

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**EHRİCH ASİT TÜMÖR CARCİNOMU MODELİNDE BLEOMİSİN  
(ANTİNEOPLASTİK), ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ YAĞI (ANTİOKSİDAN) VE  
KOMBİNASYONU UYGULAMASININ HÜCRE PROLİFERSAYONU  
PLAZMA LİPİD PEROKSİDASYONU VE TOTAL ANTİOKSİDAN  
STATÜSÜ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Besime BUCAK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

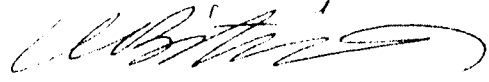
**ŞANLIURFA  
2011**

Doç. Dr. Davut MUSA 'nın danışmanlığında, Besime BUCAK 'ın hazırladığı "Erlich asit tümör carcinomu modelinde bleomisin (antineoplastik ), üzüm çekirdeği yağı (antioksidan ) ve kombinasyonu uygulamasının hücre proliferasyonu plazma lipid peroksidasyonu ve total antioksidan statüsü üzerine etkilerinin değerlendirilmesi" konulu bu çalışma 12/09/ 2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

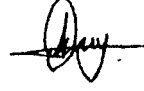
Danışman : Doç. Dr. Davut MUSA



Üye : Prof. Dr. Muharrem BİTİREN



Üye : Yrd. Doç. Dr. Ebru UYAR



**Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım .**



**Prof. Dr. Mehmet CİCİ**  
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.**  
Proje No: 1127

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|   |     |
|---|-----|
| ÖZ .....  | I   |
| ABSTRACT .....  | II  |
| TEŞEKKÜR .....  | III |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....   | IV  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....   | V   |
| SİMGELER DİZİNİ .....   | VI  |
| 1. GİRİŞ .....  | 1   |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....  | 4   |
| 2.1. Kanser Biyolojisi .....  | 4   |
| 2.2. Aşırı Kanser Hücreleri Üretiminin Nedeni .....                     | 4   |
| 2.3. Kanser hücrelerinin genel özellikleri .....                        | 5   |
| 2.3.1. Onkogenler .....   | 6   |
| 2.3.2. Tümör-Süpressör (Baskılayıcı) Genler .....                       | 7   |
| 2.3.3. Kanser ve Sebepleri .....  | 8   |
| 2.3.4. Kanser Tedavi Çeşitleri .....                                    | 10  |
| 2.3.4.1. Cerrahi Onkoloji .....   | 11  |
| 2.3.4.2. Radyasyon Onkolojisi .....                                     | 11  |
| 2.3.4.3. Tıbbi Onkoloji .....   | 11  |
| 2.3.4.4. Hormonlarla Tedavi .....                                       | 11  |
| 2.3.4.5. Kemoterapi .....   | 11  |
| 2.3.5. Kemoterapötik İlaçlar ve Özellikleri .....                       | 13  |
| 2.3.5.1. Antineoplastik İlaçların Ortak Yan Tesirleri (toksikite) ..... | 15  |
| 2.3.6. Antitümör Antibiyotikler .....                                   | 16  |
| 2.3.6.1. Bleomisin .....  | 17  |
| 2.4. Üzüm Çeğirdeğinin Yapısı .....                                     | 19  |
| 2.4.1. Fonksiyonel Özellikleri .....                                    | 20  |
| 2.4.2. Resveratrol (3, 4', 5-trihidroksi-stilben) .....                 | 21  |
| 2.4.3. Resveratrolün Kimyasal Bileşimi .....                            | 23  |
| 2.5. Ehrlich Ascites Tümör (EAT) .....                                  | 24  |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM .....   | 27  |
| 3.1. Materyal .....   | 27  |
| 3.1.1. Deney hayvanlarının yetiştirilmesi .....                         | 27  |
| 3.1.2. Bitki ekstraktlarının hazırlanması .....                         | 27  |
| 3.2. Ehrlich Ascites Tümör Hücreleri .....                              | 27  |
| 3.3. Çalışma için Gerekli Malzeme ve Kimyasallar .....                  | 27  |
| 3.4. Deneysel Uygulamalar .....   | 27  |
| 3.4.1. Mitotik İndeks Çalışması .....                                   | 29  |
| 3.4.2. Hücre Çoğalma Hızı Çalışması .....                               | 29  |
| 3.4.3. Patolojik Çalışmalar .....                                       | 29  |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....                                | 30  |
| 4.1. Araştırma Bulguları .....  | 30  |
| 4.1.1. Mitotik İndeks .....   | 30  |
| 4.1.2. Hücre Çoğalma Hızı .....   | 32  |
| 4.1.3. Patolojik Bulgular .....   | 33  |
| 4.1.4. Biyokimyasal analizler .....                                     | 42  |
| 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....   | 46  |
| KAYNAKLAR .....   | 51  |
| ÖZGEÇMİŞ .....  | 57  |
| ÖZET .....  | 58  |
| SUMMARY .....   | 59  |

## ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

### EHRLICH ASİT TÜMÖR CARCİNOMU MODELİNDE BLEOMİSİN(ANTİNEOPLASTİK ), ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ YAĞI (ANTIOKSİDAN ) VE KOMBİNASYONU UYGULAMASININ HÜCRE PROLİFERASYONU PLAZMA LİPİD PEROKSİDASYONU VE TOTAL ANTIOKSİDAN STATÜSÜ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Besime BUCAK  
Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Davut MUSA  
Yıl: 2011, Sayfa: 59

Resveratrol doğal bir polifenol madde ihtiva eder , çok yönlü olarak sağlığa etki eden bir maddedir ve diğer tüm fenolik bileşikler gibi antioksidan aktivitesi olduğu görülmektedir. Anti -inflamatuvar , kalp hastalığına ve kansere karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Ayrıca kronik inflamatuvar ve autoimmun hatalıklara karşı ve kullanılmaktadır. Muhtelif çalışmalarda resveratrol (üzüm çekirdeği ekstresi) çok kuvvetli bir antioksidan ve kanserin hem solid hem de ascites formlarına karşı ve hematolojik miğn hastalıklarına karşı hücre proliferasyonu inhibe etkisi göstermektedir. Bu çalışmada resveratrol Balb/c ırkı farelerde uygulanan Ehrlich ascites tümör hücreleri , hücre proliferasyonu , mitotik indeks, biyokimya analizleri ve histopatolojik sonuçları resveratrolün hem kanser hücre proliferasyonunu ve mitotik indeksi üzerine etkisi ve antioksidan olduğu görülmektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Resveratrol, Ehrlich ascites tümör, Bleomycin

## **ABSTRACT**

**Master Thesis**

### **EVALUATION OF STATUS OF EFFECT CELL PROLIFERATION, PLASMA LIPID PEROXIDATION AND TOTAL ANTIOXIDANT STATUS ON THE EHRlich ACID TUMOR CARCINOMA MODEL BLEOMYCIN (ANTINEOPLASTIC) ,GRAPE SEED OIL (ANTIOXIDANT) AND THEIR COMBINATION TREATMENT**

**Besime BUCAK**

**Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology**

**Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Davut MUSA  
Year: 20011, Page 59**

Resveratrol is naturally occurring polyphenol that exhibits pleiotropic health beneficial facts, including anti-inflammatory , cardio-protective and cancer protective activities. It is recognized as one of the most promising natural molecules in the prevention and treatment of chronic inflammatory and autoimmune disorders. Experimental data suggest that resveratrol possess strong antioxidant molecule. It has gained considerable attention because of it' s anticancer properties as shown in bath solid and hematologic malignancies. Resveratrol not only inhibits proliferation but also induces cytotoxicity. The present study aimed to evaluate the effects of resveratrol on the proliferation , mitotic index of ehrlich ascites tumor in Balb/c mice in comparison with effect of Bleomycin, whic is known as antineoplastic agent and the amorialative the Bleomycin-induced pulminar inflammatory.

**KEY WORDS:** Resveratrol, Ehrlich ascites tumor, Bleomycin

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmamda bana yol gösteren, bana destek olan danışman hocam Doç. Dr. Davut MUSA'ya, deneyleri gerçekleştirirken benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. İsmail KOYUNCU'ya, istatistik analizlerinde bana vakit ayırıp yardımcı olan Dr. Hatice GÜMÜŐHAN'a ve Biyoloji Bölümü akademik personeline bana desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|  | Sayfa No |
|--|----------|
| Şekil .1. Bleomisin'in kimyasal yapısı.....  | 1        |
| Şekil 2.1. Kanser ilaçlarının hücre döngüsünde etki yerleri.....   | 13       |
| Şekil.2.2. Anti Kanser İlaçlarının Etki Yerleri.....   | 15       |
| Şekil.2.3. Resveratrolün Kimyasal Yapısı.....  | 24       |
| Şekil.2.3. Normal (sağlıklı) fare ve EAT gelişmiş fare.....  | 26       |
| Şekil.4.1.Mitotik indeks.....  | 34       |
| Şekil .4.2. Hücre Çoğalma Hızı.....  | 35       |
| Şekil 4.3. Kontrol grubu. Kontrol grubu. Akciğer parankiminde fibroziste azalma ve fokal inflamatuvar hücre toplulukları.....        | 36       |
| Şekil 4.4. Bleomisin grubu. Akciğer parankimin de yoğun fibrozis ve inflamasyon.....   | 36       |
| Şekil 4.5.Resveratrol grubu Akciğer parankiminde fibrozis ve inflamatuvar infiltrasyonunda azalma .....                              | 37       |
| Şekil 4.6. Bleomisin+Resveratrol 25 grubu. Akciğer parankiminde fibrozis ve inflamasyonda azalma.....                                | 37       |
| Şekil.4.7. Bleomisin+ Resveratrol 50 grubu. Akciğer parankiminde fibrozis ve inflamatuvar hücre infiltasyonunda belirgin azalma..... | 37       |
| Şekil 4.8. Kontrol grubu. Böbrek doku kesitinde normal histolojik görünüm.....   | 40       |
| Şekil.4.9 Bleomisin grubu. Böbrek doku kesitinde fokal inflamatuvar hücre infiltasyonu .....   | 40       |
| Şekil.4.10.EAT grubu. Karaciğer parankiminde normal histolojik görünüm.....  | 41       |
| Şekil.4.11. Bleomisin grubu. Hepatik parankimde yer yer fokal inflamatuvar hücre toplulukları.....                                   | 41       |
| Şekil. 4.12.Karaciğer dokularının TAS sonuçları.....   | 43       |
| Şekil.4.13. Karaciğer dokularının TOS sonuçları.....   | 45       |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|  | Sayfa No |
|--|----------|
| Çizelge.2.1. Kanser ilaçların sınıflandırılması.....                         | 16       |
| Çizelge .2.2.Kırmızı üzüm kabuğu ve çekirdeğinin antioksidan içerikleri..... | 22       |
| Çizelge 3.1. Kontrol ve deney grupları.....                                  | 29       |
| Çizelge 4.1. Mitotik indeks yüzdesi.....                                     | 34       |
| Çizelge 4.2. Hücre çoğalma hızı.....   | 35       |
| Çizelge 4.3. Akciğer doku kesitlerinin grade tablosu.....                    | 38       |
| Çizelge.4.4. Karaciğer dokularının TAS sonuçları.....                        | 42       |
| Çizelge.4.5. Karaciğer dokularının TOS sonuçları.....                        | 44       |

## SİMGELER DİZİNİ

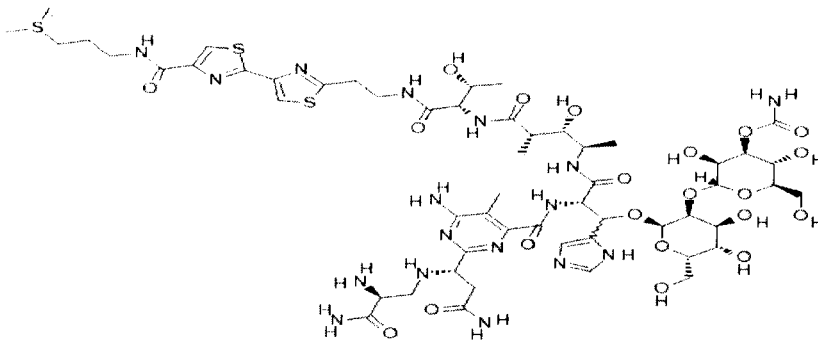
|       |                               |
|-------|-------------------------------|
| ATP   | Adenozintrifosfat             |
| BLM   | Bleomisin                     |
| CDK   | Cyclin Dependent Kinase       |
| DNA   | Deoksiribonükleikasit         |
| EAT   | Ehrlich Ascites Tumor         |
| FDA   | Food and Drug Administration  |
| GSH   | Glutasyon                     |
| RESV. | Resveratrol                   |
| RNA   | Ribonükleikasit               |
| SDS   | Sodyum dodesil sülfat         |
| SIRT1 | Sirtuin                       |
| SOD   | Superoxide dismutase          |
| LDL   | Düşük Dansiteli Lipoprotein   |
| MDA   | Malondialdehit                |
| P.F   | Pulmoner Fibrozis             |
| TAS   | Total Antioksidan Capacity    |
| TOS   | Total Oksidan Statüs          |
| TBA   | Tiyobarbitürik asit           |
| TEP   | Tetraetoksipropan             |
| HBSS  | Hank's Balanced Salt Solution |
| U.V   | Ultra Viyole                  |
| İ.P   | İntraperitonal                |
| HPV   | Human Papilloma Virus         |

## 1. GİRİŞ

Kanser, içerisinde bulunduğumuz modern çağın en ciddi hastalığı olup insan ölümlerine yol açan nedenler arasında önemli bir yere sahiptir. Gelişmiş toplumlarda kanserden kaynaklanan ölümler ilk sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde ise giderek artmaktadır. Günümüzde kanser ile mücadele için çok ciddi çabalar ve inanılmaz miktarlarda bütçeler harcanmaktadır. Buna rağmen kanser, insan sağlığını tehdit eden ilk faktör olma özelliğini muhafaza etmektedir.

Bugün kanseri önlemede en umut verici strateji kemoterapidir. Kemoterapi, insanda kanser gelişimini önleyici sentetik veya doğal maddelerin (yalnız başına veya kombinasyonu) kullanımı olarak tarif edilir. Halk tarafından kullanılan bitkiler, sebzeler ve şifalı otlar, kanser kemoterapisinin keşfedilmesinin ve gelişiminin ana kaynağı olmuştur. Günümüzde kemoterapide kullanılan pek çok antitümör ilaç bulunmaktadır. Bunlar kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmaya çalışırken aynı zamanda normal ve sağlıklı olan hücreleri de etkilemek suretiyle pek çok yan etkiye sebep olmaktadır. Bu ilaçlardan biri ve en sık kullanılanı da Bleomisin'dir.

Bleomisin, (BLM) ilk kez 1966 UMEZAWA ve arkadaşları tarafından topraktan elde edilen *Streptomyces verticulus*'den izole edilmiş glikopeptit yapısında (Umezawa 1978) bir antineoplastik antibiyotiktir (Şekil 1).



Şekil. 1. BLM in kimyasal yapısı ( Takita ve ark. 1978). Bleomisin A ve Bleomisin B olmak üzere iki gruba ayrılır ( Umezawa ve ark. 1966).

Bleomisin'in, bakteriler, doku kültüründe yetiştirilen hücreler ve deneysel hayvan tümörlerini inhibe etkisi ile ilgili birçok çalışmalar vardır. Bleomisin birçok bakteri ve mantar türlerinde çoğalmayı durduran ve inhibe edici etkiye sahiptir (Umezawa ve ark. 1967). Doku kültüründe yapılan çalışmalarda Bleomisinin sitostatik bir etkiye sahip olduğunu gösterilmişlerdir. Yine deneysel olarak elde edilen hayvan tümörleri ile yapılan çalışmalarda, BLM bu tip tümörlerde bir antineoplastik etkiye sahiptir. Farelerde deneysel olarak elde edilen lösemi, melanoma, akciğer karsinomu, osteogenik sarkom, ve endimoblastomaya karşı Bleomisinin çeşitli derecelerde antitümöral etkilere sahip olduğu saptanmıştır. Bunun dışında farelerde deneysel olarak elde edilen Ehrlich Ascites tümör hücrelerinde (EAT) de inhibe edici etkisi vardır (Goldiner ve ark 1978).

*Streptomyces verticillus* isimli bakteri tarafından üretilen sitotoksik bir antibiyotik olan bleomisinin, pulmoner toksik etkileri yüzünden kullanımı kısıtlıdır çünkü, kanser tedavisinde kullanılan BLM, pulmoner toksisite etkileri sebebiyle dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır. Hücre zincirlerinde serbest radikaller oluşturarak DNA kırılmalarına neden olur. Bleomisin, tedavi amaçlı kullanıldığında en çok deri ve akciğerde konsantre olduğu gözlenmiş dolayısıyla ilacın yan etkisi de en çok bu organlarda gözlenmektedir (Söğüt ve ark. 2004). Kemoterapide kullanılan bu ilaçların meydana getirdiği serbest radikallerin yan etkileri ve tedavinin uzun süreli oluşu nedeniyle hastalar başka arayışlar içine girebilmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde kullandığımız birçok ilaç oldukça pahalı, toksik ve etkinlikleri de sınırlıdır. Bu nedenle serbest radikallerin oluşumunun antioksidan ajanlarla tedavi edilmesi gerekmektedir. Son zamanlarda üzüm çekirdeğinden elde edilen ekstre veya diğer doğal ürünlerden kaynaklanan ajanların kanser ve diğer hastalıklardan korunma ve tedavisine yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Son yıllarda üzüm çekirdeği üzerine odaklanılmış ve özütü (resveratrol) kanser de dâhil birçok hastalıkta kullanılmaya başlanmıştır.

Resveratrol, trans-resveratrol başta üzüm olmak üzere pekçok farklı bitkide varolan doğal bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler, bitkilerde UV ışını, hasar ve enfeksiyonlara karşı gelişen ikincil yapılardır. Resveratrol, bitkilerde özellikle kırmızı üzümde, yer fıstığında ve ananasta yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Resveratrol, siyah üzümün soğuk hava koşulları, mantar enfeksiyonları gibi etkenlere bağlı olarak kendini korumak için ürettiği bir maddedir.

Yukarıda verilen tüm bu bilgiler ışığında mevcut çalışma ile resveratrol'ün kanserli hücreler üzerindeki koruyucu etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan 60 adet Balb/C ırkı farenin tamamı Ehrlich asit tümör modeli ile kanserleştirilmiştir. 12 tanesine kanser hücresi inokülasyonu haricinde başka bir işlem uygulanmamıştır, 12 hayvana sadece Bleomisin, diğer 12 tanesine de sadece Resveratrol ve geriye kalan 24 tanesine de aynı dozda Bleomisin ve değişen dozlarda ( 25 mg ve 50 mg) Resveratrol i.p. (intraperitoneal) yolla uygulanmıştır. Mitotik indeks, hücre çoğalma indeksi ile böbrek, karaciğer ve akciğer dokularındaki patolojik değişimlere bakılarak üzüm çekirdeği özütünün kanser hücreleri üzerine antitümöral etkinliği ve Bleomisinin neden olduğu dokular üzerindeki inflamasyon etkinliği araştırılmıştır.

## **2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

### **2.1. Kanser Biyolojisi**

Kanser vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üreyerek komşu dokuları işgal etmesi (invazyon) veya kaynağını aldığı organdan daha uzak bir yere, kan veya lenf yoluyla yayılması (metastaz) ile oluşan bir hastalıktır. Hücreler DNA replikasyonları esnasında meydana gelen bozulmalar nedeniyle yapı değiştirirler. Normal vücut hücre ve dokuları, orijinal büyüklük ve yapılarını korurken kanser hücreleri saldırgan bir tablo çizerler.

Kanser potansiyeli olan hücrelerin en önemli özelliği "onkogen" içermesi yani bulunduğu dokudan tamamen farklı yeni bir hücre grubu olacak şekilde bozulma potansiyeli olmasıdır. Bu hücreler kanser dönüşümünü tamamladığında, alınan patoloji örneklerinde bu hücrelerin kökenini tanımlamak neredeyse imkânsızdır. Bir kanser hücresi oluştuğunda, vücudun bağışıklık sistemi bu yabancı hücreyi tanır ve parçalar. Bu sayede vücutta oluşan binlerce kanser hücresi, bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. Her hücrede, onkogenlerin aktivasyonunu baskılayan anti onkogenler (Tümör Baskılayıcı Gen) bulunmaktadır. Anti onkogenlerin kaybolması veya inaktive olması durumunda onkogen aktivitesine izin verilmiş olur. Bunu da kanserin oluşumu izler.

## 2.2. Aşırı Kanser Hücresi Üretiminin Nedeni

**A. Anormal hücrelerin apoptozise gidememesi:** Apoptozis, programlı hücre ölümü demektir. Apoptozis anormal DNA'lı hücreleri yok eder. Anormal DNA'lı hücreler ya tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla transkrip olmuş DNA'dan dolayı oluşur. Buradaki apoptozis, belli bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesinde ve aneuploidy nin önlenmesinde ana mekanizmadır. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin mitozaya girmesi sağlanır.

**B.Genetik bozukluklar:** Bu bozukluklar normal proliferasyon mekanizmasından bağımsız olarak meydana gelir. Reseptörlerin veya sinyal aktarıcı proteinlerin mutasyonları veya aşırı üretimleri hücrelerin büyüme faktörlerinden veya diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine ve böylece kendi başına giden hücre bölünmesine yol açarlar. Bu gen anormallikleri genellikle dominanttır.

**C.Tümör supressör genlerdeki anormallikler.** Bu genler hücre bölünmesinin (siklusunun) baskılanmasından sorumlu genlerdir. Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Bu genler çekingen (resesifdir); yani malign hücre normal hücre ile hibridleştirildiğinde normalleşir.

## 2.3. Kanser hücrelerinin genel özellikleri:

**1. Klonal orijin:** Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden gelişir. Bazı kanser tipleri birden fazla sayıda malign klonlardan gelişir. Bu klonlar ya bir saha hasarı "field defect" sonucu (dokunun birden fazla sayıda hücresi karsinojene maruz kalmasıyla) ya da bazı genlerdeki kalıtsal defektler sonucu oluşurlar

**2. İmmortalite (Ölümsüzlük):** Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler (çoğalırlar) ve bitmez tükenmez miktarda hücre oluştururlar. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken, çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat kanser hücrelerinde ve stem hücrelerinde telomerler, telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim normal olarak hücreler diferansiye olurken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe

azalır. Tamamıyla diferansiye olmuş bir hücre istirahat "senescent" durumuna girer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölür. Oysa birçok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonunda, telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır (Barry ve ark. 2000).

**3. Genetik instabilite:** Kanser hastalığında moleküler kontrol mekanizması genetik mutasyonlar veya çevresel koşullar nedeniyle (örneğin HPV benzeri bazı viral enfeksiyonlar veya sigara dumanında mevcut hidrokarbonlar gibi kanserojen kimyasal maddeler sebebiyle) fonksiyonunu kaybeder. Kontrol mekanizmalarındaki bu fonksiyon kaybına genellikle hücre çoğalmasını destekleyen (proliferasyon) sinyallerinde patolojik bir artış ve hasarlı DNA parçalarının onarımında rol alan (tümör baskılayıcı) moleküler mekanizmalarda ek patolojiler eşlik eder. Böylece kanserli dokuda kontrolsüz çoğalmanın yanısıra "genetik kararsızlık" olarak tarif edilen mutasyonlara son derece açık ve genetik olarak dengesiz bir hal oluşur.

**4. Kontakt inhibisyon:** Kültürde, normal hücreler komşu hücrelere yapışarak ilişkilerini devam ettirirler. Bu yapışma (adezyon) noktalarında hücrelerde elektronca yoğun bir plak oluşur. Bununla birlikte, hücrelerin ameboid uzantılarında yavaşlama ve durma görülür. Bu olaya kontak inhibisyon denir. Bu şekilde, hücre büyümesi kontrol edilir. Deneysel olarak, normal hücreler bir kültür ortamında kendilerine sağlanan ortam şartları ne kadar iyi olursa olsun kontak inhibisyon nedeniyle tek tabaka oluşturduktan sonra daha fazla çoğalamazlar. Çünkü bölünme sınırlı sayıda olur. Fakat, kanser hücreleri sürekli çoğalarak birkaç tabakalı düzensiz kitleler oluştururlar. Bu da kanserli hücrelerde kontak inhibisyon kaybı olduğunu göstermektedir.

**5. Metastaz:** Benign ( iyi huylu) tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmadan sorumlu hücrel proteinlerin kaybı ya da anormalliklerinden, hücreler arası interaksiyonun bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, metaloproteaz gibi bazı enzimlerle (kolejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir (Barry ve ark. 2000).

### 2. 3.1 Onkogenler

1969'da Huebner ve Tadora ilk olarak kanser gelişiminde onkogenlerin rol alabileceklerini ileri sürmüşlerdir (Tchia. ve ark.1991). Onkogenler, protoonkogen denen

normal hüresel genlerden gelişir. Protoonkogenlerin kodlanmış protein ürünleri genel olarak hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin regülasyonunda önemli rol oynar. Bu genler mutasyon, kromozomal translokasyon, DNA amplifikasyon veya transkripsiyonel disregulasyon ile aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olur. Aktive olan protoonkogenlere onkogen, protein ürünlerine ise onkoprotein denir. Protoonkogenler, hücre içi sinyal ileticileri, nükleer transkripsiyon faktörleri, hücre siklusunu kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörleri olmak üzere beş kategoriye ayrılır. Protoonkogenler değişik yollarla aktive olarak onkogen haline gelirler. Genin yapısal bir bölgesinde değişiklik sonucu farklı fonksiyon gören bir protein sentezlenir. Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşur. Genin ekspresyonunu regüle eden bölgede oluşan bir değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına karşın sürekli olarak uyarılma sonucu gen ürününün aşırı miktarda üretilir. Kromozom translokasyonlarında ise kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir. Genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatör bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır ( Köktürk. ve ark. 2003).

### **2.3.2. Tümör-Süpressör (Baskılayıcı) Genler**

Bir kanser hücresi oluştuğunda vücudun bağışıklık sistemi bu yabancı hücreyi tanıır ve parçalar. Bu sayede vücutta oluşan binlerce kanser hücresi bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. Her hücrede, onkogenlerin aktivasyonunu baskılayan antionkogenler (Tümör Baskılayıcı Gen) bulunmaktadır. Antionkogenlerin kaybolması veya inaktive olması durumunda onkogen aktivitesine izin verilmiş olur. Bunu da kanserin oluşumu izler. Normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan ve tümör baskılayıcı genler olarak tanımlanan genlerin (antionkojenler) birinde veya birkaçındaki mutasyon da tümör oluşumuna neden olmaktadır (Gündüz. ve ark. 2009).

Onkogenlerin aktive edici mutasyon sonucu aşırı aktivasyonu ya da bunları dengeleyen tümör baskılayıcı genlerin kromozomal lokalizasyonlarındaki delesyonu ya da inaktive edici mutasyon sonucu fonksiyonlarını yitirmesi ile hücre çoğalmasının aşırı olması ve durdurulamaması ile kanserleşme meydana gelir.

### **2.3.3.Kanser ve Sebepleri**

Kanser, toplumda en fazla ölüm nedenleri içinde yer alan bir hastalık grubudur. Kanserden korunma, ancak ona neden olan faktörlerin ortaya konması ve bunlardan uzak bir yaşam ile mümkündür ( Güran, 2005). Farklı toplumlarda görülen farklı kanser dağılımları, çevre faktörleri ve bu toplumlardaki insanların sosyal alışkanlıkları, yaşam biçimleri gibi ilişkilerle orantılıdır. (Şengelen, 2002).

Kanser insidansı ( oluş sıklığı) gelişmekte olan ülkelerde daha belirgin olmak üzere, tüm dünyada artmaktadır. Ülkemizde de benzer biçimde kanser insidansında bir artış beklenmektedir. Bu kapsamda kanserle savaş faaliyetlerinin bilinçli bir şekilde planlanması ve akılcı politikalar üretilmesi gerekmektedir. (Gültekin ve ark.2011). Kansere karşı kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve kanser kontrol programının uygulamaya geçirilmesi için kanser vakalarının coğrafi alanlarda zamana ve mekana bağlı değişimleri önemlidir (Şengelen, 2002).

Kanserin sebebi henüz kesin olarak bilinmemektedir. Kansere sebep olan etkenlere karsinojen denir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkma olasılığını etkileyebilir. Kanser hastalığı için iki grup risk faktörü vardır. Kanser için risk faktörleri yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile öykülerine bağlı olarak değişir. Bir başka risk grubu ise çevresel faktörlerdir. Kansere neden olan çevresel etkenleri birçok başlık altında toplayabiliriz. Bunlar;

- 1.Kimyasal mutajenler
- 2.Fiziksel etkenler (radyasyon ve ultraviyole ışınlar)
- 3.Virüsler (kanserin %10'nuna neden olmakta)
4. Alınan gıdalardaki transgenik, mutajenik veya ilave edilen katkı maddeler
5. Sigara (kanserlerin % 50-60'ına neden olmakta)
- 6.Yaşlanmış hücrelerde biriken toksik maddeler ve çevre kirliliği

Kalıtım molekülü olan DNA'da oluşan ve kuşaktan kuşağa veya hücreden hücreye aktarılabilen kalıcı değişikliklere “mutasyon” denilmektedir. Mutasyona neden olan maddelere ise “mutajen” adı verilmektedir. Çevreden kaynaklanan mutajenlere ise “çevresel mutajen”adı verilir. Çevresel mutajenler fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki grupta toplanabilir. Fiziksel mutajen olarak radyasyon, kimyasal mutajen olarakta her gün bizi etkileyen pek çok kimyasal maddeler arasında, benzen, naftilamin , is, katran, arsenik,

kadmium , pestisidler, endüstriyel ürünler ve atıklar gibi çevre kirleticileri, besinlerimizdeki doğal ve yapay kimyasal maddeler sayılabilir (Başoğlu ve ark.,2009). Mutajenlerin DNA üzerindeki etki mekanizmaları farklı olduğu için herbirinin fenotipik etkisi farklı şekilde görölmektedir. Bunun başka bir sebebi de DNA'daki farklı bölgelerin mutasyona duyarlılığının değişkenlik göstermesidir ( Lewis. 2007).

Çevresel mutajenler genellikle onkogenleri inaktive ettikleri zaman kanser oluşumuna neden olan onkogen veya tümör baskılayıcı gen bölgelerinde değişikliğe sebep olarak hücre bölünmesinin kontrolden çıkıp kanserleşmeye doğru ilerlemesine neden olurlar. Bu gen bölgelerinin yanı sıra apoptozu düzenleyen ve DNA tamir mekanizmasında rol oynayan ürünlerin sentezlendiği gen bölgelerinde de mutasyona neden olabilirler.

Günümüz dünyasında radyasyondan izole yaşamak mümkün değildir. Özellikle 19. yüzyılın sonlarına doğru x-ışınları ve radyoaktivitenin keşfedilmesiyle tıp ve endüstri alanlarında kullanılması ve günümüze kadar artan bir hızla yayılması radyasyonu hayatımızın ayrılmaz bir parçası haline getirmiştir. Bu teknoloji insan yaşamını kolaylaştırmasının yanı sıra maruziyete bağlı sağlık sorunlarına da neden olmaktadır. Ultraviyole ve radyasyon ışınları kanserojen maddeler olarak önem arz etmektedir. Örneğin ultraviyole ışınlarına maruz kalan deride deri kanseri meydana gelmekte, x-ışınları ise troide etki yaparak troit kanserine sebep olmaktadır. Bu tür maddeler temas ettikleri hücrelerin kromozomlarında mutasyonlara veya kırılmalara neden olmaktadır (Başoğlu ve ark.2009; Dilsiz. 2004).

Sigarada özellikle benzopiren maddesi akciğer, üst solunum yolları, özofagus, pankreas, mide ve karaciğerde kansere yol açmaktadır. Benzopiren maddesi DNA yapısındaki guaninlerin timin bazlarına dönüşmesine sebep olmaktadır (Dilsiz. 2004).

| METAL VE KAYNAKLARI   | KARSİNOJENİK ETKİ  |
|---|--|
| <b>ARSENİK</b><br>İçme suları<br>Endüstriyel atıklar<br>Arsenikli pestisitler<br>Sigara   | Akciğer kanseri<br>Lenfoma, Lösemi<br>Dermal karsinoma<br>Mesane kanseri, Böbrek ve Kolon<br>Kanseri |
| <b>KADMIYUM</b><br>Boya ,pil,seramik,plastik<br>Cam endüstrisi<br>Madencilik<br>Sigara  | Akciğer kanseri<br>Prostat kanseri   |
| <b>KROM</b><br>Demir –çelik sanayi<br>Termik santraller<br>Boya ,deri,tekstil, cam<br>Lastik endüstrisi<br>Fotoğrafçılık,Kuyumculuk | Akciğer Kanseri  |

Tablo. 2.1. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (BAŞOĞLU. F., 2009).

### 2.3.4.Kanser Tedavi Çeşitleri

Her şeyden önce, tüm hastalıkların tedavilerinde esas rolü vücudun bağışıklık sistemi üstlenmektedir. Bağışıklık sistemini zayıflatan etmenlerin ortadan kaldırılması tedavinin ilk basamağıdır. Kanserli hücrelerin ne kadar ve nerelere metastaz yaptığını tespit etmek olanaksız olduğundan kanser tedavisi gören hastaların bağışıklık sistemlerinin güçlendirilerek bu yayılmış hücreleri yok etmesi arzu edilen bir durumdur. Kanser tedavisi kanserin tipine, yerleşimine, evresine, kişinin genel sağlık durumuna ve diğer faktörlere bağlı olarak değişiklikler gösterir. Doktorlar her hastası için, o hastanın kişisel durumuna ve ihtiyaçlarına göre biçimlendirilmiş farklı tedavi planları hazırlamaktadır.

**2.3.4.1. Cerrahi Onkoloji:** Kanser bugün en emin ve en iyi sonuç veren tedavi şeklinin uygulandığı uzmanlık dalıdır. Genellikle organ kanserlerinde ilk tedavi seçeneğidir. Bu tedavide kanserli doku ve yöresel lenf bezleri ameliyat ile çıkarılır (Dilsiz.2004).

**2.3.4.2. Radyasyon Onkolojisi:** Kanserli doku ve yöresel lenf bezlerindeki kanser hücrelerinin çoğalmasını önleme ve öldürülmesine yönelik radyoaktif ışınlama tedavisini uygulayan uzmanlık dalıdır. Radyoterapi kanserin tedavisinde kullanılan en önemli tedavi yaklaşımlarından birisi olmakla birlikte, tüm kanser vakalarının yarısından fazlasında kullanılmaktadır. Özellikle cilt kanseri, baş-boyun kanseri, erken evre Hodgkin hastalığı veya non Hodgkin lenfoma (Lenf bezlerinin kötü huylu kanserleri) gibi bazı tip tümörlerin tedavisinde ilk tedavi yaklaşımı olabilir. Akciğer, meme, rahim, prostat, testis, mesane, tiroid ve beyin kanserlerinin tedavisinde de kullanılabilir. Radyasyon, genelde cerrahi müdahaleden önce kanserli bir tümörün küçültülmesi için, cerrahi müdahaleden sonra geriye kalan kanser hücrelerinin büyümesinin durdurulması veya anti-kanser ilaçlar ile ölümcül bir durumda olan bir tümörün ortadan kaldırılması için kullanılabilir (Dilsiz,2004).

**2.3.4.3. Tıbbi Onkoloji:** Kanser ilaçlarını uygulayan uzmanlık dalıdır. İlaçlar kan yolu ile bütün vücuda yayıldıkları için bu tedavi, yöresel tedavi olan radyoterapiden farklı olarak sistemik etkilidir. Ameliyat ya da radyoterapiden önce veya sonra uygulandığı gibi, bu tedavilerle eş zamanlı da uygulanmaktadır. Ayrıca kanserlerin bir grubu yalnız ilaçlarla tedavi edilebilmektedir. Tıbbi onkoloji uzmanlığının tedavide kullandığı ilaçların sayısı, alanı ve uygulama yöntemleri gün geçtikçe artmaktadır.

**2.3.4.4. Hormonlarla Tedavi:** Bir grup kanserin hormon bağımlı olduklarını bilinmektedir. Bu grup kanserlerin tedavisinde hormonların sentezini veya etkisini önlemeye yönelik ilaçlar kullanılmaktadır.

**2.3.4.5. Kemoterapi:** Tıbbi onkolojinin uyguladığı ilk tedavi yöntemidir. Kanser hücrelerinin öldürülmesine yönelik (sitotoksik) ilaçlarla yapılan bu tedavi son yıllarda büyük aşama göstermiştir. Önceleri yaygın ve artık tedavisi mümkün olmayan hastalarda konforlu ve biraz daha uzun yaşam için uygulanan bu tedavi her gün yeni çıkan ilaçlar ve yöntemlerle bu grup hastalarda çok daha ileri ve iyi başarılar sağladığı gibi, artık hastalığın her döneminde değişik amaçlarla uygulanmaktadır. Kemoterapi ameliyatlara ile birlikte de kullanılmaktadır. Erken dönemde teşhis edilen hastalarda, saptanması mümkün olmayan mikroskobik yayılmalar olabilir görüşü içerisinde, birçok kanserde ameliyat sonrası (adjuvan) kemoterapi uygulanmaktadır. Aynı görüş içerisinde ya da ameliyat edilemez durumda olan hastalarda ameliyat öncesi (neo-adjuvan) kemoterapi yapılmaktadır. Kemoterapi bazı kanserlerde

radoterapi beraberliğinde uygulanmaktadır. Ayrıca kemoterapinin tek başına sonuç aldığı bazı kanserler de vardır.

Kemoterapi prensiplerini ve nasıl etki ettiklerini anlamak için öncelikle normal yaşam döngüsünün (hücre siklusu) bilinmesi çok önemlidir. Yaşam döngüsünün başlıca 5 önemli fazı vardır:

**G0 fazı:** Mitoz sonrası hücrelerin dinlendikleri ve hücre bölünmesine aktif olarak katılmadıkları devredir. Bu fazda kemoterapötik ajanların etkisi yok denecek kadar azdır. Normal hücreler zamanlarının çoğunu G0 fazında geçirirler, bir uyarıcının etkisiyle çoğalan hücre haline geçebilirler.

**G1 fazı:** Uyarılma sonucunda başlar. Hücre üreme için gerekli olan RNA, enzimler ve diğer proteinler sentez edilir. Hücre bu dönemde kemoterapiye hassastır.

**S fazı:** Yeni DNA sentez edilir, hücre bölünmeye hazırlanır. Hücre bu fazı etkileyen ilaçlara hassastır.

**G2 fazı:** Mitoz için gerekli protein ve RNA sentezi hızlanır.

**M fazı:** Mitoz fazıdır. Dört safhada iki yeni hücre oluşur. Bu iki yeni hücre ya yaşam döngüsüne girer (G1) ya da kemoterapiye dirençli olarak G0 fazında istirahate çekilirler. Aslında kanser hücreleri ve normal hücreler benzer hücre sikluslarına sahiptirler. Kanser hücresiyle normal hücre arasındaki en önemli fark, kanser hücrelerinde proliferasyonu frenleyen mekanizmanın bulunmaması ve organizmayı ölüme götüren duraksız bir proliferasyon içinde olmasıdır.

Kemoterapötik ajanlar en fazla hücreler proliferatif dönemde iken etkilidirler. Bu bilgi ilaçların geliştirilmesi sırasında önem taşımaktadır. Çünkü yaşam döngüsünün bir fazına spesifik etki eden ilaçlar (faz spesifik ilaçlar) ya da bütün fazlara etkili (faz spesifik olmayan ilaçlar) geliştirilebilir (Gibson ve ark., 1999).

### **2.3.5 Kemoterapötik İlaçlar ve Özellikleri**

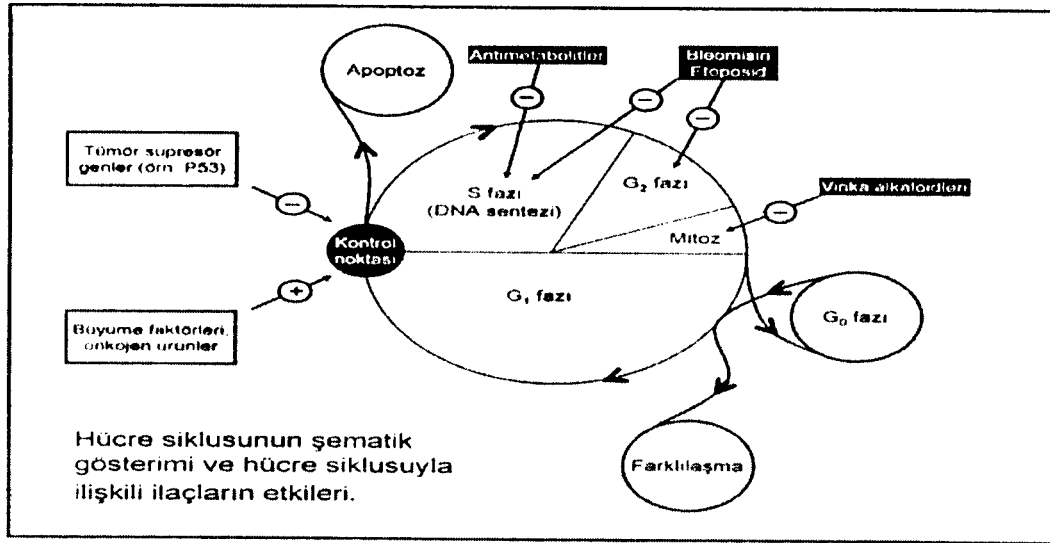
Kemoterapötik ilaçları etkilerine göre iki grupta inceleyebiliriz.

#### **A- Hücre siklusuna bağımlı ilaçlar**

S fazına dönük ilaçlar (Antimetabolitler): Hücre metabolizmasını ve DNA sentezini bozarak etki ederler. Methotrexate, Cytarabine, Procarbazine, 6 Tyoguanin, 6 Mercaptopurine gibi.

M fazına dönük ilaçlar (Bitki alkaloidleri): Ana hücreden iki yavru hücre oluşmasını engellerler. Vincristine, Vinblastine bu gruptandır.

G2 fazına dönük ilaçlar (Antitümör antibiyotikler): RNA, DNA ve protein sentezini etkilerler. Bleomisin, Acyctinomycin-D, Daunorubisin gibi (Akyol,2004).



Şekil 2.1. Kanser ilaçlarının hücre döngüsünde etki yerleri (Akyol.,2004)

## B- Hücre siklusedan bağımsız ilaçlar

Alkilleyici ajanlar: Hücre çekirdeğini, DNA ve RNA sentezini etkilerler. Hızlı çoğalan hücrelerin ölümüne yol açarlar. Nitrojen mustard, Cisplatin, Cyclophosphamide, Procarbazine gibi.

Hormonlar: Tümör ortamını değiştirerek büyüme ve çoğalmayı engellerler, protein sentezini bloke ederler. Östrojenler, Kortikosteroidler gibi.

Antibiyotikler: DNA replikasyonunu bozarlar. Adriamisin gibi (Akyol,2004).

Kemoterapötik ilaçlar kimyasal yapıları ve hücre aktivitesine göre 6 sınıfa ayrılmaktadırlar:

**Alkilleyici ajanlar:** Sitotoksik etkileri, hünyelerindeki elektrofilik alkil kökü ile hedef makromoleküllerin nükleofilik parçasının geri dönüşsüz bir kombinasyon yapması ile olmaktadır. Bu gruptaki ilaçlar arasında, Busulfan, Carboplatin, Carmustine, Clorambusil, Cyclophosphamide, Dacarbazine, Fosfamide, Lomustine, Melphalan, Nitrojen mustard, Procarbazine yer almaktadır.

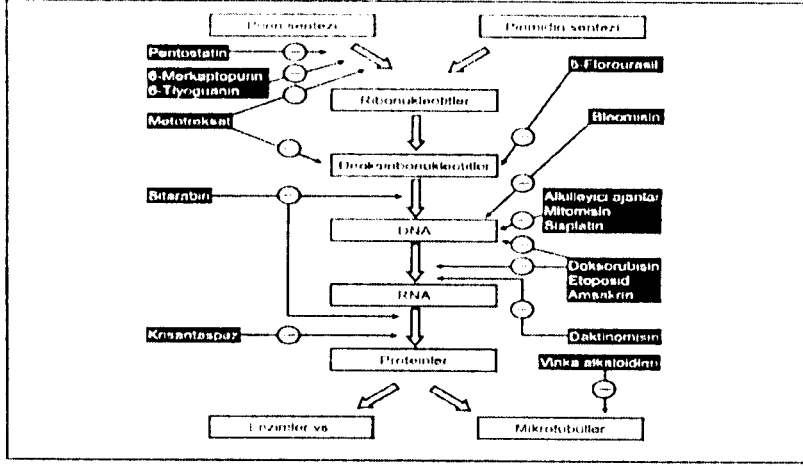
**Antimetabolitler ve immunosuppressent ( bağışıklık sistemi baskılayıcı ):** Hücrenin normal metabolitleri ile benzerlik gösterdiklerinden onların yerine, enzimler için benzerlik gösterdikleri metabolitlerin yerine geçer veya aynı rolü alarak aktiviteyi bloke eder, azaltır yada makromoleküllerin içine girerek, fonksiyonu olmayan bir makromolekül yaratırlar. Bu grupta; Cytrabine, Methotexate, 6-Mercaptopurine yer almaktadır.

**Bitki alkaloidleri:** Podofilotoksinler iğ iplikleri oluşumuna karşı bitki maddeleri ve vinca alkaloidlerinden semisentetik olarak elde edilen ilaçlardır. Hücre bölünmesini mitoz safhasında durdururlar. Bu grupta; Vincristine, Vinblastine, Etoposide ve Teniposide ( podophillotoxin' den elde edilen yarı sentetik ilaç) yer almaktadır.

**Antitümör antibiyotikler:** Hücrede DNA ve RNA transkripsiyonunu durdurup, dokularda uzun süre kaldıklarından DNA sentezi boyunca hücre ölümüne yol açarlar. Radyasyonla birlikte verildiklerinde toksisiteyi arttırırlar. Actinomycin-D, Adriamycin, Bleomycin, Epirubicin, İdarubicin bu gruptadırlar.

**Kortikosteroidler:** Kortikosteroidler pasif difüzyonla hücre içine girip, glukokortikoid reseptörleri ile bağlanarak çekirdeğe geçer, orada DNA ile bağlanıp transkripsiyon olayını bozarlar.

**Diğer çeşitli yapıda ilaçlar:** L-Asparaginase bu grupta yer almaktadır. *Escherichia coli* veya *Erwinia* kültürlerinden elde edilen bir enzimdir. Blastik hücrelerde DNA ve RNA sentezini inhibe eder (Akyol,2004).



Şekil.2.2. Anti Kanser İlaçlarının Etki Yerleri

### 2.3.5.1 Antineoplastik İlaçların Ortak Yan Tesirleri (toksikite)

Kemoterapötik ajanların seçici olmayan yani hem tümör hücresine hem de normal hücre üzerine olan yan etkileridir. Toksikite, sıklıkla ilaçlarda doz sınırlayıcı, hasta yaşamını tehdit edici, yaşam kalitesini bozan, hasta tarafından kabul edilemeyen, kısa veya uzun süreli olabilmektedirler. Toksikitelerin düzelebilmesi için tedavi kürleri arasında normal hücrelerin kendilerini toparlayabilmesi için fırsat verilmelidir.

En sık gözlenen toksisiteler kemik iliğinde baskılanmaya bağlı lökopeni, trombositopeni şeklinde, gastrointestinal sistemde mukozit, stomatit, bulantı, kusma, ishal yada alopesi (alopecia = saç dökülmesi) olarak klinikte karşımıza çıkmaktadır.

Çizelge.2.1. Kanser ilaçların Sınıflandırılması (Ankara Ecz. Fak. Dergisi ,2002)

| Antimetabolitler | Antibiyotikler | Alkilleyici ilaçlar        | Diğerleri              |
|------------------|----------------|----------------------------|------------------------|
| Sitarabin        | Bleomisin      | Korbustin ve Lomustin      | Asparaginaz            |
| Fludarabin       | Daktinomisin   | Siklofosamid ve Mekloreタミン | Sisplatin ve Kaboplaün |
| 5-florourasil    | Daunorubisin   | Streptozotosin             | Estoposid              |
| merkaptopürin    | Doksorubisin   |                            | İnterferonlar          |
| Metotraksat      | İdaurubisin    |                            | Radyoaktif izotoplar   |
| 6-Tiyoguanin     | Plikamisin     |                            |                        |

### 2.3.6 Antitümör Antibiyotikler

Antitümör antibiyotikler mantar ve bakteriyal fermantasyon ürünleridir. *Streptomyces* türleri tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerin bir karışımıdır. İlacın hemen hemen tamamı idrarla veya dışkı ile atıldığı için böbrek fonksiyon bozukluklarında atılımı gecikir. Kemik iliği ve immün sistem depresyonu yapmadığından birçok kombinasyona girmektedir. En önemli toksik etkisi akciğerlerde fibrozise yol açmasıdır.

Bleomisin ile tedavi edilen hastaların pulmoner komplikasyonları ilk kez 1978 tarihinde Nygaard ve ark. tarafından yayınlanmıştır. Bu rapora göre bleomisin ve radyoterapiden sonra özofagus kanseri nedeniyle operasyon edilen hastalarda post operatif pulmoner komplikasyonlar daha sık olarak izlenmektedir.

Goldiner ve ark.(1978), bleomisin tedavisi alan hastalarda 3-5 gün sonra ciddi solunum sıkıntısı geliştiğini, yoğun bakım tedavisine rağmen 5 hastanın öldüğünü ve otopsilerinde interstisyel pnömoni saptadıklarını bildirmişlerdir. Özellikle kemoterapide kullanılan bu ilacın cerrahi girişim ve anestezi uygulaması öncesinde verilmesi halinde tehlikeli olabileceği çeşitli araştırmalar sonucunda tespit edilmiştir ( Sert ve ark. 2007).

#### 2.3.6.1. Bleomisin

Bleomisin , *Streptomyces verticillus* türünden elde edilmiş sitotoksik glikopeptid antibiyotiklerin bir karışımı, antitümoral etkili bir antibiyotiktir. Bleomisin ilk olarak 1966 yılında Japon bilim adamı Hamao Umezawa tarafından anti kanser tarama faaliyetleri sırasında keşfedilmiştir. Bleomisin , 1973 yılında FDA onayını aldıktan sonra ilk olarak Blenoxana adı altında ABD’de pazara sunulmuştur.

BLM, bleomisin-demir kompleksi oluşturarak moleküler oksijeni, süperoksit ve hidroksil radikallerine dönüştürür. Bu da DNA’ da iplikçik kırılmalarına ve DNA-RNA-protein sentezinde (transkripsiyon ve translasyon basamakları) hasara sebep olarak anti-neoplastik etki gösterir (Erden ve ark.2008).

Akciğer, böbrek, periton ve lenf sisteminde yüksek oranda konsantre olduğu gösterildiği için deri kanserleri, baş- boyun kanserleri, uterus kanseri, serviks kanseri, retikulosarkom ve lenfosarkom tedavisinde kullanılır.

Bleomisinini inaktive eden hidrolaz enziminin akciğer dokusunda diğer dokulara oranla çok düşük düzeyde bulunmasından dolayı yan etki olarak özellikle akciğerlerde yaygın fibrozis ve interstisyel pnömoni oluşturur ve BLM kullanılan hastalarda akciğer hasarı gelişme oranı %3-40 oranında değişmektedir. Bu durumda gelişen akciğer fibrozisinde serbest oksijen radikallerinin önemli faktörlerden biri olduğu iddia edilmektedir.

Tedavi amacıyla bleomisin uygulandığında en çok deri ve akciğerde konsantre olduğu gözlenmiş, dolayısıyla ilacın yan etkisi de en sık bu organlar da görülmektedir. İlaç kullanımı esnasında akciğerde kollojen yıkımı azalırken yapımı büyük oranda artmakta ve sonuç olarak bazı vakalarda Pulmoner Fibrozis (PF) gelişmektedir( Zitnik, 1995).

Bleomisin yapısal olarak bileşenleri iki kısmı ayrılır. Anti kanser ajanı olarak kullanıldığı zaman kemoterapötik formları ilkin Bleomisin A2 ve Bleomisin B2'dir Bleomisin hodgkin lenfoma tedavisinde, testis kanserinde, skuamöz hücre kanserinde ve siğil tedavisin de kullanılmaktadır( Lewis.2007).

Bleomisin tedavisi ile pulmoner lezyon arasındaki ilişkiyi pek çok araştırmacı tanımlamıştır. Bunlar intraalveoler eksuda, hyalin membran, interstisyel fibrozis, özellikle tip 1 ve daha sonra tip 2 pnömositlerdeki skuamoz hücreli metaplazi ve alveola-kapiller alandaki interstisyel sıvı artışıdır. Ayrıca otopsi bulgularında akciğerlerin normalden daha büyük ve ağır olduğu saptanmıştır (Paul ve ark. 1993).

Conley ve ark.1986, bleomisinin alveoler makrofajların süperoksit anyonlarını artırarak oksijen toksisitesine yol açtığını ileri sürmüştür. Klinik çalışmalarda hidrokortizonun süperoksit üretiminin %33 kadarını inhibe ettiği bulunmuş ve hidrokortizonun bleomisin pnömosini azalttığı gösterilmiştir.

Bleomisin ayrıca nitrik oksit salınımına neden olur. İlacı takiben oksijene maruz kalma durumunda solunum yetmezliği yerleşir ve bleomisin verilen hastalara cerrahi girişim gerekirse mümkün olduğu kadar düşük tutulmalıdır (Conley ve ark.1986). Bleomisin büyük oranda idrar ile atılmasına rağmen genellikle çok yüksek dozda verilmedikçe böbrek hasarına yol açmaz (Sert ve ark. 2007).

## 2.4. Üzüm Çekirdeğinin Yapısı

Üzüm botanikte cins adı *Vitis* olan ve asma olarak adlandırılan bitkinin meyvesidir. Meyve üretiminde kullanılan türler içerisinde dünyada en çok üzüm çeşidi içeren tür *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* D.C.'dir. Bu tür içerisinde tespit edilen çeşit sayısı 10.000'nin üzerinde olup dünyadaki üretimin % 90'ından fazlasını oluşturmaktadır.

Üzüm, yüksek seker içeriğinden dolayı, kalori değeri yüksek bir besin maddesidir. Ayrıca, mineral maddelerden kalsiyum, potasyum, sodyum ve demir yönünden zengin olduğu gibi, bazı vitaminler (A, B1, B2, niasin ve C vitaminleri) yönünden de önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Üzümün bileşimi üzerine basta üzüm çeşidi olmak üzere toprak ve iklim koşulları, uygulanan teknik ve kültürel işlemler ile özellikle olgunluk derecesi vb. faktörler etkilidir. Genel olarak üzümlerin bileşiminde su, şekerler, organik asitler, fenol bileşikleri, pektik maddeler, aroma maddeleri, azotlu maddeler, enzimler, vitaminler ve mineraller bulunur (Canbas, 2003, Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2006).

Üzüm çekirdeği kompleks bir bileşime sahip olup, bileşimi oluşturan öğeler ve yaklaşık oranları çizelgedeki gibidir.

| Üzüm Çekirdeği Bileşimi |          |
|-------------------------|----------|
| Bileşim<br>Ögesi        | Oran (%) |
| Lif                     | 40       |
| Yağ                     | 16       |
| Protein                 | 11       |
| Fenolik Bileşikler      | 7        |

Üzüm çekirdeğinde bulunan proantosiyandinler, geniş farmolojik aktivitelere ve tedavi edici potansiyele sahip oldukları bilinen bir polifenolik biyoflavanoid grubudur.

Kırmızı şarap ve üzüm çekirdeklerinde bulunan esas polifenoller olan proantosiyandinlerin kalp sağlığını koruyucu etkileri yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

### 2.4.1.Fonksiyonel Özellikleri

Üzüm çekirdeği ve kabuğu, zengin bir proantosiyanidin kaynağıdır. Prosiyanidinlerin karışımı, oligomerik proantosiyanidin kompleksleri (OPCS) (+) kateşin ve (-) epikateşin dimer ve trimerleri ile proantosiyanidinlerin trimer ve polimerlerinden oluşur. Ayrıca üzümde resveratrol ve viniferinler gibi stilbenler de bulunmaktadır ( Fine, 2000).

Üzüm çekirdeği ve üzüm çekirdeği ekstraktının içermekte olduğu bileşenlerine bağlı olarak sahip olduğu başlıca fonksiyonların;

1. Antioksidan
2. Antinflamatuar
3. Antitrombotik
4. Antikarsinojenik (Antikanserojenik)
5. Antibakteriyal

etkilerden kaynaklandığını bilinmektedir (Fremont.2000).

Pek çok araştırmacının bulgularına göre, üzüm çekirdeği özütünün serbest radikalleri süpürücü yeteneği, bir başka deyişle antioksidan aktivite kapasitesi, gerek hayvan modelleri gerekse analitik testler sonucunda oldukça yüksek düzeylerde tespit edilmiş ve hatta C ve E vitaminleri ile beta-karotenden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar üzüm flavanollerinin, özellikle de resveratrolün güçlü bir kalp koruyucusu olduğunu ortaya koymuştur. Üzümde bulunan viniferin ve kateşinin sitokrom oksidaz enzimini inhibe ederek aspirin ve naproksen benzeri etkiler meydana getirdiği, çekirdeğinde bulunan resveratrolün trombosit agregasyonunu inhibe ederek pıhtılaşmayı engellediği, LDL oksidasyonunu azalttığı, ön yangısal (inflamatuar) cevabı baskıladı ve ileri sürülmektedir (Yılmaz,2010).

Oksijen radikalleri beyin hasarında çok önemli bir rol oynar. Yangzherg ve arkadaşları (2005). üzüm çekirdeği özütünün yeni doğmuş sıçanlarda oksijen radikalleri tarafından indüklenen beyin hasarı üzerindeki etkilerini inceleyen bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Araştırma sonucunda, üzüm çekirdeği özütünün kullanılmasıyla lipid peroksidasyonunun durdurulduğu ve hipoksik (oksijen azlığı nedeni) istemik beyin hasarının yeni doğan sıçanlarda azaltıldığı tespit edilmiştir.

Tyagi ve arkadaşları (2003) tarafından gerçekleştirilen araştırmada çeşitli in vitro çalışmalar sonucunda üzümü çekirdeği özütünün tümör gelişimini bastıracağı göğüs, akciğer, prostat, kolon ve lenf bezlerinde görülen kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Çizelge. 2.2. Kırmızı üzüm kabuğu ve çekirdeğinin antioksidan içerikleri

| Çözünabilir Polifenoller | Çekirdek (g/kg kuru madde) | Kabuk (g/kg kuru m.) |
|--------------------------|----------------------------|----------------------|
| Fenolik asitler          | %26.2                      | %13.4                |
| Hidroksisinnamik asitler | %4.2                       | %4.8                 |
| Flavan-3-ol'ler          | %40.3                      | %17.8                |
| Flavanoller              | %6.7                       | %11.8                |
| Antosiyaninler           | % 22.7                     | %52.2                |

#### 2.4.2 Resveratrol (3, 4', 5-trihidroksi-stilben)

Son zamanlarda yapılan çalışmalar üzüm çekirdeğinin tespit edilebilmiş en güçlü antioksidan olduğunu, bunun yanında insan sağlığı açısından birçok faydalı madde içerdiğini ortaya koymuştur. Resveratrolün ilk tespiti, Fransız mutfağının son derece yüksek miktarda doymuş yağ, kolesterol içerikli beslenmesi ve yoğun sigara tüketimine rağmen özellikle Bordeaux bölgesinde yaşayan kesiminde, kalp hastalıklarının yok denecek kadar az görülmesinin bilim adamları tarafından “Fransız paradoksu” olarak değerlendirilmesiyle başlamıştır. Bordeaux bölgesinin rutubetli havasında yetişen “*Cabernet Sauvignon*” cinsi üzümlerin kabuğunda küf mantarına karşı oluşan resveratrol adlı antioksidan maddenin, yüksek kalorili ve yüksek yağ oranlı yiyecekler tüketildiği halde, kalp hastalıklarına karşı koruyucu rolü olduğu yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

Resveratrolün ilk kez 1930’lu yılların başlarında tedavi edici bitkilerde var olduğu belirlenmiştir (Takaoka. 1940). Daha sonraki yıllarda Avustralya’da yetiştirilen okaliptus ağacında, bir stilben olan resveratrolün antifungal aktivitesi üzerine çalışmalar yapılmıştır (Fremont. 2000).

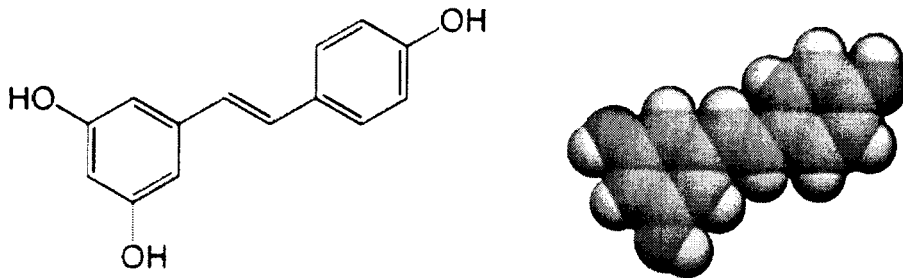
Resveratrol üzüm yapraklarında ve üzüm tanelerinde ilk defa 1976 yılında saptanmış ve bu tarihten itibaren resveratrolün antifungal aktivitesi üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Resveratrol yıllarca Asya

tıbbında Ko-jo-kon olarak bilinen ve iltihaplanmaları önleyen bir ilaç olan *Poligonum cuspidatum*'un (sivri uçlu çoban değneği) köklerinden elde edilen bir maddedir. Çin ve Japon halklarının kojokon olarak adlandırdıkları geleneksel ilacın resveratrol olduğu bugün bilinmektedir. Resveratrol antifungal özelliklere bağlı olarak pek çok bitki tarafından üretilmektedir. Çok değişken miktarlarda üzümde, dut ağacında, Ahududunda, yer fıstığında, fındıkta, böğürtlende, İsveç çamı ve Doğu beyaz çamı gibi bazı çam ağaçlarında, sivri uçlu çoban değneği'nde bulunmaktadır. Resveratrol diğer bitkilerde de değişen miktarlarda üretilmesine rağmen üzüm ve üzümde elde edilen ürünlerde özellikle de şarapta fazla miktarda bulunan bileşiktir (Çaylak ve ark.2009).

İnsanoğlunun yeniden keşfettiği en büyüleyici moleküllerden birisi Resveratrol'dur. Resveratrol mantar enfeksiyonları ve diğer çevresel streslere karşı koruyucu olarak bitkilerden elde edilen doğal bir fitoaleksindir. Alexin kelimesi Yunan dilinden gelir ve Yunanca engellemek yada korumak anlamındadır. Resveratrol aynı zamanda dejeneratif hastalıklardan korumak için insanlarda alexin benzeri aktiviteye sahiptir.

#### 2.4.3. Resveratrolün Kimyasal Bileşimi

Üzümlerde bulunan polifenoller başlıca iki grup altında toplanır; Flavonoidler ve flavanoid olmayan bileşiklerdir. Üzümde en yaygın olan flavanoidler flavanoller (kersetin, kamferol, mirsetin), flavan-3-ol'ler (katesin, epikatesin, tanenler) ve antosiyaninlerdir. Flavonoid olmayan bileşikler ise; hidroksisinnamik asit ve gallik asit türevleri ile trans-resveratrol'dür



Şekil.2.3. Resveratrolün Kimyasal Yapısı. ( Greenwood ve Earnshaw ,1997)

Resveratrol , biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı üzümde sentezlenen stilben grubu bir fitoaleksindir. Özellikle renkli üzüm çeşitlerinin kabuk kısmında yüksek miktarda sentezlenmektedir (0.30- 14.10 mg/g yaş ağırlık; 9.30-78.50 mg/g kuru ağırlık). Biyokimyasal yapısının aydınlatılmasından sonra resveratrol, çeşitli hastalıkların oluşumunun önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Üzüm ve şarabın içeriğinde resveratrol bulunduğunun tanımlanmasıyla birlikte, bu bileşiğe olan ilgi daha da artmıştır. Bir çok eczacılık ve tıp literatüründe, resveratrolün antifungal, antimikrobiyal, antitümör ve antioksidan etkileri olduğu vurgulanmaktadır (Keskin ve ark.2009).

Resveratrol ile ilgili araştırmaların büyük çoğunluğu kanser üzerine yoğunlaşmış olup, bu bileşiğin, kanserin pek çok aşamasında durdurucu ve engelleyici özelliği olduğu belirlenmiştir. Resveratrol, antiinflamatuvar,trombosit kümeleşmesini engelleme ve kolesterolü düşürme gibi etkileriyle aynı zamanda koroner kalp hastalıkları riskini de azaltmaktadır. Fransa'da koroner kalp hastalıklarından ölüm oranının düşük olması, orta düzeyde şarap tüketimine (Fransız Paradoksu) dayandırılmıştır. (De Lorgeril ve ark. 2002) Bunların yanı sıra, son yıllarda yapılan çalışmalarda resveratrolün Alzheimer hastalığı üzerinde de iyileştirici etkisinin olduğu belirlenmiştir. Resveratrol ısıya dayanıklı olması nedeniyle, birçok yiyecek çeşidinde aktif formunu (transresveratrol) koruyabilmekte, ağız yoluyla alındıktan hemen sonra sindirilmekte ve hızla kana karışmaktadır. Günlük 375 mL kırmızı şarap tüketilmesi, 50 adet kırmızı-siyah renkli üzüm tanesinin yenmesi, ya da ticari önem kazanmış resveratrol içerikli ekstraların içilmesiyle resveratrolün koruyucu etkisinden yararlanılabilmektedir. (Keskin ve ark. 2009).

Resveratrol hücre yaşam süresini uzatan ilk moleküldür. Resveratrol'un sirtuin (SIRT2, insan SIRT1 homologu) aktivasyonu ile kalori kısıtlamasına yanıt olarak mantarlarda hücre yaşam süresini uzattığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Resveratrol'ün sirtuinleri aktive ettiği insan ve hayvan modellerinin kullanıldığı çalışmalarla gösterilmiştir. Araştırmalara göre antioksidant ve antimitojen olarak yaşamayı geciktirme özelliğine sahip olan resveratrol, kanser oluşumuna doğru giden hücre değişimlerini bloke etmekte ve istenmeyen dokuların vücutta oluşmasını engellemektedir (Karabulut,2008).

## 2.5. Ehrlich Ascites Tümör (EAT)

Günümüzde tedavide başarılı olmak ve kansere karşı yeni yöntemler geliştirmek üzere yapılan çalışmalar deney hayvanlarında oluşturulan bu deneysel hayvan tümörleri üzerinde sürdürülmektedir. Elde edilişinden bu yana pek çok araştırılmaya konu olan hayvansal tümörlerden biri olan EAT, ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış ve Ehrlich ile Apolant tarafından 1905 te tümör parçaları farenden fareye deri altından transplante edilerek deneysel tümör haline getirilmiştir (Lazebnik ve ark., 1991).

1932 yılında Loewenthal ve Jahn, bu tümörün farelerin peritonunda sıvı halde büyüyen formunu elde etmeyi başarmışlar ve peritonda hücrelerin yanı sıra asit sıvısı da oluştuğu için tümör Ehrlich Ascites Tümörü adını almıştır. EAT diferansiye olmamış bir tümördür. Transplante edilebilme oranı yüksek olan, regrasyon göstermeyen, hızlı proliferasyona, kısa yaşama süresine sahip ve %100 ölüme götüren bir tümör çeşididir.

Tümör hücrelerinin herhangi bir vücut boşluğuna enjekte edilmesinden sonra orada çoğalmaları ile neoplastik hücreler ihtiva eden bir effüzyon meydana gelmesi, bir asit terimi ile ifade edilir. Genellikle tümörler tekrarlayan pasajlarla virulanslarını artırırılar. Bu gibi tümörlerin büyüme hızı artar. Diferansiasyon (farklılaşma) gitgide kaybolur (Altun ve Özalpan, 2004).

Asit, gri- beyaz bazen hafif kanlı görünümde koyu bir sıvıdır. 0.1 cc'de yaklaşık 10 milyon neoplastik hücre içerir. EAT'nin sıvı formunun elde edilmesiyle birlikte, çalışmalarda yoğun bir şekilde sıvı tümör kullanılmıştır. Kullanımdaki yoğunluğun nedeni, sıvı formun serbest tümör hücrelerini içeren süspansiyon şeklinde olması ve bunun sonucunda istenilen sayıdaki hücrenin bir başka hayvana transplante edilebilmesidir. Dolayısıyla alışılmış basit sayma yöntemleriyle hem transplante edilen tümör hücre sayısı, hem de oluşan tümör büyüklüğünü kolay bir şekilde saptanabilmesi mümkün olmaktadır (Altun ve Özalpan, 2004).

EAT amaca göre asit form veya solid form olarak kullanılmaktadır. Eğer tümör hücresi içeren asit sıvısı deney hayvanına intraperitoneal yolla enjekte edilirse asit form, subkutanöz yolla enjekte edilirse solid form elde edilir. EAT hücreleri, farelerin peritoneal boşluğunda süspansiyon halinde çoğalırlar ve in vitroda yapay yüzeylere yapışmazlar. Pasajdan 4-6 gün sonra asit oluşmaya başladığı anlaşılabilir ve toplam 5-12 cc asit teşekkül eder (Altun ve Özalpan, 2004).



Şekil.2.4. Normal (sağlıklı) fare (solda) ve EAT gelişmiş fare (sağda). Karın ileri derecede şişmiş, sağlıklı fare kolayca ayırt edilebilmektedir.

Sunulan çalışmada Bleomisin uygulanan farelerde hücre poliferasyonu , mitotik indeks , biyokimya analizleri , ve histopatolojik sonuçlar ile resveratrolün antioksidant özelliği ve fibrozis oluşumu üzerine olan etkileri yorumlanacaktır.

## **MATERYAL ve YÖNTEM**

### **3.1. Materyal**

#### **3.1.1. Deney hayvanlarının yetiştirilmesi**

Tez çalışmasında kullanılan ve ağırlıkları 25-30 gram arasında değişen fareler Dollvet Veteriner Aşı, İlaç, Biyolojik Madde Üretimi Sanayi Ticaret A.Ş. tarafından bağışlanmıştır. Uygun koşullarda ve polipropilen kafeslerde normal şartlar altında  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, % 50-70 rutubete sahip odada bakımları yapıldı. Hayvanlara uygulama yapılmadan önce 2 hafta süreyle buldukları ortama alışmaları beklendi. Daha sonra işlemlere başlandı.

#### **3.1.2. Resveratrolün Temini**

Çalışmamızda ticari olarak piyasada bulunan Sigma firmasına ait R5010 kod no'lu Resveratrol kullanılmıştır.

### **3.2. Ehrlich Ascites Tümör Hücreleri**

Deneyde kullanılan EAT hücreleri, hiperdiploid EAT hücreleridir. Bu hücreler 1977 yılında Köln Radyobioloji Bölümü'nden temin edilerek İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Radyobioloji Anabilim Dalı'nda devamı sağlanmıştır. Buradan 2009 yılında Üniversitemize gönderilmiş ve çalışmamızda kullanılmıştır. Rutin olarak her 10 günde bir, donör fareden diğerine transplantasyonları yapılmıştır.

### **3.3. Deneysel Uygulamalar**

Deney hayvanı olarak 60 adet Balb/C ırkı yetişkin fareler kullanıldı. Her grupta 12'şer hayvan olacak şekilde toplam 5 grup oluşturuldu. Bütün farelere i.p. yoldan 2.5 milyon EAT hücresi uygulandı. I no'lu grup kontrol grubu, II no'lu grup i.p. yolu ile sadece 1,5mg/kg Bleomisin verilen grup, III no'lu grup i.p. yolla sadece 25mg/kg üzüm çekirdeği ekstresinin uygulandığı grup oldu. Bundan sonraki grupların hepsine Bleomisin aynı dozda (1,5 mg/kg) uygulandı, ancak; IV no'lu gruba i.p. yol ile 25 mg/kg üzüm çekirdeği ekstresi, V no'lu gruba i.p. yol ile 50 mg/kg üzüm çekirdeği ekstresi, Deneyin kontrol ve çalışma gruplarını içeren program Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kontrol ve Deney Grupları

|     | Denek Sayısı | Uygulanacak Madde  |
|-----|--------------|--|
| I   | 12           | Kontrol grubu  |
| II  | 12           | Sadece 1,5mg/kg Bleomisin verilen grup                       |
| III | 12           | Sadece 25 mg/kg üzüm çek. ekstresi verilen grup              |
| IV  | 12           | 1,5mg/kg Bleomisin+ 25 mg/kg üzüm çek. ekstresi verilen grup |
| V   | 12           | 1,5mg/kg Bleomisin+ 50 mg/kg üzüm çek. ekstresi verilen grup |

Hayvanlara kanser hücrelerinin enjeksiyonu, antitümöral ilaç enjeksiyonu ve bitki ekstralarının verilmesi i.p. yolla yapılmıştır. Her uygulama öncesi hayvanların karın bölgesi antiseptik bir solüsyonla temizlenip sterilize edilmiş ve her hayvan için ayrı steril iğne kullanılmıştır. İlk gün hayvanların tamamına EAT hücreleri enjekte edildi. Ertesi gün ise, Bleomisin ve üzüm çekirdeği ekstresi enjekte edildi. İlaç ve ekstre uygulamasının yapıldığı gün 1. gün olarak kabul edildi. Uygulamanın yapıldığı ilk günü takip eden 2., 4., 6. ve 9. günlerde her gruptan seçilen 3'er fare inhalasyon yoluyla anestezi yapılarak derin genel anestezi altında peritonları açılarak periton içi 50 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ile yıkandı ve Neubauer lamında periton içi sıvılarından kanser hücresi sayımı yapıldı.

### 3.4.1. Mitotik İndeks Çalışması

Kontrol ve deney gruplarından 2., 4., 6. ve 9. günler için farelerden karın içi asit sıvıları alındı ve her bir hayvandan üçer adet preparat hazırlandı. Preparatlar fikse edildi ve feulgen boyasından sonra giemsa boyasıyla boyandı. Her preparatta 1000 adet hücrede mitoz yapan hücrelerin sayısı belirlendi.

### **3.4.2. Hücree Çoğalma Hızı Çalışması**

Kontrol ve deney gruplarında 2., 4., 6.ve 9. günler için ayrı ayrı farelerin periton içleri 50 ml IHBSS ile yıkandı ve Neubauer lamında sayım yapıldı.

### **3.4.3. Patolojik Çalışmalar**

Deney hayvanlarından dislokasyon yapılmadan önce 2 ml injektor kalp punkçuru ile kanları alındı ve dislokasyonla sakrifiye edildikten sonra farelerden böbrek, karaciğer ve akciğer dokuları çıkarılarak öncelikle fizyolojik suda yıkanarak kan ve pıhtı maddeleri uzaklaştırıldı. Tüm örnekler 24 saat boyunca %10 formaldehid fiksatifinde bekletildi. Sonra %30, %50, %70, %85, %95, ve iki sefer %100 alkol ve daha sonra %25 + %75, %50 + %50, %75 + %25 ksilol + alkol serilerinden geçirilerek alkolü uzaklaştırılmıştır ve %100 ksilol'de bekletilmiştir. Daha sonra %25 ksilol + %75 parafin , %50 ksilol + %50 parafin , %75 ksilol + %25 parafin serilerinden geçirildikten sonra 58°C' de %100 parafinde bekletildi. Daha sonra parafin blokları hazırlanan doku örneklerinden 5' er mikron kalınlığında doku kesitleri alınmış ve deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Hematoksilen boyada 5 dakika bekletildikten sonra yıkanıp eozin ile 30 saniye daha yıkanıp tekrar dehidrasyon yapıldı ve preparatlar hazır hale getirildi.

## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA**

### **4.1. Araştırma Bulguları**

#### **4.1.1. Mitotik İndeks**

Kontrol ve deney gruplarından 2., 4., 6. ve 9. günler için farelerin karın içi asit sıvıları alındı ve her bir hayvandan üçer adet preparat hazırlandı. Her preparat fikse edildi ve önce feulgen boyada sonra da giemsa ile boyandı. Her preparatta 1000 adet hücrede mitoz yapan hücrelerin sayısı belirlendi. Her hayvan için ortalama mitoz sayısı belirlendi ve standart sapmaları ile ortalama değerleri hesaplandı. Varyans analizi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.11 ve Şekil 4.1.1'de görülmektedir. Varyans analizi sonucunda kontrol grupları ile deney grupları arasında anlamlı düzeyde farklar bulundu.

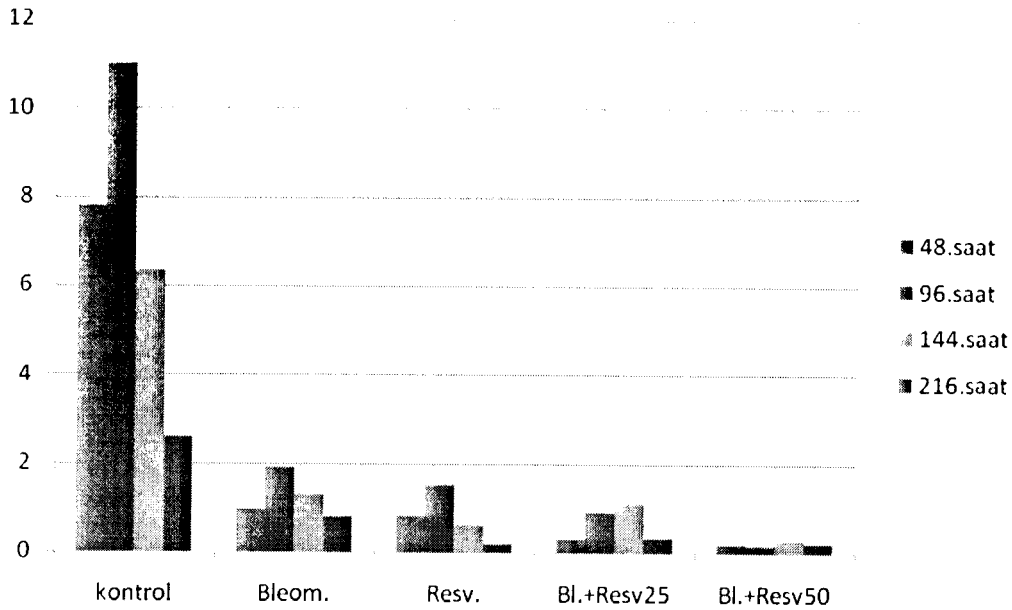
Deney gruplarının kontrol grubu ile ve kendi aralarında günlere göre ikili karşılaştırmaları SPSS 15 programı kullanılarak ANOVA testi ile yapıldı. ANOVA testi sonuçlarına göre kontrol grubu ile diğer deney grupları arasında tüm günler için  $p < 0.01$  düzeyinde ileri derecede anlamlı farklar olduğu anlaşılmış olup, hangilerinin birbirinden farklı olduğunu belirlemek için DUNCAN testi kullanılmıştır. DUNCAN testi sonucunda ise sadece birinci grubun diğerlerinden çok anlamlı derecede farklı olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.01$ ).

DUNCAN çoklu karşılaştırmalı testi sonucunda sadece kanser hücrelerinin enjekte edildiği ve aynı zamanda kontrol grubu da olan 1. grupta çok anlamlı derecede fark gözlenmiştir ( $p < 0.01$ ).

Diğer grupların kendi aralarındaki karşılaştırmalarında ise 5. grupta diğerlerine nazaran anlamlı fark olduğu gözlendi ( $p < 0.01$ ). Çizelge 4.1. ve şekil 4.1.'de bütün grupların 2., 4., 6. ve 9. günlerdeki mitotik indeks yüzdeleri görülmektedir.

Çizelge .4.1.Mitotik indeks yüzdesi. Bütün grupların 2., 4., 6., ve 9., günlerdeki mitotik indeks yüzdeleri.

| Grup                         | 2. Gün      | 4. Gün       | 6. Gün      | 9. Gün      |
|------------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| I ( Kontrol)                 | 7,81 ± 0,41 | 11,01 ± 0,26 | 6,35 ± 0,18 | 2,61 ± 0,19 |
| II (1,5mg/kg Bleomisin)      | 0,98 ± 0,11 | 1,92 ± 0,18  | 1,31 ± 0,09 | 0,81 ± 0,05 |
| III (25 mg üzüm çek. Eks.)   | 0,82 ± 0,06 | 1,51 ± 0,10  | 0,62 ± 0,13 | 0,18 ± 0,09 |
| IV(Bleomisin+25mg üzüm çek.) | 0,30 ± 0,14 | 0,91 ± 0,20  | 1,10 ± 0,12 | 0,33 ± 0,13 |
| V( Bleomisin+25mg üzüm çek.) | 0,18 ± 0,01 | 0,22 ± 0,02  | 0,29 ± 0,07 | 0,21 ± 0,09 |



Şekil.4.1.Mitotik indeks. Bütün grupların 2., 4., 6., ve 9., günlerdeki mitotik indeks yüzdeleri

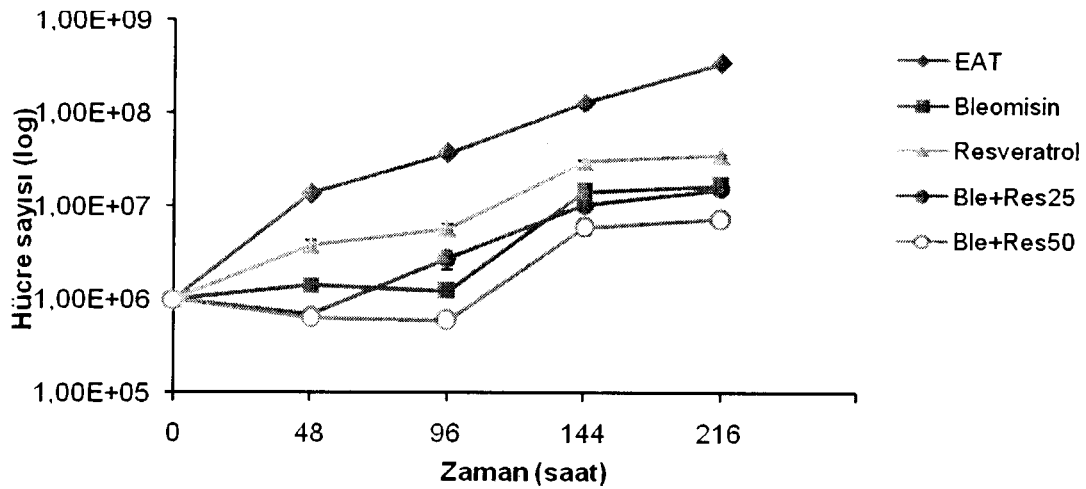
Yapılan çalışmalar sonucunda mitotik indeks kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bleomisin verilen grupta önemli bir azalma görülmüştür. Resveratrol verilen gruplar da ise resveratrolün dozu arttıkça mitotik indeksin yüzdesi de giderek daha fazla bir azalma göstermiştir. Kontrol grubunda 96. saate en yüksek mitotik aktive gözlenmiştir.

#### 4.1.2. Hücre Çoğalma Hızı

Kontrol ve deney gruplarında 2., 4., 6.ve 9. günlerde, farelerin periton içi 50 ml HBSS ile yıkandı ve hücreler Neubauer lamında sayıldı. Ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2.'de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Hücre Çoğalma Hızı.  $2.5 \times 10^6$  EAT hücrelerinin enjeksiyonundan sonra 2., 4., 6.ve 9. günlerde her grubun sahip olduğu hücre sayısı görülmektedir.

| SAAT<br>GRUP | 0         | 48                        | 96                           | 144                          | 216                          |
|--------------|-----------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| EAT          | 2.500.000 | 13704748<br>±<br>697434,3 | 37202267,4<br>±<br>558785,38 | 130038904,4<br>±<br>874060,8 | 350612635,4<br>±<br>780570,4 |
| Bleomisin    | 2.500.000 | 1407572<br>±<br>98034,01  | 1225380,4<br>±<br>138542,2   | 14318760,2<br>±<br>807513,5  | 16947387<br>±<br>455250,4    |
| Resveratrol  | 2.500.000 | 3849567<br>±<br>464189,6  | 5738051,6<br>±<br>731178,5   | 30479435,2<br>±<br>686078,5  | 35516276<br>±<br>726621,8    |
| Ble+Res25    | 2.500.000 | 689925,6<br>±<br>67863,87 | 2727453,6<br>±<br>632956,4   | 10341390,8<br>±<br>720365,6  | 15329221<br>±<br>755331,7    |
| Ble+Res50    | 2.500.000 | 636721,4<br>±<br>38264,04 | 595120,4<br>±<br>54129,95    | 5985393,8<br>±<br>1000829    | 7264165<br>±<br>610641,1     |

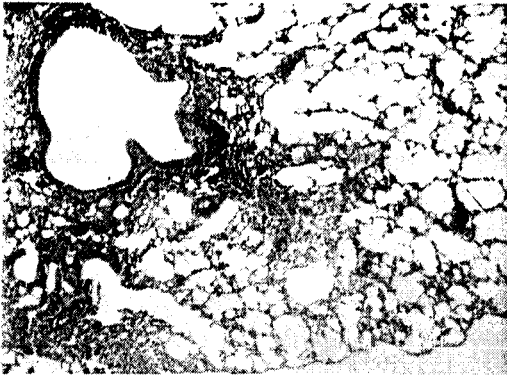


Şekil 4.2. Hücre Çoğalma Hızı. Bütün grupların 2., 4., 6. ve 9. günlerdeki hücre çoğalma hızı yüzdeleri görülmektedir.

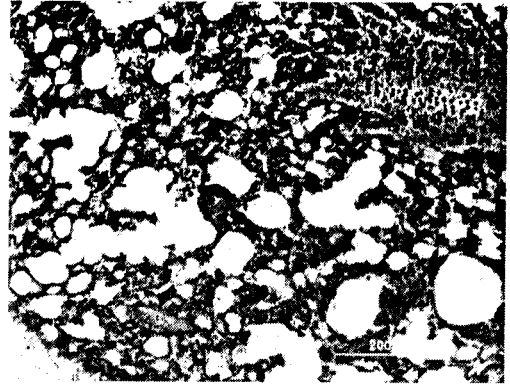
Yapılan karşılaştırmalı test sonucunda BI ve BI+Res.25 ile BI + Res.25 ve BI+Res.50 grupları dışında diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak ( $p < 0,05$ ) anlamlı artış gözlenmiştir.

#### 4.1.3. Patolojik Bulgular

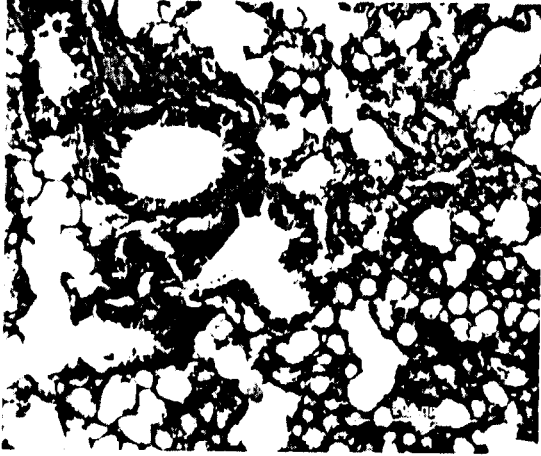
Deney hayvanlarının sakrifikasyonu genel anestezi altında gerçekleştirilmiştir ve sakrifiye edilen hayvanların akciğer, karaciğer ve böbrek dokuları alınmıştır. Hazırlanan doku preparatlarının histopatolojik incelemeleri sonucunda bleomisin akciğer parankiminde fibrozis ve fokal inflamatuvar hücre toplulukları görülmüştür. Bütün gruplarda akciğer doku kesitlerinde ortalama Grade 1-3 arasında inflamasyon gözlenmiştir. Kontrol grubunda ortalama olarak grade 1 iken bleomisin ile tedavi edilen gruplarda ortalama olarak grade 3'e kadar inflamasyon izlenmiştir. Buna karşın Bleomisin+Resveratrol 25mg/kg gruplarında inflamasyon ortalama grade 2 olarak izlenmiştir. Bleomisin+Resveratrol 50mg/kg gruplarında ise inflamasyon ortalama grade 1 olarak izlenmiştir.



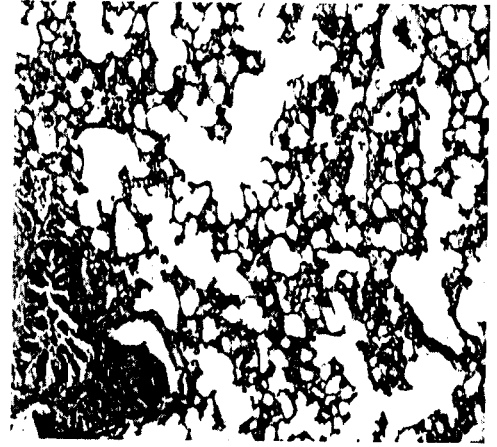
Şekil 4.3. Kontrol grubu. Akciğer parankiminde fibroziste azalma ve fokal inflamatuvar hücre toplulukları, Grade:1, (Masson Trichrom, x200).



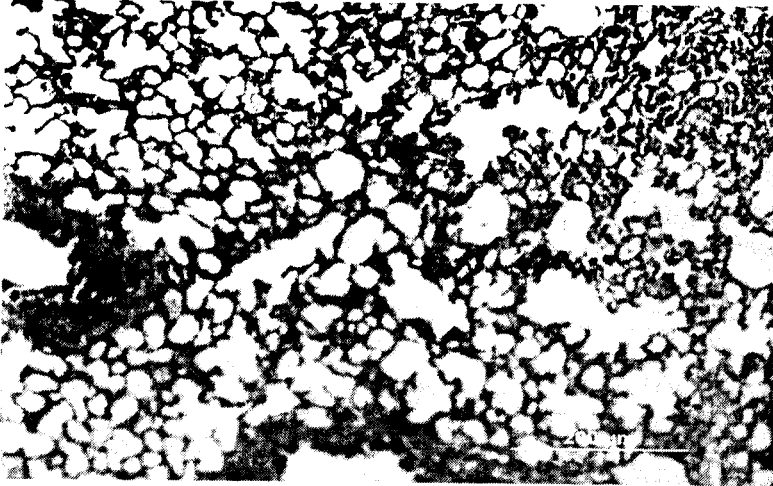
Şekil 4.4. Bleomisin grubu. Akciğer parankiminde yoğun fibrozis ve inflamasyon, Grade :3, (H&E, x200).



Şekil 4.5. Resveratrol grubu. Akciğer parankiminde fibrozis ve inflamatuvar infiltrasyonunda azalma, Grade: 1, (H&E, x200).



Şekil 4.6. Bleomisin + Resveratrol 25 grubu. Akciğer parankiminde fibrozis ve inflamasyonda azalma, Grade :2, (H&E, x 200).



Şekil.4.7. Bleomisin + Resveratrol 50 grubu. Akciğer parankiminde fibrozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda belirgin azalma, Grade :1, (H&E, x200).

Çizelge 4.3. Akciğer doku kesitlerinin grade tablosu

| GRADE         | G0 | G1  | G2  | G3  | G4  |
|---------------|----|-----|-----|-----|-----|
| GRUP<br>EAT   |    | +   |     |     |     |
| BLEOM.        |    |     |     | +   |     |
| RESV.         |    | +   |     |     |     |
| BLEO.+RESV.25 |    | --- | +   |     | --- |
| BLEO.+RESV.50 |    | +   | --- | --- | --- |

**x10'luk objektifte**

**Grade 0:** hiç iltihap görülmedi.

**Grade 1:** 1 veya daha az iltihap görüldü

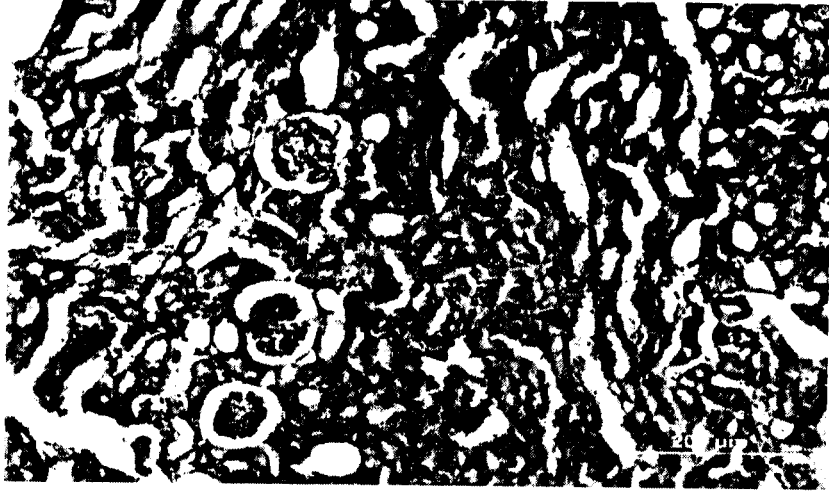
**Grade 2:** 2-4 arasında iltihap görüldü

**Grade 3:** 5-10 arasında iltihap görüldü

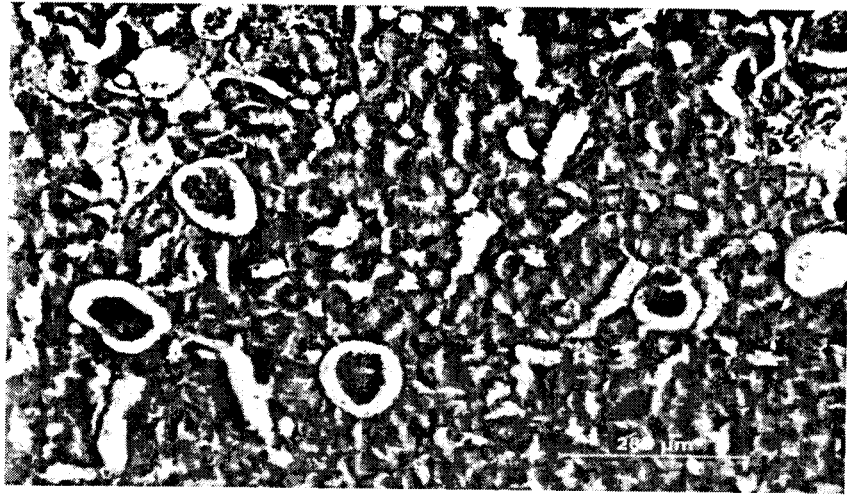
**Grade 4:** 10'dan fazla iltihap görüldü

## 5 Gruba ait böbrek doku kesitleri

Bleomisinin böbreklerde, özellikle kortekste olmak üzere, yer yer farelerde hafif bir inflamasyona yol açtığı saptanmış ve grade 0-1 skorlamaları yapılmıştır. Nekroz ve fibroze rastlanılmamıştır (Şekil.4.9).



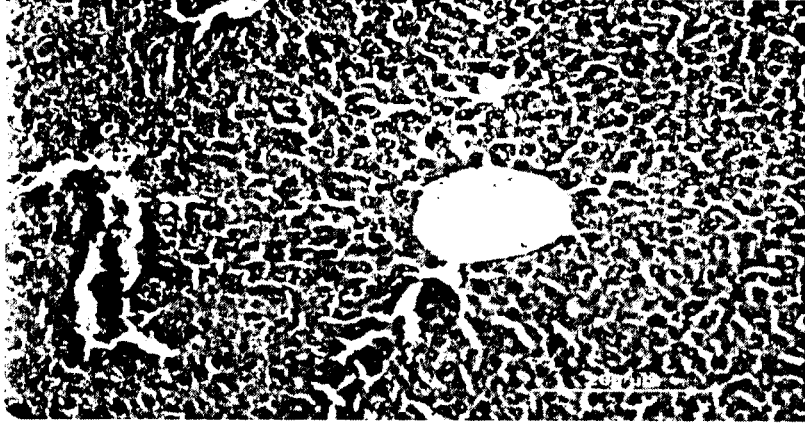
Şekil 4.8. Kontrol grubu. Böbrek doku kesitinde normal histolojik görünüm. (H&E.X 200).



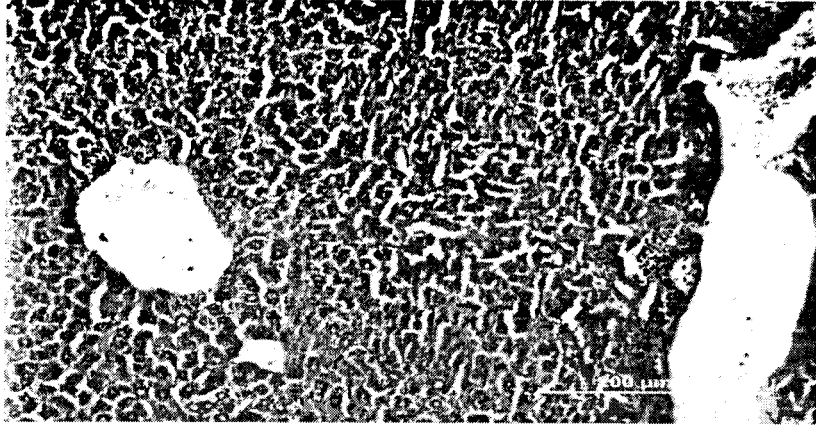
Şekil 4.9. Bleomisin grubu. Böbrek doku kesitinde fokal inflamatuvar hücre infiltrasyonu (H&E.X 200).

## 5 Gruba ait karaciğer doku kesitleri

Kontrol grubunda karaciğerde inflamasyon izlenmezken, bleomisin ile tedavi edilen gruplarda inflamatuvar hücre yoğunluğu grade 0-1 arasında izlenmiştir (Şekil.4.10). Bl + Resv.25 mg/kg ve Bl + Resv.50 mg/kg tedavi edilen gruplarda inflamasyon gözlenmedi.



Şekil.4.10. Kontrol grubu. Karaciğer parankiminde normal histolojik görünüm, ( H&E, x200 ).



Şekil.4.11. Bleomisin grubu. Hepatik parankimde yer yer fokal inflamatuvar hücre toplulukları, ( H&E, x200 ).

Yaptığımız patolojik çalışmalar sonucunda EAT' ne karşı kullandığımız bleomisin, özellikle akciğer parankiminde fibroze ve fokal inflamatuvar hücre topluluklarına yol açtığı görülmüştür (Şekil.4.4). Buna karşılık kullandığımız üzüm çekirdeği ekstresi (Resveratrol ) akciğerlerde meydana gelen bu hasarı azaltmış özellikle de resveratrolün dozu giderek artan Bl + Resv. 25 ve Bl + Resv. 50 gruplar da akciğer hasarında belirgin bir azalma görülmüştür ( Şekil.4.6 ve Şekil.4.7 ).

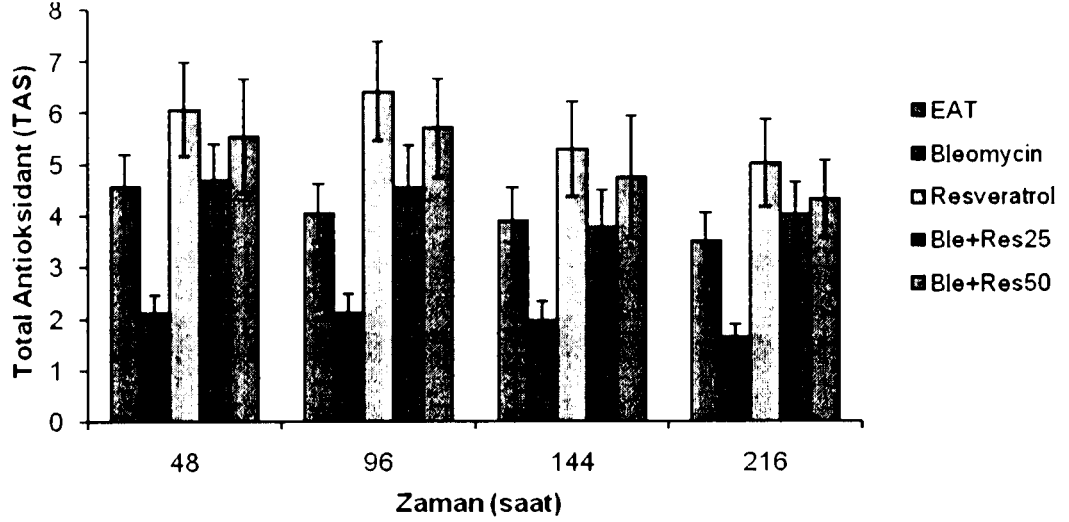
#### 4.1.4 Biyokimyasal analizler

Karaciğerden alınan doku parçalarının homojenizasyon örneklerinden total oksidan statüs (TOS) ve total antioksidan capacity 'ne (TAS) bakıldı.

Bütün Deney gruplarında normalite testi yapıldı. Varyans analizi için Kruskal-Walis testi uygulandı. Deney gruplarının kontrol grubu ile ve kendi aralarında ikili karşılaştırmaları için Mann-Whitney testi uygulandı.

Çizelge.4.4. Karaciğer dokularının Total antioksidan capacity (TAS )sonuçları (ortalama±standart hata)

| SAAT<br>MADDE | 48.saat   | 96.saat   | 144.saat  | 216.saat  |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| EAT           | 4,56±0,62 | 4,05±0,55 | 3,89±0,66 | 3,50±0,55 |
| BLEO.         | 2,11±0,34 | 2,11±0,37 | 1,95±0,38 | 1,63±0,23 |
| RES.          | 6,07±0,91 | 6,41±0,95 | 5,28±0,92 | 5,01±0,85 |
| BR25          | 4,68±0,71 | 4,55±0,81 | 3,78±0,71 | 4,02±0,61 |
| BR50          | 5,54±1,10 | 5,70±0,95 | 4,75±1,18 | 4,32±0,74 |



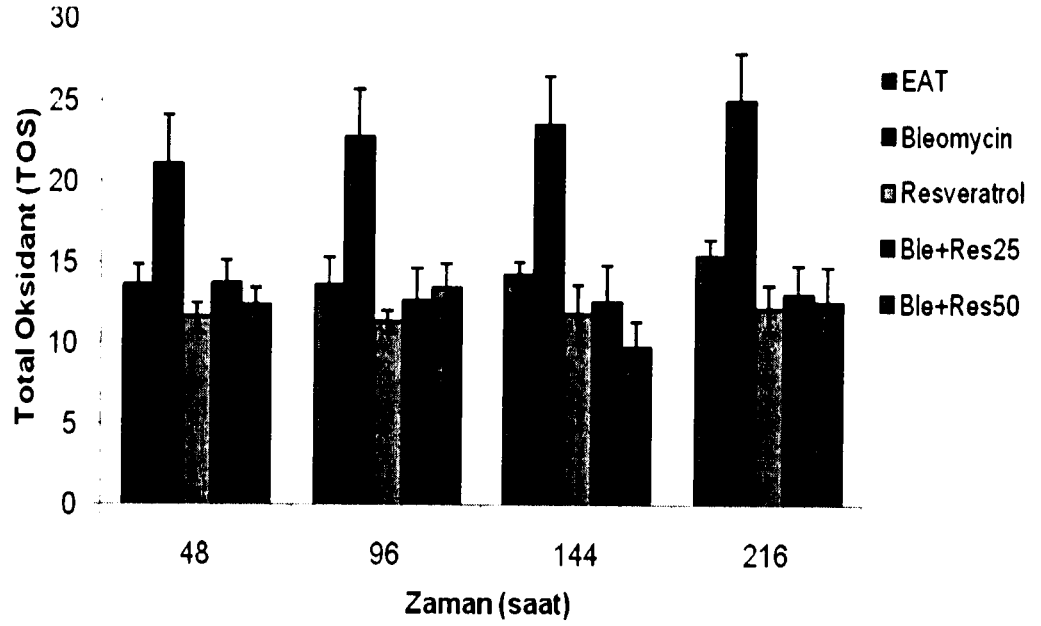
Şekil .4.12. Karaciğer dokularının Total antioksidan capacity (TAS) sonuçları

Çalışmalar sonucunda bleomisin ile tedavi edilen gruplarda total antioksidan capacity (TAS) miktarı kontrol grubuna göre azalma görülürken üzüm çekirdeği ekstresinin verildiği tüm gruplarda resveratrol dozu arttıkça TAS değerlerinde de yükselme gözlenmiştir (çizelge.4.4. ve şekil.4.10). Sadece resveratrolün verildiği grupta TAS değerleri artış gösterirken Bl+Resv.25 ve Bl+Resv.50 gruplarında sadece resveratrol verilen gruba göre bir azalma gözlenmiştir. Bu durum bize bleomisin kullanımının resveratrolün TAS değerlerini artırma özelliği üzerine inhibitör etkisi yapmakta olduğunu göstermiştir. İstatiksel olarak ta en fazla azalmanın olduğu bleomisin grubunda anlamlı bir ( $p<0.05$ ) azalma olduğu, diğer üzüm çekirdeği ekstresi verilen gruplarda ise sadece resveratrol verilen grupta anlamlı ( $p<0.05$ ) artış olduğu gözlenmiştir.

Çizelge.4.5. Karaciğer dokularının Total oksidan statüs (TOS) sonuçları (ortalama± standart hata)

| SAAT<br>MADDE | 48.saat    | 96.saat    | 144.saat   | 216.saat   |
|---------------|------------|------------|------------|------------|
| EAT           | 13,60±1,23 | 13,64±1,69 | 14,25±0,79 | 15,42±0,98 |
| BLEO.         | 21,04±3,03 | 22,77±2,85 | 23,54±2,93 | 25,04±2,85 |
| RES           | 11,64±0,90 | 11,37±0,66 | 11,80±1,79 | 12,20±1,38 |
| BR25          | 13,76±1,40 | 12,68±1,98 | 12,55±2,26 | 13,09±1,72 |
| BR50          | 12,40±1,00 | 13,43±1,55 | 9,82±1,52  | 12,60±2,13 |

Çizelge 4.5.' te görüldüğü gibi bleomisin ile tedavi edilen grupta total oksidan statüs (TOS) değerlerini yükseldiği görülmüştür. Resveratrol ile tedavi edilen grupta ise bu değerlerin azaldığı gözlenmiştir. Bleomisin + resveratrolün verildiği gruplarda da TOS değerlerinde kontrole yakın sonuçlar gözlendiğinden resveratrolün bleomisinin TOS değerlerini arttırma özelliği üzerine inhibitör etkisi yapmakta olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.13. Karaciğer dokularının Total oksidan statüs (TOS) sonuçları

Grupların total oksidan status (TOS) miktarı kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında (şekil.4.11.) en fazla artışın bleomisin ile tedavi edilen grupta olduğu gözlemlendi. Bunun sonucunda bleomisin dokularda oksidan değerlerini yükselttiği görülmüştür. Üzüm çekirdeği ekstresi verilen gruplarda ise kontrole yakın bir seviyede oldukları gözlenmiştir. Bitki grubuna göre ise; tüm bitki gruplarında farklı oranlarda görülen azalmanın sadece Bl+Res.50 grubunda istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) olduğu saptanmıştır.

## 5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Kanser hastalığı, Dünya’da ve ülkemizde kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada görülen ölüm sebebidir (Alıcı ve ark. 2006). Kanser hastalığı, ikinci sırada görülen ölüm sebebi olmakla birlikte, tedavi edilebilir bir hastalıktır. Kanser tedavi planındaki hedef, hastanın yaşam süresini uzatmak, tümör hücrelerinin yok edilmesi ve normal hücrelerin aktivitesini minimal düzeyde etkilemek olmalıdır.

Kanser tedavisinde sıklıkla kimyasal tedavi uygulanmaktadır. Kemoterapi, özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal-biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir (Akyol, 2004). Bleomisin ise dünyada sık kullanılan antineoplastik ajanlardan biridir. Kanser kemoterapisinde kullanılan tüm ajanlarda olduğu gibi bleomisinde de çeşitli yan etkilerle karşılaşılmaktadır (Goldiner ve ark.1978).

Bu çalışmada bleomisin ehrlich asit tümörüne karşı kullanılmıştır. Bleomisin, bazı lenfoma türleri, germ hücre türleri, baş-boyun kanserleri, serviks kanseri gibi bir çok kanser türüne karşı bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Zitnik ve ark. 1995; Koslowski ve ark. 1998). Bleomisinin etki mekanizması; BLM-demir kompleksinin moleküler oksijeni süperoksit ve hidroksil radikaline indirgeyerek, DNA zincirinde kırılma meydana getirmesi şeklindedir. Yapılan in-vitro çalışmalarda antioksidan tedavisi ile BLM’ye bağlı DNA ve hücre hasarının inhibe olduğu gösterilmiştir. Reaktif oksijen radikalleri ve proteazlar genellikle bu inflamatuvar hücrelerden salgılanarak akciğer dokusunda hasar oluşturur ve onarım sürecinde aşırı fibrozis gelişir. Bleomisinin en çok karşılaşılan yan etkisi pulmoner fibrozisdir (Erden ve ark. 2008).

Dünyada ve ülkemizde özellikle kanser hastalarının hastalığı yenmek veya kemoterapinin yan etkilerini azaltmak amacıyla denediği bir çok alternatif tıp ürünü bitkisel materyaller mevcuttur. Bunlar içerisinde en sık başvurulanı ise bazı etkilere

sahip olan bitkilerin kullanılmasıdır. Ülkemizde sıklıkla vinkristin, vinblastin, ıhlamur, adaçayı, kekik, ısırgan otu vb. bitkilerin kullanıldığı tespit edilmiştir. (Aydın ve ark., 2008).

Çalışmamızda EAT taşıyan kanserli farelere bleomisin'in neden olduğu doku tahribatını önleyici etkisi olup olmadığını araştırmak üzere, kuvvetli bir antioksidan olan üzüm çekirdeği ekstresi (resveratrol) verilmiştir. Ayrıca üzüm çekirdeği ekstresinin antitümöral etkinliği de araştırılmıştır.

Resveratrol ile ilgili araştırmaların büyük çoğunluğu kanser hastalığı üzerine yoğunlaşmış olup, bu bileşiğin, neoplazik dokunun pek çok aşamasında durdurucu veya engelleyici özelliği olduğu belirlenmiştir (De Lorgeril ve ark. 2002). Resveratrol, anti-inflamatuar, trombosit kümeleşmesini engelleme ve kolesterolü düşürme gibi etkileriyle aynı zamanda koroner kalp hastalıkları riskini de azaltmaktadır (Keskin ve ark.2009, Sayın ve ark.2008). Resveratrol, oksidatif stresin indüklediği apoptotik hücre ölümünü önleyerek ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi yakalayarak vasküler oksidatif strese karşı direnci arttırmaktadır (Ungvari ve ark.,2007).

Yaptığımız çalışmalarda sadece 1,5 mg/kg bleomisin verilen gruptaki farelerin akciğerlerinde grade 3'e kadar inflamasyon görülmüştür. Böbrek ve karaciğerlerde ise akciğere göre daha az inflamasyon (grade 1-2 ) görülmüş buda bize bleomisin'in akciğerlerde daha fazla zarar verdiğini göstermiştir. Kuvvetli bir antioksidan olan resveratrolün verildiği gruplarda ise, dokularda meydana gelen inflamasyonun azaldığı gözlenmiş ve bu azalmanın 1.5mg/kg bleomisin+25mg/kg resveratrol verilen grup ile 1.5mg/kg bleomisin+50mg/kg resveratrol verilen gruplarda ise resveratrolün dozajı artığından dolayı dokularda ki inflamasyonun daha çok azaldığı görülmüştür. Bunun sonucunda üzüm çekirdeği ekstresinin EAT hücreleri üzerinde de inhibe edici etkisi olduğu ve aynı zamanda bleomisin'in yan etkilerini azaltıcı ve hatta yok edebilecek bir etkiye sahip olduğu da gözlenmiştir.

Bu çalışmada, siyah üzümün çekirdek ve kabuklarında bulunan ve bunları stres faktörlerine karşı koruyan bir bileşik olan resveratrolün, insanları da hastalıklara karşı koruduğu üzerinde durulmuş ve başta kanser olmak üzere insan sağlığı üzerine olumlu etkileri literatür ışığında aktarılmıştır.

Günümüzde çok sayıda araştırmacı serbest radikallerin DNA, proteinler, lipidler ve hücredeki diğer bileşenlerin üzerinde oluşturduğu oksidatif hasarı araştırmaktadır. Hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunmasında ve normal fonksiyonlarını yerine getirmelerinde oksidan ve antioksidan sistem arasındaki mevcut dengenin korunması büyük önem taşımaktadır (Caporaso,2003). Bu dengenin bozulması sonucu oluşan serbest radikaller vücudumuzun temel yapısal molekülleri olan lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif hasarlanmasına neden olur ( Paz-Elizur ve ark. 2003.)

Organ ve dokuları tutan birtakım hastalıkların aşırı yükselttiği oksidatif strese karşı koruyucu antioksidan sistem yetersiz kalmakta bu da hastalığın daha da ilerlemesine hatta pek çok komplikasyonun hızlı bir şekilde ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Vliet ve ark.2000). Sürekli oksijene maruz kalan solunum yolları ve akciğerlerde bu ihtimal çok daha fazla ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller direkt olarak DNA hasarı yaparak çeşitli mutasyonlara neden olduğu (p53 tümör supresör geninde olduğu gibi) ve bununda akciğer kanseri etiyopatogenezinde rol aldığı çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Thacova ve ark.,2004).

Tümör hücrelerinin proliferasyonunda serbest oksijen radikallerinin etkili olduğu bazı deneysel çalışmalarla da kanıtlanmıştır. Bugünkü bilgilerimize göre serbest oksijen radikalleri, kanser oluşumunu uyaran karsinojenlerin en önemlilerinden sayılabilir. Yine karsinogenezin herhangi bir safhasında oksidatif stresin etkisi, etki eden serbest oksijen radikallerinin bileşimine ve miktarına bağlıdır.

Sleijfer'in yapmış olduğu bir çalışmada (2001) bleomisin'in süperoksit ve hidroksil radikallerini içeren reaktif oksijen radikallerini ürettiği bildirilmektedir.

BIM uygulamasını takiben kollojen üretiminin uyarıldığı, yıkılımının ise inhibe edildiği yine aynı çalışmada bildirilmiştir. Bleomisin toksisitesi, otokatalitik bir mekanizma ile hücrel membranların hasarına yol açan lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir ve membran yıkımı toksik, reaktif metabolitlerin üretimi ve hücre ölümüne yol açabilir.

Çelikezen ve Ertekinin (2009) yaptığı çalışmalarda bleomisin uygulanan ratlarda gözlenen histopatolojik bulgularda bleomisin verilen grupta alveoller arası septumlarda belirgin kalınlaşmalar ve fibrozis görülmüştür.

Serbest radikal düzeyinin hücrenin antioksidan kapasitesini aştığı durumlarda membran lipidlerinde peroksidasyon meydana gelmektedir (Ames ve ark.1995; Dimitrescu ve ark.1993).

Özkurt ve arkadaşları (2000), 35 akciğer kanserli ve 26 sağlıklı kontrol grubundan oluşan çalışmalarında akciğer kanserli hastalarda TOS düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır.

Lankin ve ark. (1976), Ehrlich's karsinomada ta SOD aktivitesinin oldukça anlamlı olarak düştüğünü göstermişlerdir.

Jaruga ve ark.(1994), insan akciğer kanseri dokusunda SOD ve katalaz aktivitesinde düşüş ve DNA lezyon düzeyinde artış tespit ederek olası kanser sebebinin serbest radikaller olduğunu yayınlamışlardır.

Çalışmamızda 25mg/kg EAT tümör hücrelerinin verildiği farelerde total antioksidan capacity kontrol grubunda günlere göre sırasıyla 4.56 , 4.05 , 3.89 , 3.50 iken bu değerler bleomisin ile tedavi edilen grupta 2.11 ,2.11 , 1.95 ,1.63'e düşmüş, resveratrolün verildiği gruplarda ise bu değerler 6.07 ,6.41 ,5.28 ,5.01'e yükselmiştir. Bunun durum ise bleomisin dokularda antioksidan seviyesini düşürdüğü resveratrolün ise bu düşüşü engellediği görülmektedir.

EAT tümörü injekte edilen farelerde total oksidan statüs değerleri ise kontrol grubunda 13.60 ,13.64 ,14.45 , 15.42 iken bu değerler bleomisin ile tedavi edilen grupta 21.04, 22.77 , 23.54 , ve 25.04 'e yükselmiştir. Bunun sebebi de bleomisinin dokularda oksidan değerlerini yükseltmesi olarak görülmüştür. Resveratrol ile tedavi edilen gruplarda ise tam tersi olarak TOS değerlerinde farklı oranlarda azalma görülmüş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.005$ ) olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, kullanılan bleomisinin diğer dokulara oranla en çok akciğer dokusunu olumsuz yönde etkilediği söylenebilir. Bununda muhtemel sebebinin, bleomisinin akciğer dokusu hasarı meydana getirirken serbest oksijen radikallerini oluşturması, buna karşı uyguladığımız antioksidan karakterli resveratrolün serbest radikalleri süpürücü etkisi ve EAT kanser hücrelerine etkisi ile hücre ve doku bütünlüğünü koruyarak stabilizasyon sağlaması olduğu söylenebilir.

## KAYNAKLAR

- AKYOL. H., 2004; Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi.
- ALICIS., İZMİRLİ.M., DOĞAN .E.,2006; Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'na Başvuran Kanser Hastalarının Epidemiyolojik Değerlendirilmesi, cilt 21, sayı 2, sayfa(lar) 087-097.
- ALTUN, S., ÖZALPAN, A., 2004; Interactive regeneration of Liver and Growth of Ehrlich Ascites Tumour in Mice. *Biologia, Bratislava*, 59(3):375-382.
- AMERICAN CANCER SOCIETY.1987; Nursing Management of the patient receiving chemotherapy.
- AMES. BN., GOLD. LS., WILLETT WC.1995; The Causes And Prevention Of Cancer *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 5258-5265.
- AYDIN, S., BOZKAYA, A. O., MAZICIOĞLU, M., GEMALMAZ, A., ÖZÇAKIR, A., ÖZTÜK, A., 2008. What Influences Herbal Medicine Use-Prevalence and Related Factors. *Turkish Journal of Medical Science*, 38(5):455-463.
- BARRY. B., LOWITZ , DENNIS. A., CASCIATO,2000; *Medical Oncology & Principles Of Cancer Biology*
- BAŞOĞLU.F., ÖNAL.A.E., 2009; Çevresel Etkenlerin Genler Üzerine Etkisi ve Genetik Analiz Yöntemler. İstanbul Üniversitesi. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul. Cilt 72, Sayı 3, Sayfa108-111
- BLARDI. P., DE LALLA. A., VOLPI. L., Dİ PERI.T., 1999; Stimulation of Endogenous Adenosine Release by Oral Administration of Quercetin and resveratrol in man. *Drugs Exp Clin Res*. 25:105-10.
- BOYLE.P., LEVIN. B., 2008; *World Cancer Report . World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.*
- CABAROĞLU, T., YILMAZTEKİN, M.,2006. Üzümün Bileşimi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Buldan Sempozyumu*.
- CANBAŞ, A. 2003; *Şarap Teknolojisi Ders Notları*. 192 s. Adana.

CAPORASO. N.,2003; The Molecular Epidemiology Of Oxidative Damage To DNA And Cancer. Natl Cancer Inst.95(17):1263-5.

CONLEY. NS., YARBRO. JW., FERRARI. HA., ZEIDDLER.R.B., 1986; Bleomycin increases superoxide anion generation by pig peripheral alveolar macrophages. Mol Pharmacol., 30:48-4.

ÇAYLAK. B., YÜCEL. U., ÇETİNKAYA.N., 2009; Farklı bölgelerin üzümlelerinden üretilen türk şaraplarında resveratrol düzeyleri,İzmir gıda. 34 (6): 381-386.

ÇELİKEZEN.F.Ç.,ERTEKİN.A.,2008;Ratlarda Akciğer Fibrozisinde Lipid Peroksidasyonu (MDA), Antioksidan Madde (Glutasyon, Seruloplazmin) ve Bazı Antioksidan Vitamin (B-Karoten, Retinol) Düzeylerinin İncelenmesi. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, (2) 17-20.

DE LORGERIL, M., SALEN, P., PAILLARD, F., LAPORTE, F., BOUCHER, F., DE LEIRIS, .2002; Mediterranean diet and the French paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease.54, (3), 503-515.

DİLSİZ, N. 2004. Moleküler biyoloji.Palme Yayıncılık,220, Ankara.

DIMITRESCU.C.,BELGUN.M.,OLINESCU.R.,1993;Effect of Vitamin C administration on the ratio between the pro- and antioxidative factors Rom J Endocrinol. 31: 81-84.

ERDEN. E.,KIRKIL. G.,DEVECİ.F., İLHAN. N., ÇOBANOĞLU.B.,TURGUT. T., MUZ. MH., 2008; Ratlarda bleomisin ile oluşturulan akciğer fibrozisinde erdosteinin inflamasyon ve fibrozis üzerine etkileri, Tüberküloz ve Toraks Derg, 56(2), 127-138.

FREMONT, L. 2000. Biological effects of resveratrol. Life Sci 66; 663-73.

FINE, A.M. 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. Altern Med Rev 5; 144-51.

GIBSON. F, EWANS. M., 1999; Pediatric Oncology Acute Nursing Care.

London, Whurr Publisher

- GREENWOOD. N. N. , EARNSHAW. A., 1997; Chemistry of the Elements, 2<sup>nd</sup> ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.
- GÜLTEKİN. M., ÖZGÜLÜN N., OLCAYTO.E., TUNCER. M., 2011; Kanser ve Kanser Risk Faktörleri Hakkında Türk Halkının Bilgi Düzeyinin Ölçülmesi ve Araştırılması Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, Cilt: 8 Sayı: 1 Sayfa: 57.
- GÜRAN Ş. Kanserden korunma , Gülhane tıp dergisi 2005; 47:324-326 derleme.
- GÜNDÜZ.E., GÜNDÜZ.M., BEDER. L., YAMANAKA. N. , SHIMIZU.K., NAGATSUKA.H., 2009; p53 Tümör Baskılayıcı Genin 72. Kodon Polimorfizminin Baş-boyun Kanserlerindeki Prognostik Rolü ,Yeni Tıp Dergisi 2009;26: 96-10
- GOLDINER.PL., CARLON. GC., CVITKOVIC. E., SCHWEİZER.O, HOWLAND.W.W.,1978; Factors Influencing Postoperative Morbidity and Mortality in Patients Treated With Bleomycin. Br Med J. 1:1664-3.
- İKİZLER. M., DERNEK.S., EREKSAP.N., KAYGISIZ.Z., SEVİN.B., KURAL.T., 2003; İzole Rat Kalplerine Uygulanan Reperfüzyon Hasarında Resveratrol'ün Hemodinamik Etkileri , Türk Göğüs Kalp Damar Cer. Derg., 11:91-95.
- JARUGA. P., ZASTAWNY.T.H., SKOKOWSKI. J.,1994; Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. FEBS Lett.341:59-64.
- KAYACAN .N., KARSLI. B., SANLI. S., YILMAZ. M, Akdeniz Üniversitesi , Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Antalya.
- KARABULUT. A. B.,2008; Resveratrol ve Etkileri ,Tıbbi Biyokimya AD,İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, MALATYA. Türkiye Klinikleri J Med Sci 28(Suppl):S166-S169.
- KESKİN. N., T NOYAN.T., KUNTER. B., 2009; Resveratrol ile Üzümden Gelen Sağlık , Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science. 229(5):1273-9
- KNUDSON. AG.,1993; Antioncogenes and human cancer. Proc Natl Acad Sci,

USA 1993;90: 10914-21.

KOSLOWSKI.R.,KNOCH.K., WENZEL.K.,1998; Proteinases and proteinase inhibitors during the development of pulmonary fibrosis in rat.Clinica Chimica Acta.271:45-46.

KÖKTÜRK. N., KIRIŞOĞLU.C.E., ÖZTÜRK.C.,2003; Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs 138.

LANKIN. U. Z., GUREVICH. S.M., 1976;Inhibition of peroxidation of lipids and detoxification of lipoperoxides by protective enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase) in experimental malignant growth.Dokl Akad Nauk SSSR.226:705-708.

LAZEBNIK, Y. A., MEDVEDEVA, . D. and ZENIN, V. V.,1991; Reversible G2 Block in the Cell Cycle of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. Experimental Cell Research, 195:247-254.

LEWIS. R. 2007; Occupational Exposures, Metals in Current Occupational & Environmental Medicine, Ed:Ladou J, 4<sup>th</sup> edition, McGrawHill, New York413-438.

MARTIN .A.R., 2004; "Resveratrol, Apolyphenol Found in Grapes, Suppresses Oxidative Damage and Stimulates Apoptosis During Early Colonic Inflammation In Rats", Biochem. Pharmacol. 67, 1399-1410.

NYGAARD. K., SMITH-ERICHSEN. N., HATLEYOLL.R., REFSUM. SB.,1978; Pulmonary complications After Bleomycin , Irradiation and Surgery for esophageal cancer. Cancer. 41:17-5

ÖNER EYÜBOĞLU.A., AYDIN.G., ÖZKARDEŞ.H., 2000; Bleomisine Bağlı Alveolit ve Akciğer Fibrozisi Gelişen Bir Olgunun Bronkoalveoler Lavaj Hücre Analizi, Solunum 2: 22-26.ANKARA.

ÖZALPAN.A., 2001; Temel Radyobioloji, İstanbul, Casciato.

ÖZKURT.S.,DEMİR.S.,KÖSEOĞLU.M.H.,ENLİ.Y.,ASLAN.D., SEVİNÇ.C.,2000; Akciğer kanserli hastalarda plazma malondialdehit düzeyi ve sülfidril içeriği. Solunum. 2: 96-99.

PAUL.L.,GOLDNER AND ADIBA SHAMSI.1993; Bleomycin-

- Oxygen interaction.Seminars In Anesthesia.2:79-8.
- PAZELIZUR.T.,KRUPSKY.M.,BLUMENSTEIN.S.,ELINGER.D.,SCHECHTMAN .E, LIVNEH Z. 2003; DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. Natl Cancer Inst. 95(17):1312-9.
- PLIN.C., 2005; "Resveratrol Protects Against Cold Ischemia-Warm Reoxygenation – Induced Damages to Mitochondria and Cells in Rat Liver", European J. Phismacol. 528, 162-168
- SAYIN.O., ARSLAN.N., GÜNER.G.,2008; Resveratrol ve Kardiyovasküler Sistem. Türk Biyokimya Dergisi. 33 (3) ; 117–121.
- SERT.H., GÖZDEMİR. M., DEMİRCİOĞLU.R.İ., USTA.B. 2007; Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, ANKARA Kemoterapi ve Anestezi Derleme Yeni Tıp Dergisi, Cilt: 24 Sayı: 2
- SLEIJEFER. S., 2001; Bleomycin-induced pneumonitis. Chest, 120, 617–24.
- SÖĞÜT.S., SONGUR.A.,YILAMZ.H.R., IRAZ.M., ÖZYURT.H., 2004; İntratrakeal Bleomisin Uygulanmış Sıçan Akciğer Dokusunda Metabolik Enzim Aktiviteleri Üzerine E Vitamini Ve Erdosteinin Etkisi. Tıp Araştırmaları Dergisi.2 (3):13-18.
- ŞENGELEN.M.,2002; Türkiyede Kanser İstatistikleri, Bilim Uzmanlığı Tezi,Hacettepe Üniversitesi,Sağlık Bilimleri, Ankara.
- TAKAOKA M. 1940. Phenolic substances of White Hellebore (*Veratum grandiflorum* Loes.Fil.). J Faculty Sci, Hokkaido Imp. Univ., Ser III 3: 1-16.
- T.C Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü Antineoplastik (Sitotoksik) İlaçlarla Güvenli Çalışma Rehberi. ANKARA–2004.
- TCHIA.M., HOLMES. M., MCLENAN. G., 1991; The Molecular Biology of Lung Cancer. Med J Australia. 154 :501-503.
- THACOVA. R., SALAGOVIC. J., CERIPKOVA. M., TKAC. I.,STUBNA. J., KALINA. I., 2004; Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism is related to COPD' in patients with non-small-cell lung cancer. Wien Klin Wochenschr. 116(4):131-4.

- TYAGI. A., AGARWAL. R., AGARWAL. C., 2003; Grape seed extract inhibits EGF-induced and constitutively active mitogenic signaling but activates JNK in human prostate carcinoma DU145 cells possible role in antiproliferation and apoptosis. *Oncogene* 22; 1302-16.
- UNGVARI. Z., OROSZ. Z., 2007; Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292:2417-2424.
- UMENZAWA, H.,1966; *J. Antibiot. Tokyo., Ser. A*, 19, 200.
- WEAVER. RF., HEDRICK. PW., 2000; *Genes and Cancer in Genetics*, 3<sup>nd</sup> Edition, WCB Publishers, Chicago; 482-503.
- VLIET, A., CROSS,C.,2000; Oxidants, Nitrosants, and the Lung. *Am J Med.* 109:398-421.
- YANGZHENG, F., LIU, Y.M., FRATKINS, J.D. , LE BLANC, M.H. 2005; Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research Bulletin*, 66; 120-127.
- YILMAZ,İ.,2010;Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif Stres,Malatya,Derleme;17 (2) 143-153.
- ZİTNIK.RJ.,1995; Drug-induced lung disease.Cancer chemotherapy agenrs.*J Respir. Dis.*16:855-865.

## **ÖZGEÇMİŞ**

14.06.1984'de Şanlıurfa'nın Siverek ilçesinde doğdu. İlköğrenim,orta ve lise öğrenimini Şanlıurfa'da tamamladı. 2003 yılında Çukurova Üniv. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2007 yılında buradan mezun oldu. 2007-2008 arası tezsiz yüksek lisansını tamamladı. 2009 yılının güz döneminde Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisansa başladı.

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı Resveratrolün Ehrlich asit tümör hücreleri üzerine uygulanan bleomisin'in yan etkilerinin üzerinde etkisini araştırmaktır. Kanser hücre proliferasyonunu , mitotik indeksi , biyokimyasal analiz total oksidan statüs (TOS) ve total antioksidan kapasitesi (TAC)'nin yanı sıra histopatolojik değişmelerden akciğer, böbrek ve karaciğerde inflamasyon skorlaması araştırılmıştır.

60 albino fare 5 eşit gruba ayrıldı. (n=12 ), Bu deney hayvanlarına  $2.5 \times 10^6$  hücre intraperitoneal olarak enjekte edildi. 24 saat sonra 1.gruba 0,3 ml normal salin, 2.gruba 1,5 ml/kg bleomisin , 3.gruba 25mg/kg resveratrol , 4.gruba 25mg/kg resv.+1,5mg/kg bleomisin , 5.gruba 50 mg/kg resv.+ 1,5 mg/kg bleomisin intraperitoneal olarak enjekte edildi. 48 ,96 ,144,216 saat sonra farenin karnı açılarak 50 ml normal tuzlu su ile iyice yıkandı ve her hayvanda iki adet kanser hücreleri hazırlandı. Hücre proliferasyonu için neubauer sayım kamerası ile hücre sayıldı. Biyokimya analizleri için karaciğerden inflamasyon, skorlama için de böbrek, akciğer ve karaciğerden alınan kesitlerden inflamasyon skorlaması yapıldı.

Sonuç olarak 25mg/kg resveratrol kanser hücrelerine etki ettiği görüldü,yalnız 50 mg/kg resveratrolün daha fazla etki ettiğini ayrıca her iki fazda antioksidant ekiye sahip oldukları kaydedildi.

## SUMMARY

The present study was aimed to investigate the effect of Resveratrol on Ehrlich ascites tumor cells and Bleomycin – induced pulmonary toxicity on lungs. The investigation conducted on the cancer cell proliferation, mitotic index, biochemical analysis including total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) and the histopathologic observation by scoring of inflammation in the lungs, kidney and liver.

60 albino mice were divided into 5 equal groups (n=12) were injected with  $2.5 \times 10^6$  Ehrlich ascites tumor cells. 24 hours after cell inoculation mice in group 1 received 0.3 ml normal saline. Group 2 received 1.5mg/kg bleomycin, group 3 received 25mg/kg resveratrol ,group 4 received 25mg/kg resveratrol+ Bleomycin, group 5 received 50mg/kg+ Bleomycin. After 48, 96, 144 and 216 hours one mouse from each group were sacrificed on 48 ,96 , 144 and 216 hours intervals. The abdominal cavity of the mice was washed with with normal saline water. Three slides from each mouse were prepared for determination of mitotic index and the total number of cell was counted using neubuer hemocytometer. The liver, lung and kidneys were dissected for biochemical analysis and histopathological investigation.

Treatment with 25 mg/kg resveratrol can decrease the mitotic index percentage ,on the other hand Bleomycin +Resveratrol can decrease the percentage of mitotic index dramatically.