

**HELA HÜCRE DİZİSİNDE VINİFERİN MADDESİNİN OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Tayyar Görkem SAYER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mayıs 2022

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2107S122. no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Tayyar Görkem SAYER'in "HELA HÜCRE DİZİSİNDE VİNİFERİN MADDESİNİN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ" başlıklı tezi .../.../2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim dalında Yüksek Lisans Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR
Üye	: Prof. Dr. Zerrin SELLER
Üye	: Prof. Dr. Hülyam KURT

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

HELA HÜCRE DİZİSİNDE VİNİFERİN MADDESİNİN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Tayyar Görkem SAYER

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2022

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Bilinen tarih boyunca canlı yaşamını tehdit eden ve ortak olarak en sık görülen problem kanser olmuştur. Rahim ağzı kanseri, dünya çapında meme kanseri (2,1 milyon vaka), kolorektal kanser (0,8 milyon) ve akciğer kanserinden (0,7 milyon) sonra kadınlarda en sık görülen dördüncü kanserdir. ϵ -Viniferin'in antioksidan aktivitesi, kanserin başlamasını ve ilerlemesini engelleyerek hem kimyasal kaynaklı oluşabilecek kanserin hem de oksidatif hasarın önüne geçmeyi amaçlamaktadır. Bu tez çalışmasında HeLa hücre dizisinde ϵ -Viniferin maddesinin oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Cisplatin (CDDP) ve ϵ -Viniferin'in HeLa hücre hattındaki sitotoksik etkilerinin tespit edilmesi amacıyla MTT yöntemi kullanılmış, bunun sonucunda CDDP için IC_{50} değeri 28 μ M, ϵ -Viniferin için IC_{50} değeri 21 μ M olarak hesaplanmıştır. IC_{50} değerleri ile hesaplanan kombine gruplarda Total Antioksidan Seviyeleri (TAS) ve Total Oksidan Seviyeleri (TOS) içerisinde, kombinasyon indeksine göre seçilmiş sinerjik gruplar içerisinde anlamlı fark TAS için %20 (5.6 μ M CDDP + 4.2 μ M VİN), TOS için %10 (2.8 μ M CDDP + 2.1 μ M VİN) gruplarında görülmüş, buna karşılık Oksidatif Stres İndeksleri (OSI), uygulanan bütün dozlarda 1'den büyük hesaplanmıştır. Sinerjik etkiye sahip olduğunu düşündüğümüz %20 ve %10'luk kombine gruplarının Süperoksit Dismutaz (SOD) değerleri kontrole göre (1,550 \pm 0,10 U/mL) düşük, Redükte Glutatyon (GSH) değerleri kontrole göre (1,378 \pm 0,09 μ M) düşük ve Malondialdehit (MDA) değerleri kontrole göre (0,461 \pm 0,000 μ M) yüksek çıkmıştır. Sonuç olarak, kombinasyon indeksine göre sinerjik kombine gruplarının, tek başına verilen CDDP'ye göre kıyaslaması yapıldığında minör seviyede oksidatif stres engelleyici özellik görülebildiği ancak kontrole göre yapılan istatistiklere göre ϵ -Viniferin'in CDDP'nin neden olduğu oksidatif stresi kısmen de olsa azaltmasına rağmen beklediğimiz seviyede hücre canlılığını azaltıcı etkiye sahip olmadığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan, Cisplatin, ϵ -Viniferin, HeLa, Oksidatif stres

ABSTRACT
INVESTIGATION OF THE EFFECT OF VINIFERIN ON OXIDATIVE STRESS IN
HELA CELL LINE

Tayyar Görkem SAYER

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, May 2022

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Throughout the known history, the most common problem that threatens the life of a living person and is common has been cancer. Cervical cancer is the fourth most common cancer in women worldwide after breast cancer (2.1 million cases), colorectal cancer (0.8 million) and lung cancer (0.7 million). The antioxidant activity of ϵ -Viniferin aims to prevent both chemical-induced cancer and oxidative damage by preventing the onset and progression of cancer. In this thesis, it is aimed to investigate the effects of ϵ -Viniferin on oxidative stress in HeLa cell series. In order to determine the cytotoxic effects of cisplatin (CDDP) and ϵ -Viniferin on the HeLa cell line, the MTT method was used, as a result of which the IC₅₀ value for CDDP was calculated as 28 μ M, and the IC₅₀ value for ϵ -Viniferin was calculated as 21 μ M. Significant difference in Total Antioxidant Levels (TAS) and Total Oxidant Levels (TOS) in the combined groups calculated with IC₅₀ values, among the synergistic groups selected according to the combination index 20% for TAS (5.6 μ M CDDP + 4.2 μ M VIN), 10% for TOS (2.8) μ M CDDP + 2.1 μ M VIN groups, whereas Oxidative Stress Indexes (OSI) were calculated greater than 1 at all doses applied. Superoxide Dismutase (SOD) values of the 20% and 10% combined groups, which we think have a synergistic effect, are lower than the control (1,550 \pm 0.10 U/mL), and Reduced Glutathione (GSH) values compared to the control (1.378 \pm 0.09 μ M) lower than the control and Malondialdehyde (MDA) values were higher than the control (0.461 \pm 0.000 μ M). As a result, according to the combination index, when the synergistic combination groups are compared with CDDP given alone, a minor level of oxidative stress inhibitory property can be observed, but according to the statistics made compared to the control, although ϵ -Viniferin partially reduces the oxidative stress caused by CDDP, we expect it. It has been observed that it has no effect on reducing cell viability at the level of as expected.

Keywords: Antioxidant, Cisplatin, ϵ -Viniferin, HeLa, Oxidative Stress

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca benden zamanını, bilgisini ve hayat tecrübesini esirgemeyen, yardımseverliği ile ihtiyaç duyduğum her an yanımda olmak için sonsuz çaba gösteren, “özgüvenimi bana geri kazandıran” danışmanım,
Çok değerli hocam Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR’e

Bilgisi, tecrübeleri ve öğretmenliği ile tez çalışmamıza katkılarda bulunmuş
Sevgili Prof. Dr. Zerrin SELLER’e

Bilgisi, çalışma azmi ve bitmek bilmeyen yardımseverliği ile tez boyunca bana sayısız kez destek olmuş çok değerli meslektaşım Gamze YILMAZ’a

Aynı laboratuvar ortamında çalışmaktan keyif aldığım, zorlu deney süreçlerimizi daha katlanılır hale getiren, birbirinden yardımsever ve güler yüzlü Dr. Yüksel ÖĞÜNÇ, Selin DEĞİRMENCİ, Stephen Damola ARIYOLE ve Burcu AKYILDIZ’a

Bana olan inancını, sabrını, güvenini ve sevgisini her daim hissettiğim, bütün bu süreçte benimle birlikte katlanan, devam etmeme en büyük desteği sağlayan, varlığı lütuf
Sevgili Hülya CAN’a

Her koşulda bana en içten desteği sağlayan sevgili geniş aileme, benim yapabildiğimden çok daha iyisini başaracağına inandığım erkek kardeşime ve sırt sırta verdiğimizde birlikte aşamayacağımız sorun olmayan can dostlarıma en samimi teşekkürlerimi sunarım. Sayenizde bugün buradayım.

Canım Anneme
Bağcığma
Kedilerime..

.../.../20....

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
ÖZET.....	iii
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser	1
1.1.1. Serviks kanseri	2
1.1.1.1. Serviks kanseri epidemiyolojisi.....	2
1.1.1.2. Serviks kanseri önleyici alternatif yöntem ve tedaviler	3
1.1.1.3. Serviks kanseri için teşhis yöntemleri	4
1.1.2. Kombinasyon tedavisi.....	4
1.2. HeLa Hücresi.....	5
1.3. Serbest Radikaller	5
1.4. Oksidatif Stres	6
1.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	8
1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	9
1.6.1. Süperoksit dismutaz enzimi (SOD)	10
1.6.2. Katalaz	11
1.6.3. Glutatyon peroksidaz (GSHPx)	11
1.6.4. Glutatyon redüktaz	12
1.6.5. Resveratrol.....	12
1.6.5.1. ε -Viniferin	12
1.6.6. Cisplatin (CDDP)	13
1.7. Kanser Tedavisinde CDDP Çalışma Mekanizması	14

2. MATERYALLER VE YÖNTEMLER	16
2.1. Kullanılan Hücre Hatları	16
2.2. Kullanılan Cihazlar	16
2.3. Kullanılan Kimyasalar	16
3. YÖNTEMLER	17
3.1. Hücre Kültürü Uygulamaları	17
3.1.1. Hela hücre hattında hücrelerinin çoğaltılması	17
3.1.2. Hela hücrelerinin pasajlanması	17
3.2. Etken Madde Dozlarının Hazırlanması	17
3.2.1. CDDP	17
3.2.2. ϵ-Viniferin	18
4. SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ:	18
4.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi:	18
4.1.1. Kombinasyon dozlarının ve belirlenmesi	19
4.1.2. Kombinasyon indeksinin belirlenmesi	19
4.2. TAS-TOS, SOD, GSH, MDA Analizleri İçin Hücrelerden Lizat Eldesi.	19
4.3. Hücrelerdeki Oksidatif Dengenin Belirlenmesi	20
4.3.1. Total Oksidan Durum (TOS) Yöntemi	20
4.3.2. Total Antioksidan Durum (TAS) yöntemi	20
4.3.2.1. Oksidatif stres indeksinin (OSI) belirlenmesi	21
4.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü	21
4.3.4. Redükte glutatyon (GSH) ölçümü	21
4.3.5. Malondialdehit (MDA) ölçümü	22
4.4. İstatistiksel Analiz	22
5. BULGULAR	23
5.1. MTT Analizi Bulguları	23
5.1.1. Kombinasyon indeksi bulguları	25

5.2. TAS ve TOS Sonuçları.....	26
5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Sonuçları.....	27
5.4. Redükte Glutasyon (GSH) Sonuçları	28
5.5. Malondialdehit (MDA) Sonuçları.....	30
6.TARTIŞMA.....	32
KAYNAKÇA.....	37

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Oksidan maddelere karşı antioksidan savunma sistemleri	9
Tablo 1.2. Endojen Antioksidanlar	10
Tablo 1.3. Endojen Antioksidanlar	10
Tablo 5.1. Hela hücre hattının CDDP ile 24 saat muamelesi sonucunda hücre canlılığına etkisi	23
Tablo 5.2. Hela hücre hattının ϵ -Viniferin ile 24 saat muamelesi sonucu hücre canlılığına etkisi	24
Tablo 5.3. CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının 24 saat sonunda Hela hücre hattındaki inhibisyonu	24
Tablo 5.4. CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının Hela hücre hattındaki kombinasyon indeksleri	25
Tablo 5.5. CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının Hela hücre hattındaki total oksidan ve antioksidan duruma etkileri	26
Tablo 5.6. Hela hücre hattındaki oksitatif stres indeksi	27
Tablo 5.7. Hela hücre hattındaki CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının 24 saatlik doza bağımlı numunelerinin SOD aktivasyon sonuçları	28
Tablo 5.8. Hela hücre hattındaki CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının 24 saatlik doza bağımlı numunelerinin GSH ativasyon sonuçları	29
Tablo 5.9. Hela hücre hattındaki CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının 24 saatlik doza bağımlı numunelerinin GSH aktivasyon sonuçları	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kanser hücresi	1
Şekil 1.2. Servikal kanserin yol haritası	2
Şekil 1.3. Servikal kanserin evreleri	3
Şekil 1.4. Oksidatif stresin hastalıktaki önemi	7
Şekil 1.5. Resvetrol - ϵ -Viniferin dönüşümü.....	13
Şekil 5.1. Hela hücre hattının CDDP ile 24 saat muamelesi sonucu oluşan canlılık grafiği.....	23
Şekil 5.2. Hela hücre hattının ϵ -Viniferin ile 24 saat muamelesi sonucu oluşan canlılık grafiği.....	24
Şekil 5.3. CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonların 24 saat sonunda Hela hücrelerindeki canlılık grafiği.....	25
Şekil 5.4. CDDP ve ϵ -Viniferin'in kombinasyon indeksleri	26
Şekil 5.5. SOD Standart grafiği	28
Şekil 5.6. GSH standart grafiği.....	29
Şekil 5.7. MDA standart grafiği	30

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
•O ₂ -	: Süperoksit Anyon Radikali
•OH	: Hidroksil Radikali
Askorbik asit	: C Vitamini
ATP	: Adenozin Trifosfat
MEM	: Minimal Essential Medium
CAT	: Katalaz
CDDP	: Cisplatin
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
CI	: Kombinasyon İndeksi
Cu/Zn SOD	: Bakır/Çinko Süperoksit Dismutaz
CYP	: Sitokrom P450
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	: Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntem
EPR	: Elektron Paramanyetik Rezonans
ETZ	: Elektron Taşıma Zinciri
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSHPx	: Glutasyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HeLa	: Rahim Ağzı Kanseri Hücresi
HPV	: Human Papilloma Virüsü
IC ₅₀	: %50 İnhibe Eden Konsantrasyon
MCF-7	: Meme Kanseri Hücresi
MCTS	: Yüksek Boyutlu Çok Hücreli Tümör Sferoidleri
Mn-SOD	: Mangan Süperoksit Dismutaz
NaCl	: Sodyum Klorür

NADPH	: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Durumu
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TOS	: Total Oksidan Durum
UV	: Ultraviyole
VLP	: Virüs Benzeri Partiküller

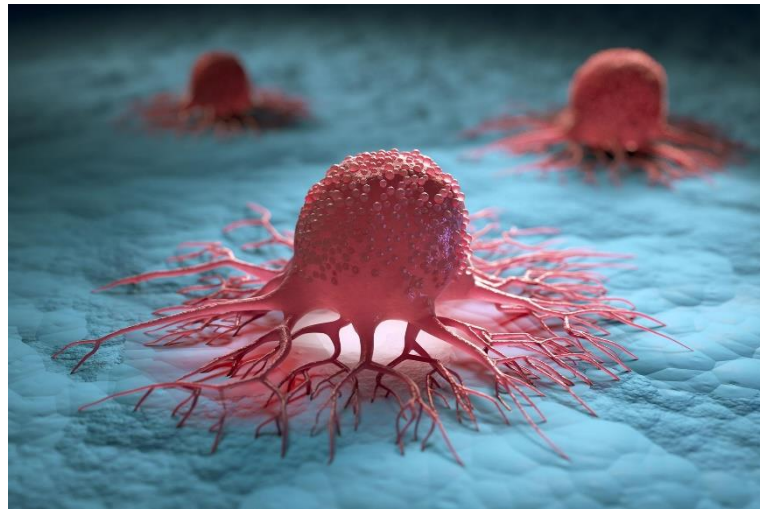
1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Bilinen tarih boyunca canlı yaşamını tehdit eden ve ortak olarak en sık görülen problem kanser olmuştur. Kelime olarak ilk defa, Hipokrat tarafından Latince yengeç anlamına gelen “cancer” kelimesinden türetilmiştir, çünkü bir tümörün etrafındaki şişmiş damarlar, yengecin bacaklarına benzetilmiştir (Şekil 1.1). En kısa anlatımıyla kanser, tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaktaki organlara da yayılarak etkisini gösterebilen hücrelerin kontrol dışı bir şekilde bölünerek çoğalması ve istemsiz bir şekilde birikmesidir. Bugüne kadar denenmiş ve hala devam eden kanser tedavi ve yöntemlerinin ortak bir paydaya indirgenememesinin sebebi, her insanın farklı bir DNA'ya sahip olmasıdır (Baykara, 2016).

Kanser gelişmesinde rol oynayan birden fazla faktörün olduğu bilinmektedir. Bu etkenlere örnek verecek olursak, bakteri, virüs, maruz kalınan çeşitli kimyasallar, radyasyon ve kalıtsal sebepleri sıralayabiliriz. Kansere neden olan bakteri ve virüsler arasında genellikle midede bulunan bir bakteri türü olan *Helicobacter pylori*, T hücreli lösemi virüsü ve servikal kanserinde ana faktör olan Human Papilloma Virüsü (HPV) bulunur (Ökçesiz, 2018).

Kanser, günümüzde insanların yaşam koşullarını olağanüstü derecede etkileyen ve süreç sonunda kişinin ölümüne yol açabilen, ciddi rahatsızlıklardan biri olarak günümüzde de önemini korumaktadır. Kanser tedavisinde birden fazla yöntem kullanılmakla birlikte kesin bir sonuç elde edilememiştir (Tandoğan, 2018).

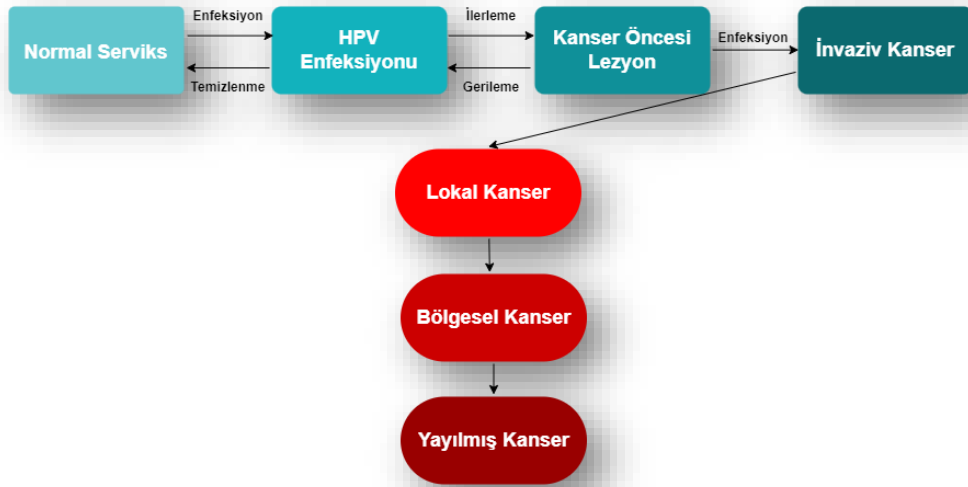


Şekil 1.1. Kanser Hücresi (<http-1>)

1.1.1. Serviks kanseri

1.1.1.1. Serviks kanseri epidemiyolojisi

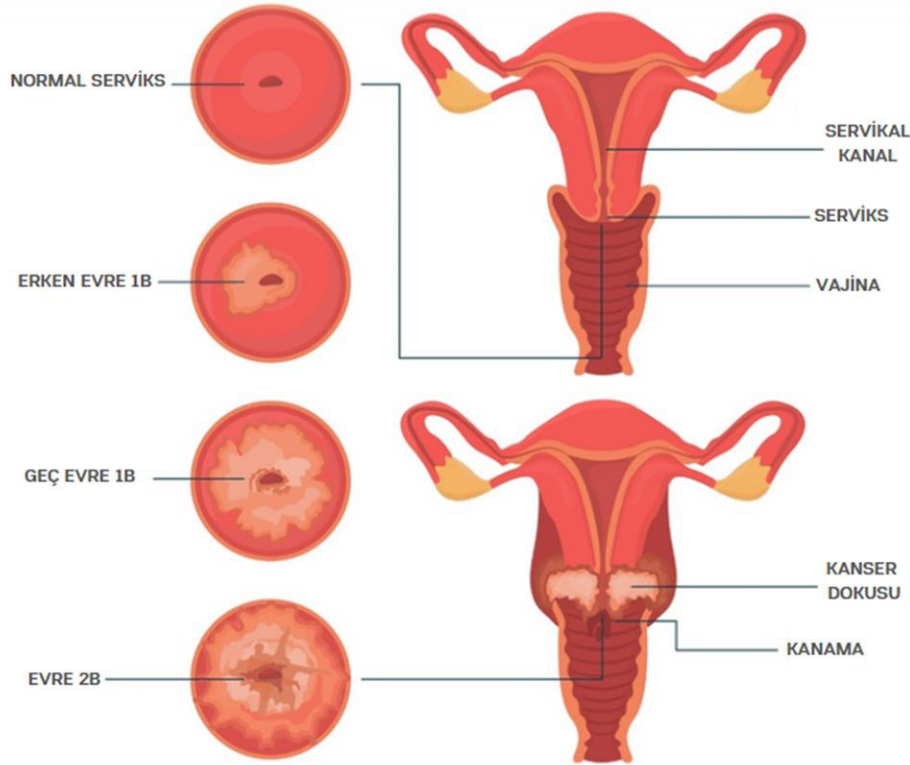
Rahim kanserlerinin büyük çoğunluğu, HPV enfeksiyonu ile gelişmektedir (Şekil 1.2) ve dünya çapında meme kanseri (2,1 milyon vaka), kolorektal kanser (0,8 milyon) ve akciğer kanserinden (0,7 milyon) sonra kadınlarda en sık görülen dördüncü kanserdir. 2018 yılında yaklaşık 570.000 rahim ağzı kanseri vakası ve 311.000 ölüm meydana gelmiştir. Serviks kanseri tanısında ortalama yaş 53, ölüm yaşı ise 59 olarak belirtilmiştir. Dünya çapında tahmini yaşa endekli serviks kanseri insidansında ülkeler arasında büyük farklılıklar gözlenmekle birlikte, 100.000 kadında 13,1 olarak kaydedilmiştir. Gelişmiş ülkelerde kanser insidansı, öncelikli olarak sigarayı bırakma (veya hiç kullanmama), teşhis ve tedavi modellerindeki iyileştirmeler ve yaşam tarzı değişikliklerinin sonucunda azalırken, gelişmekte olan düşük gelirli ülkelerde mortalite ve genel kanser insidansı artmıştır (Buskwofie vd., 2020). Rahim ağzı kanserinin 20-39 yaş arası kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olduğu ve bu yaş grubundaki her 10 kadının, erken doğum sonucu ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (zur Hausen, 2002).



Şekil 1.2. Servikal kanserin yol haritası (Ebadi, 2022)

1.1.1.2. Serviks kanseri önleyici alternatif yöntem ve tedaviler

HPV'nin, rahim kanserinin yanı sıra oral, anal ve vajinal bölgede de çeşitli kanserlere yol açabildiği bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) yakın zamanda yayınladığı verilere göre, 2020 yılında aşılması gereken yaş grubunun sadece %13'ü iki doz HPV aşısını yaptırmıştır (http-2). Kanser aşuları bağışıklık sistemini zayıflatılmış molekülleri kullanarak uyaran ve hastalıkları engellemeyi amaçlayan geleneksel aşular ile benzerlik gösterir. Bu iki aşı türü arasındaki temel fark, kanser hücrelerinin hedeflenmesidir ki bu hedeflemeyi B veya T hücrelerini uyararak yapar. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ-WHO) göre Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), rahim kanserine neden olan HPV'ye karşı geliştirilmiş sadece 3 aşuya (Gardasil, Gardasil 9 ve Cervarix) onay vermiştir. Ancak bu aşuların faydası ve verimliliği hakkında olumlu birçok görüş olduğu kadar karşıt görüş de bulunmakta ve pazarlama sonucu aşuların etkisinin abartıldığı savunulmaktadır (Baykara, 2016; Tsikouras vd., 2016). Virüs benzeri partiküllerin (VLP) üretilmesinde kullanılan HPV antijenlerinin zayıflatılması ile aşular üretilmektedir. Hatırlanması gereken en önemli veri, bu aşuların kanseri tedavi etmediği, HPV'ye maruz kalmadan önce koruma amaçlı yapılması gerekliliği belirtilmiştir. (Baykara, 2016).



Şekil 1.3 Servikal kanser evreleri (http-3)

1.1.1.3. Serviks kanseri için teşhis yöntemleri

Günümüzde rahim ağzı kanseri taraması için iki farklı tanı testi kullanılmaktadır: Papanikolaou testi ve HPV testi. Birinci test etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için kanser öncesi ve kanserli hücre lezyonlarını erken teşhise dayalıdır. İkinci test ise, kansere yol açabilecek HPV tiplerinin neden olduğu enfeksiyonları teşhis etmeye çalışmaktadır (Tsikouras vd., 2016). Her ne kadar tedaviler günümüzde geliştirilmeye ve iyileştirilmeye devam etse de, çoğu kanser hastasının yaşam kalitesi, geleneksel agresif tedavilerle ilişkili sayısız yan etki (hematolojik, gastrointestinal, hepatik ve/veya renal) nedeniyle kemoterapi ve/veya radyasyon tedavisinden sonra ciddi şekilde tehlike oluşturmaktadır. Yaşam kalitesini sınırlayan bu yan etkileri en aza indirmek için, tek başına kullanılan her ilacın toksik yan etkilerini azaltırken, etkinliklerini arttırmak amacıyla iki veya daha fazla ilacın birleştirilmesini içeren onaylanmış klinik protokol geliştirilmektedir (Robledo-Cadena vd., 2020).

Aktif olarak çoğalan hücreleri hedefleyen ve seçici olmayan geleneksel konvansiyonel monoterapötik tekniklerin hem sağlıklı hem de kanserli hücrelerin yok edilmesiyle sonuçlandığı iyi bilinmektedir. Kemoterapi, birçok yan etki ve risk ile hasta için olumsuz yaşam koşulları oluşturabilir ve daha da önemlisi, kemik iliği hücrelerine saldırarak konakçı hastalık/hastalıklara karşı yatkınlığı artırarak bağışıklık sistemini ciddi şekilde tehlikeye atabilir (Lebaron, 1988; Partridge vd., Burstein, Winer, 2001). Kombinasyon tedavisinde kullanılan ajanlardan biri kemoterapötik ve dolayısıyla toksik olsa da farklı yollar ve kombinasyonlar denenerek, toksisite azaltılmaya çalışılmaktadır. Ayrıca kombinasyon tedavisi normal hücreler üzerindeki toksik etkileri önleyebileceği gibi kanser hücreleri üzerinde de aynı anda sitotoksik etkiler üretebilir (Blagosklonny, 2005).

1.1.2. Kombinasyon tedavisi

Kanser hastalarında kombinasyon ilaç tedavisi ilk olarak 1965 yılında, Frei ve diğerleri tarafından akut lösemi için ilk kombinasyon kemoterapisi ile denenmiştir. Kanser hücrelerinin heterojenliği nedeniyle bu tedavi yöntemi tüm kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için standart tedavi ile dönüşümlü olarak uygulanmaktadır. Sonuç olarak, kısıtlayıcı kombinasyonlar, etkinliği arttırabilmek adına tedavi direncini sınırlandırırken toksisiteyi azaltmaktadır (Mokhtari vd., 2017).

1.2. HeLa Hücresi

Bu tez kapsamında, diğer kanser hücrelerine göre çeşitli avantajları olduğu için model olarak HeLa hücre dizisi seçilmiştir. HeLa hücreleri, üreme çağındaki kadınlarda görülme sıklığı daha yüksek olan kanser türlerinden birini temsil etmekte ve diğer kanser hücre hatlarına kıyasla yüksek bir metastatik derece göstermektedir. HeLa hücreleri, diğer yüksek derecede metastatik (meme MDA-MB-231, meme MDA-MB-468) karsinomlara kıyasla klinik kemoterapide kullanılan farklı ilaçlara karşı direnç gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca antikanser ilaçları ve bunların kombinasyonlarını test etmek için geçerli, güvenilir ve tekrarlanabilir veriler elde etmek için çok önemli olan, tek tip, yüksek boyutlu çok hücreli tümör sferoidleri (MCTS'ler) üretme özelliğini de gösterirler. Bu özellikler, HeLa hücrelerini çoklu ilaç direnci ve ilaç sinerjisi mekanizmalarını incelemek için uygun bir model haline getirir (Robledo-Cadena vd., 2020).

1.3. Serbest Radikaller

Oksijen molekülünün neden toksik olduğu ile ilgili soruların cevapları, 1954'te Gershan'in yayınladığı serbest radikal oksijen toksisitesi teorisine kadar (oksijen toksisitesinin oksijenin kısmen indirgenmiş formlarından kaynaklandığı) belirsizdi (Valko vd., 2006). Yine 1954 yılında, Townsend, Commoner ve Pake, serbest radikallerin varlığının habercisi olduğu bilinen zayıf bir Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) sinyalinin, birçok liyofilize biyolojik materyallerde gözlemlendiği rapor kaydedilmiştir (Commoner vd., Townsend, Pake, 1954).

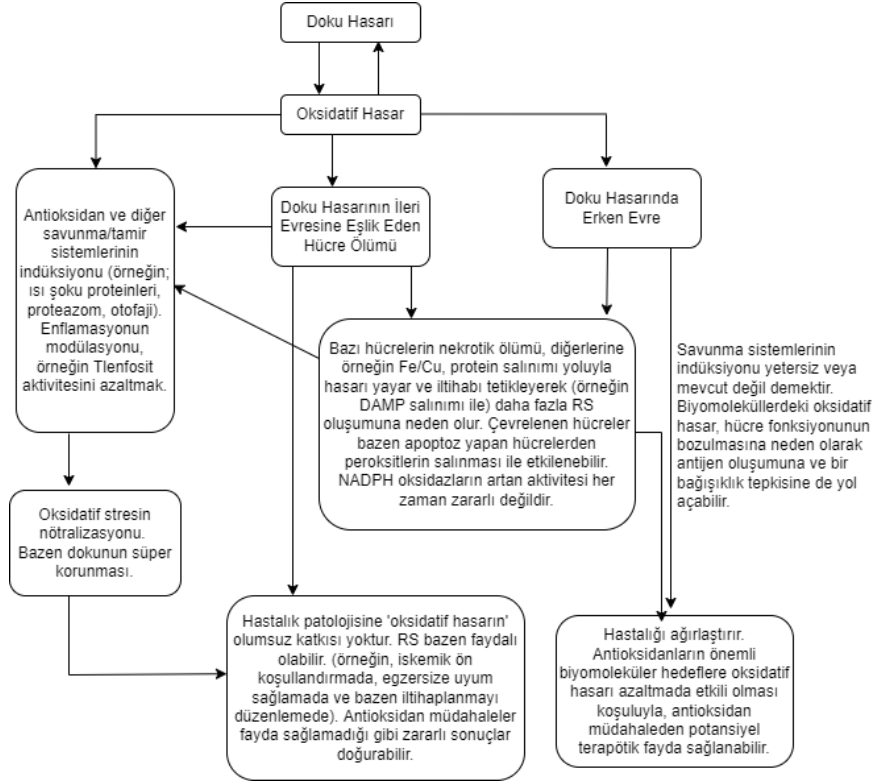
Biyolojik sistemlerdeki serbest radikal araştırmalarının ikinci dönemi, 1969'da McCord ve Fridovich'in Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimini keşfetmeleri ile başlamıştır (McCord ve Fridovich, 1969). Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin üçüncü dönemi ise, 1977 yılında Mittal ve Murad'ın hidroksil radikalının ($\bullet\text{OH}$) guanilat siklaz aktivasyonunu ve "ikinci haberci" siklik guanozin monofosfatın (cGMP) oluşumunu uyardığına dair kanıt bulması ile başlamıştır. (Mittal ve Murad, 1977)

Serbest oksijen radikalleri veya bilinen genel ismiyle reaktif oksijen türleri (ROT) ve buna ek olarak reaktif nitrojen türleri (RNS), normal hücre metabolizmasının ürünleri olarak kabul görmektedir. ROT ve RNS, canlı sistemler için hem zararlı hem de faydalı türler olarak ikili bir rol oynadıkları bilinmektedir (Valko vd., 2004).

1.4. Oksidatif Stres

Kanser hücreleri, kısmen onkojenik stimülasyon, artan metabolik aktivite ve mitokondriyal arıza nedeniyle normal hücrelerden daha fazla ROT sergilerler. Oksidatif stres ise Cisplatin (CDDP) toksisitesinde rol oynayan en önemli mekanizmalardan biridir. Oksidatif stres terimi, reaktif türlerin üretimi ile antioksidan savunma arasında meydana gelen ciddi dengesizlik durumunu ifade eder. Sies bunu, 'pro-oksidan-antioksidan dengesinde birincinin lehine olan, potansiyel hasara yol açan bir bozulma' olarak tanımlamıştır (Sies, 1997). CDDP kaynaklı oksidatif stres için birincil hedef mitokondridir ve mitokondriyal protein sülfidril grubunun kaybı, kalsiyum alımının inhibisyonu ve mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ile sonuçlanır (Dasari ve Bernard, 2014).

Potansiyel biyolojik hasara neden olan serbest radikallerin zararlı etkisi nitrozatif stres veya oksidatif stres olarak da adlandırılır (Kovacic ve Jacintho, 2001; Valko vd., 2001). Oksidatif stres genel olarak oksijen kullanan metabolik reaksiyonlardan kaynaklanır. Aşırı ROT; proteinlerin, hücresel lipidlerin veya DNA'nın normal işlevlerini inhibe ederek zarar verebilir. Bu nedenle oksidatif stres, yaşlanma sürecinin yanı sıra bir dizi insan hastalığında da rol oynamaktadır. Serbest radikallerin zararlı ve faydalı etkileri arasındaki denge, canlı organizmalar için son derece önem arz eder ve "redoks düzenlemesi" adı verilen mekanizmalarla sağlanır. "Redoks düzenleme" süreci, canlı organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korur ve redoks durumunu *in vivo* kontrol ederek "redoks homeostazını" sürdürür (Dröge, 2002).



Şekil 1.4. Oksidatif stresin hastalıktaki önemi? (Halliwell ve John, 2015)

Oksidatif stres, normal hücrelere kıyasla çeşitli kanser hücrelerinde hücrel redoks dengesizliğini indükler. Bu indüklenme, oksidatif hasar olaylarından kaynaklanan genetik materyalin kalıcı modifikasyonu, mutajenez, kanserojeniz ve yaşlanma gibi sonuçların ilk adımı temsil eder. DNA mutasyonu karsinogenezde kritik bir adımdır ve çeşitli tümörlerde yüksek seviyelerde oksidatif DNA lezyonları kaydedilmiştir ki; bu da kanserin etiolojisinde bu tür bir hasarı vurgular. Bugüne kadar tanımlanan 100'den fazla oksitlenmiş DNA ürünü bulunmaktadır. ROT kaynaklı DNA hasarı, tek veya çift sarmallı DNA kırılmalarını, DNA çapraz bağlarını, pürin, pirimidin veya deoksiriboz modifikasyonlarını içerir. DNA hasarı, tümü karsinogenez ile ilişkili olan transkripsiyonun durdurulması veya uyarılması, replikasyon hataları, sinyal iletim yollarının uyarılması ve genomik kararsızlık ile sonuçlanabilir. Oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşikler, ikincil antioksidanlar olarak nitelendirilir (Ou vd., 2002).

1.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Atomik veya moleküler orbitallerde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküllere serbest radikaller denir (Halliwell ve John, 2005). Eşleşmemiş elektron veya elektronlar genellikle serbest radikale önemli derecede reaktivite sağlar. Canlı sistemlerde üretilen radikal türlerin en önemli sınıfını oksijenden türetilmiş olan radikaller temsil eder (Miller vd., 1990). Moleküler oksijenin kendisi bir radikaldir (dioksijen) ve benzersiz bir elektronik konfigürasyona sahiptir. Moleküler oksijenin tek elektronla indirgenmesi süperoksit radikalini oluşturur ($O_2^{\bullet-}$). Metabolik süreçler veya fiziksel ışınlama ile oksijenin aktivasyonunu takiben ortaya çıkan süperoksit anyonu, birincil ROT olarak kabul edilir ve metal katalizli işlemler ya da enzim yoluyla, doğrudan veya yaygın olarak ikincil ROT üretmek için diğer moleküllerle de etkileşime girebildiği bilinmektedir (Valko vd., 2006). Süperoksit üretimi çoğunlukla bir hücrenin mitokondrisinde meydana gelmektedir (Cadenas ve Sies, 1998). Mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETZ), memeli hücrelerindeki ATP'nin ana kaynağıdır ve bu nedenle yaşam için gereklidir. Mitokondriyal ETZ bazı hastalık ve kalıtsal bozukluklarda rol oynayan başlıca ROT kaynağı olarak da kabul edilmektedir. Bu hastalıklar arasında obezite, diyabet eğilimi, yüksek tansiyon, kalp krizi ve felç bulunur (Kovacic vd., 2005).

ROT üretimi hem fizyolojik uyarılara hem de hücre işleyişinin bozulmasına ve ölüme yol açan ajanlara karşı hücre reaksiyonlarında rol oynar. Doksorubisin, paklitaksel, kamptotesin, vinblastin, inostamisin, tamoksifen gibi birçok sitotoksik anti-kanser ilaçlarının etkilerini ROT üretimi yoluyla gösterdiği düşünülmektedir (Lee vd., 2000; Mokhtari vd., 2017).

ROT'un kemoterapötik ajanların sitotoksik etkilerine katılımı hakkında çok sayıda rapor yayınlanmış olmasına rağmen (Marullo vd., 2013; Renschler, 2004), hücresel yanıtlarının moleküler mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmamıştır. Ayrıca, ROT'un hücre ölümü indükleyicileri olarak hareket edebileceği (Trachootham vd. 2009) veya apoptozu önleyebileceği (Del Bello vd., 1999) ve kemoterapötik direnç ürettiği (Kuo, 2009) konusunda tartışmalı veriler vardır.

1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Vücuttaki ROT oluşumunu engellemek ve meydana getirdiği hasarları önlemek/detoksifikasyonu sağlamak üzere görev yapan savunma sistemlerine genel olarak antioksidan savunma sistemleri adı verilir (Karabulut ve Gülay, 2016). Antioksidanlar, memeli sisteminde oto-oksidasyon süreçleri veya enzimatik reaksiyonlar tarafından üretilen serbest radikallere veya reaktif oksijen/azot türlerine (ROT/RNS) karşı ilk savunma hattıdır (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Valko vd., 2006). Serbest radikal kaynaklı oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları şu şekilde listelenebilir:

- a. Önleyici mekanizmalar
- b. Onarım mekanizmaları
- c. Fiziksel savunmalar
- d. Antioksidan savunmalar

Antioksidan savunma sistemlerinin genel amacı ROT'u ortadan kaldırmak ve ROT oluşumunu en aza indirmektedir, ancak %100 etkili değildir. Bu nedenle, oksidatif olarak hasar görmüş moleküller için çeşitli onarım sistemleri mevcuttur ki; bunların içinde DNA'da meydana gelebilecek mutasyonları önleyebilenin son derece önemli olduğu düşünülen birçok onarım sistemi vardır (Curtin, 2012). Enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları arasında katalaz (CAT), SOD ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) bulunur. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında glutatyon (GSH), askorbik asit (C Vitamini), E vitamini, flavonoidler, karotenoidler ve diğer antioksidanlar bulunur. ROT için bilinen en genel kanserojen kaynağı olan tütün dumanı, oksidatif DNA hasar oranını, %20-50 oranında artırmaktadır (Loft ve Poulsen, 1996).

Tablo 1.1. Oksidan maddelere karşı antioksidan savunma sistemleri (Karabulut ve Gülay, 2016)

Oksidan	Antioksidan savunma
Sigara dumanı	Süperoksit dismutaz
Egzersiz	Katalaz
Çevre kirleticiler	Glutatyon peroksidaz
Ateşli hastalıklar	Glutatyon
Radyasyon	Ubikinon
İskemi	Ürik asit
Karsinojenler	E vitamini, C vitamini ve β - karoten

Tablo 1.2. Endojen Antioksidanlar (Karabulut ve Gülay, 2016)

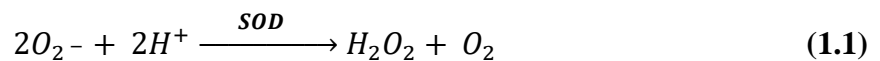
ENDOJEN ANTIOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	α -Lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin

Tablo 1.3. Endojen Antioksidanlar (Karabulut ve Gülay, 2016)

EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	
VİTAMİN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR
α -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
β -karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar)
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant SOD
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferoksamin)
	Nötrofil adezyon inhibitörleri
	Sitokinler (TNF ve IL-1)
	Barbitüratlar
	Demir şelatörleri

1.6.1. Süperoksit dismutaz enzimi (SOD)

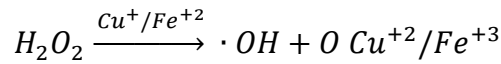
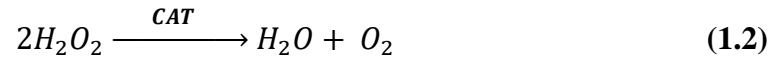
ROT'a karşı ilk savunma hattını oluşturan bu enzim, süperoksit anyonunun ($\cdot O_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2005). H_2O_2 daha sonra, CAT ya da GPx ile ortamdan uzaklaştırılır.



İnsanlarda SOD'un üç formu bulunur. Bunlardan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren SOD (Cu/Zn SOD) sitozolde, manganez (Mn) içeren SOD (Mn SOD) mitokondride ve ekstrasellüler SOD (EC SOD) hücre dışı sıvılarda bulunur (Karabulut ve Gülay, 2016). Cu (II), SOD'nin katalitik aktivitesinden sorumludur ve katalitik döngü sırasında bakır (II)oksit ve bakır (I) oksit arasında gidip gelirken, Zn (II) enzim konformasyonunu stabilize eder (Djordjević, 2004).

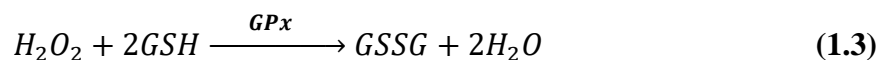
1.6.2. Katalaz

Bir metalloenzim olarak bilinen katalaz enzimi redoks reaksiyonunu destekleyen en etkili protein katalizörlerinden birisidir. SOD enziminin aktivitesi ile meydana gelen toksik H₂O₂, katalaz enziminin etkisiyle su ve oksijene dönüştürülür (Koca ve Karadeniz, 2005). Katalazlar, eritrositlerde ve katalazların en yüksek enzim aktivitesini gösterdiği hemen hemen tüm memeli dokuları dahil olmak üzere aerobik solunum yapan tüm organizmalarda bulunurlar (Djordjević 2004; Koca ve Karadeniz, 2005). H₂O₂ bir radikal olmamasına ve biyolojik öneme sahip birçok molekülle reaksiyona girmemesine rağmen, Cu ve Fe iyonları tarafından katalize edilen Fenton reaksiyonu ile en reaktif oksijen türü olan •OH oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016).



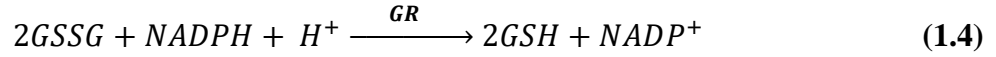
1.6.3. Glutatyon peroksidaz (GSHPx)

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlarla etki gösteren ve serbest radikalleri temizleyen hücresel antioksidanlardır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutatyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmakta, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir (Larson, 1988; Di Mascio vd., 1991). Aktiviteleri için Selenyum gerektirdiği bilinen tek insan enzimi peroksidazlardır (Djordjević, 2004).



1.6.4. Glutasyon redüktaz

Glutasyon redüktaz (GR), NADPH'nin bir elektronunu okside glutasyonun (GSSG) disülfid bağlarına aktararak redükte glutatyon (GSH) dönüştürür. Bu nedenle GR'nin yanında NADPH, serbest radikal hasarını engellemek için gereklidir ve en önemli kaynağı heksoz monofosfat (pentoz fosfat) yoludur (Karabulut ve Gülay, 2016).

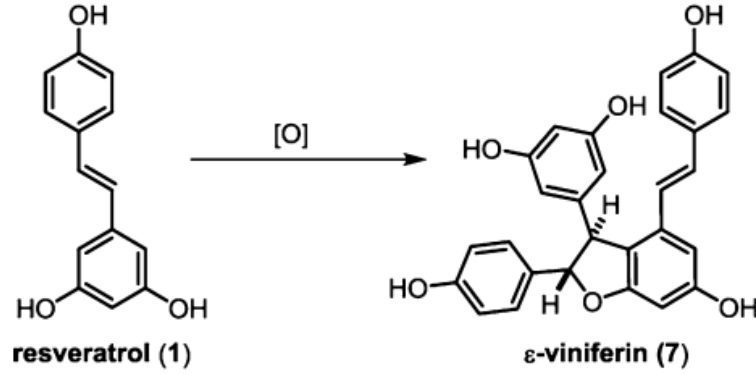


1.6.5. Resveratrol

Resveratrol'ün ilk kez elde edilişi, O. Lose tarafından beyaz karaca otunun (*Veratrum grandiflorum*) köklerinin izole edilmesine dayanmaktadır. Kimyasal yapısının analizi sonucunda, Resveratrol'ün bir polifenol bifenil bileşiği olduğu yaygın olarak kabul görülmektedir. (Takaoka, 1940).

1.6.5.1. ϵ -Viniferin

ϵ -Viniferin maddesi, *Vitis vinifera*'dan (Vitaceae) izole edilmiştir (Sotheeswaran ve Pasupathy, 1993). ϵ -Viniferin üzerine bugüne kadar yapılmış birçok çalışma, ϵ -Viniferin'in antikanser ve antioksidan aktivitelerine odaklanmıştır. ϵ -Viniferin'in antioksidan aktivitesi, kanserin başlamasını ve gelişmesini engelleyerek hem kimyasal etkenler nedeniyle oluşabilecek kanserin hem de oksidatif hasarın önüne geçmeyi amaçlamaktadır. ϵ -Viniferin'in, $\bullet O_2^-$ radikallerine karşı Resveratrol'den daha iyi antioksidan özellikler gösterdiği ve ROT üretimini engelleyebildiği bildirilmiştir (Kim vd., 2002); Privat vd., 2002). Sitokrom P450 (CYP), kimyasal kanserojenler de dahil olmak üzere ksenobiyotikleri metabolize eden önemli bir oksidatif enzimdir. Kanseri önlemenin bir başka yolu, bu faz I enzimlerinin inhibitörleri ile kanserojenlerin aktivasyonunu engellemektir. Bu enzimlerin modülasyonunun karsinogenez ve toksisite üzerinde büyük etkisi vardır. ϵ -Viniferin, faz II enzimlerini de düzenleyerek, kanserojen detoksifikasyonunu indükleyebilir (Piver vd., 2003).



Şekil 1.5. Resveratrol- ε-Viniferin dönüşümü (Keylor vd., Matsuura, Stephenson, 2015)

Xue ve diğerleri tarafından yapılan bir başka çalışmada, ε-Viniferin'in çeşitli kanser hücrelerine doğrudan sitotoksikite gösterdiği de bildirilmiştir. ε-Viniferinin sırasıyla 20.4 ve 44.8 µg/mL IC₅₀ değerleri ile doza bağlı bir şekilde HeLa ve MCF-7 kanser hücre dizilerini öldürebildiği bildirilmiştir (Xue vd., 2014). Son olarak, ε-Viniferin ve resveratrol'ün asetillenmiş formlarının, normal formlarından (asetillenmemiş) daha güçlü antikanser etkilere sahip olduğu ve bu bilgiler ışığında, resveratrol türevi veya resveratrol oligomer analoglarından yeni kanser önleyici ajanlar elde edilebileceği kaydedilmiştir (Şekil 1.5). Bir başka çalışmada, daha önce ε-Viniferin gibi resveratrol oligomerlerinin tümör hücre hattının çoğalmasını bloke ettiği ve hem trans-resveratrol hem de ε-viniferin içeren bir vineatrol preparatının, malign hücre hatları üzerinde ayrı ayrı test edilen her bir bileşikten daha büyük bir anti-proliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. ε-Viniferin'in lösemi β-hücrelerinde apoptozu indüklediği sıçan hepatositleri üzerinde karaciğeri koruyucu etkisinin olduğu, insan CYP enzimlerini inhibe ettiği ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir (Öğünç, 2018).

1.6.6. Cisplatin (CDDP)

CDDP ilk olarak 1844 yılında M. Peyrone tarafından sentezlenmiş ve kimyasal yapısı ilk olarak 1893 yılında Alfred Werner tarafından aydınlatılmıştır, ancak bileşik Rosenberg ve diğerleri tarafından platin ağ elektrotlarının belirli elektroliz ürünlerinin *E.coli*'de hücre bölünmesini engelleyebildiğine dikkat çekmiş ve bu ürünlerin kanser kemoterapisinde olası kullanımına büyük ilgi yaratmıştır. Bu aktiviteden sorumlu ajan

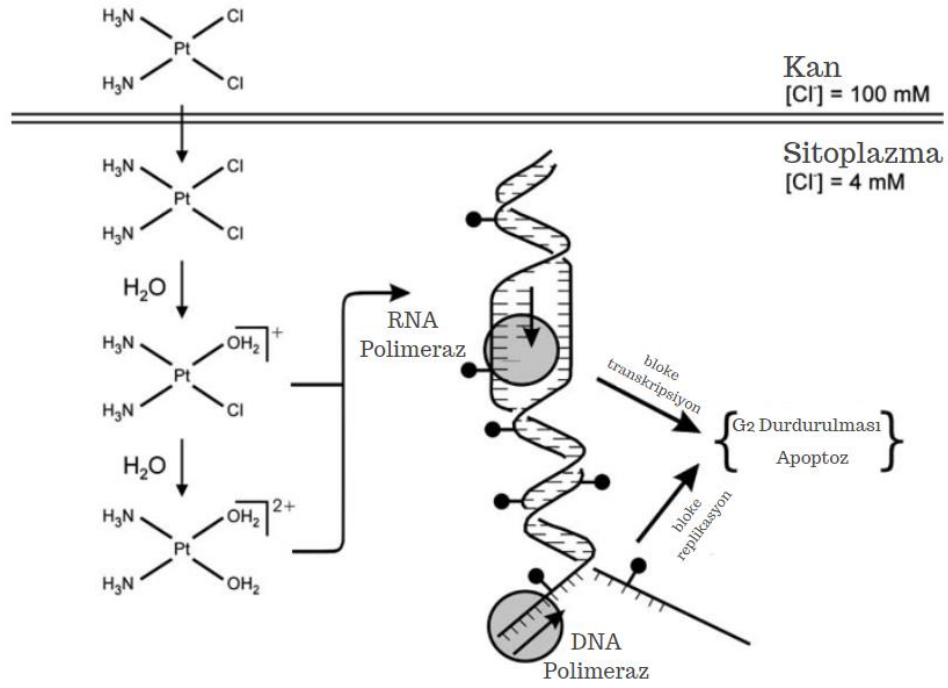
olarak *cis*-diklorodiaminplatin (II) tanımlanmasından bu yana, kanser tedavisinde platin, paladyum ve diğer asil metallerin koordinasyon komplekslerinin kullanımının yaygınlaştığı bilinmektedir (Baykara, 2016). Çeşitli kaynaklara göre CDDP, 1978'de kanser tedavisi için FDA onaylı ilk platin bileşiğidir. Bu, potansiyel antikanser ilaçları olarak platin (II) ve diğer metal içeren bileşiklere ilginin artmasına, bunun etkisiyle de ilaç direnci ve önemli yan etkileri nedeniyle CDDP diğer kanser ilaçları ile kombinasyon tedavisi gibi birçok kanser türüne yönelik yenilikçi terapötik stratejiler geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Kombinasyon için seçilen analogların bazıları klinik deneylerde değerlendirilmiş ancak yalnızca bir tanesi (karboplatin) Cisplatin'e göre kesin avantaj sağlamış ve dünya çapında onay almıştır (Dasari ve Bernard, 2014). Moleküler açıdan CDDP, kimyasal yapıdaki küçük bir değişikliğin hedef hücredeki biyolojik aktiviteyi nasıl önemli ölçüde etkileyebileceğinin mükemmel bir örneğini temsil etmektedir (Goodsell, 2006).

1.7. Kanser Tedavisinde CDDP Çalışma Mekanizması

CDDP, pürin kalıntılarındaki N7 reaktif merkezine bağlanır ve bu nedenle onkojenik hücrelerde deoksiribonükleik asit hasarına neden olarak hücre bölünmesini bloke eder ve sonuç olarak apoptotik hücre ölümüyle tamamlanır.

CDDP direncinin altında yatan moleküler mekanizmalar son derece karmaşıktır ve genellikle aşağıdaki özelliklerle ilişkilidir:

- 1) Platin bileşiklerinin hücre içi birikiminde azalma;
- 2) DNA hasar onarımında artış;
- 3) Apoptozun inaktivasyonu;
- 4) Epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) aktivasyonu;
- 5) DNA metilasyonunda, mikroRNA profilinde, kanser kök hücre özelliklerinde ve strese tepki şaperonlarının ifadesinde değişiklik (Zhu vd., 2016).



Şekil 1.6. CDDP çalışma mekanizması (Kartalou ve Essigmann, 2001)

CDDP intravenöz olarak uygulanır ve klorür konsantrasyonunun yüksek olduğu (~100 mM) kanda dolaşırken, Pt (II) klorür ligandlarıyla koordineli kalır. Bununla birlikte, klorür konsantrasyonunun düşük olduğu (~4 mM) hücreye girdikten sonra, Cisplatin'in klorür ligandları muhtemelen su molekülleri ile değiştirilir ve protein, RNA oluşturmak için hücre içi makromoleküller üzerindeki nükleofilik bölgelerle reaksiyona girebilen pozitif yüklü bir tür oluşturur (Şekil 1.6). DNA ile reaksiyon, guanin veya adenin N7 pozisyonuna koordineli platin atomu ile monofonksiyonel eklentiler, zincir içi çapraz bağlar ve zincirler arası çapraz bağlar verir. Eklenti oluşumu, DNA replikasyonunun inhibisyonu, RNA transkripsiyonu, hücre döngüsünün G₂ fazında durma ve/veya programlanmış hücre ölümü ile sonuçlanır (Kartalou ve Essigmann, 2001). Sitotoksik bir ajan olarak Cisplatin'in DNA sentezine müdahale ettiği ve hücre döngüsü ilerlemesini modüle eden DNA çapraz bağlanmasına neden olduğu, bunun sonucunda da tümör hücresi apoptozunu indüklediği bilinmektedir (Geyikoglu vd., 2017). CDDP bazlı kombinasyon kemoterapisi testis, yumurtalık, baş, boyun ve akciğer kanserlerine karşı önemli antitümör aktivite gösterir (Kartalou ve Essigmann, 2001).

2. MATERYALLER VE YÖNTEMLER

2.1. Kullanılan Hücre Hatları

HeLa serviks kanser hücre hattı Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nden (AÜBİBAM) temin edilmiştir. Tezin deneysel aşaması Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Sıvı azot tankı (Taylor Wharton - Almanya); buzdolabı (Arçelik - Türkiye); derin dondurucu (-20°C) (Arçelik No Frost-Türkiye); ultra düşük sıcaklıklı dondurucu (Eppendorf U410 –Almanya); karbondioksitli (CO₂'li) etüv (Thermo Fisher Scientific Hera Cell 240 – ABD); distile su cihazı (Nüve ND12 - Türkiye); Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntem (ELISA) okuyucu (BioTek ELx800 - US); UV-Vis spektrometre (Shimadzu UV-160A - 25 Japonya); etüv (Nüve FN500 - Türkiye); floresan mikroskop (Leica DMI 4000B -Almanya); hassas terazi (Ohaus AV264C - İsviçre); inverted mikroskop (Leica DM ILLED - Almanya); laminar kabin (Steril Kabin) (Thermo Fisher Scientific Heracell 150i - ABD); otoklav (ALP CL32L - Japonya); santrifüj (Thermo Fisher Scientific Heraeus Megafuge 1.0R – ABD); sterilizatör (Nüve FN 500-Türkiye); su banyosu (Nüve BM 302 - Türkiye); vorteks (IKA Yellowline TTS2 - Çin); manyetik karıştırıcı (Sigma Aldrich Heidolph 3001 – ABD); çalkalayıcı (Biometra WT 17 – Almanya).

2.3. Kullanılan Kimyasalar

Total Antioksidan Durum (TAS) kiti (MEGA TIP, Türkiye); Glutathione Assay (GSH) Kit (Cayman, ABD); Superoxide Dismutase Assay (SOD) Kit (Cayman, ABD); Malondialdehit Assay (MDA) Kit (Cayman, ABD); Total Oksidan Durum (TOS) kiti (MEGA TIP, Türkiye); dimetilsülfoksit (DMSO) (Applichem, Almanya); disodyum fosfat (Na₂HPO₄) (Merck, Almanya); etil alkol (Necm Kimya, Türkiye), fetal sıgır serumu (FBS) (Sigma-Aldrich, ABD); RoswellPark Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri (Sigma-Aldrich, ABD); Minimum Essential Medium (MEM) besiyeri (ATCC, ABD); MTT [(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)] (Applichem, Almanya); penisilin – streptomisin solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, ABD); potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) 19 (Merck, Almanya); sodyum bikarbonat

(NaHCO₃) (Merck, Almanya); sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya); sodyum klorür (NaCl) (Detsan, Türkiye); HEPES (SigmaAldrich, ABD); tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, ABD); ε-VİN (Sigma-Aldrich – ABD); *cis*-diaminplatinyum (II) diklorid (CDDP) (Sigma-Aldrich – ABD (Applichem - Almanya); disodyum fosfat (Na₂HPO₄) (Merck- Almanya)

3. YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü Uygulamaları

3.1.1. Hela hücre hattında hücrelerinin çoğaltılması

Hela hücre hattı, %10'luk FBS, %1 penisilin/streptomisinden oluşan MEM besiyeri ortamında, 37°C'de %5 CO₂'de inkübe edilmiş ve çoğaltılmıştır.

3.1.2. Hela hücrelerinin pasajlanması

Hela hücre hattı kültür ortamında 8×10³ hücre çoğaltıldıktan sonra, flask'daki besiyeri steril pipetler yardımı ile çekilmiş ve hücreler 1× Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra kültür kabına 1× Tripsin-EDTA ilave edilerek hücreler 2-4 dakika 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübe edilmiş ve taban kısmına tutunmuş olan hücrelerin birbirinden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop ile kontrol edilmiştir. Tripsin etkisini nötralize etmek için, süspanse hücreler önceden hazırlanmış ve içinde 5 ml besiyeri bulunan steril santrifüj tüplerine steril pipet yardımı ile aktarılmıştır. 1200 rpm'de oda ısısında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant atılmıştır ve dipte kalan hücrelere yeni besiyerleri ilave edilerek pipetlenmiş ve kültür plakalarına hücrelerin yoğunluk durumuna göre besiyeri eklenmiştir. Çoğaltılmış olan hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere sıvı azot tankında (-196°C) saklanmıştır.

3.2. Etken Madde Dozlarının Hazırlanması

3.2.1. CDDP

0,02 M ana stok hazırlamak için, toz halde bulunan Cisplatinden 6 mg tartılıp 100 µL DMSO'da çözülerek oluşturulmuştur. Ana stok -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Deneylede kullanılan CDDP dozları, toplam kullanılacak kuyucuk sayısı ve hacmi dikkate alınarak, mevcut ana stoktan DMSO'nun %0,1'lik toksik dozu göz önünde bulundurularak, her tekrar için taze bir şekilde hazırlanmıştır.

Kullanılan doz aralıkları: 10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 85 µM, 100 µM.

3.2.2. ϵ -Viniferin

0,02 M ana stok hazırlamak için toz halde bulunan ϵ -Viniferin'den 9,08 mg tartılıp 100 μ L DMSO'da çözülerek oluşturulmuştur. Ana stok -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılan ϵ -Viniferin dozları, toplam kullanılacak kuyucuk sayısı ve hacmi dikkate alınarak, mevcut ana stoktan DMSO'nun %0,1'lik toksik dozu göz önünde bulundurularak, her tekrar için taze bir şekilde hazırlanmıştır.

Kullanılan doz aralıkları: 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 85 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M.

4. SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ:

4.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi:

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanarak suda çözünmeyen formazan tuzları oluşturur. MTT yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen değer, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini verir ve bu değerle yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir (proliferasyon arttıkça formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbanans değeri artış gösterir) (Carmichael vd., 1987). HeLa hücreleri, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren MEM besiyeri ortamında, 37°C'de %5 CO₂ ortamlı inkübatörde kültüre edilmiştir. Daha sonra hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayım yapılmıştır. Sayım sonucunda yeterli sayıya ulaşan hücreler 96'lık plakalara her bir kuyucukta 8×10^3 hücre olacak şekilde besiyeri ortamına ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. CDDP ve ϵ -Viniferin'in hazırlanan ara stok solüsyonları için, belirlenen konsantrasyonlarda besiyeri içinde seyreltmeler yapılmış ve bunun sonrasında CDDP için (10, 20, 40, 60, 85, 100 μ M), ϵ -Viniferin için ((10, 20, 40, 60, 85, 100, 150, 200 μ M) kuyucuklara eklenerek hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Analiz süresinin sonunda plakadaki her kuyucuğa 20 μ l MTT boyası ilave edilmiş ve plaka 2 saat daha inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, plakadaki her bir kuyucuğa, 200 μ l DMSO ilave edilmiş ve 10 dakika boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. Plakalardaki hücre süspansiyonunun absorbanans değerleri ELx800 Bio-Tek cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Deneyin son aşaması karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Deney birbirinden bağımsız üç tekrar olarak çalışılmıştır. CDDP ve ϵ -Viniferin IC₅₀ dozları Graphpad Prism 8.0.1 programı ile hesaplanarak belirlenmiştir.

4.1.1. Kombinasyon dozlarının ve belirlenmesi

CDDP ve ϵ -Viniferin belirlenen IC₅₀ dozlarının aynı yüzdeleri (%100, 75, 50, 40, 30, 20, 10) kullanılarak kombinasyonlar oluşturulmuştur. Oluşturulan bu kombinasyonların hücreler üzerindeki inhibe edici etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

(4.1)

$$\frac{CDDP \text{ (veya } \epsilon - \text{Viniferin) IC}_{50} \text{ oranı}}{100} \times \text{Kombinasyon Oranı} = \% \text{ Kombinasyon}$$

$$CDDP \text{ IC}_{50} \%20 + \epsilon\text{-Viniferin IC}_{50} \%20 = \%20 \text{ Kombine}$$

4.1.2. Kombinasyon indeksinin belirlenmesi

MTT yöntemi ile elde edilen farklı kombinasyonların zamana bağlı hücre indeksi değerleri kullanılarak % inhibisyon oranı hesaplanmıştır. CompuSyn programı ile kombinasyon indeksi (CI) hesaplanmıştır. Bu hesaplamayla ilaçların sinerjik ve antagonist etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.

4.2. TAS-TOS, SOD, GSH, MDA Analizleri İçin Hücrelerden Lizat Eldesi

1. Hela hücreleri 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
2. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilerek, öncesinde belirlenmiş konsantrasyonlarda (%10, %20, %40, %50, %75, %100) CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonları kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. 24 saatin sonunda hücreler soğuk PBS ile yıkanıp kazıyıcı ile falkon tüplere alınmıştır. +4 C° 1600 rpm 6 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.
4. Süpernatant atılmış, oluşan pellet tampon çözelti ile ependorflara alınmıştır.
5. Pellet sonikatör yardımı ile parçalanmıştır. Parçalama işleminden sonra +4 C°de 20 dk 13000 rpm de santrifüjlenmiştir.
6. Süpernatant çalışmalarda kullanılmak üzere başka bir epondorfa alındı ve lizatlar deneysel analizler için çalışılncaya kadar -20 C°de saklanmıştır.

4.3. Hücrelerdeki Oksidatif Dengenin Belirlenmesi

4.3.1. Total Oksidan Durum (TOS) Yöntemi

TOS yönteminin temel prensibi, örneklerdeki serbest radikallerin yöntemde kullanılan şelatör kompleksi yapısında yer alan Fe^{2+} iyonunu Fe^{3+} iyonuna yükseltmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan bu reaksiyon sonucunda renk değişimi meydana gelmektedir. Renk değişimi spektrofotometre ile 530 nm dalga boyunda ölçülür. TOS yöntemi REL ASSAY DİAGNOSTİK (Gaziantep, Türkiye) ticari kitinin kullanım talimatına göre uygulanmıştır. Kit kullanım talimatlarına göre ilk olarak standart ölçümü gerçekleştirilmiştir. Devam eden aşamada, ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örneklerden 45 µL alınarak 300 µL reaktif I ile karıştırılarak spektrofotometre küvetine aktarılmıştır. Küvetler, reaktif I eklendikten 30 saniye sonra spektrofotometre cihazında 530 nm'de okutulmuş ve absorbans değeri (A1) elde edilmiştir. A1 verileri alındıktan sonra her bir küvete reaktif II'den 15 µL eklenmiştir. Küvetler 5 dakika 37 °C'de bekletilip, spektrofotometre cihazında 530 nm'de okutulmuş ve absorbans verileri (A2) kaydedilmiştir. Ölçüm sonuçları µmol H₂O₂ Equiv/L cinsinden hesaplanmıştır.

(4.2)

$$A2 - A1 = \Delta Absorbans$$

$$TOS \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta \text{Örnek Absorbans}}{\Delta \text{Standart Absorbans}} \times 10$$

4.3.2. Total Antioksidan Durum (TAS) yöntemi

Hücrelerde bulunan antioksidan miktarını belirlemede sıklıkla 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat) (ABTS+) temelli yöntemler kullanılmaktadır. Numunelerdeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirger. Reaksiyona eklenen antioksidan maddeler, madde yoğunluğu ile ters orantılı bir şekilde renk değişikliğine uğramaktadır. Total antioksidan madde yoğunluğu renk değişimine göre spektrofotometre cihazıyla belirlenebilmektedir. TAS yöntemi REL ASSAY DİAGNOSTİK (Gaziantep, Türkiye) ticari kitinin kullanım talimatına göre uygulanmıştır. Kit kullanım talimatlarına göre ilk olarak standart ölçümü gerçekleştirilmiştir. Devam eden aşamada, ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örneklerden 18 µL alınarak 300 µL reaktif I ile karıştırılarak spektrofotometre küvetine

aktarılmıştır. Küvetler, reaktif I eklendikten 30 saniye sonra spektrofotometre cihazında 660 nm’de okutulmuş ve absorbans değeri (A1) elde edilmiştir. A1 verileri alındıktan sonra her bir küvete reaktif II’den 45 µL eklenmiştir. Küvetler 5 dakika 37 °C’de bekletilip, spektrofotometre cihazında 660 nm’de okutulmuş ve absorbans verileri (A2) kaydedilmiştir. Ölçüm sonuçları µmol Trolox Equiv/L cinsinden hesaplanmıştır.

(4.3)

$$A2 - A1 = \Delta \text{Absorbans}$$

$$TAS \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) = \frac{(\Delta \text{Kör Absorbans}) - \Delta(\text{Örnek Absorbans})}{(\Delta \text{Kör Absorbans}) - (\Delta \text{Standart Absorbans})}$$

4.3.2.1. Oksidatif stres indeksinin (OSI) belirlenmesi

Hücrelerin oksidatif denge durumlarının tespiti için oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır. OSI, TOS ve TAS sonuçları belirlendikten sonra aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$OSI = \frac{TOS}{TAS} \times 100 \quad (4.4)$$

4.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü

SOD ölçümü, hücredeki total süperoksit dismutaz enzimi hakkında bilgi vermektedir. SOD ölçümleri ‘Cayman’ Süperoksit Dismutaz Kit’i kullanılarak ölçülmüş olup bu kitin temel prensibi; ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen süperoksit radikallerinin tespiti için bir tetrazolyum tuzu kullanılarak ölçülmesi esasına dayanır. SOD analizi için 96 kuyucuklu plakaya standart ve numune kuyucuklarının her birine radikal detektör solüsyonundan 200 µL eklenmiştir. Standart kuyucuğunun her birine farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlardan, numune kuyucuklarına da lizis edilmiş örneklerden 10 µL numune eklenmiştir. Kullanılan bütün kuyucuklara en son olarak 20 µL ksantin oksidaz eklenmiştir ve daha sonra 30 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 440-460 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. SOD standart grafiği çizilerek numunelerdeki SOD miktarı hesaplanmıştır.

4.3.4. Redükte glutatyon (GSH) ölçümü

GSH ölçümleri ‘Cayman’ Glutatyon Kit’i kullanılarak ölçülmüş olup bu kitin temel prensibi; glutatyon miktarını ölçmek için geri dönüşümlü enzimatik glutatyon redüktaz

yöntemini kullanır. GSH, DTNB (5,5'-ditiyo-bis-2-(nitrobenzoik asit)) ile reaksiyona girer ve sarı renkli TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) üretir. GSTNB (GSH + TNB) daha fazla GSH ve TNB üretmek için geri dönüşümlü glutatyon redüktaz enzimi ile azalmaktadır. TNB üretim hızı, numunedeki GSH konsantrasyonuyla doğrudan orantılıdır. TNB absorbansının 405-414 nm de ölçülmesi GSH seviyesini vermektedir. GSH analizi için kuyucuklarına standart ve örneklerden 50 µL eklenmiştir. Kullanılan tüm kuyucuklara 150 µL hazırlanan Assay Coctail'den eklenerek karanlık ortamda 25 dk çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 405-414 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. GSH standart grafiği çizilerek numunelerdeki GSH miktarı hesaplanmıştır.

4.3.5. Malondialdehit (MDA) ölçümü

MDA ölçümleri 'Cayman' TBARS Kit' i kullanılarak ölçülmüş olup bu kitin temel prensibi; tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin ölçümü (TBARS), lipid peroksidasyonunun taranması ve izlenmesi için en iyi bilinen yöntemdir. MDA analizi için falkon tüplere lizis edilmiş örneklerden 100 µl ve standart eklenmiştir. Numune ve standart falkonlarının her birine 100 µl SDS çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Her falkona 4 ml renk reaktifi eklenmiştir. Falkon tüpler 1 saat boyunca kaynatılmıştır. Kaynama işleminden hemen sonra falkonlar, tüplerdeki reaksiyonu durdurmak için 10 dk boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler, 1600 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir. Numune ve standartlar ölçüm için 96 kuyucuklu plakalara 150 µl eklenmiştir. ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. MDA standart grafiği çizilerek numunelerdeki MDA konsantrasyonu hesaplanmıştır.

4.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri ortalama \pm standart sapma kullanılarak, Graphpad Prism 8.0.1 programı kullanılarak yapılmıştır. Grup farklılıkları tek yönlü ANOVA ve post-hoc olarak Tukey testi kullanılarak verilerin istatistiksel analizi yapılmıştır. Tüm çalışmalar %95 güven aralığı baz alınarak gerçekleştirilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

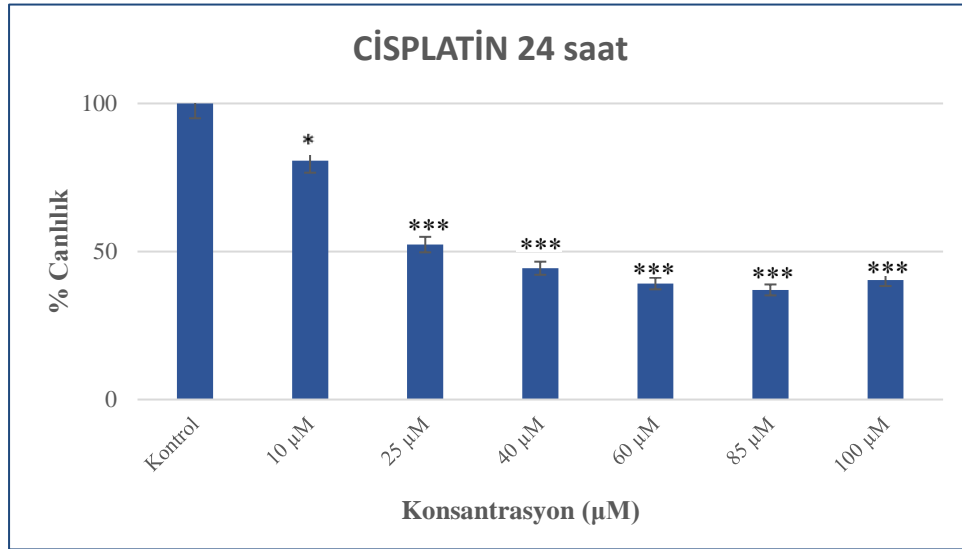
5. BULGULAR

5.1. MTT Analizi Bulguları

CDDP ve ϵ -Viniferin IC₅₀ değerleri 24 saatlik muamele sonucu Hela hücre hattı için sırasıyla 28 μ M ve 21 μ M olarak tespit edilmiştir (şekil 5.1 ve şekil 5.2).

Tablo 5.1. Hela hücre hattının 10-100 μ M konsantrasyon aralığında CDDP ile 24 saat muamelesi sonucunda hücre canlılığına etkisi (Kontrole göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

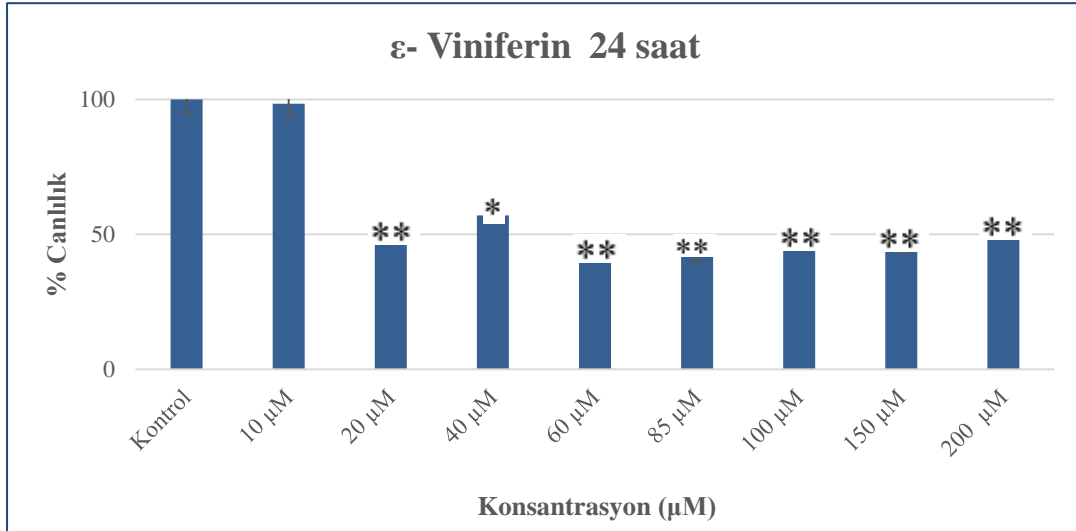
Dozlar	IC ₅₀ (%)
Kontrol	100
10 μ M	80,65*
20 μ M	52,33***
40 μ M	44,35***
60 μ M	39,18***
85 μ M	37,02***
100 μ M	40,35***



şekil 5.1. Hela hücre hattının 10-100 μ M konsantrasyon aralığında CDDP ile 24 saat muamelesi sonucu oluşan canlılık grafiği (Kontrole göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

Tablo 5.2. *Hela hücre hattının 10-200 µM konsantrasyon aralığında ε-Viniferin ile 24 saat muamelesi sonucu hücre canlılığına etkisi (Kontrole göre *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001)*

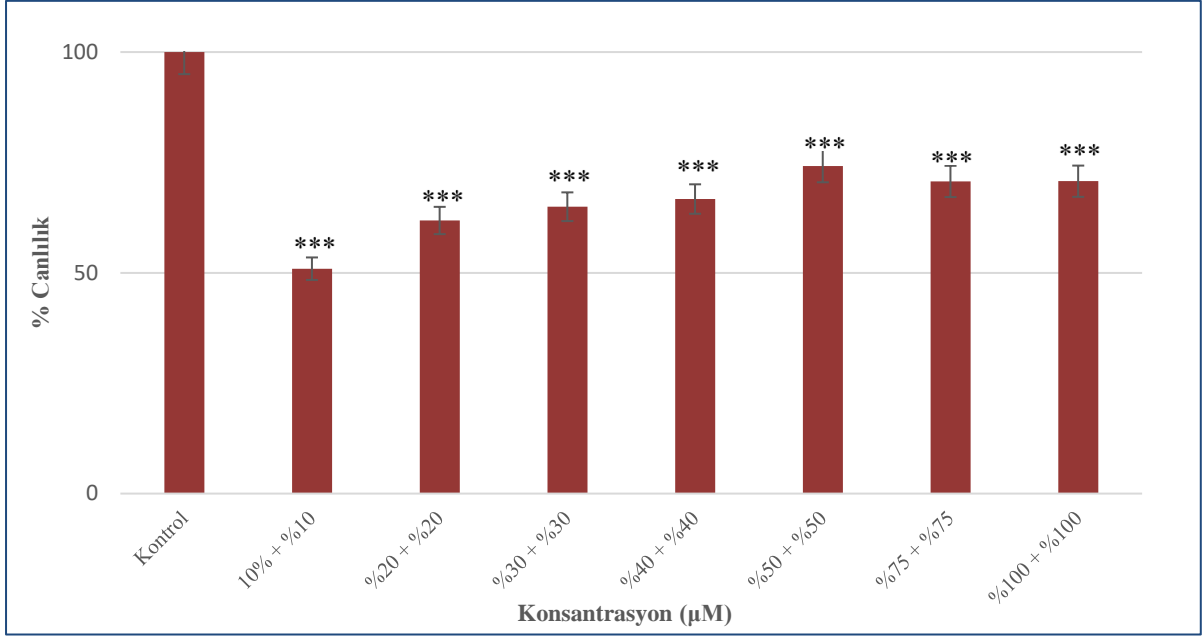
Dozlar	IC ₅₀ (%)
Kontrol	100
10 µM	98,37
20 µM	48,78**
40 µM	57,01*
60 µM	45,37**
85 µM	42,14**
100 µM	47,48**
150 µM	45,59**
200 µM	52,11**



Şekil 5.2. *Hela hücre hattının 10-200 µM konsantrasyon aralığında ε-Viniferin ile 24 saat muamelesi sonucu oluşan canlılık grafiği (Kontrole göre *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001)*

Tablo 5.3. *CDDP ve ε-Viniferin IC₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 sonunda Hela hücrelerindeki inhibisyonu (Kontrole göre *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001)*

IC ₅₀ Yüzdesi	Dozlar (ε-Vin + CDDP)	% İnhibisyon
% 100	21 µM ± 28 µM	%29,25***
% 75	15,75 µM ± 21 µM	%29,30***
% 50	10,5 µM ± 14 µM	%25,78***
% 40	8,4 µM ± 11,2 µM	%33,29***
% 30	6,3 µM ± 8,4 µM	%35,03***
% 20	4,2 µM ± 5,6 µM	%38,15***
% 10	2,1 µM ± 2,8 µM	%49,07***



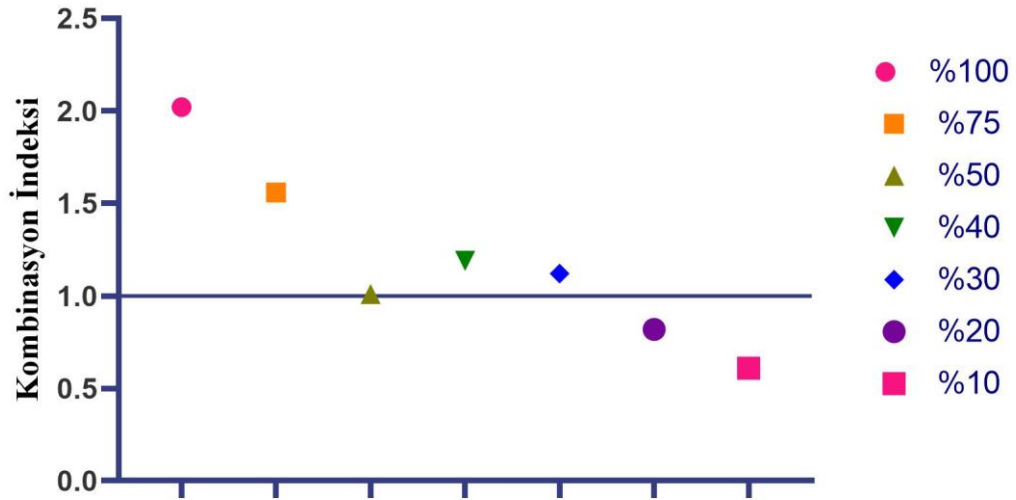
Şekil 5.3. CDDP ve ϵ -Viniferin IC_{50} dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonunda Hela hücrelerindeki canlılık grafiği (Kontrole göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

5.1.1. Kombinasyon indeksi bulguları

CDDP, ϵ -Viniferin ve bu iki maddenin Hela hücre hattındaki sitotoksisite verilerine dayanarak kombinasyon indeksi hesaplanmıştır. Hela hücre hattındaki kombinasyonların sinerjik ya da antagonist etkilerini belirlemek için CompuSyn programı ile kombinasyon oranları belirlenmiştir. Program verilerine göre %10, %20 kombinasyon oranlarının sinerjik etkili olduğu bulunmuştur, yapılacak olan diğer deneysel süreçler için sinerjik etki gösteren kombinasyon oranları olarak seçilmiştir (Tablo 5.4).

Tablo 5.4. CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının Hela hücre hatlarındaki sitotoksisite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri (CI)

IC ₅₀ Yüzdeleri	Dozlar (Vin + CDDP)	CI
100%	21 μ M \pm 28 μ M	2,02
75%	15.75 μ M \pm 21 μ M	1,56
50%	10.5 μ M \pm 14 μ M	1,01
40%	8.4 μ M \pm 11.2 μ M	1,19
30%	6.3 μ M \pm 8.4 μ M	1,12
20%	4.2 μ M \pm 5.6 μ M	0,82
10%	2.1 μ M \pm 2.8 μ M	0,61



Şekil 5.4. CDDP ve ϵ -Viniferin ve kombinasyonların sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri $CI < 1$ (Sinerjistik), $CI = 1$ (Aditif), $CI > 1$ (Antagonist)

5.2. TAS ve TOS Sonuçları

HeLa hücre hattına uyguladığımız CDDP ve ϵ -Viniferin'in hem sinerjik hem de antagonist kombinasyonlarının, oksidatif strese olan etkileri için TAS ve TOS verileri ölçülerek OSI (Oksidatif Stres İndeksi) değerleri belirlenmiştir. %20 kombine uygulamasının (5,6 μ M CDDP + 4,2 μ M ϵ -Viniferin) TAS değeri haricinde TAS ve TOS değerlerinde herhangi bir anlamlı farklılık görülmemiştir ve %20 kombine (5,6 μ M CDDP + 4,2 μ M ϵ -Viniferin) için istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür (Tablo 5.5).

Tablo 5.5. CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının HeLa hücre hattındaki total oksidan ve antioksidan duruma etkileri (Kontrole göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

Gruplar	TOS (μ mol/L)	TAS (μ mol/L)
Kontrol	61,67 \pm 9,28	266,67 \pm 0,06
CDDP (28 μ M)	31,67 \pm 4,41***	666,67 \pm 0,13
ϵ -Viniferin (21 μ M)	20,00 \pm 5,00*	1133 \pm 0,06
%40 kombine [11.2 μ M CDDP + 8.4 μ M VİN]	35,00 \pm 1,66*	1266,67 \pm 0,13
%20 kombine [5.6 μ M CDDP + 4.2 μ M VİN]	43,33 \pm 6,01	2466,67 \pm 0,98*
%10 kombine [2.8 μ M CDDP + 2.1 μ M VİN]	21,67 \pm 4,41**	1333,33 \pm 0,06

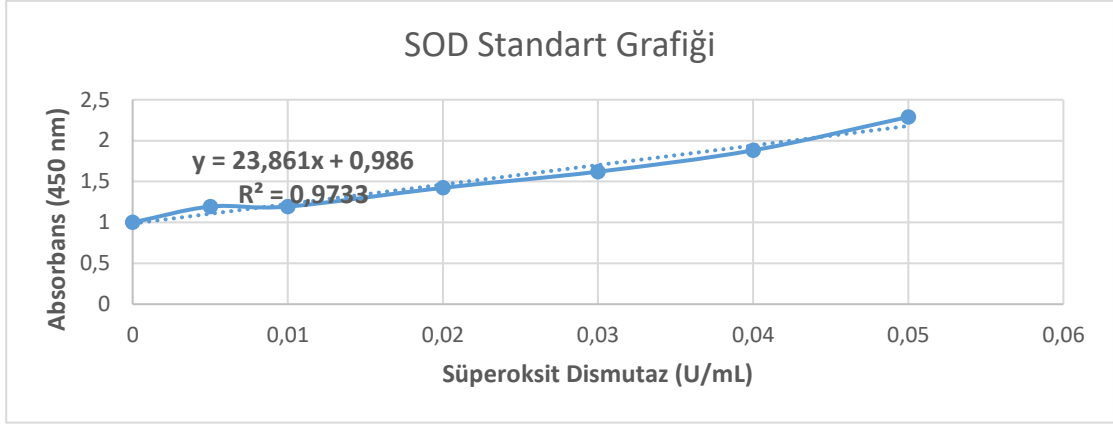
Sinerjik olarak etkili olan gruptaki %10 kombine (2,8 μM CDDP + 2,1 μM ϵ -Viniferin) için OSI değeri 1,63 hesaplanırken, %20 kombine (5,6 μM CDDP + 4,2 μM ϵ -Viniferin) bu değer 1,75'e çıkmıştır. Artan kombinasyon yüzdesi ile birlikte OSI değerinin düşmesi, dolayısı ile oksidatif stres yükünün azalması beklenmiş ancak beklenen değer aralığının altında veriler elde edilmiştir. Tek başına verilen ϵ -Viniferin ve CDDP + ϵ -Viniferin kombinasyonlarının OSI değerleri, tek başına verilen CDDP'nin OSI değerinden düşük çıkmış olsa da tüm sonuçların OSI değerlerinin 1'in üzerinde tespit edilmesi, ortamda bir oksidatif stres yükü varlığının göstergesidir (Tablo 5.6).

Tablo 5.6. *HeLa hücre hattındaki TOS ve TAS deney sonuçları üzerinden hesaplanan oksidatif stres indeksi*

Gruplar	OSİ ([TOS/TAS]x100)
Kontrol	22,50
CDDP (28 μM)	5,00
ϵ -Viniferin (21 μM)	1,72
%40 kombine [11.2 μM CDDP+ 8.4 μM VİN]	3,02
%20 kombine [5.6 μM CDDP + 4.2 μM VİN]	1,75
%10 kombine [2.8 μM CDDP + 2.1 μM VİN]	1,63

5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Sonuçları

CDDP, ϵ -Viniferin ve kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda HeLa hücrelerindeki SOD aktivasyon bulguları, spektrofotometre verileri üzerinden, GraphPad Prism 8 programı ile hesaplanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada SOD değerlerinde tek başına verilmiş CDDP ve %10 CDDP + ϵ -Viniferin kombinasyonu için kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmaktadır. CDDP + ϵ -Viniferin kombinasyonlarındaki hem antikanser hem de antioksidan madde miktarı arttıkça, SOD değerleri de doğru orantılı şekilde artış göstermiş, kontrol grubunun SOD değerinin ise altında sonuç vermişlerdir (Tablo 5.7).



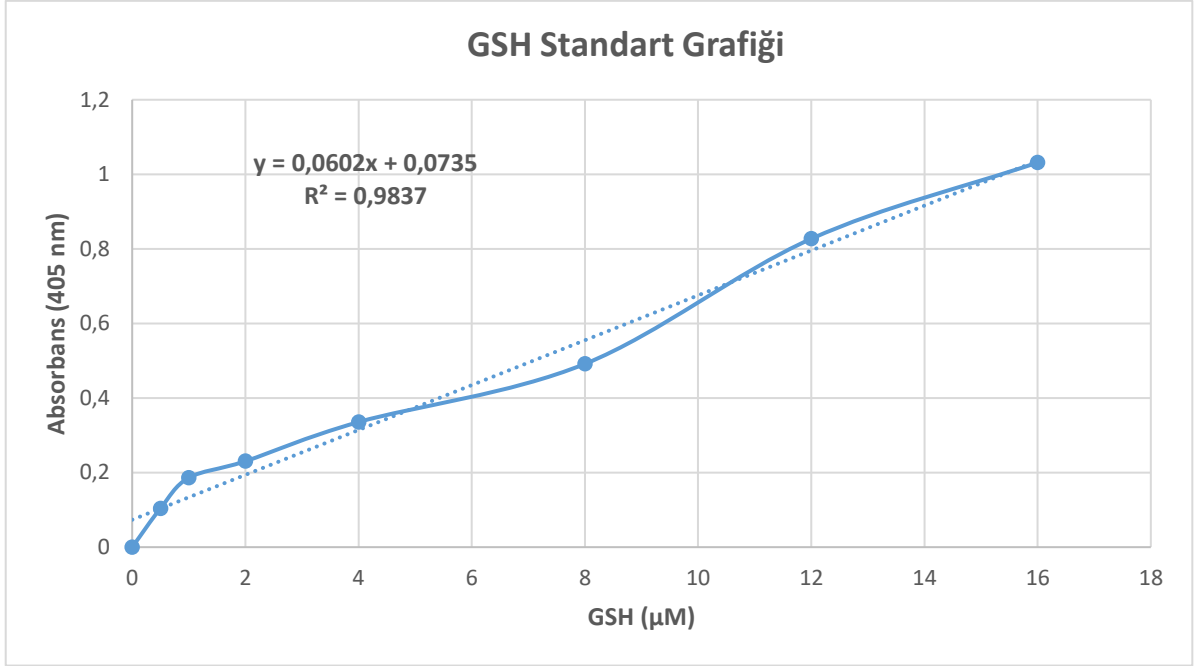
Şekil 5.5. SOD Standart Grafiği

Tablo 5.7. Hela hücre hattındaki CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının 24 saatlik doza bağımlı numunelerinin SOD aktivasyon sonuçları (Kontrolle göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

Gruplar	SOD (U/mL)
Kontrol	1,550 \pm 0,10
CDDP (28 μ M)	0,502 \pm 0,12*
ϵ -Viniferin (21 μ M)	0,384 \pm 0,07*
%40 kombine [11.2 μ M CDDP + 8.4 μ M VİN]	1,783 \pm 0,44
%20 kombine [5.6 μ M CDDP + 4.2 μ M VİN]	1,12 \pm 0,24
%10 kombine [2.8 μ M CDDP + 2.1 μ M VİN]	0,805 \pm 0,02*

5.4. Redükte Glutasyon (GSH) Sonuçları

GSH standardı için, stok çözeltiliden, belirtilen dilüsyonların ölçümü yapılarak standart eğri grafiği elde edilmiştir. Yaptığımız çalışmalarda %10 (2,1 μ M ϵ -Viniferin + 2,8 μ M CDDP) ve %20 (5,6 μ M CDDP + 4,2 μ M ϵ -Viniferin) kombinelerinin GSH değerleri, tek başına verilen Cisplatin'in GSH seviyelerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tek başına verilen CDDP ve %10 CDDP + ϵ -Viniferin kombinasyonu için istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır. İstatistiksel yaklaşım açısından SOD ve GSH gruplarındaki anlamlı farklılıklar benzerlik göstermektedir (Tablo 5.8).



Şekil 5.6. GSH standart grafiği

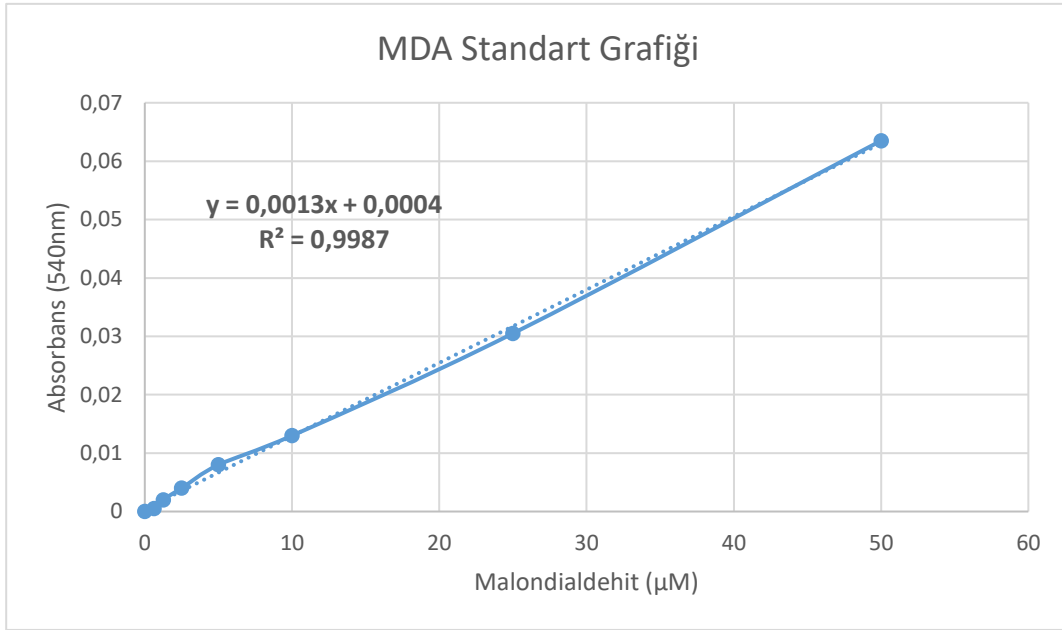
CDDP, ε-Viniferin ve kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda HeLa hücrelerindeki GSH bulguları, spektrofotometre verileri üzerinden, GraphPad Prism 8 programı ile hesaplanmıştır.

Tablo 5.8. HeLa hücre hattındaki CDDP ve ε-Viniferin kombinasyonlarının 24 saatlik doza bağımlı numunelerinin GSH atıvasyon sonuçları (Kontrolle göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

Gruplar	GSH (µM)
Kontrol	1,378 ± 0,09
CDDP (28 µM)	0,418 ± 0,16**
ε-Viniferin (21 µM)	0,636 ± 0,16*
%40 kombine [11.2 µM CDDP + 8.4 µM VİN]	1,353 ± 0,30
%20 kombine [5.6 µM CDDP + 4.2 µM VİN]	0,836 ± 0,19
%10 kombine [2.8 µM CDDP + 2.1 µM VİN]	0,847 ± 0,03**

5.5. Malondialdehit (MDA) Sonuçları

MDA standardı için, stok çözeltilerden, belirtilen dilüsyonların ölçümü yapılarak standart eğri grafiği elde edilmiştir. Çalışmamızda en düşük MDA değeri kontrol grubunda elde edilmiştir ancak en yüksek MDA değeri ise deneme amaçlı yaptığımız ve antagonist olarak belirlediğimiz %40 (8,4 μ M ϵ -Viniferin + 11,2 μ M CDDP) kombinasyon grubuna aittir. ϵ -Viniferin'in MDA değeri tek başına verilen Cisplatin'in MDA değerinden düşük olmasına rağmen, kombinasyonlarda kullanılan madde miktarı arttıkça, doğru orantılı şekilde MDA değerleri de artış göstermektedir. CDDP + ϵ -Viniferin %20 ve %40 kombinasyonları haricinde kalan kombine gruplarında ya da tek başına verilen CDDP veya ϵ -Viniferin için herhangi bir istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir (Tablo 5.9).



Şekil 5.7. MDA standart grafiği

CDDP, ϵ -Viniferin ve kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda HeLa hücrelerindeki MDA bulguları, spektrofotometre verileri üzerinden, GraphPad Prism 8 programı ile hesaplanmıştır.

Tablo 5.9. *Hela hücre hattındaki CDDP ve ε-Viniferin kombinasyonlarının 24 saatlik doza bağımlı numunelerinin MDA aktivasyon sonuçları (Kontrole göre *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001)*

Gruplar	MDA (μM)
Kontrol	0,461 ± 0,000
CDDP (28 μM)	1,564 ± 0,05
ε-Viniferin (21 μM)	0,923 ± 0,16
%40 kombine [11.2 μM CDDP + 8.4 μM VİN]	4,307 ± 0,59***
%20 kombine [5.6 μM CDDP + 4.2 μM VİN]	3,794 ± 0,46**
%10 kombine [2.8 μM CDDP + 2.1 μM VİN]	3,358 ± 0,35

6.TARTIŞMA

Kanser, dünya çapında ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir ve kontrolsüz hücre büyümesi nedeniyle küresel olarak ana sağlık sorunudur. Küresel olarak, meme ve kolon kanserinden sonra serviks kanseri, kadınlar arasında üçüncü önde gelen malignitedir. Rahim ağzı kanseri orta ve düşük gelirli ülkelerde yaşayan kadınlarda en sık görülen kanserlerden biridir (Al-Oqail vd. 2021). Kanserden korunma programları üç grupta incelenir. Bu koruma programlarından en önemlisi olan birincil korunma, kansere neden olan maddelerden kaçınılması, aşılama ve sağlık eğitimi yoluyla gerçekleştirilir. İkincil korunma, kanser öncesi lezyonların invaziv olmadan erken tanı ve tedavisi olarak tanımlanabilir. Üçüncül korunma, klinik aşamaları sonrası dönemde gerçekleştirilen bir koruma şeklidir, oluşabilecek sakatlıkları azaltmak ve hastaları rehabilite etmek için uygun yöntemlerin kullanılmasını da içerir (Acar, 2014).

Gardasil ve Cervarix, FDA onaylı koruyucu aşılardır. Gardasil veya Cervarix'in serviks kanserine karşı koruma süresinin şu anda en az beş yıl olduğu bildirilmektedir. Gardasil, risk altındaki kadınlarda görülen bazı HPV tipleri ile ilişkili olan CIN II/III lezyonlarına karşı %100 koruma sağlar. Ayrıca aşının, siğiller dahil vulvar lezyonlara karşı korumadaki etkinliği de %100'e yakındır. HPV aşısı henüz Türkiye'nin ulusal aşı takvimine dahil edilmemiştir. Kullanımı kişinin kendi veya reşit değilse ailesinin isteğine bağlıdır ve ücretlidir (Aydoğdu ve Özsoy, 2018).

Yaptığımız çalışmada amacımız, CDDP ve ϵ -Viniferin'in ayrı ayrı ve kombine şekilde HeLa hücre hattı üzerindeki oksidatif stres etkilerinin gözlemlenmesidir. CDDP ile yaptığımız 24 saatlik MTT sonucu IC_{50} değeri 28 μ M tespit edilmiştir. Koyuncu ve diğerleri tarafından HeLa hücre hattında gerçekleştirilen çalışmalarda, Cisplatin'in 24 saatlik MTT sonucunda 28,9 μ M IC_{50} değeri tespit edilmiş, yapmış olduğumuz sitotoksisite çalışmaları literatür ile uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızın devam eden kısmında ϵ -Viniferin ile yaptığımız 24 saatlik MTT sonucu IC_{50} değeri 21 μ M tespit edilmiştir. Koyuncu ve diğerleri tarafından devam ettirilen yine aynı çalışmanın 48 saatlik sürecinde bu IC_{50} değeri, 7,6 μ M'a kadar düştüğü görülmüştür (Koyuncu vd., 2019). ϵ -Viniferin hakkında HeLa hücre hattında çok fazla çalışma bulunmasa da, Kim ve diğerleri tarafından yapılan sitotoksik aktivite çalışmaları esnasında ϵ -Viniferin için HeLa insan kanser hücre hattında IC_{50} değeri 20.4 μ M tespit edilmiş, bu sonuçlar referans alınarak, yapmış olduğumuz sitotoksisite çalışmaları literatür ile uyumlu bulunmuştur diyebiliriz. (Kim vd., 2002b). Xue ve diğerleri tarafından yapılan bir başka ϵ -Viniferin kaynaklı

çalışmada ise HeLa hücresi için ϵ -Viniferin IC_{50} değeri 20.4 μ M bulunmuştur (Xue vd., 2014). Çalışmamızda HeLa hücre dizisi üzerine tek başına verilmiş olan CDDP ve ϵ -Viniferin'in maddelerinin IC_{50} değerleri üzerinden %10, %20, %30, %40, %50, %75, ve %100 olacak şekilde kombine konsantrasyonları hazırlanmış ve 24 saatlik sürece tabi tutulmuştur. Kullanılan kombine dozların yüzde oranı minimum seviyede, hücre inhibisyonunun maksimum olduğu görülmüştür (Tablo 5.3). En düşük canlılık %10 (2,8 μ M CDDP + 2,1 μ M ϵ -Viniferin) kombinesinde görülmüştür. Yüksek canlılık veya daha düşük toksisite yüzdesi bakımından %75 (21 μ M CDDP + 15,75 μ M ϵ -Viniferin) ve %100 (28 μ M CDDP + 21 μ M ϵ -Viniferin) kombineleri arasında minimal bir fark görülmüştür. Kontrole göre yapılan istatistiksel analizler sonucunda, inhibisyona karşılık bütün kombinasyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür. CDDP, ϵ -Viniferin ve bu iki maddenin kombinasyonlarının HeLa hücre hattındaki sitotoksosite verilerine dayanarak hesaplanan kombinasyon indeksleri tablosuna göre (Tablo 5.4), sinerjik etki gösteren ($CI < 1$) %10 (2,8 μ M CDDP + 2,1 μ M ϵ -Viniferin) ve %20 (5,6 μ M CDDP + 4,2 μ M ϵ -Viniferin) kombinasyonlar ile antagonist etkiye ($CI > 1$) sahip %40 (11,2 μ M CDDP + 8,4 μ M ϵ -) kombinasyonu, çalışmanın bundan sonraki aşamaları için seçilmiştir.

Vücut sıvılarının TAS ve TOS'u, bilinen ve bilinmeyen antioksidanların kapasitesi ile bunların etkileşimlerini belirler ve değerlendirilmesi sonucunda vücutta antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki hassas denge hakkında bir fikir vermektedir (Ghiselli vd., 2000; Rabus vd., 2008). Çeşitli çalışmalar, insanlarda ve hayvanlarda strese bağlı bozukluklara yol açan fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerdeki TAS ve TOS seviyeleri arasında bir dengesizlik olduğunu göstermektedir (Buettner, 1993; Halliwell ve Gutteridge, 1990; Valko vd., 2006]. Agcayazi ve diğerleri tarafından fareler üzerinde yapılan, CDDP ile kombine verilmiş olan Resveratrol ile ilgili bir çalışmada, bizim yapmış olduğumuz çalışmamızdaki TAS sonuçlarının kıyaslamasına benzer bir şekilde kombinasyon TAS değerlerinin, tek başına verilen Cisplatin'in TAS değerine göre artış gösterdiği kaydedilmiştir (Agcayazi vd., 2021). Fare midesi ve akciğeri için Fatime ve diğerleri tarafından CDDP ile kombine verilmiş Oleuropein çalışmasında, kombine uygulamaların TAS değerlerinin, tek başına verilen CDDP'in TAS değerine kıyasla artmış bulunduğu, CDDP ve Oleuropein kombinasyonlarının TOS değerlerinin ise Cisplatin'in TOS değerine kıyasla azaldığı veya bu değerlerin yakınında kaldığı kaydedilmiştir (Geyikoglu, 2017).

ROT'a karşı ilk savunma hattını oluşturan SOD enzimi, süperoksit anyonunun ($\cdot\text{O}_2^-$), hidrojen peroksida (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2005). Toplu ve diğerleri tarafından yapılan *in vivo* çalışmada CDDP ve antioksidan bir madde olan Molsidomine ile kombinasyon grubu denenmiş ve bu kombinelerin SOD değerlerinin, tek başına verilen Cisplatin'in SOD değerinin üzerinde çıktığı kaydedilmiştir (Toplu vd., 2014). Toplu ve diğerleri tarafından yapılan çalışmanın SOD sonuçlarına benzer bir tablo, bizim çalışmamızdaki SOD değerlerinde de gözlemlenmiştir.

ROT'un neden olduğu oksidatif stres, endojen bir antioksidan olan glutatyonda (GSH) azalmaya neden olur. Glutasyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmakta, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Koyuncu ve diğerleri tarafından tek başına CDDP uygulaması yapılan ratların doku ve serumlarında gerçekleştirilen bir çalışmada, GSH değerlerinin en yüksek, karaciğer dokusunda olduğu tespit edilmiştir (Koyuncu vd., 2017). Bir başka çalışmada, CDDP ve bir enzim olan NOX ile yapılmış kombinasyonlarının konsantrasyon yüzdeleri arttıkça GSH değerleri üç deney ortamı için de (karaciğer, böbrek, serum) tek başına verilen Cisplatin'in GSH düzeylerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Lee vd., 2000). Koyuncu ve diğerleri tarafından yapılmış olan kombine çalışmaların GSH sonuçlarının, tek başına verilen CDDP'nin GSH sonuçlarına olan oranındaki benzerlik bizim çalışmamızda da görülmüş, CDDP ve ϵ -Viniferin'in GSH değerleri, kombine grupların yüzde değerleri ve madde miktarları arttıkça (%10, %20 vb.), tek başına verilen Cisplatin'in GSH seviyelerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Toplu ve diğerleri tarafından albino fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada, CDDP + Molsidomine kombinasyonunun GSH değerinin, tek başına verilen CDDP'ye oranla GSH değerini arttırdığı bildirilmiştir. Molsidomin'in GSH değerini, kontrol grubunun GSH değeri ile kıyasladığımızda ise en yüksek GSH değeri kontrol grubuna aittir (Toplu vd., 2014).

MDA seviyesi lipid peroksidasyonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin göstergelerinden biridir (Chen vd., 2001; Yang vd., 2011). Lipid peroksidasyonu, membrandaki doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Ayrıca ROT, hücre zarı lipid peroksidasyonunu etkiler ve malondialdehit (MDA) gibi daha toksik ürünlerin ortaya çıkmasına neden olur (Sun vd., 2014). Koc ve diğerleri tarafından *in vivo*

ortamda yapılan çalışmalarda, bizim çalışmamızın MDA sonuçlarına benzer şekilde, en düşük MDA değeri kontrol grubunda görülmüş, tek başına verilen Cisplatin'in MDA düzeyi ise farklı dozlarda verilen ve antioksidan olarak kabul edilen Oleuropein maddesinin MDA değerlerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CDDP + Oleuropein kombinasyonlarının MDA seviyeleri, konsantrasyon yüzdesi azaldıkça artmış ancak tek başına uygulanan Cisplatin'in MDA değerinin altında kalmıştır. Dikkat edilmesi gereken nokta, *in vivo* ortamda yapılmış bu çalışmada, tek başına verilen Oleuropein ve CDDP maddelerinin konsantrasyon değerleri arttıkça MDA değerleri artmış, madde miktarı azaldıkça MDA değeri azalmıştır (Koc vd., 2018). Koyuncu ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada rat karaciğeri ve böbreği için CDDP + NOX kombinasyonlarının MDA değerleri, konsantrasyon miktarı arttıkça azalmaya devam etmiş ve tek başına verilen Cisplatin'in MDA değerinin altında kalmışlardır. Serumda yapılan çalışmada ise bu durumunun tam tersi yaşanmış ve CDDP + NOX kombinasyonlarının MDA değerleri konsantrasyon miktarı arttıkça Cisplatin'in MDA değerinin üzerinde çıkmıştır (Koyuncu vd., 2017).

Sonuç olarak, elde edilen veriler ışığında, düşük dozda uygulaması yapılan (%10 ve %20) CDDP ve ϵ -Viniferin kombinasyonlarının HeLa hücre dizisinde sinerjik etkili olduğu bununla birlikte konsantrasyon oranları arttıkça antagonizme doğru kayma olduğu bulunmuştur. Bu çalışma tek başına kullanılan Cisplatin'in yüksek doz uygulamasının ϵ -Viniferin ile birlikte kombine olarak verilmesiyle daha da düşürülmüş ve Cisplatin'in olası toksik dozunu azalttığı tespit edilmiştir. CDDP ve ϵ -Viniferin kombine uygulamasının oksidatif stres üzerindeki etkilerini incelediğimizde tek başına verilen CDDP'nin TOS değeri, %10'luk kombine şekilde verilen CDDP + ϵ -Viniferin grubunun altında değerde, bu grubun haricinde kalan bütün grupların ise üzerinde değer çıkmıştır. Tek başına verilen CDDP'nin OSI değeri, kombine şekilde verilen CDDP + ϵ -Viniferin gruplarının OSI değerinden düşük çıkmıştır. Buna karşılık, tek başına verilen CDDP'nin TAS değerinin, kontrol grubunun TAS değerinden yüksek olduğu, tek başına verilen ϵ -Viniferin'in ve kombine gruplarının TAS değerinden düşük bulunmuştur. Bu bulgular, oksidatif stresin yükselmesinin ϵ -Viniferin kombinesi ile azaltılabileceğinin göstergesi olabilir. SOD inhibisyonu hücrel süperoksit radikallerinin birikmesine neden olur ki bu da serbest radikal hasarı ile kanser hücrelerinin apoptoza gitmesine yol açar ancak yaptığımız çalışmada, ϵ -Viniferin ve CDDP kombine gruplarının SOD değerlerinin, tek

başına verilen Cisplatin'in SOD değerine göre daha yüksek çıkması, toksik etkilerin azaltıldığını göstermektedir ancak yine de kontrol grubunun SOD değeri, tek başına verilen CDDP ve ϵ -Viniferin ile kombine gruplarının SOD değerlerinin altında kalmıştır. ϵ -Viniferin'in hücrel antioksidan savunma sistemindeki dengeyi artırarak reaktif oksijen türlerine karşı hücreyi daha iyi savunabileceğini düşünmekteyiz. GSH'ın hücrede azalımı intraselüler oksidasyonu yansıtır. Bu bilgiyi referans olarak, çalışmalarımızdaki CDDP + ϵ -Viniferin kombinasyonlarının GSH değerlerinin, Cisplatin'in GSH değerine göre olan artışı, hücrenin olası bir oksidatif hasara karşı hazırlanıyor olabileceğinin göstergesi olabilir. Çalışmamızda, GSH düzeylerine doğrudan ve kombine grupların etkilerini incelediğimiz maddelerden ϵ -Viniferin'in doza bağlı olarak hücrel GSH düzeyini arttırmış olması ile HeLa hücrelerini koruduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda GSH düzeyindeki artışın ise ϵ -Viniferin'in HeLa hücrelerinde glutatyon sentezi ile ilgili enzimleri etkilemiş olabileceğini düşünüyoruz. Dikkat edilmesi gereken nokta, düşük dozdaki ϵ -Viniferin + CDDP kombinasyonlarının, SOD aktivasyonunu ve GSH düzeyini artırarak koruyucu etki göstermiş olduğudur. MDA değerlerini incelediğimizde, tek başına verilen Cisplatin'in MDA değerine göre artmış olan kombinasyon konsantrasyonlarındaki MDA değerlerinin, ROT'in intraselüler olarak daha fazla birikmesinin işaretçisi olduğunu ve hücrel lipid peroksit düzeylerinin daha da artırarak ϵ -Viniferin'in kemoterapötik ajanın etkilerini daha da güçlendirdiğini, bu nedenle de LPO seviyesini artırarak prooksidan etki gösterdiğini düşünülmektedir. ϵ -Viniferin ve CDDP maddelerinin HeLa hücre hattı üzerinde kombine olarak literatürlerde daha önce yapılmış bir çalışması olmadığından, antioksidan enzim düzeylerinde ve aktivasyonlarında değişikliğe neden olabilecek biyokimyasal mekanizmaların ve bu enzimatik değerlerin ölümcül bir hasar yaratıp yaratmayacağını anlaşılmaması, hücrenin apoptoza yönlendirilip yönlendirilemeyeceği ve zamana bağlı değişimlerin gözlemlenebilmesi için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* araştırmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- Acar, N. (2014). Birinci basamakta çalışan hekim ve aile sağlığı elemanlarının serviks kanseri ile human papilloma virüs aşısına ilişkin bilgi düzeyleri. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
- Agcayazi, S., Ugurlu, A., Ucak, T., Tasli, N., Karakurt, Y., Icel, E., Cimen, F., Süleyman, H. (2021). Protection against experimental cisplatin-induced optic nerve toxicity using resveratrol: A rat model study. *Cutaneous And Ocular Toxicology*, 40(3), 263-267.
- Al-Oqail, M., Farshori, N., Al-Sheddi, E., Al-Massarani, S., Saquib, Q., Siddiqui, M., Al-Khedhairi, A. (2021). Oxidative Stress Mediated Cytotoxicity, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis Induced by Rosa damascena in Human Cervical Cancer HeLa Cells. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, Volume 2021, Article ID 6695634, 11 pages
- Aydoğdu, S. ve Özsoy Ü., (2018). Serviks kanseri ve HPV, *Androl Bul* 20:25–29
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (3), 154-165.
- Blagosklonny, MV. (2005). Overcoming limitations of natural anticancer drugs by combining with artificial agents. *Trends Pharmacol Sci.* 26(2):77-81.
- Buettner, G. (1993). The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 300(2), 535-543.
- Buskwofie, A., David-West, G. and Clare, CA. (2020). A Review of Cervical Cancer: Incidence and Disparities. *J Natl Med Assoc.* 112(2):229-232.
- Cadenas, E. and Sies, H. (1998). The lag phase. *Free radical research*, 28(6), 601-609.

- Carmichael, J., DeGraff, W., J.B. (1987). "Evaluation Of A Tetrazolium-Based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment Of Chemosensitivity Testing". *Cancer Research* 15;47(4):936-42.
- Chen, C., Shiesh, S., Tsao, H., Chen, F., Lin, X. (2001). *Digestive Diseases And Sciences*, 46(4), 927-931.
- Commoner, B., Townsend, J. and Pake, G. (1954). Free Radicals In Biological Materials. *Nature* 174, 689–691
- Curtin, N. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, 12(12), 801-817.
- Dasari, S. and Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal Of Pharmacology*, 740, 364-378.
- Del Bello, B., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A., Maellaro, E. (1999). Hydrogen Peroxide Produced During Γ -Glutamyl Transpeptidase Activity Is Involved In Prevention Of Apoptosis And Maintenance Of Proliferation In U937 Cells. *The FASEB Journal*, 13(1), 69-79.
- Di Mascio, P., Murphy, M. and Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 53(1), 194S-200S.
- Djordjević, V. (2004). Free Radicals in Cell Biology. *International Review Of Cytology*, 237:57-89.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1):47-95.
- Ebadi, M. (2022). Personalized screening policies for cervical cancer prevention- Sabanci University Research Database.

- Geyikoglu, F., Isikgoz, H., Onalan, H., Colak, S., Cerig, S., Bakir, M., Hosseinigouzdagani, M., Koc, K., Erol, H., Saglam, Y., Yildirim, S. (2017). Impact of high-dose oleuropein on cisplatin-induced oxidative stress, genotoxicity and pathological changes in rat stomach and lung. *Journal Of Asian Natural Products Research*, 19(12), 1214-1231.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology And Medicine*, 29(11), 1106-1114.
- Goodsell, D. (2006). The Molecular Perspective: Cisplatin. *Stem Cells*, 24(3), 514-515.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 280(1), 1-8.
- Halliwell, Barry. and John, M. C. (2015). Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press,
- Karabulut, H. ve Gülay, M. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-65.
- Kartalou, M. and Essigmann, J. (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 478(1-2), 23-43.
- Keylor, M., Matsuura, B. and Stephenson, C. (2015). Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products. *Chemical Reviews*, 115(17), 8976-9027.
- Kim, H., Chang, E., Bae, S., Shim, S., Park, H., Rhee, C., Park, J., Choi, S. (2002a). Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Archives Of Pharmacal Research*, 25(3), 293-299.
- Kim, H., Chang, E., Cho, S., Chung, S., Park, H., Choi, S. (2002b). Antioxidative Activity of Resveratrol and Its Derivatives Isolated From Seeds of *Paeonia Lactiflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(9), 1990-1993.

- Koc, K., Bakir, M., Geyikoglu, F., Cerig, S. (2018). Therapeutic effects of oleuropein on cisplatin-induced pancreas injury in rats. *Journal Of Cancer Research And Therapeutics*, 14(3), 671.
- Koca, N. ve Karadeniz, F. (2005). Gıdalardaki Doğal Antioksidan Bileşikler. *Gıda*, 30(4): 229-236
- Kovacic, P. and Jacintho, JD. (2001). Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem*. 8(7):773-96.
- Kovacic, P., Pozos, R.S., Somanathan, R., Shangari, N., O'Brien, PJ. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem*. 12(22):2601-23.
- Koyuncu, I., Kocyigit, A., Gonel, A., Arslan, E., Durgun, M. (2017). The Protective Effect of Naringenin-O 9 pagesxime on Cisplatin-Induced Toxicity in Rats. *Biochemistry Research International*, Volume 2017
- Koyuncu, I., Tülüce, Y., Slahaddin Qadir, H., Durgun, M., Supuran, C. (2019). Evaluation of the anticancer potential of a sulphonamide carbonic anhydrase IX inhibitor on cervical cancer cells. *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, 34(1), 703-711.
- Kuo, M. (2009). Redox Regulation of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(1), 99-133.
- Larson, R.A. (1988). The Antioxidants of Higher Plants. *Phytochemistry*, 27, 969-978.
- LeBaron, S., Zeltzer, L.K., LeBaron, C., Scott, S.E., Zeltzer, P.M. (1988). Chemotherapy side effects in pediatric oncology patients: drugs, age, and sex as risk factors. *Med Pediatr Oncol*. 16(4):263-8.

- Lee, Y., Kang, Y., Lee, S., Kim, J. (2000). Role of NAD(P)H oxidase in the tamoxifen-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Cell Death and Differentiation*, 7(10), 925-932.
- Loft, S. and Poulsen, H. (1996). Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal Of Molecular Medicine*, 74(6), 297-312.
- Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S., and Doetsch, P. (2013). Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. *Plos ONE*, 8(11), e81162.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 244(22):6049-55.
- Miller, D.M., Buettner, G.R. and Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*. 8(1):95-108.
- Mittal, C.K. and Murad F. (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(10):4360-4.
- Mokhtari, R. B., Homayouni, T.S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* 8(23):38022-38043
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem*. 50(11):3122-8.
- Öğünç, Y. (2018). Hedeflendirilmiş Kanser Tedavisinde Vinkristin ve E-Viniferin Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve İn Vitro Uygulamaları. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

- Ökçesiz, A. (2018). Pitavastatin Sitotoksitesinin Serviks Kanser Hücre (Hela) Hattında Değerlendirilmesi – Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ankara - Farmasötik Toksikoloji Programı
- Partridge, A.H., Burstein, H.J. and Winer, E.P. (2001). Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *JNCI Monographs* (30): 135-142.
- Piver, B., Berthou, F., Dreano, Y., Lucas, D. (2003). Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by ϵ -viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sciences*, 73(9), 1199-1213.
- Privat, C., Telo, J., Bernardes-Genisson, V., Vieira, A., Souchard, J., Nepveu, F. (2002). Antioxidant Properties of -trans - ϵ -Viniferin As Compared to Stilbene Derivatives in Aqueous and Nonaqueous Media. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 50(5), 1213-1217.
- Rabus, Ö, Demirbağ, R., Sezen, Y., Konukoğlu, O., Yildiz, A., Erel, O., Zeybek, R., Yakut, C. (2008). Plasma and tissue oxidative stress index in patients with rheumatic and degenerative heart valve disease. *Turk Kardiyoloji Dernegi Arsivi*
- Renschler, M. (2004). The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. *European Journal Of Cancer*, 40(13), 1934-1940.
- Robledo-Cadena, D.X., Gallardo-Pérez, J., Dávila-Borja, V., Pacheco-Velázquez, S., Belmont-Díaz, J.A., Ralph, S.J., Blanco-Carpintero, B.A., Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S. (2020). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Increase Cisplatin, Paclitaxel, and Doxorubicin Efficacy against Human Cervix Cancer Cells. *Pharmaceuticals* (Basel). 13(12):463.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 82(2):291-5.

- Sotheeswaran, S. and Pasupathy, V. (1993). Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry*, 32(5), 1083-1092.
- Sun, Y., Yang, J., Wang, L.Z., Sun, L.R., Dong, Q. (2014). Crocin attenuates cisplatin-induced liver injury in the mice. *Human and Experimental Toxicology*. 33(8):855-862.
- Takaoka, M.J. (1940). Of the Phenolic Substances of White Hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University*, 3, 1-16.
- Tandoğan, N. (2018). Sisplatinin Nanopartiküller Aracılığıyla Hela Hücre Hattı Üzerine Etkisi- Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Toplu, Y., Parlakpınar, H., Sapmaz, E., Karatas, E., Polat, A., Kizilay, A. (2014). The Protective Role of Molsidomine on the Cisplatin-Induced Ototoxicity. *Indian Journal Of Otolaryngology And Head and Neck Surgery*, 66(3), 314-319.
- Trachootham, D., Alexandre, J. and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7), 579-591.
- Tsikouras, P., Zervoudis, S., Manav, B., Tomara, E., Iatrakis, G., Romanidis, C., Bothou, A., Galazios, G. (2016). Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *J BUON*. 21(2):320-5.
- Valko, M., Morris, H., Mazúr, M., Raptá, P., Bilton, RF. (2001). Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim Biophys Acta*. 1527(3):161-6.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, CJ., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 266(1-2):37-56.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MT., Mazur, M., Telser, J. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.

Xue, Y., Di, J., Luo, Y., Cheng, K., Wei, X., Shi, Z. (2014). Resveratrol Oligomers for the Prevention and Treatment of Cancers. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, Volume 2014, 1-9.

Yang, R., Wang, J., Liu, Z., Pei, X., Han, X., Li, Y. (2011). Antioxidant Effect of a Marine Oligopeptide Preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) by Enzymatic Hydrolysis in Radiation Injured Mice. *Marine Drugs*, 9(11), 2304-2315.

Zhu, X., Zhu, H., Luo, H., Zhang, W., Shen, Z., Hu, X. (2016). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Design, Development And Therapy*, 10: 1885–1895.

zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2(5):342-50.

http-1: <https://scitechdaily.com/octopus-like-tentacles-help-cancer-cells-invade-the-body-new-insight-on-a-fundamental-mechanism-in-all-living-cells/> (Erişim tarihi: 20.04.2022)

http-2:[https://www.who.int/news/item/11-04-2022-one-dose-human-papillomavirus-\(hpv\)-vaccine-offers-solid-protection-against-cervical-cancer](https://www.who.int/news/item/11-04-2022-one-dose-human-papillomavirus-(hpv)-vaccine-offers-solid-protection-against-cervical-cancer) (Erişim tarihi: 30.03.2022)

http-3:https://www.freepik.com/premium-vector/stages-cervical-cancer_11097280.htm (Erişim tarihi: 29.04.2022)