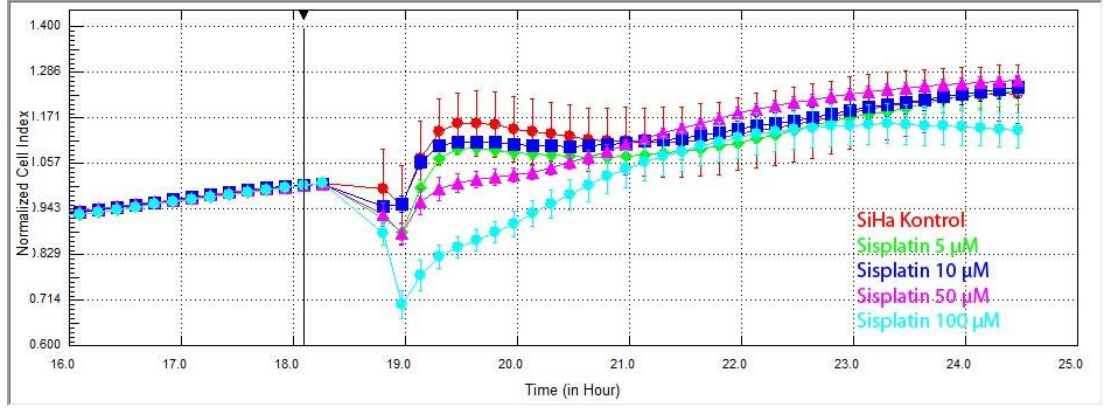
Şekil 3.10. HGF hücrelerine thymoquinone uygulanması ile radyoterapiye kadar geçen süre içinde normalize hücre indeksleri arasındaki farklar.

3.1.4. Radyoterapi Öncesinde SiHa Hücrelerine Sisplatinin Etkileri

Deneyin 18. saatinde SiHa hücrelerine sisplatin 5, 10, 50 ve 100 µM dozlarda uygulandı. Deneyin 24. saatinde, hiçbir doz grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gözlenmedi. (şekil 3.11.) Grafikler 18. saatteki ilaç uygulaması öncesine göre normalize edildiğinde de fark oluşmadı. (Şekil 3.12.)



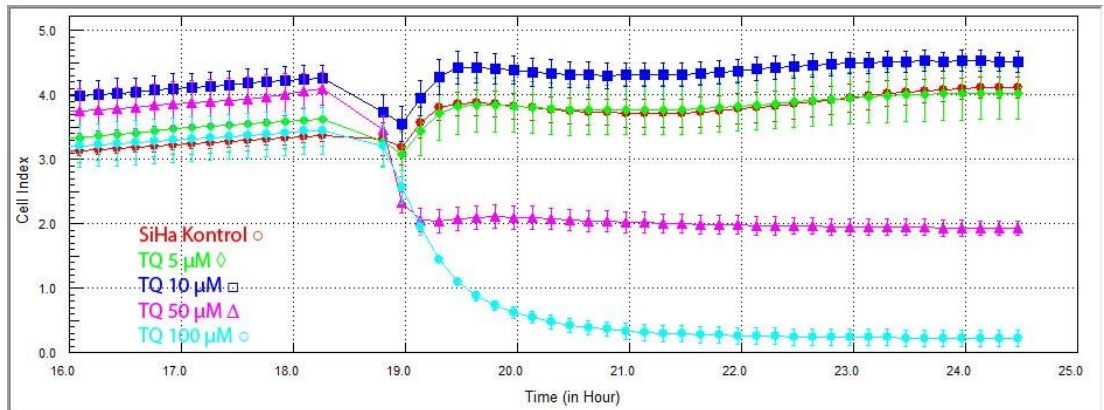
Şekil 3.11. SiHa hücrelerine sisplatin uygulanması ve radyoterapiye kadar geçen süre



Şekil 3.12. SiHa hücrelerine sisplatin uygulanması ve radyoterapiye kadar geçen süre. Veriler 18. Saatte ilaç uygulaması öncesi değerlere göre normalize edilmiştir.

3.1.5. Radyoterapi Öncesinde SiHa Hücrelerine Thymoquinone' nun Etkileri

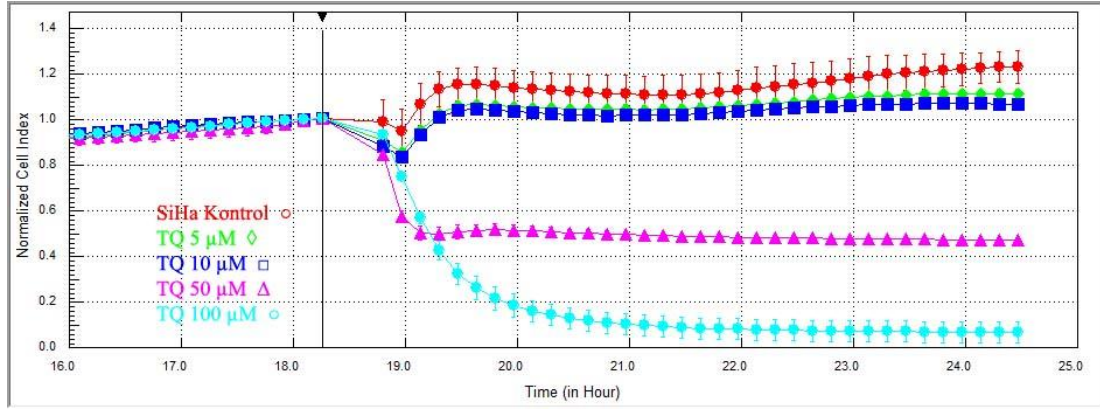
SiHa hücrelerine 5 ve 10 μM dozda TQ uygulanmasının ardından hücre indekslerinde anlamlı farklılık gözlenmedi. 50 μM dozda TQ uygulamasının hemen ardından hücre indeksi yarı yarıya düştü. 100 μM dozunda TQ ile hücre indeksi sıfıra yakın değerlere indi. ($p < 0.0001$) (Şekil 3.13.)



Şekil 3.13. SiHa hücrelerine sisplatin uygulanması ve radyoterapiye kadar geçen süre

Veriler deneyin 18. saatindeki ilaç uygulamasından hemen önceki ölçümlere göre normalize edildiğinde ise; deneyin 24. saatindeki hücre indeksleri değerlendirildiğinde TQ' nun 10 μM dozda uygulanmasının SiHa hücreleri üzerinde anlamlı baskılayıcı etkisinin olduğu izlendi. ($p = 0.016$) SiHa kontrol grubu

hücre indeksi ortalaması 4.122 ± 0.08703 ; TQ 10 μM grubunun ortalaması 4.519 ± 0.08147 olarak hesaplandı. (Şekil 3.14)



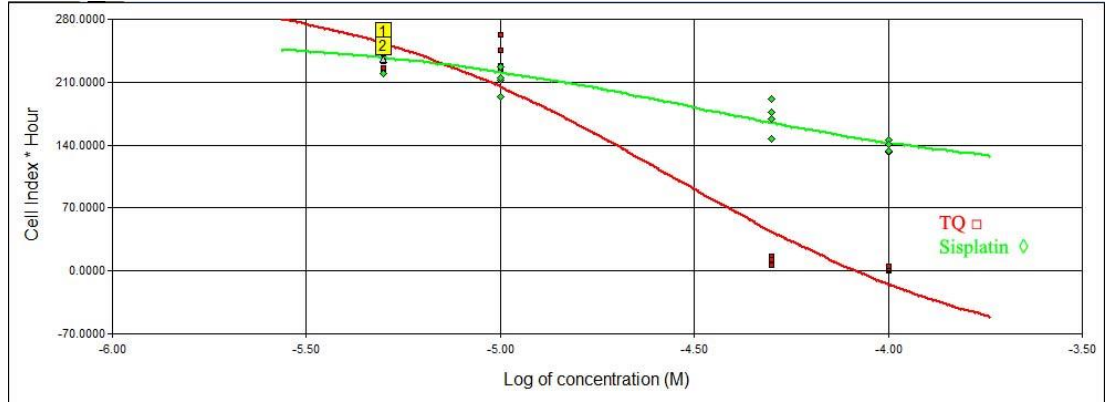
Şekil 3.14. SiHa hücrelerine TQ uygulanması ve radyoterapiye kadar geçen süre. Veriler 18. Saatte ilaç uygulaması öncesi değerlere göre normalize edilmiştir.

3.2. Radyoterapi Sonrası HGF ve SiHa Hücrelerinde Gözlenen Etkiler

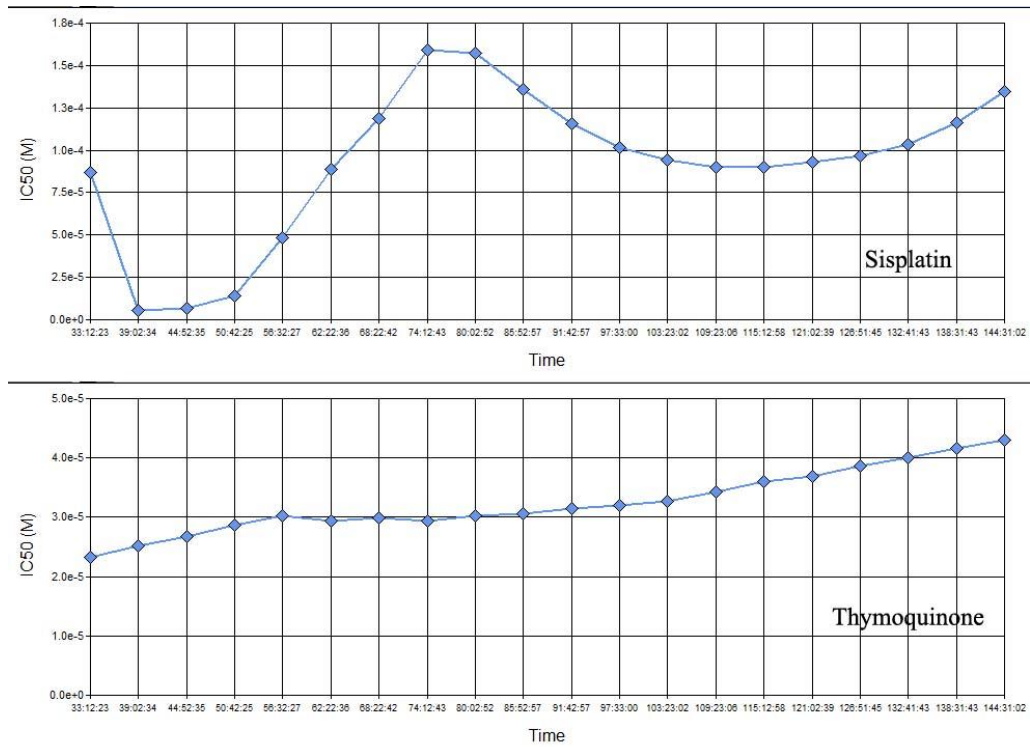
“Radyoterapi sonrası” olarak tanımladığımız, ışınlamanın hemen ardından deney sonuna kadar geçen süreyi de kendi içinde iki dilime ayırarak inceledik. İlk dilimi, zaman-hücre indeksi eğrilerinde belirgin değişimlerin başladığı radyoterapi sonrası 3. saat (deneyin 27. saati) ile, eğrilerin plato çizmeye başladığı radyoterapi sonrası 42. saat (deneyin 66. saati) arası geçen süre olarak tanımladık. İkinci dilimi ise zaman hücre indeksi eğrilerinde büyük değişimlerin görülmediği deneyin 66. saatinden sonuna kadar geçen dönem olarak inceledik.

3.2.1. Radyoterapi Sonrasında HGF ve SiHa Hücrelerinde Sisplatinin ve Thymoquinone’ un IC50 Değerleri

Radyoterapi sonrası 3. Saat ile 42. saat arası eğri altında kalan alan ile hesaplamalar yapıldı. HGF hücrelerinde TQ’ nun IC50 değeri 27.34 μM ; sisplatinin IC50 değeri 31.48 μM olarak bulundu (Şekil 3.15.) Zamana karşı IC50 değişimlerinin incelenmesinde ise radyoterapi sonrası 3. Saat ile deney sonuna kadar olan sürede IC50 değerleri aşağıdaki grafikte gösterildi (Şekil 3.16.)

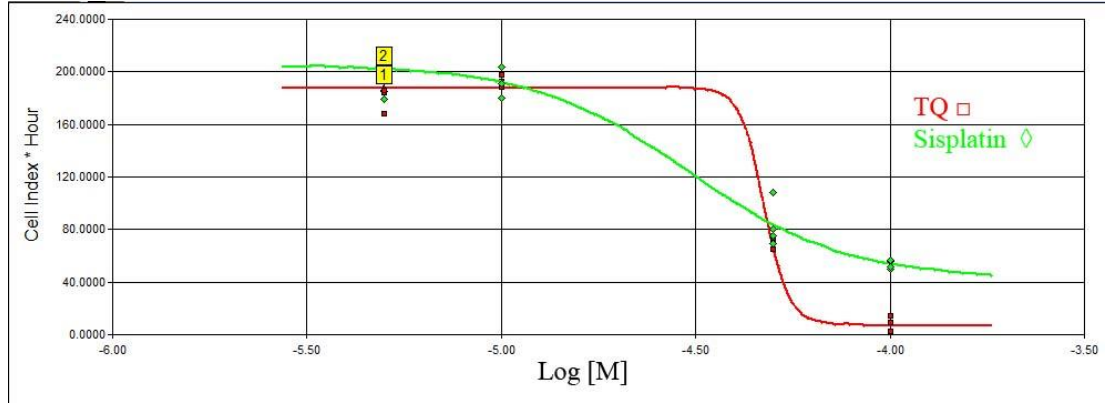


Şekil 3.15. HGF hücrelerinde radyoterapi sonrası 3. saat ile 42. saat arasında hücre indeksi-zaman eğrisi altında kalan alana karşı konsantrasyon logaritması grafiği

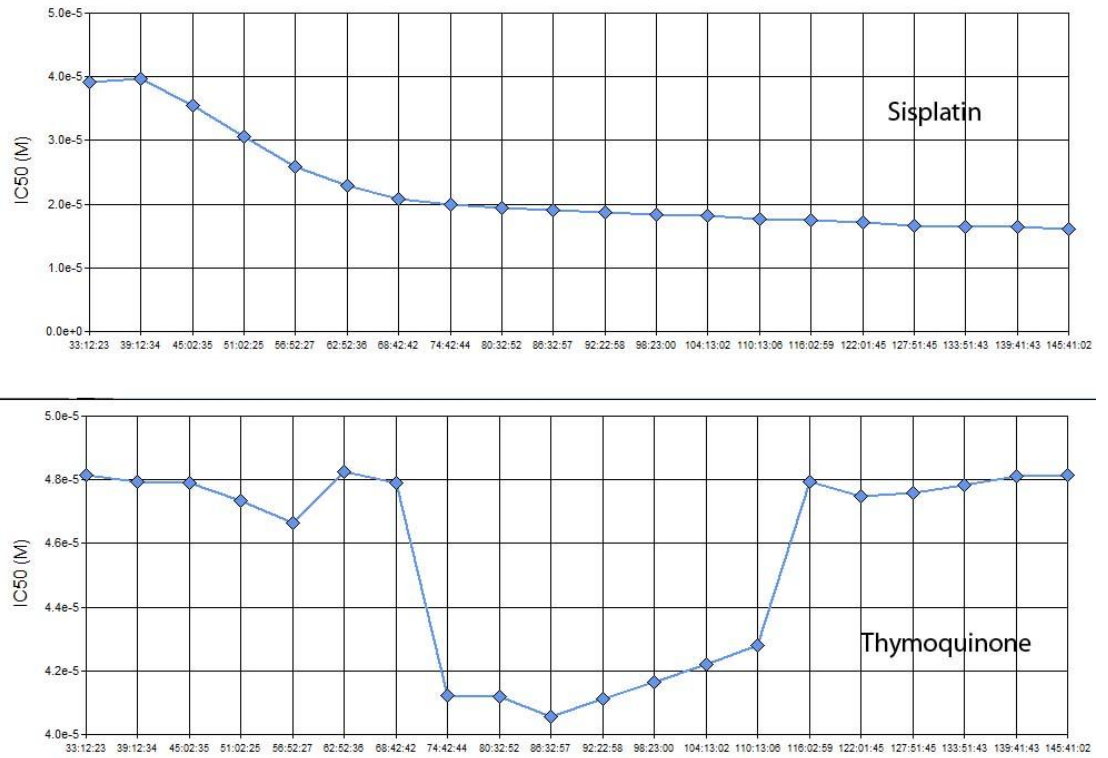


Şekil 3.16. HGF hücrelerinde sisplatin ve thymoquinone için IC50 değerlerinin zamana karşı değişim grafiği

SiHa hücrelerinde radyoterapi sonrası 3. Saat ile 42. Saat arasında zamana karşı hücre indeksi eğrisi altına kalan alana göre yapılan hesaplamada TQ' nun IC 50 değeri $47.78 \mu\text{M}$ ($R^2=0.99$); sisplatinin IC 50 değeri $30.44 \mu\text{M}$ ($R^2=0.97$) olarak bulundu (şekil 3.17.) zamana karşı IC50 değişimlerinin değerlendirmesinde sisplatin IC50 değerinin deney sonuna doğru $20 \mu\text{M}$ seviyesinin altına kadar indiği gözlemlendi. (Şekil 3.18.)



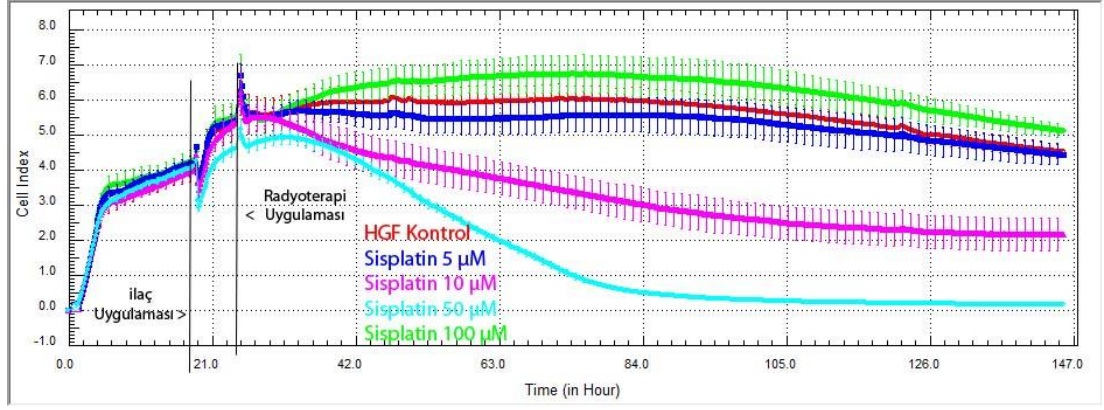
Şekil 3.17. SiHa hücrelerinde radyoterapi sonrası 3. ve 42. saat arası thymoquinone ve sisplatinin hücre ideksi-zaman eğrisi altına kalan alana karşı konsantrasyon logaritması



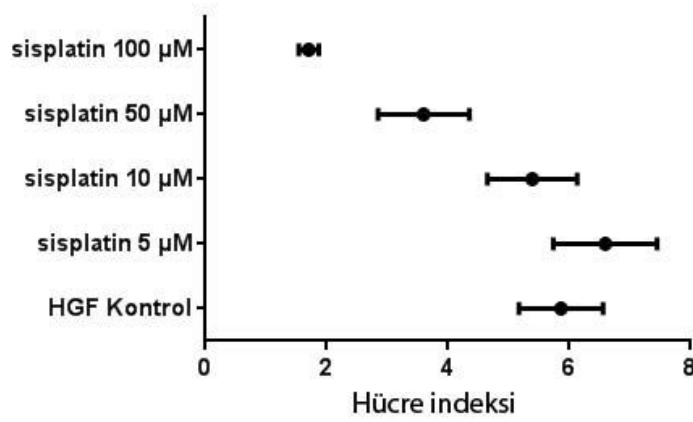
Şekil 3.18. SiHa hücrelerinde radyoterapi sonrası sisplatin ve thymoquinone için IC50 değerlerinin zamana karşı değişim grafiği

3.2.2. Radyoterapi Sonrasında HGF Hücrelerine Sisplatinin Etkileri

Sisplatin uygulanan HGF hücrelerinde radyoterapi sonrası 42. saatteki noktada hücre indeksleri değerlendirildiğinde; HGF kontrol grubuna göre sisplatin 5 ve 10 μ M dozların anlamlı etkisi gözlenmedi. 50 ve 100 μ M dozlarda sisplatin uygulamasının ise anlamlı şekilde hücre indeksini düşürdüğü izlendi ($p < 0,0001$). (Şekil 3.19. - 3.20.)

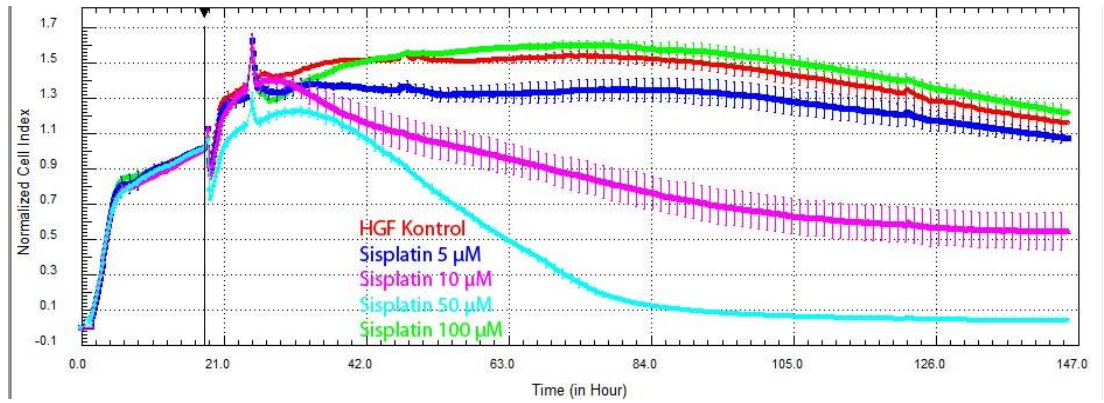


Şekil 3.19. HGF hücrelerinde sisplatin ve radyoterapinin etkisi



Şekil 3.20. Sisplatin uygulanan HGF hücrelerinde radyoterapi sonrası 42. saatteki hücre indeksleri

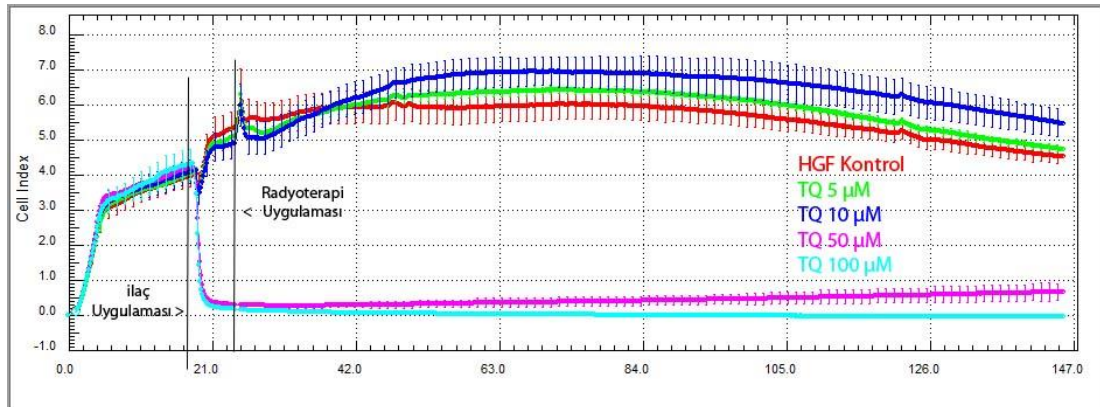
Veriler deneyin 18. saatindeki ilaç uygulamasından hemen önceki ölçümlere göre normalize edildiğinde ise 10 μM sisplatin uygulanan grubun hücre indekslerinde, kontrol grubuna göre ilk 2-3 günde azalma olduğu fakat deney sonuna doğru bu farkın kapandığı gözlemlendi. (Şekil 3.21.)



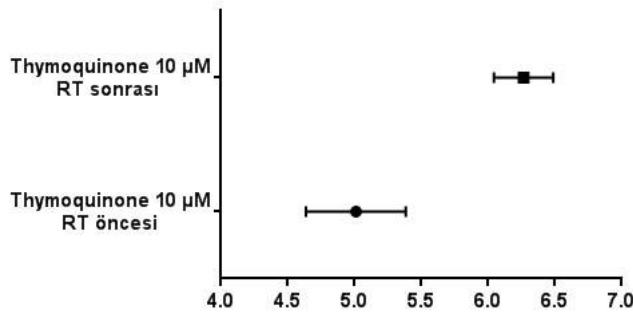
Şekil 3.21. HGF hücrelerine sisplatin ve radyoterapi uygulamasının etkileri. Veriler 18. Saatte ilaç uygulaması öncesi değerlere göre normalize edilmiştir.

3.2.3. Radyoterapi Sonrasında HGF Hücrelerine Thymoquinone' nun Etkileri

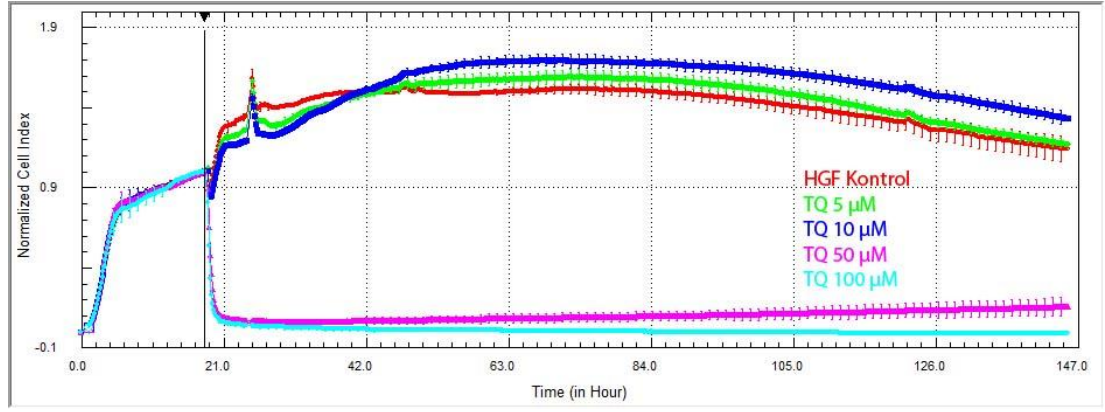
Radyoterapi sonrasında HGF kontrol grubuna göre TQ 5 μ M doz uygulanan grupta anlamlı farklılık görülmedi. Radyoterapi sonrası 10. saatten sonra, radyoterapi öncesine göre TQ 10 μ M doz uygulanan grupta hücre indeksi anlamlı düzeyde artış görüldü ($p=0.003$). Bu artış kontrol grubuna göre değil, radyoterapi öncesi-sonrası analizine göre idi. Fakat deneyin 6. gününde, 10 μ M dozda TQ uygulanan bu grubun, HGF kontrol grubuna göre hücre indeksinde de anlamlı artış görüldü ($p=0.011$). 10 μ M TQ uygulanan grubun hücre indeksi ortalaması 5.42 ± 0.2 ; HGF kontrol grubunun ortalaması ise 4.47 ± 0.11 olarak hesaplandı. 50 ve 100 μ M dozlardaki TQ' nun uygulama sonrası ani gelişen toksik etkisi deney sonuna kadar devam etti. (Şekil 3.22. – Şekil 3.23.) Hücre indeksleri ilaç uygulamasının hemen öncesine göre normalize edildiğinde de benzer sonuçlara ulaşıldı. (Şekil 3.24.)



Şekil 3.22. HGF hücrelerinde thymoquinone ve radyoterapinin etkisi



Şekil 3.23. TQ 10 μ M uygulanan HGF grubunda, Radyoterapi öncesine göre, radyoterapi sonrası 10. saatteki hücre indeksi farkları

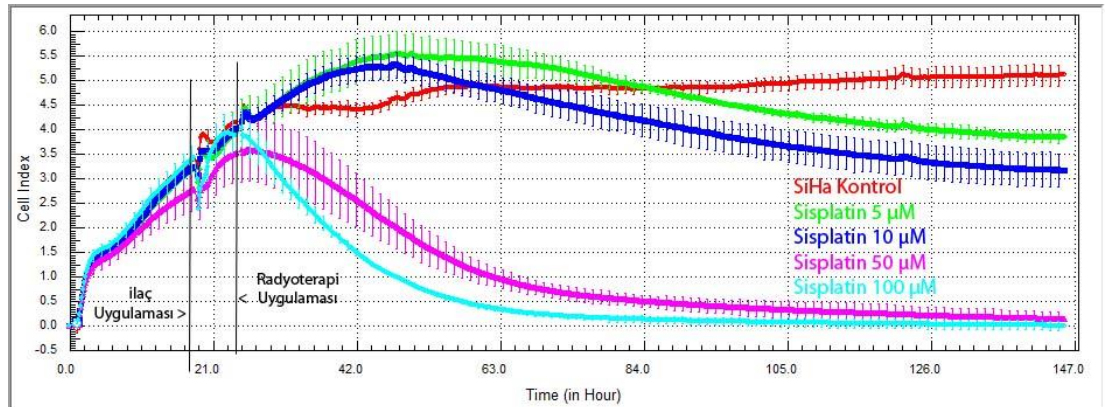


Şekil 3.24. HGF hücrelerine thymoquinone ve radyoterapi uygulamasının etkileri. Veriler 18. Saatte ilaç uygulaması öncesi değerlere göre normalize edilmiştir.

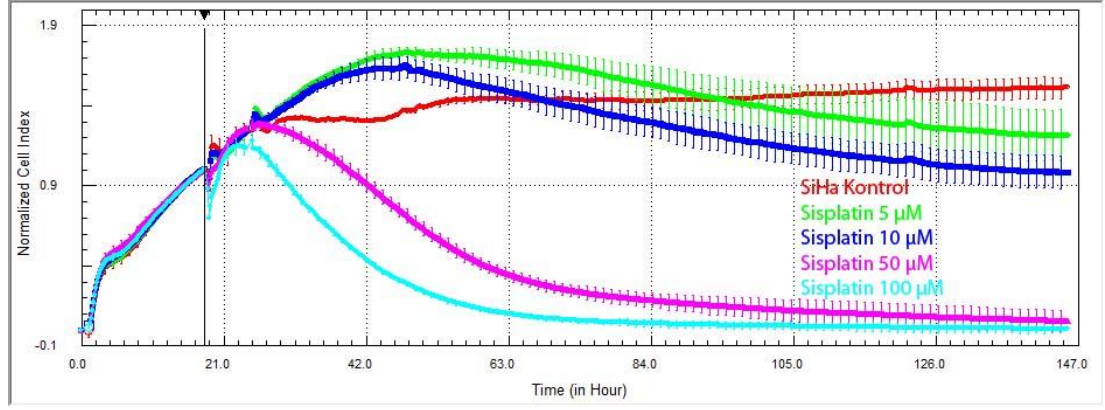
Ayrıca deney sonlandırıldıktan sonra HGF hücrelerinin mikroskopik görüntülerinin fotoğrafları çekildi (Bkz EK-A).

3.2.4. Radyoterapi Sonrasında SiHa Hücrelerine Sisplatinin Etkileri

Sisplatin uygulanan siha hücrelerinde radyoterapi sonrası 42. saatte yapılan ölçümlere göre 5 ve 10 µM dozlarda anlamlı farklılık gözlenmezken; 50 ve 100 µM dozlarda hücre indekslerinde belirgin düşme gözlenmiştir ($p < 0.001$) SiHa kontrol grubu hücre indeksi ortalaması 4.82 ± 0.05 ; sisplatin 50 µM grubu ortalaması 0.85 ± 0.09 ; sisplatin 100 µM grubunun ortalaması 0.29 ± 0.03 olarak hesaplanmıştır. Deneyin 6. Günü sonunda elde edilen verilere göre ise, SiHa hücrelerine sisplatinin 5 ve 10 µM dozlarda uygulanan gruplarda da kontrol grubuna göre hücre indeksinde anlamlı düşme izlenmiştir ($p < 0.001$) (şekil 3.24. – 3.25.) (Şekil 3.28.)



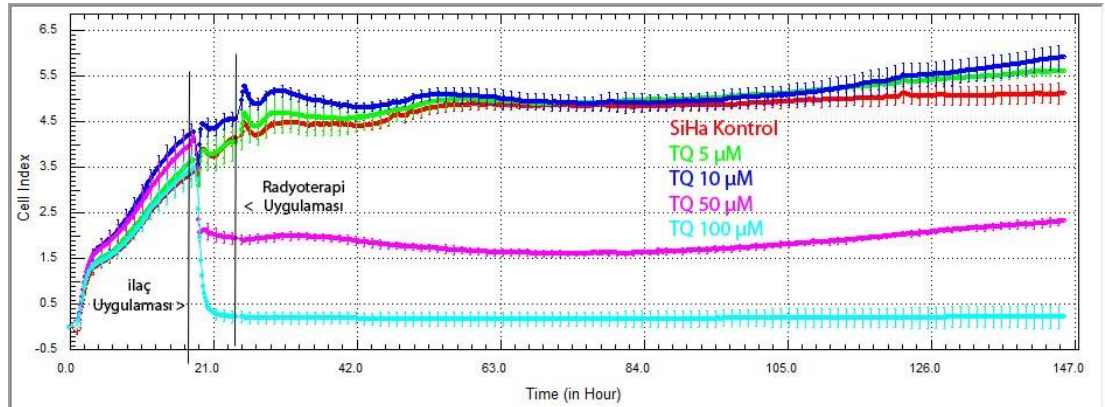
Şekil 3.24. SiHa hücrelerine sisplatin uygulanması ve radyoterapi sonrası takibi.



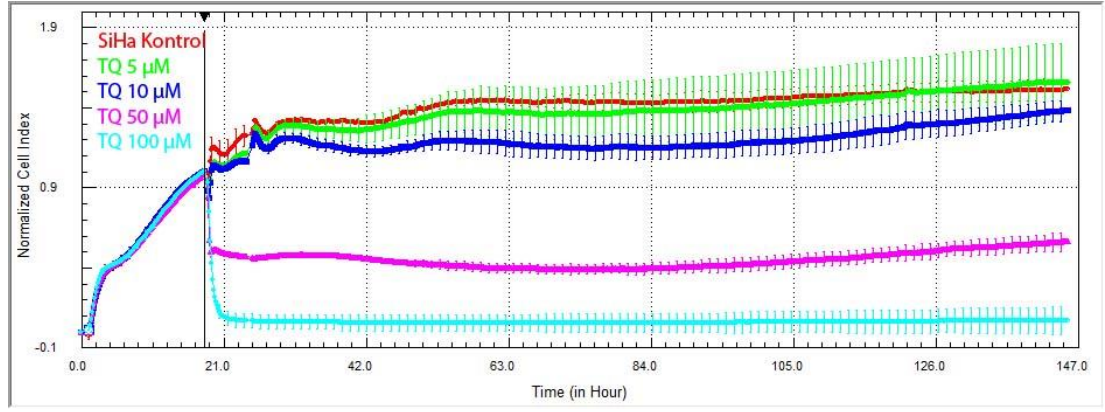
Şekil 3.25. SiHa hücrelerine cisplatin ve radyoterapi uygulamasının etkileri. Veriler 18. Saatte ilaç uygulaması öncesi değerlere göre normalize edilmiştir.

3.2.5. Radyoterapi Sonrasında SiHa Hücrelerine Thymoquinone' nun Etkileri

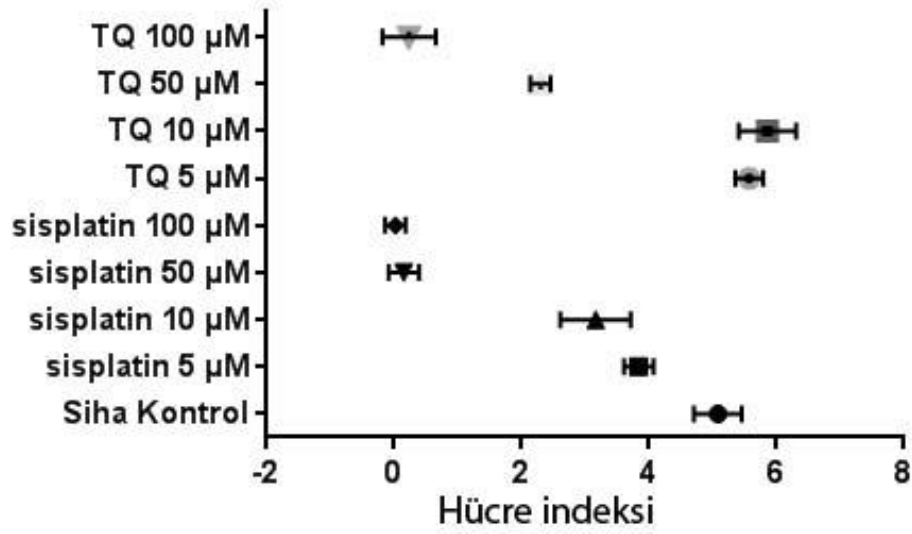
50 ve 100 μM dozda TQ uygulaması sonrası hücre indekslerinde ani düşüş gözlenmişti. SiHa hücrelerinde elde edilen sonuçlarda TQ 5 ve 10 μM dozlarda uygulanan gruplarda, radyoterapi sonrası, kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gözlenmedi (Şekil 3.26.). Deney sonunda TQ 10 μM dozda ilaç uygulanmış grupta, kontrol grubuna göre oluşan farklılığın, değerler ilaç uygulaması öncesine göre normalize edilince kaybolduğu izlendi. (Şekil 3.27.)



Şekil 3.26. (SiHa hücrelerine thymoquinone uygulanması ve radyoterapi sonrası takibi.)



Şekil 3.27. SiHa hücrelerine thymoquinone ve radyoterapi uygulamasının etkileri. Veriler 18. Saatte ilaç uygulaması öncesi değerlere göre normalize edilmiştir.



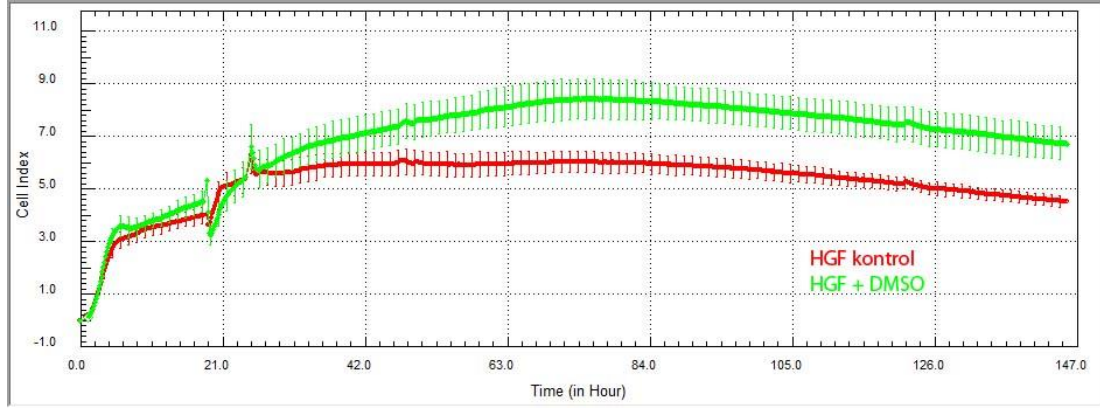
Şekil 3.28. (SiHa hücrelerinde thymoquinone ve sisplatinin radyoterapi ile birlikte etkisi.)

Deney sonlandırıldıktan sonra SiHa hücrelerinin mikroskopik görüntülerinin fotoğrafları çekildi (Bkz EK-B).

3.2.6. Çözücü Olarak Kullanılan DMSO' nun Etkileri

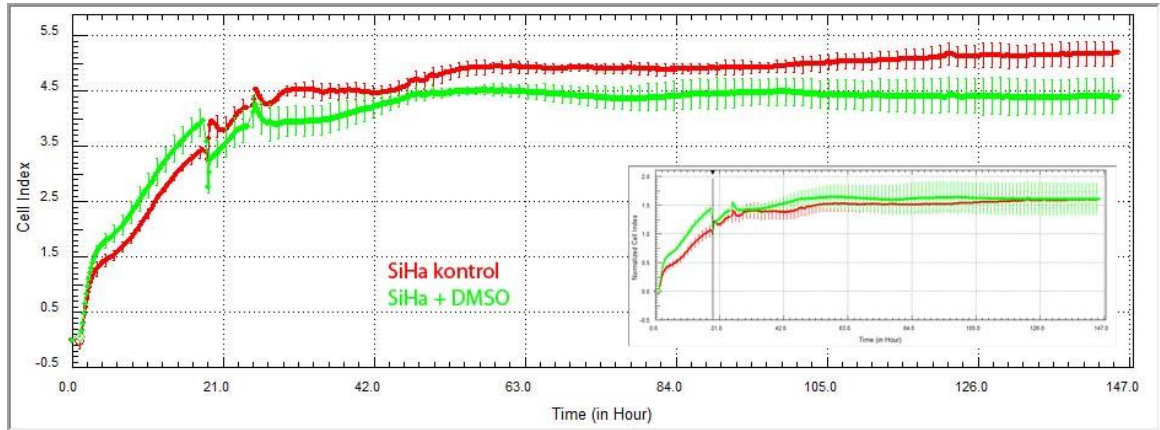
Deney sırasında çözücü olarak kullanılan DMSO' nun olası etkilerini incelemek için hazırlanan DMSO + DMEM + HGF hücre grubunda, HGF + DMEM kontrol grubuna göre hücre indeksinde belirgin artış izlendi ($p=0.004$) HGF kontrol grubunun hücre indeksi ortalaması 4.45 ± 0.11 ; HGF + DMSO grubunun ortalaması 6.61 ± 0.32 olarak hesaplandı. Radyoterapi öncesi ve sonrası HGF kontrol grubunda belirgin farklılık gözlenmezken, HGF+DMSO grubunda radyoterapi sonrası 42.

Saatte, radyoterapi öncesine göre hücre indeksi ortalamaları arasındaki fark 2.74 ± 0.50 olarak hesaplandı ($p=0.002$). (şekil 3.29)



Şekil 3.29. HGF hücrelerinde DMSO' nun etkisi

DMSO + EMEM + SiHa hücre grubunun, SiHa kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DMSO içeren grubun hücre indekslerinin deneyin 6. gününde anlamlı düştüğü görüldü. Fakat 18. Saatteki ilaç uygulamasına göre hücre indeksleri normalize edildiğinde anlamlı farkın ortadan kalktığı görüldü. (Şekil 3.30.)



Şekil 3.30. SiHa hücrelerinde DMSO' nun etkisi

4. TARTIŞMA

TQ ‘ nun sağlıklı hücre örneği olarak seçtiğimiz HGF hücrelerine belirgin ölçüde toksik etkisi olduğunu gördük. 5 μ M dozun herhangi bir etkisi gözlenmezken 10 μ M dozda baskılayıcı etkisinin başladığı gözlemlendi. 50 ve 100 μ M dozlarda uygulanan TQ ise ilk 1 saat içinde hücre indekslerini sıfıra yakın değerlere kadar indirdi. Yine HGF hücrelerine sisplatinin aynı dozlarda uygulanmasının ardından 5,10 ve 50 μ M dozların etkilemediği 100 μ M dozda sisplatinin ise kontrol grubu hücre indeksini %15 kadar düşürdüğü gözlemlendi. TQ’ nun oldukça potent ve toksik bir madde olabileceğini düşündürdü. Aynı zamanda sağlıklı hücre örneğinde gözlenen toksik etkisi, çok şiddetli yan etkilere yol açabileceğini düşündürdü. TQ’ nun, muhtemel antioksidan ve benzer özellikleri ile ilgili olarak, normal sağlıklı hücre modellerinde, kanser hücrelerine göre daha yüksek IC50 değerleri olduğuna işaret eden makaleler vardı⁴. Sisplatin uyguladığımız en yüksek dozda bile hücre indeksinde TQ’ ya göre ılımlı sayılabilecek düşüşe neden oldu. Ayrıca klinikte sisplatinin kullanıldığı dozlarda kan konsantrasyonunun 10 μ M ‘ ı pek geçmediği göz önüne alınınca 100 μ M sisplatin dozunun ılımlı toksisitesinin kabul edilebilir düzeylerde olduğu düşünüldü.

HGF hücrelerine sisplatin uygulamasından sonra radyoterapi uygulanmasına kadar geçen süre içinde (deneyin 21. ve 24. saatleri arasında) hesaplanan IC50 değerlerinin yaklaşık 125 μ M’ dan 90 μ M’ a kadar düştüğü gözlemlendi. TQ için hesaplanan IC50 değerleri ise 20 μ M seviyesinde sabit kaldı. Bu değerler iki ilacın potenslerini karşılaştırmak için bir araç olarak kullanıldı. Ayrıca TQ’ ya göre sisplatinin IC50 değerlerindeki değişimin daha belirgin olması; iki ilacın etki mekanizmalarında farklılık olabileceğini düşündürdü. Çünkü benzer bir patern SiHa hücrelerinde de görüldü. Aynı zaman aralığında yapılan ölçüm ve hesaplamalarda sisplatinin IC50 değerinin yaklaşık 90-100 μ M arasında değişirken; TQ’ nun 52-54 μ M arasında değiştiği gözlemlendi. Sisplatinin değişken, TQ’ nun nispeten sabit IC50 değerlerinin, hücrelerin savunma mekanizmaları (SiHa hücrelerinde daha zayıf ölçüde) , veya protein ekspresyonu gerektiren etki mekanizmaları ile ilgili olabileceği düşünüldü. (Bir başka ihtimal olan TQ’ nun 50 ve 100 μ M dozlarda hücre indeksini sıfıra yakın değerlere indirmesi nedeni ile meydana gelen hesaplama hatası da göz önünde bulunduruldu.)

SiHa hücrelerinde, HGF hücrelerine benzer şekilde 50 ve 100 μM dozlarda TQ uygulamasının hemen ardından ilk 1 saat içinde hücre indekslerinde hızlı bir düşüş gözlemlendi. 100 μM doz verilen grubun hücre indeksi sıfıra yakın değerlere inerken; 50 μM doz uygulanan grupta yaklaşık yarı değerine kadar indi. TQ' nun sitotoksik etkisinin SiHa hücrelerinde HGF hücrelerine göre daha az olduğu düşünüldü.

Radyoterapi sonrasında 10 μM doz TQ uygulanan HGF hücre grubu hücre indekslerinin anlamlı şekilde arttığı görüldü. Aynı zamanda radyoterapi sonrasında deney sonuna kadar olan süreçteki IC50 değerlerinin de 25 μM civarından 45 μM civarlarına kadar çıkması TQ' nun radyoterapi etkisini azalttığı sorusunu akla getirdi. Fakat SiHa hücrelerinde TQ uygulanan grupların hiçbirinde radyoterapi öncesi ve sonrasında anlamlı farklılık görülmedi. Bu sonuç TQ' nun düşük dozlarda; sağlıklı hücrelerde, kanser hücrelerine göre daha iyi çalışan bir koruma mekanizmasını aktive edebileceği sorusunu akla getirdi.

Radyoterapi sonrası sisplatinin etkileri ise, bu ilacın klinik uygulamada neden ilk tercih ilaç olduğunu açıklar nitelikte idi. HGF hücrelerinde radyoterapi sonrası hücre indekslerini 50 μM dozda %50' den fazla ve 100 μM dozlarda sıfıra yakın değerlere kadar düşürürken; 5 ve 10 μM dozda anlamlı etkisi olmadı. Buna karşın SiHa hücrelerinde radyoterapi sonrası 50 ve 100 μM dozlar hücre indekslerini sıfıra kadar; 5 ve 10 μM dozlarda uygulanan sisplatin ise %50' yakın miktarda düşürdü.

Sisplatin HGF hücreleri üzerindeki IC50 değerleri radyoterapi öncesi 90 μM civarında iken radyoterapi sonrası 12. Saatte 24 saat kadar süre ile 40 μM düzeylerinin altında seyredip sonra tekrar 100 μM seviyelerine kadar yükseldiği gözlemlendi.

Sisplatinin SiHa hücreleri için IC50 değerleri ise; radyoterapi öncesi 100 μM düzeylerinde iken radyoterapi sonrası hızla 40 ve daha sonra 20 μM seviyesinin altına kadar indiği gözlemlendi.

Deney sırasında çözücü olarak kullanılan DMSO' nun SiHa hücrelerinde herhangi bir anlamlı etkisi gözlenmezken; HGF hücrelerinde radyoterapi sonrası

proliferasyonu arttırıcı etkisi görüldü. Aynı etkinin HGF hücrelerine uygulanan TQ 5 μ M dozda görülmezken, TQ 10 μ M doz grubunda da görülmesi yeni sorulara yol açtı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

TQ' nun serviks kanseri hücrelerinde radyoduyarlaştırıcı etkisi izlenmedi. TQ' nun yüksek dozlarda hem HGF hem de SiHa hücrelerine karşı sisplatinden çok daha toksik olduğu izlendi.

Sisplatinin serviks kanseri hücrelerine karşı güçlü radyoduyarlaştırıcı etkisi olduğu gözlenirken; sağlıklı fibroblast hücrelerine daha az toksik olduğu görüldü.

Sonuçlar tablo 5.1. de özetlendi.

Tablo 5.1.

		HGF		SiHa	
		RT Öncesi	RT Sonrası	RT Öncesi	RT Sonrası
Thymoquinone	Ortalama IC50 (μ M)	20	27	53	47
	En Yüksek IC50 (μ M)	21	42	55	49
Sisplatin	Ortalama IC50 (μ M)	94	31	97	30
	En Yüksek IC50 (μ M)	120	160	98	40

6. KAYNAKLAR

1. UK CR: How many different types of cancer are there? [Internet]. Cancer Research UK, [cited 2013 Dec 5]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/cancer-questions/how-many-different-types-of-cancer-are-there>
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J-P, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, et al.: Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* [Internet] 2012 [cited 2013 Nov 6], 380:2095–2128. Available from: [http://www.thelancet.com/journals/a/article/PIIS0140-6736\(12\)61728-0/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/a/article/PIIS0140-6736(12)61728-0/fulltext)
3. Bray F, Ren J-S, Masuyer E, Ferlay J: Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* [Internet] 2013 [cited 2013 Nov 22], 132:1133–1145. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752881>
4. Ng WK, Yazan LS, Ismail M: Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein. *Toxicol In Vitro* [Internet], Elsevier Ltd, 2011 [cited 2013 Jan 7], 25:1392–1398. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609759>
5. Velho-Pereira R, Kumar A, Pandey BN, Jagtap AG, Mishra KP: Radiosensitization in human breast carcinoma cells by thymoquinone: role of cell cycle and apoptosis. *Cell Biol Int* [Internet] 2011 [cited 2013 Jan 19], 35:1025–1029. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21557727>
6. Hajdu SI: A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* [Internet] 2011 [cited 2013 Nov 6], 117:1097–1102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960499>
7. Massagué J: G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* [Internet] 2004 [cited 2013 Nov 28], 432:298–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549091>
8. Ji P, Jiang H, Rekhtman K, Bloom J, Ichetovkin M, Pagano M, Zhu L: An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant. *Mol Cell* [Internet] 2004 [cited 2013 Nov 28], 16:47–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15469821>
9. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A: Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] 2008 [cited 2013 Nov 8], 9:402–412. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431400>

10. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM: The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet] 2008 [cited 2013 Nov 15], 8:253–267. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354415>
11. Pellettieri J, Sánchez Alvarado A: Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annu Rev Genet* [Internet] 2007 [cited 2013 Nov 15], 41:83–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076325>
12. Croce CM: Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* [Internet] 2008 [cited 2013 Nov 18], 358:502–511. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234754>
13. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet], Elsevier Inc., 2011, 144:646–674. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
14. Murray-Zmijewski F, Slee EA, Lu X: A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] 2008 [cited 2013 Nov 8], 9:702–712. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719709>
15. Mantovani F, Banks L: The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* [Internet] 2001 [cited 2013 Dec 4], 20:7874–7887. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753670>
16. Chalhoub N, Baker SJ: PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* [Internet] 2009 [cited 2014 Jan 23], 4:127–150. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2710138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
17. Polakis P: The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* [Internet] 2007 [cited 2014 Jan 23], 17:45–51. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X06002413>
18. Hirohashi S, Kanai Y: Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* [Internet] 2003 [cited 2014 Jan 31], 94:575–581. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01485.x>
19. Bierie B, Moses HL: Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet] 2006 [cited 2014 Jan 21], 6:506–520. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16794634>
20. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* [Internet] [cited 2012 Nov 1], 61:69–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296855>
21. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF: Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* [Internet] 2006 [cited 2012 Nov 6], 24:2137–2150. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682732>
22. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* [Internet] [cited 2012 Nov 1], 55:74–108. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761078>
23. GLOBOCAN: Country Fast Stat [Internet]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>

24. GLOBOCAN 2008: Country Fact Stat [Internet]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
25. Berrington de González A, Green J: Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer* [Internet] 2007 [cited 2013 Dec 3], 120:885–891. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17131323>
26. Kjær SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T: Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst* [Internet] 2010 [cited 2013 Nov 20], 102:1478–1488. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2950170&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
27. Doorbar J: Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* [Internet] 2006 [cited 2013 Nov 14], 110:525–541. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597322>
28. Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL: Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* [Internet] 2001 [cited 2013 Dec 4], 20:7888–7898. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753671>
29. Barnholtz-Sloan J, Patel N, Rollison D, Kortepeter K, MacKinnon J, Giuliano A: Incidence trends of invasive cervical cancer in the United States by combined race and ethnicity. *Cancer Causes Control* [Internet] 2009 [cited 2013 Jan 19], 20:1129–1138. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19253025>
30. Wang SS, Carreon JD, Gomez SL, Devesa SS: Cervical cancer incidence among 6 asian ethnic groups in the United States, 1996 through 2004. *Cancer* [Internet] 2010 [cited 2013 Jan 19], 116:949–956. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029972>
31. Bray F, Loos AH, McCarron P, Weiderpass E, Arbyn M, Møller H, Hakama M, Parkin DM: Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and the effects of screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet] 2005 [cited 2012 Dec 20], 14:677–686. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15767349>
32. Watson M, Saraiya M, Benard V, Coughlin SS, Flowers L, Cokkinides V, Schwenn M, Huang Y, Giuliano A: Burden of cervical cancer in the United States, 1998–2003. *Cancer* [Internet] 2008 [cited 2012 Dec 11], 113:2855–2864. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18980204>
33. Sasieni P, Castanon A, Cuzick J: Screening and adenocarcinoma of the cervix. *Int J Cancer* [Internet] 2009 [cited 2013 Dec 3], 125:525–529. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19449379>
34. ACOG practice bulletin. Diagnosis and treatment of cervical carcinomas. Number 35, May 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet] 2002 [cited 2013 Dec 3], 78:79–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12197489>
35. Thigpen T, Shingleton H, Homesley H, Lagasse L, Blessing J: Cis-platinum in treatment of advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a phase II

- study of the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* [Internet] 1981 [cited 2013 Jan 19], 48:899–903. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7196794>
36. Monk BJ, Tewari KS, Koh W-J: Multimodality therapy for locally advanced cervical carcinoma: state of the art and future directions. *J Clin Oncol* [Internet] 2007 [cited 2012 Nov 12], 25:2952–2965. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617527>
 37. Gaffney DK, Erickson-Wittmann BA, Jhingran A, Mayr NA, Puthawala AA, Moore D, Rao GG, Small W, Varia MA, Wolfson AH, Yashar CM, Yuh W, Cardenes HR: ACR Appropriateness Criteria® on Advanced Cervical Cancer Expert Panel on Radiation Oncology-Gynecology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet] 2011 [cited 2013 Dec 10], 81:609–614. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215531>
 38. Rotman M, Sedlis A, Piedmonte MR, Bundy B, Lentz SS, Mudderspach LI, Zaino RJ: A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in Stage IB cervical carcinoma with poor prognostic features: follow-up of a gynecologic oncology group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet] 2006 [cited 2013 Dec 3], 65:169–176. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427212>
 39. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol* [Internet] 2008 [cited 2013 Nov 16], 26:5802–5812. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2645100&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 40. Tan LT, Zahra M: Long-term survival and late toxicity after chemoradiotherapy for cervical cancer--the Addenbrooke's experience. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* [Internet] 2008 [cited 2013 Nov 20], 20:358–364. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395427>
 41. Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, Hu K, Shasha D: Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist* [Internet], AlphaMed Press, 2002, 7:492–508. Available from: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/content/abstract/7/6/492>
 42. Taylor CW, Nisbet A, McGale P, Darby SC: Cardiac exposures in breast cancer radiotherapy: 1950s-1990s. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet] 2007 [cited 2013 Nov 20], 69:1484–1495. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035211>
 43. Alborzinia H, Can S, Holenya P, Scholl C, Lederer E, Kitanovic I, Wöfl S: Real-time monitoring of cisplatin-induced cell death. *PLoS One* [Internet] 2011 [cited 2013 Nov 14], 6:e19714. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3095603&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 44. TRZASKA S: CISPLATIN. *Chem Eng News Arch* [Internet], American Chemical Society, 2005 [cited 2013 Dec 2], 83:52. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cen-v083n025.p052>
 45. Siddik ZH: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* [Internet] 2003 [cited 2013 Nov 12], 22:7265–7279. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576837>
 46. Stordal B, Davey M: Understanding cisplatin resistance using cellular models. *IUBMB Life* [Internet] 2007 [cited 2013 Dec 2], 59:696–699. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17885832>

47. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, Damanhour Z, Anwar F, Kishore K: A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet] 2013 [cited 2013 Nov 8], 3:337–352. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3642442&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
48. Shafi G, Munshi A, Hasan TN, Alshatwi A a, Jyothy a, Lei DKY: Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. *Cancer Cell Int* [Internet] 2009 [cited 2013 Jan 19], 9:29. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2794855&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Khan MA, Chen H, Tania M, Zhang D: Anticancer activities of *Nigella sativa* (black cumin). *Afr J Tradit Complement Altern Med* [Internet] 2011 [cited 2012 Nov 2], 8:226–232. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3252704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
50. Banerjee S, Padhye S, Azmi A, Wang Z, Philip P a, Kucuk O, Sarkar FH, Mohammad RM: Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. *Nutr Cancer* [Internet] 2010 [cited 2013 Jan 7], 62:938–946. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20924969>
51. Yi T, Cho S-G, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M: Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Cancer Ther* [Internet] 2008 [cited 2013 Feb 3], 7:1789–1796. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2587125&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
52. al-Shabanah OA, Badary OA, Nagi MN, al-Gharably NM, al-Rikabi AC, al-Bekairi AM: Thymoquinone protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity without compromising its antitumor activity. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet] 1998 [cited 2013 Feb 3], 17:193–198. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9700580>
53. Daba MH, Abdel-Rahman MS: Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett* [Internet] 1998 [cited 2013 Feb 3], 95:23–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9650643>
54. Arafa E-SA, Zhu Q, Shah ZI, Wani G, Barakat BM, Racoma I, El-Mahdy MA, Wani AA: Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutat Res* [Internet] 2011 [cited 2013 Feb 3], 706:28–35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3037029&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
55. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R: Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol* [Internet] 2004 [cited 2013 Feb 3], 25:857–866. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375533>
56. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA: Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs* [Internet] 2004 [cited 2013 Feb 3], 15:389–399. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057144>

57. Wirries A, Schubert A-K, Zimmerman R, Jabari S, Ruchholtz S, El-Najjar N: Thymoquinone accelerates osteoblast differentiation and activates bone morphogenetic protein-2 and ERK pathway. *Int Immunopharmacol* [Internet], Elsevier B.V., 2013 [cited 2013 Feb 3], 15:381–386. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333454>
58. Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA: Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chem Biol Interact* [Internet] 2012 [cited 2013 Dec 10], 197:40–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450443>

7. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İnsan Servikal Kanser Hücrelerinde Çörekotunun (Nigella Sativa-Thymoquinone) Radyoduyarlaştırıcı Etkisi

Dr. M. Fatih Demirci

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ / Konya, 2013

Serviks kanseri evre IB2 den evre IVA ya kadar tedavide ilk seçim konkomitan kemoradyoterapidir. Burada kullanılan sisplatin önemli yan etkilere sahiptir. Bulantı şikayetine en çok yol açan kemoteropatik ilaçlardan biridir. Ayrıca nefrotoksisite, ototoksisite, nörotoksisite, kemik iliği süpresyonu en ciddi yan etkileridir. Klinik uygulamada bu yan etkiler tedavinin kısıtlanmasına neden olur. Bu nedenle radyoterapi sırasında güçlü bir radyoduyarlaştırıcı olarak kullanılabilecek, daha az yan etkili ajanlara ihtiyaç vardır.

Botanik nomenklatürde Ranunculaceae ailesinden Nigella sativa adı verilen çörekotu birçok kültürde şifalı olarak kabul edilmiştir. Çörekotunun aktif bileşenleri arasında en çok öne çıkan madde olan thymoquinone' nun (TQ) birçok çalışmada antioksidan ve antineoplastik etkileri gösterilmiştir. Bu veriler ışığında servikal kanserin tedavisinde kullanılan sisplatin ve radyoterapi kombinasyonundan daha etkili fakat yan etki potansiyeli daha düşük bir tedavi alternatifi olabilecek; thymoquinone ve radyoterapi kombinasyonu tedavisinin etkisini araştırmayı planladık.

İnsan servikal skuamoz karsinom hücre kültürlerine (SiHa) ve sağlıklı bağ dokusu hücresi örneği olarak; İnsan gingival fibroblast (HGF) hücre kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tek başına TQ veya sisplatin uygulandı. Kontrol grupları ile birlikte bütün hücelere radyoterapi koşullarına uygun şekilde x ışını verildi. Deneyin başından sonuna kadar empedans ölçümleri ile hücre viabilitesi gerçek zamanlı olarak değerlendirildi.

TQ' nun 50 ve 100 μ M dozlarda hem SiHa hem de HGF hücrelerinde ileri derecede toksik olduğu gözlemlendi. 5 ve 10 μ M dozlarda ise SiHa hücrelerinde radyoterapi öncesi ve sonrasında anlamlı etki gözlenmedi. 10 μ M dozda TQ uygulanan sağlıklı HGF hücrelerinin indekslerinde radyoterapi sonrası artış gözlemlendi($p=0,0105$). Sisplatinin ise radyoterapi öncesi her iki hücre grubunda da belirgin etkisi gözlenmezken; radyoterapi sonrası bütün dozlarda SiHa hücre indekslerini etkili bir şekilde düşürdüğü gözlemlendi ($p<0.0001$). 5 ve 10 μ M dozlarda sisplatin uygulanan sağlıklı HGF hücrelerinde radyoterapi sonrasında bile toksik etki izlenmedi. Deney sırasında sisplatinin IC50 değerlerinin geniş bir aralıkta; TQ' nun ise nispeten daha dar bir aralıkta değişimler gösterdiği gözlemlendi.

TQ' nun serviks kanseri hücrelerinde radyoduyarlaştırıcı etkisi izlenmedi. Sisplatinin serviks kanseri hücrelerine karşı güçlü radyoduyarlaştırıcı etkisi olduğu gözlenirken; sağlıklı fibroblast hücrelerine daha az toksik olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Thymoquinone; Servikal kanser; Sisplatin; Radyoterapi

8. SUMMARY

Radiosensitization in Human Cervical Cancer Cells by Black Bumin (Nigella Sativa - Thymoquinone)

Concomitant chemoradiotherapy is the first choice of treatment for cervical cancer stage from IB2 to IVA. However, cisplatin is drug of choice for this treatment, it has critical side effects. It is in fact one of the medications that causes nausea the most. Moreover, nephrotoxicity, ototoxicity, neurotoxicity and bone marrow suppression are the most severe side effects of this medication. These side effects cause limitations of clinical applications. Therefore, during the radiotherapy, a need for agents with less side effects that can be used as a strong radiosensitizer emerges.

Nigella sativa (from Ranunculaceae family), also called black cumin known as a healing herb in several different cultures. In many studies, it was observed that, thymoquinone (TQ); the most abundant active component of black cumin, had antioxidant, antineoplastic and many more effects. In the light of this data, we planned to research on an alternative treatment with combination of radiotherapy and TQ, which could be more effective than cisplatin and radiotherapy with a potential of less side effects.

TQ and cisplatin were applied in different concentrations to culture of human cervical cancer cells (SiHa) and as healthy connective tissue cells; to culture of human gingival fibroblast (HGF) cells were used. Following this, X-ray was applied in accordance to radiotherapy conditions to all cell groups, including the control group. During the experiment, cell viability were assessed in real time by measuring impedance (xCelligance system), at all times.

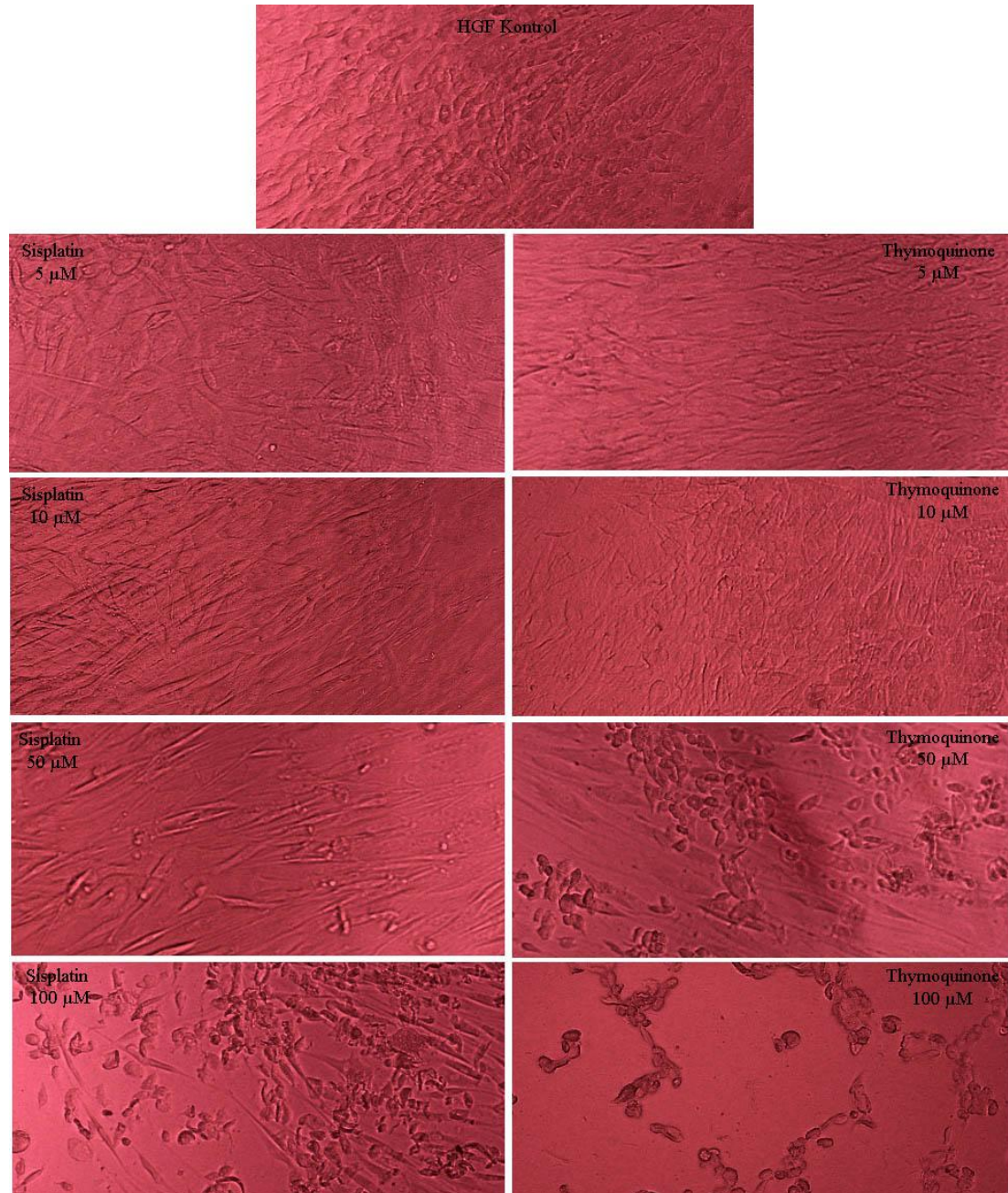
It was observed that, on both SiHa and HGF cells TQ was highly toxic at the dosage of 50 and 100 μM . However, at the dosage of 5 and 10 μM there were no significant effects SiHa cells before and after radiotherapy. When 10 μM TQ was applied to healthy HGF cells, an increase on their cell index was observed ($p=0,0105$). While there was not a significant effect of cisplatin on both cell groups before radiotherapy; after radiotherapy, there was a significant decrease on SiHa cell index at all dosages ($p<0.0001$). There was not any toxic effect on healthy HGF cells that were applied cisplatin at the dosage of 5 and 10 μM even after radiotherapy. During the experiment fluctuations in IC50 levels of cisplatin were seen in a wider range than TQ's.

A radiosensitizer effect of TQ was not observed on cervical cancer cells. While cisplatin's strong radiosensitizer effect was seen on cervical cancer cells; it was also seen less toxic on healthy fibroblast cells.

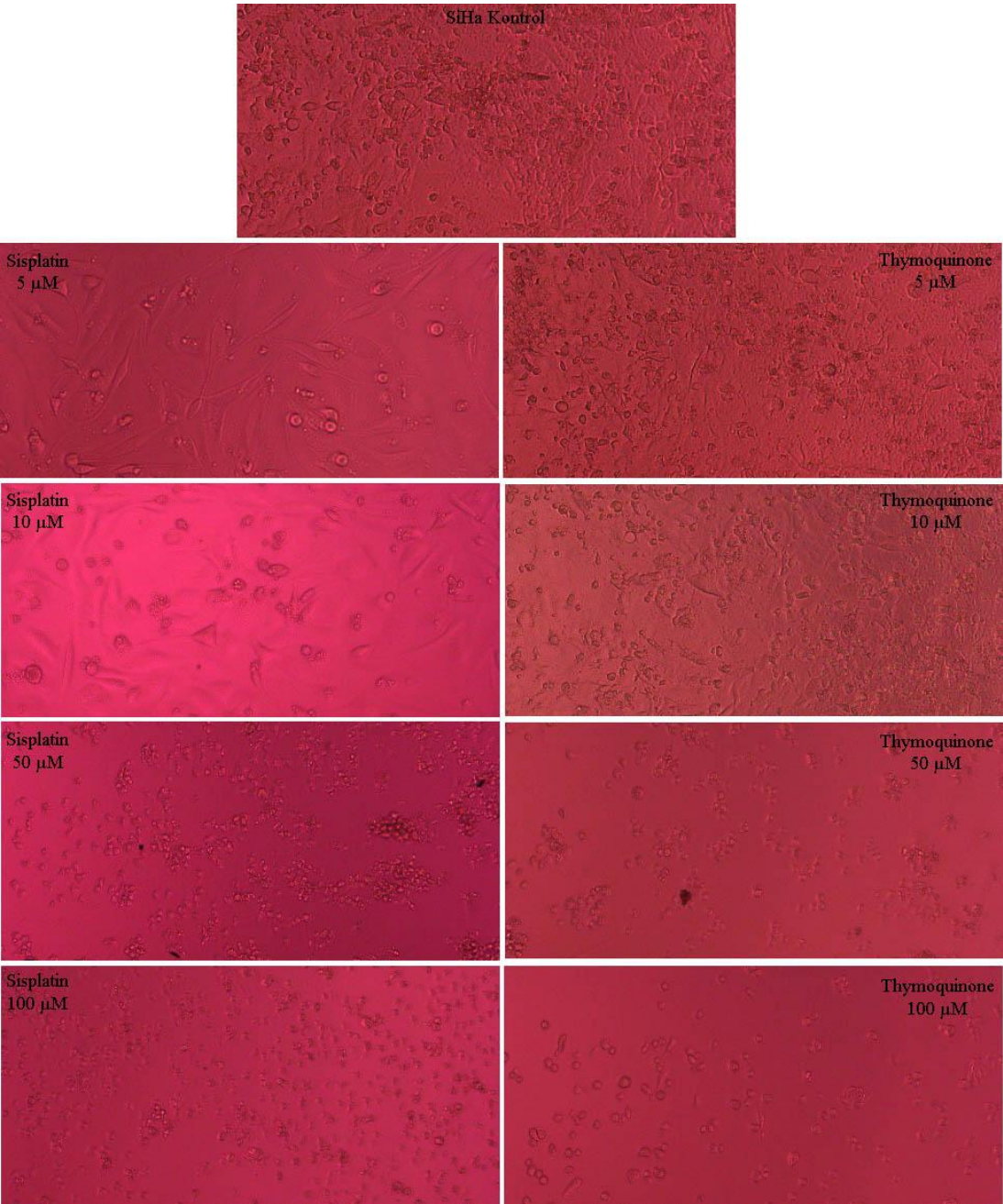
Key Words: Thymoquinone; Cervical cancer; Cisplatin; Radiotherapy

9. EKLER

EK-A



EK-B



10. ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Fatih Demirci 2004 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldu. Konya Başkent Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde pratisyen hekim olarak çalıştı. Daha sonra Sağlık Bakanlığı kadrosunda Çeşmelisebil Sağlık Ocağı'nda görev yaptı. 2008 yılında aile hekimliği sertifikası almaya hak kazandı. 2009-2013 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde iç hastalıkları uzmanlık eğitimini tamamladı.