

**MCF-7 HÜCRELERİNDE OKSİDATİF HASARA KARŞI CİSPLATİN İLE
KOMBİNASYONDA RESVERATROLÜN SİNERJİK ETKİSİ VE OKSİDATİF
STRES İNDEKSİ**

Arda SEVER

Eskişehir 2018

**MCF-7 HÜCRELERİNDE OKSİDATİF HASARA KARŞI CİSPLATİN İLE
KOMBİNASYONDA RESVERATROLÜN SİNERJİK ETKİSİ VE OKSİDATİF
STRES İNDEKSİ**

Arda SEVER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2018

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1610S658 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

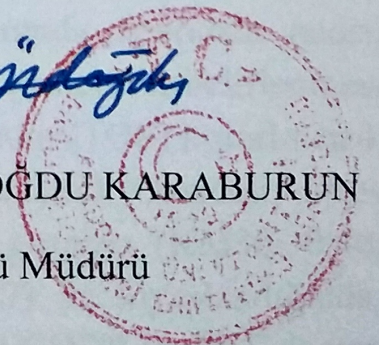
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Arda Sever'in "MCF-7 Hücrelerinde Oksidatif Hasara Karşı Cisplatin ile Kombinasyonda Resveratrolün Sinerjik Etkisi ve Oksidatif Stres İndeksi" başlıklı tezi 20/06/2018 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca Biyokimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez danışmanı)	: Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR	
Üye	: Prof. Dr. Zerrin SELLER	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Fahrettin AKYÜZ	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü



ÖZET

MCF-7 HÜCRELERİNDE OKSİDATİF HASARA KARŞI CİSPLATİN İLE KOMBİNASYONDA RESVERATROLÜN SİNERJİK ETKİSİ VE OKSİDATİF STRES İNDEKSİ

Arda SEVER

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2018

Danışman: Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Dünya genelinde, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme kanser neden olmaktadır. Meme kanseri, kadınlarda en sık rastlanan kanser türü olması nedeni ile önemli bir sağlık problemidir. Cisplatin (CDDP); akciğer, rahim, meme, testis ve beyin kanseri gibi pek çok kanser türüne karşı sıklıkla uygulanan bir kemoterapi ajanıdır. Cisplatin, hücrelerde DNA hasarı ve oksidatif stres oluşturarak etki göstermektedir. Resveratrol (RSV), kuvvetli antioksidan özelliğe sahip olan, stilbenler grubuna ait bir flavonoiddir. RSV'nin anti-kanser, östrojenik/anti-östrojenik, anti-inflamatuvar, anti-koagulant ve dolaşım sistemini koruyucu gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, CDDP ve RSV'nin kombinasyon halinde kullanımının, MCF-7 meme adenokarsinom hücreleri üzerindeki apoptotik ve oksidatif stres oluşturuıcı etkileri ele alınmıştır. CDDP ve RSV'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacı ile MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT deneyi sonucunda CDDP ve RSV'nin IC₅₀ değerleri sırasıyla 96±12 µM ve 180±16 µM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen IC₅₀ değerlerinin yüzdeleri üzerinden KM30 (28,8 µM CDDP + 54 µM RSV) ve KM40 (38,4 µM CDDP + 72 µM RSV) kombinasyonları oluşturulmuştur. CDDP, RSV ve kombinasyonların hücreler üzerindeki apoptotik etkileri, Annexin/PI, MMP ve TUNEL yöntemleri ile belirlenmiştir. KM40 kombinasyonu, apoptozun belirlenmesi amacı ile yapılan tüm deneylerde, CDDP ve RSV'nin tek başına uygulandığı gruplardan daha yüksek oranda apoptoza neden olmuştur. Maddelerin hücrelerin oksidatif dengeleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacı ile Total Antioksidan Durum (TAS) ve Total Oksidan Durum (TOS) kolorimetrik yöntemleri kullanılmış ve bu deneylerden alınan veriler kullanılarak Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplanmıştır. Kombinasyon uygulanan hücre grupları (KM30: 0,70, KM40: 1,60), tek başına cisplatin uygulanan grup (OSI: 1,97) ile kıyaslandığında, oksidatif stresin azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak düşük doz CDDP ve RSV içeren KM30 ve KM40 kombinasyonları, apoptotik ölümü indükleyerek MCF-7 hücre büyümesini sinerjistik bir şekilde inhibe etmiş ve hücrelerde CDDP aracılığı ile oluşan oksidatif stresi azaltmıştır.

Anahtar Sözcükler: Cisplatin, Resveratrol, MCF-7, Apoptoz, Oksidatif Stress

ABSTRACT

SYNERGISTIC EFFECT OF RESVERATROL IN COMBINATION WITH CISPLATIN AGAINST OXIDATIVE DAMAGE AND OXIDATIVE STRESS INDEX ON MCF-7 CELLS

Arda SEVER

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2018

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Cancer is the most common cause of death after cardiovascular diseases. Breast cancer is an important health problem with the reason that it is the most common type of cancer in women. Cisplatin (CDDP) is a widely used chemotherapeutic agent against lung, cervix, breast, testicle and brain cancers. Cisplatin's anticancer activity comes from its ability to induce DNA damage and oxidative stress in cells. Resveratrol (RSV) is a potent antioxidant flavonoid belonging to stilbenoids. It has been shown that RSV has many biological activities including anti-cancer, estrogenic/ anti-estrogenic, anti-inflammatory, anti-coagulant and cardioprotective activity. Within the scope of this thesis study, apoptotic and oxidative stress inducing effects of CDDP and RSV combinations against MCF-7 breast adenocarcinoma cells was investigated. MTT assay was used to determine the cytotoxic effects of CDDP and RSV. IC₅₀ values of CDDP and RSV was found at 96±12 µM and 180±16 µM respectively. KM30 (28,8 µM CDDP + 54 µM RSV) and KM40 (38,4 µM CDDP + 72 µM RSV) combinations were prepared from percentages of IC₅₀ doses. To evaluate the apoptotic effects of CDDP, RSV and combinations; Annexin V-FITC/PI, MMP and TUNEL assays were conducted. In all of the experiments that were conducted to detect apoptosis, KM40 combination caused the highest apoptotic response. In order to determine the compounds effect on cells oxidative balance, Total Antioxidant Status (TAS) and Total Oxidant Status (TOS) colorimetric assays were used and by using the data from these assays, Oxidative Stress Index (OSI) was calculated. When compared to the cisplatin-only group (OSI: 1,97), combinations (KM30: 0.70, KM40: 1,60) reduced the oxidative stress of cells. In conclusion, combinations of low doses of CDDP and RSV, synergistically inhibited the growth of MCF-7 cells by inducing apoptosis and reduced the oxidative stress caused by CDDP.

Keywords: Cisplatin, Resveratrol, MCF-7, Apoptosis, Oxidative Stress

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca her konuda yanımda olan, insanı motive eden güler yüzünü hiç eksik etmeyen, bana bilim ve hayata dair çok şey öğreten danışman hocam sevgili Filiz ÖZDEMİR'e,

Bilgisi ve tecrübesi ile bölümümüze yol gösteren, tez çalışmalarım sırasında bana farklı bakış açıları göstermiş olan hocam sevgili Zerrin SELLER'e,

Teorik bilgimin evriminde büyük rol oynayıp, sayesinde hücre kültürü ve akış sitometrisi hakkında çok şey öğrendiğim, en iyi ve en kötü günümde her zaman yanımda olmuş olan arkadaşım Şennur GÖRGÜLÜ'ye,

Aynı laboratuvarında olmaktan büyük keyif duyduğum, fikirleri ve yardımları ile beni her zaman desteklemiş olan Kadri GÜLEÇ, Yüksel ÖĞÜNÇ ve Mine EZER'e,

Bana düşünmeyi ve düşünene saygıyı aşılayıp, sorgulamanın ve bilginin gücünü öğretmiş olan, tüm eğitim hatayım boyunca her koşulda ve her konuda beni desteklemiş olan aileme, içten teşekkürlerimi sunarım.

Aileme...

20.06.2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Arda SEVER



İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.1.1. Meme kanseri	1
1.1.1.1. MCF-7 hücre hattı	2
1.2. Apoptoz	3
1.2.1. Kaspazlar	5
1.2.2. Apoptozun mekanizmaları	7
1.2.2.1. Ölüm reseptörü yolağı	7
1.2.2.1.1. Ölüm reseptörü yolağının düzenlenmesi	8
1.2.2.2. Granül ekzositoz yolağı	9
1.2.2.3. Mitokondriyal yolak	11
1.2.2.3.1. Mitokondriyal yolağın düzenlenmesi	11
1.2.2.4. Endoplazmik retikulum yolağı	12
1.3. Serbest Radikaller	14
1.4. Antioksidanlar	16
1.4.1 Resveratrol	18
1.5. Oksidatif Stres	20
1.6. Cisplatin	22
2. GEREÇLER	24
2.1. Kullanılan Laboratuvarlar ve Hücre Hattı	24
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24

2.3. Kullanılan Cihazlar	24
3. YÖNTEMLER	26
3.1. Hücre Kültürü.....	26
3.1.1. Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması	26
3.2. Etken Madde Dozlarının Hazırlanması.....	26
3.2.1. Cisplatin.....	26
3.2.2. Resveratrol	26
3.3. Sitotoksikite Testleri.....	27
3.3.1 Cisplatin ve resveratrolün sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	27
3.3.1.1 <i>MTT yönteminin uygulanması</i>	28
3.3.1.2 <i>İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi</i>	28
3.3.2 Kombinasyon dozlarının belirlenmesi ve sitotoksik etkilerinin araştırılması.....	28
3.3.3 Kombinasyon indeksinin belirlenmesi	28
3.4 Apoptozun Belirlenmesi	29
3.4.1 Annexin V-FITC/PI yöntemi	29
3.4.1.1 <i>Yöntemin uygulanması</i>	30
3.4.2 Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi.....	30
3.4.2.1 <i>Yöntemin uygulanması</i>	31
3.4.3 TUNEL yöntemi.....	31
3.4.3.1 <i>Yöntemin uygulanması</i>	32
3.5 Hücrelerdeki Oksidatif Dengenin Belirlenmesi	32
3.5.1 Total Oksidan Durum (TOS) yöntemi.....	32
3.5.1.1 <i>Yöntemin uygulanması</i>	33
3.5.2 Total Antioksidan Durum (TAS) yöntemi.....	34
3.5.2.1 <i>Yöntemin uygulanması</i>	34
3.5.3 Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) belirlenmesi	35
3.6 İstatistiksel Analiz.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1 Sitotoksikite Bulguları	36
4.1.1 Cisplatin ve resveratrolün sitotoksik etkileri	36
4.1.2 Cisplatin ve resveratrol kombinasyonlarının sitotoksik etkileri	37
4.1.3 Kombinasyon indeksi bulguları.....	37

4.2 Apoptoz Bulguları.....	38
4.2.1 Annexin V-FITC/PI	38
4.2.2 Mitokondriyal membran potansiyeli bulguları.....	40
4.2.3 TUNEL.....	41
4.3 Hücrelerin Oksidatif Denge Durumları.....	42
4.3.1 TOS ve TAS bulguları	42
4.3.2 OSI değerinin hesaplanması	43
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	44
KAYNAKÇA.....	49

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Enzimatik antioksidanlar ve serbest radikaller ile girdikleri reaksiyonlar.....	17
Tablo 1.2. Resveratrol ile uygulandığında hücrelere karşı terapötik etkisi artan ilaçlar ve etki mekanizmaları..	19
Tablo 4.1. Cisplatin ve resveratrolün IC ₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda MCF-7 hücreleri canlılığına etkisi.....	37
Tablo 4.2. Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri.....	38
Tablo 4.3. Akım sitometri cihazından alınan grafiklerde, hücrelerin alanlara göre dağılımı	39
Tablo 4.4. Akım sitometri cihazından alınan grafiklerde, hücrelerin alanlara göre dağılımı.	41
Tablo 4.5. Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda MCF-7 hücreleri DNA fragmentasyonuna etkileri.....	42
Tablo 4.6. Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda MCF-7 hücreleri total oksidan ve antioksidan durumuna etkileri.	43
Tablo 4.7. TOS ve TAS deney sonucu üzerinden hesaplanan ([TOS/TAS]x100) OSI değerleri.	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. MCF-7 hücrelerinin in vitro ortamda görünüşü.	3
Şekil 1.2. Apoptotik hücrelerde membran büzüşmesi (A), çekirdek yoğunlaşması ve parçalanması (B, C) ile apoptozun en son aşamasında hücrenin apoptotik cisimcik adı verilen parçalara ayrılmasının (D) mikroskopik görüntüsü.	4
Şekil 1.3. Kaspazların yapısı (A) ve aktivasyonu (B).	6
Şekil 1.4. Ölüm reseptörleri aracılığı ile gerçekleşen apoptoz mekanizması.	8
Şekil 1.5. Lenfosit hücresi içerisindeki salgı lizozomları (a), granüllerin mikrotübüler sistem aracılığıyla hücre membranına taşınımı (b, c), granüllerin, membranda oluşturulan sinapslardan salgılanması sonucu hedef hücre membranında por oluşumu (d) ve hedef hücrede apoptoz kaskadının başlatılması (e).	10
Şekil 1.6. Reaktif oksijen türlerinin oluşum yolları.	15
Şekil 1.7. Resveratrolün biyosentezi ve kimyasal yapısı.	19
Şekil 1.8. Resveratrolün antikanser etkilerinin altında yatan potansiyel mekanizmaları özetleyen şematik bir diyagram.	20
Şekil 1.9. Cisplatinin oluşturduğu DNA hasarı ve oksidatif stres sonucunda oluşturulan apoptotik yanıt.	23
Şekil 3.1. Formazan tuzunun oluşumu.	27
Şekil 3.2. Annexin V-FITC/PI boyama ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi.	29
Şekil 4.1. Cisplatin konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda MCF-7 hücre canlılığına etkisi (kontrol göre; **p < 0.01, *p < 0.05).	36
Şekil 4.2. Resveratrol konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda MCF-7 hücre canlılığına etkisi (kontrol göre; ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05).	36
Şekil 4.3. Cisplatin ve resveratrolün IC ₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda MCF-7 hücre canlılığına etkisi (kontrol göre; **p < 0.01, *p < 0.05).	37
Şekil 4.4. Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların sitotoksisite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri (CI<1(Sinerjist), CI=1(Aditif), CI>1(Antagonist)).	38

Şekil 4.5. Cisplatin ve resveratrolün IC ₅₀ ile IC ₈₀ dozlarının ve [CDDP+RSV] kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri.....	39
Şekil 4.6. Cisplatin ve resveratrolün IC ₅₀ , IC ₈₀ dozlarının ve [CDDP+RSV] kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, MCF-7 hücreleri mitokondriyal membran potansiyeline etkileri	40
Şekil 4.7. Cisplatin ve resveratrolün IC ₅₀ , IC ₈₀ dozlarının ve [CDDP+RSV] kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, MCF-7 hücreleri DNA fragmentasyonuna etkileri	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta\psi_{mt}$: Mitokondri membran potansiteli
μM	: Mikro molar
AIF	: Apoptoz uyarıcı faktör
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
ATF3	: Transkripsiyon faktörü-3 aktive edici
ATM	: Ataksi telanjiektazi geni
Bcl-2	: B hücreli lenfoma - 2
Bcl-XL	: B hücreli lenfoma – ekstra büyük
BH	: Bcl-2 homoloji bölgesi
BID	: BH-3 etkileşim bölgesi
BRCA	: Meme kanseri duyarlılık geni
CAD	: Kaspaz ile aktifleşen DNaz
CAT	: Katalaz
Ca⁺²	: Kalsiyum
CDDP	: Cisplatin
Chk2	: Checkpoint kinaz 2
CI	: Kombinasyon indeksi
CoQ₁₀	: Koenzim Q10
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CTL	: Sitotoksik T lenfosit
CTR1	: Bakır taşıyıcı 1
cyt C	: Sitokrom C
c-FLIP	: Hücresel FLICE inhibitörü protein
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
DcR3	: Yem reseptörü 3
DD	: Ölüm bölgesi
DED	: Ölüm etkili bölge
DIABLO	: Direkt IAP'a bağlanan mitokondriyal proteini
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DNA	: Deoksiribo nükleik asit

DNA-PK	: DNA bağımlı protein kinaz
DR	: Ölüm reseptörü
dUTP	: Deoksiüridin trifosfat
d(ApG)	: Deoksiadenozin monofosfat guanozin
d(CpG)	: Deoksisitidil-deoksiguanozin
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EMT	: Epitelden mezenkimale geçiş
EndoG	: Endonükleaz G
ER-α	: Östrojen reseptörü alfa
FADD	: Fas ilişkili ölüm bölgesi protein
FASR	: Fas reseptörü
FASL	: Fas ligandı
FITC	: Floresin izotiyosiyonat
FoxO	: Forkhead box proteini O
GR	: Granzim
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
HIF-1a	: Hipoksi ile indüklenen faktör-1a
HtrA2	: Yüksek sıcaklık proteazı A2
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
ICAD	: Kaspaz ile aktifleşen DNaz inhibitörü
IC₅₀	: %50 inhibe eden konsantrasyon
IC₈₀	: %80 inhibe eden konsantrasyon
KM	: Kombinasyon
MAP	: Mitojen aktivatörü protein
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7 hücre hattı
MM	: Multipl miyeloma
MMP	: Mitokondriyal membran potansiyeli
mmol/L	: Milimolar/litre
MOMP	: Mitokondri dışı membran geçirgenliği
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NF-κB	: Nükleer faktör- kappaB
NHL	: Non-Hodgkin Lösemi
NK	: Doğal öldürücü hücre
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
NUMA	: Çekirdek mitotik aparat proteini
OH·	: Hidroksil radikali
OSI	: Oksidatif stres indeksi
O₂	: Süperoksit radikali
PARP	: Çoklu (ADP-riboz) polimeraz
ROCK-1	: Rho ilişkili sarmal içeren protein kinaz 1
ROOH	: Organik peroksit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RSV	: Resveratrol
Se-OH	: Selenol
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAS	: Total antioksidan durum
TdT	: Terminal deoksinükleotidil transferaz
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNBC	: Üçlü negatif meme kanseri
TRADD	: Ölüm Bölgesi TNFR Adaptör Protein
TRAIL	: Tümör nekroz faktör ilişkili, apoptoz oluşturucu ligand
TOS	: Total oksidan durum
UV	: Ultraviyole
5-FU	: 5-Floroaçil
8-OHG	: 8-hidroksideoksi guanozin

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, vücudun herhangi bir dokusundaki sağlıklı hücrelerin, kontrolsüz bir hale dönüşmesi sonucunda oluşan geniş bir hastalık grubudur. Kanseri hücreleri; buldukları doku, hücre tipi ve sahip oldukları mutasyonlara göre farklılıklar göstermektedir. Kanseri terimi altında farklı fenotip ve genotipe sahip yüzden fazla hücre tipi bulunmaktadır. Kanseri görüldüğü doku tipine göre karsinoma, sarkoma, lösemi ve lenfoma olmak üzere dört gruba ayırmak mümkündür. Kanseri hücreleri kontrolsüz bölünme ve dolaşım sistemleri aracılığı ile başka dokuları istila edebilme (metastaz) özelliklerine sahiptirler. Kanseri hücrelerinin metastaz yeteneği, kanserden ölümlerin önemli nedenlerinden biridir (http-1, Güleç, 2016).

Sağlıklı hücrelerin kanserli hücrelere dönüşümü, DNA’da meydana gelen mutasyonlar sonucu gerçekleşmektedir. Kanserileşmeye neden mutasyonların büyük bir çoğunluğu serbest radikaller, iyonize edici ışınlar, morötesi ışınlar, kanserojen ajanlar ve viral enfeksiyonlar gibi etmenler sonucu oluşmaktadır. Bireyin genetik mirası ve hücrelerde bölünme sırasında oluşabilen DNA replikasyon hataları da bu mutasyonların oluşumuna sebep olan etmenlerdir (Hyndman, 2016).

Ülkemizde ve dünyada hastalık sonucu ölüm verileri incelendiğinde, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada kanseri yer almaktadır. Kanseri, büyük bir toplum sağlığı problemi olması nedeni ile bilim dünyasının dikkatini çekmekte ve kanserin oluşum, gelişim ve yayılım mekanizmalarının aydınlatılması ve tedavisi üzerine her yıl pek çok araştırma gerçekleştirilmektedir. Dünya çapında 2012 yılı verilerine göre; 14.1 milyon yeni kanseri vakası, 8.2 milyon kansere bağlı ölüm ve 32.6 milyon kanserli hasta (tanı konulduğu 5 yıl içinde) bulunmaktaydı. Türkiye’de ise her yıl yaklaşık 163.500 yeni kanseri vakası teşhis edilmektedir. Ülkemizdeki ölüm istatistikleri incelendiğinde, kanseri nedenli ölümler tüm ölümlerin yaklaşık %20’sini oluşturmaktadır. Kanseri, 2015 yılı içerisinde 49.946 erkeğin ve 27.022 kadının ölümüne neden olmuştur (http-2, http-3).

1.1.1. Meme kanseri

Meme kanseri dünyada en sık rastlanan ikinci kanseri türüdür. Kadınlarda ise en sık rastlanan kanseri türü olup, 2012 yılında 1.67 milyon kadına meme kanseri tanısı konulmuş (kanseriilerin %25,1’i) ve 521 bin kadın ölmüştür (http-3).

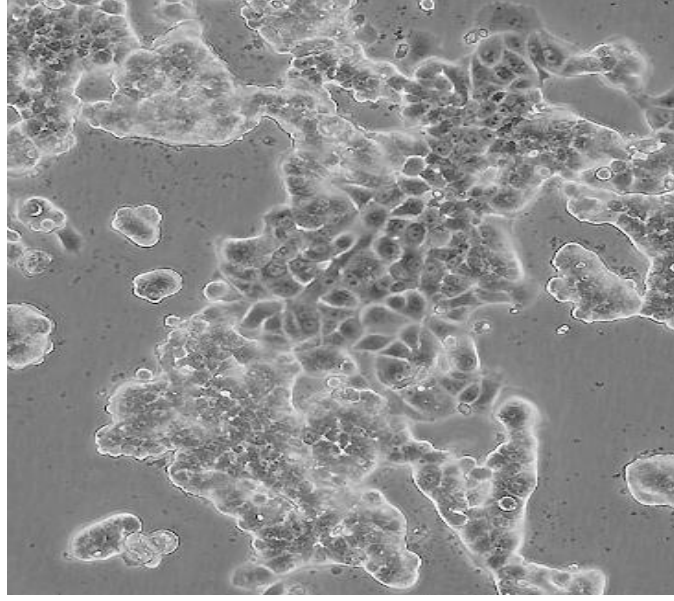
Kalıtım yolu ile aktarılabilen meme kanseri yatkınlık genleri (özellikle *BRCA1* ve *BRCA2*), obezite, alkol kullanımı, yüksek östrojen miktarı ve yaş, meme kanserinde ana risk faktörleridir. *BRCA 1* ve *BRCA2*, DNA tamir mekanizmasında rol oynayan tümör baskılayıcı genlerdir. Meme kanseri vakalarının yaklaşık %10'unda bu iki genin mutasyona uğradığı gözlemlenmektedir (Klevos vd., 2017).

Meme kanseri, genellikle memenin süt üretimini sağlayan bez ve lobüllerinde oluşmaktadır. Bu tümörleri oluşturabilen farklı kökene sahip pek çok hücre tipi olması, meme kanserinin tanı ve tedavisinde zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Özellikle epidermal büyüme faktörü, östrojen ve progesteron reseptörlerini barındırmayan üçlü-negatif meme kanserinin (TNBC), insidansı ve mortalitesi oldukça yüksektir (Hutchinson, 2010).

1.1.1.1. MCF-7 hücre hattı

MCF-7 hücreleri ilk kez Dr. Soule tarafından, metastatik meme kanserine sahip olan 69 yaşında bir kadının plevral efüzyonundan çoğaltılmıştır ve ismini Michigan Cancer Foundation'dan (MCF) almaktadır. Bu hücre hattı, östrojen reseptörü alfa'ya (ER- α) sahip olan nadir meme kanseri tiplerinden biridir. Yapılan çalışmalar, östrojenin MCF-7 hücre hattı üzerinde anti-apoptotik etkisi olduğunu ve diğer yandan ise tamoxifen gibi anti-östrojenik maddelerin ise hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptotik etki yarattığını göstermiştir. Günümüze kadar yayınlanan 25.000 kadar makale ile MCF-7 hücreleri dünyada en çok çalışılmış meme kanseri hücre hattıdır. MCF-7 hücreleri agresif olmayan ve metastaz potansiyeli düşük bir yapıya sahiptirler (Comşa, Cîmpean ve Raica, 2015; Lee, Oesterreich ve Davidson, 2015).

MCF-7 hücreleri epitel hücrelere benzer bir morfoloji sergilerler ve *in vitro* ortamda tek katman halinde çoğalırlar (Bkz. Şekil 1.1).



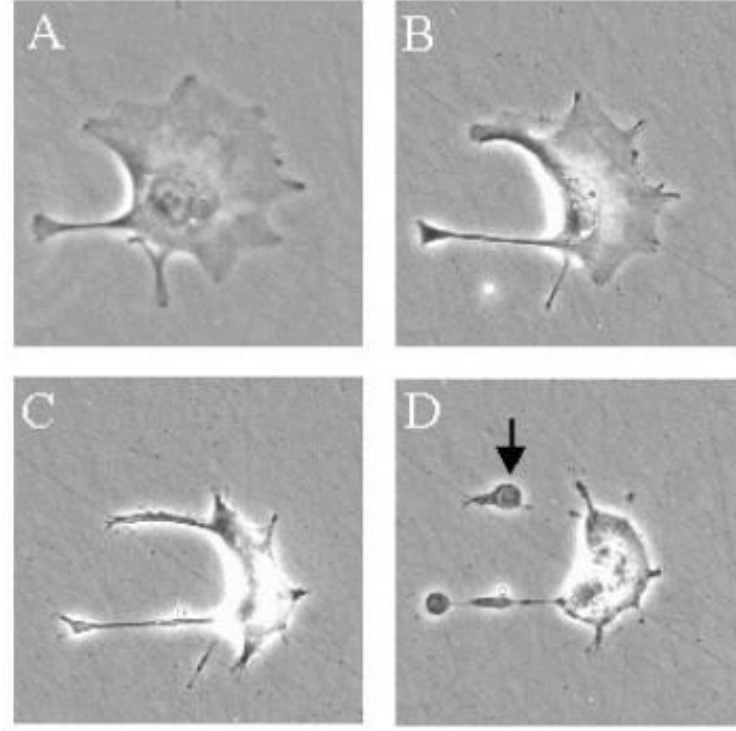
Şekil 1.1. MCF-7 hücrelerinin in vitro ortamda görünüşü (<http-4>).

1.2. Apoptoz

Apoptoz, programlı hücre ölümü mekanizmalarından biridir. Apoptoz terimi ilk olarak 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Kerr ve ark, 1972). Apoptoz mekanizmasını aydınlatma amacıyla yapılan ilk çalışma, gelişim aşamasındaki *Caenorhabditis elegans* türü nematodlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Horvitz, 1999). Ergin hale geçmekte olan *Caenorhabditis elegans* türü nematodlarda 1090 adet somatik hücre bulunur ve gelişimin son aşamalarına doğru bu hücrelerden 131'i programlı bir şekilde ölür. Hücrelerin öldükleri gelişim aşamalarının ve konumlarının *Caenorhabditis elegans* türü nematodlarda hep aynı olması, bu ölüm şeklinin sıkı kontrol edilen bir mekanizma ile gerçekleştirildiğini göstermiştir. Horvitz'in yaptığı çalışmadan günümüze kadar geçen sürede, apoptozun çalışma prensibi ve yolları üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Apoptoz mekanizmasının canlılar için önemi, hücrelerin çevrelerindeki dokuya zarar vermeden ve inflamasyon oluşturmadan yok edilmesini sağlayan bir hücre ölümü tipi olmasıdır. Apoptoz mekanizması başlatılmış hücrelerde büzüşme, kromatin yoğunlaşması ve piknozis gibi morfolojik değişiklikler ve bununla beraber, kaspaz aktivasyonu, hücre iskeleti ve DNA'nın parçalanması gibi biyokimyasal olaylar gerçekleşmektedir. Apoptozun en son aşamasında ise hücreler apoptotik cisimcik adı verilen küçük parçalara ayrılırlar (Bkz. Şekil 1.2). Oluşan bu parçacıklar, dokuya zarar vermeden, çevrede bulunan fagositoz özelliğine sahip hücreler tarafından yok edilirler.

Apoptotik cisimciklerin fagosite edilemediği durumlarda sekonder nekroz adı verilen durum ortaya çıkmaktadır (Hacker, 2000; Saraste ve Pulkki, 2000; Ziegler, 2004; Koff, Ramachandiran ve Bernal-Mizrachi, 2015).



Şekil 1.2. Apoptotik hücrelerde membran büzüşmesi (A), çekirdek yoğunlaşması ve parçalanması (B, C) ile apoptozun en son aşamasında hücrenin apoptotik cisimcik adı verilen parçalara ayrılmasının (D) mikroskopik görüntüsü (<http-5>).

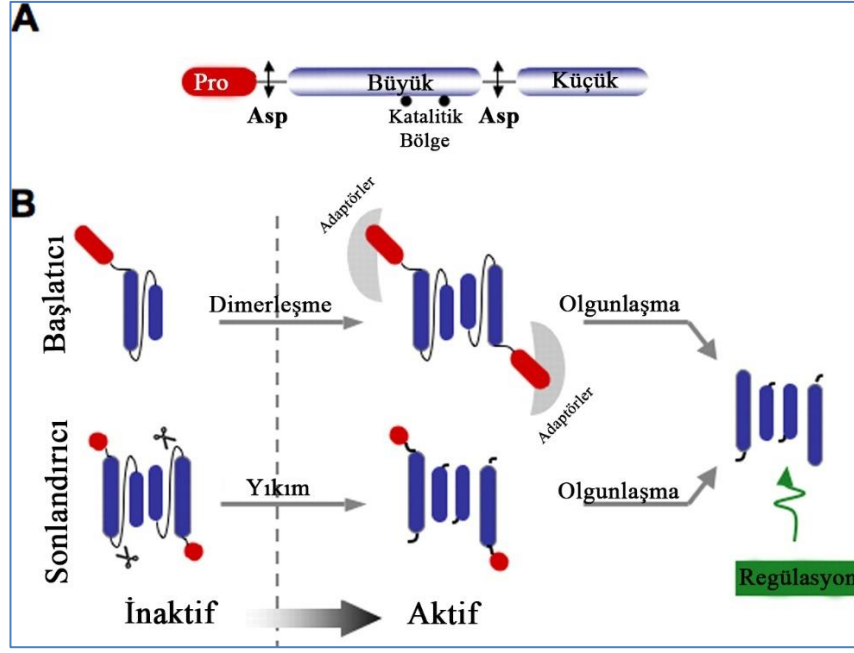
Evrimsel açıdan, programlı hücre ölümleri çok hücreli yaşamın sürdürülebilmesini sağlayan kilit noktalardan biri olmuştur. Kaspaz benzeri proteaz enzimleri ile gerçekleştirilen bir ölüm mekanizmasının ilk izlerine, çok hücreliliğe geçiş aşaması olduğu düşünülen bazı siyanobakteri kolonilerinde rastlanmıştır. Programlı hücre ölümü tiplerinden biri olan ve kaspaz enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilen apoptoz mekanizmasına ise hayvanlar alemine üye her canlıda rastlanmaktadır. Bu mekanizmanın metabolik yolları, hayvanlar alemi sınıfları arasında dikkate değer bir ölçüde benzerlik göstermektedir (Ameisen, 2002; Berman-Frank vd., 2004; Zmasek vd., 2013; Green ve Fitzgerald, 2016).

Apoptoz, çok hücreli organizmaların embriyonik dönemlerinden ölümlerine kadar aktif bir şekilde çalışan bir mekanizmadır. Embriyoda doku bütünlüğünün ve fenotipinin sağlanması apoptotik hücre ölümü ile gerçekleştirilir. Bu durumun en tipik örneği,

embriyonik gelişim sırasında, el ve ayak parmaklarındaki hücrelerin apoptoz mekanizması ile parmak aralarını oluşturmasıdır. Apoptozun diğer bir görevi de anormal hücrelerin yok edilmesidir. Hücre ve çevresindeki dokuyu risk altında bırakan DNA hasarı ve viral enfeksiyonlar gibi durumlarda apoptoz, hücrenin kontrollü bir şekilde yok edilmesini sağlamaktadır. Apoptozun metabolik yollarında oluşan hatalar sebebiyle fazla ya da az çalışması, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserin oluşumunda büyük rol oynamaktadır (Wu, Ding ve Fisher, 2001; Anita vd., 2014).

1.2.1. Kaspazlar

Apoptozu diğer hücre ölümü mekanizmalarından ayıran noktalardan biri kaspaz enzimlerinin aktivasyonudur. Kaspazlar, apoptoz sürecinin başlangıcından sonuna kadar kilit rol oynayan enzimlerdir. Bu enzimler, aktif bölgelerindeki sistein aminoasidi aracılığı ile substratlarının aspartat aminoasidine bağlı peptit bağlarını hidrolize eden, sistein proteaz enzim ailesine ait endoproteazlardır. Kaspazlar substratlarına karşı yüksek bir özgülüğe sahiptir. Bu enzimlerin katalitik aktivitelerini gösterebilmeleri için spesifik bir peptit sekansının enzimin aktif merkezine yerleşmesi gerekmektedir. Kaspazların inaktif olan monomer (zimojen, prokaspaz) formları hücrelerde yoğun bir şekilde eksprese edilmektedir. Sentezlenen tüm prokaspazların temel yapılarında N-terminal prodomain, büyük alt ünite ve küçük alt ünite yer alır (Bkz. Şekil 1.3). Kaspazların aktif hale geçebilmeleri için, aynı ünitelerden oluşan iki prokaspaz monomerinin bir araya getirilerek dimer oluşturması gerekmektedir (Mackenzie ve Clark, 2012).



Şekil 1.3. Kaspazların yapısı (A) ve aktivasyonu (B) (Pop ve Salvesen, 2009).

Kaspazlar görevlerine göre apoptozda (kaspaz-2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10) ve inflamasyonda (kaspaz-1, 4, 5 ve 12) rol oynayanlar olarak iki gruba ayrılmıştır. Apoptozda görev alan kaspazlar ayrıca başlatıcı (kaspaz-2, 8, 9 ve 10) ve sonlandırıcı (kaspaz-3, 6 ve 7) alt gruplarını içerir.

Apoptozun ilk evrelerinde aktif hale geçen başlatıcı kaspazlar, enzimatik aktiviteleri ile sonlandırıcı kaspazların aktivasyonunu sağlamak ile görevlidirler. Sonlandırıcı kaspazlar ise sitokeratinler, PARP, hücre iskeleti proteinleri gibi yapıların enzimatik olarak yıkımından sorumludurlar (Slee, Adrain ve Martin, 2001; McIlwain, Berger ve Mak, 2013; Behzadi ve Ranjbar, 2015). Kaspaz-3, sonlandırıcı kaspazlardan en önemlisi olarak bilinmektedir. Kaspaz-3'ün apoptoz sürecindeki rollerinden biri, endonükleaz enzim olan CAD'ın aktivasyonudur. Sağlıklı hücrelerde CAD, inhibitörü olan ICAD ile bağlanmış bir şekilde inaktif halde bulunur. Kaspaz-3 enzimi proteolitik aktivitesi ile CAD'ın ICAD'dan ayrılmasını sağlayarak DNA yıkımı ve kromatin yoğunlaşmasını başlatır. Kaspaz-3'ün substratı olan bir diğer proteinde jelsolindir. Jelsolin, hücre iskeletini oluşturacak aktin polimerleşmesinin başlangıç noktasıdır ve fosfatidilinositol ile beraber aktin organizasyonu için gereken sinyal iletimini gerçekleştirir. Jelsolin, aktif hale geçirilen kaspaz-3 tarafından parçalara ayrılır ve bu parçalarda aktin filamentlerinin proteolitik yıkımını sağlayarak hücrenin iskelet sistemi,

taşıma sistemi, bölünme ve sinyal iletimi gibi yapı ve faaliyetlerine zarar verir (Sakahira, Enari ve Nagata, 1998; Behzadi ve Ranjbar, 2015).

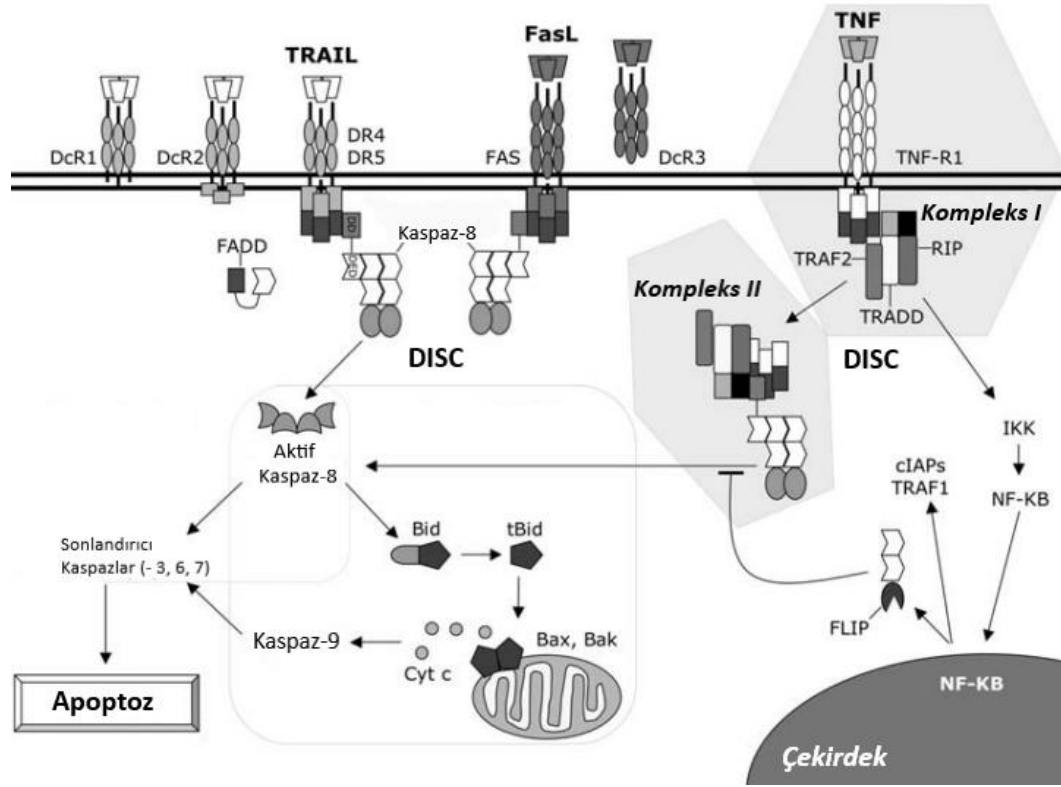
1.2.2. Apoptozun mekanizmaları

Apoptoz mekanizmasını başlatılma şekline göre dış ve iç yolak olmak üzere iki ana başlığa ayırmak mümkündür. Dış yolak ölüm reseptörü ve granüler ekzositoz, iç yolak ise mitokondriyal ve endoplazmik retikulum yolakları ile gerçekleştirilebilmektedir.

1.2.2.1. Ölüm reseptörü yolağı

Apoptozun dış yolağı, sitotoksik T lenfosit (CTL) ve doğal öldürücü hücreler “natural killer” (NK) tarafından, enfekte veya kanserleşen hücelere karşı üretilen ölüm ligandlarının, hücre zarında yer alan ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır. Ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktör (TNF) gen ailesinde yer almaktadır. TNF ailesinde yer alan tüm reseptörlerde, 80 amino asitten oluşan, sisteince zengin ölüm bölgesi “death domain” (DD) bulunur. Reseptörlerin yapısındaki ölüm bölgeleri, apoptozun iç yolak kaskatını başlatacak olan sinyalin oluşturulmasında rol oynamaktadır. Günümüzde etkileşimleri en iyi anlaşılmış ölüm reseptörü ve ligandları; FasR/FasL, TNFR1 /TNF- α , DR3/Apo3L, DR4/Apo2L ve DR5/Apo2L’dir (Ashkenazi ve Dixit, 1998; Elmore, 2007).

Ölüm ligandının reseptörü ile etkileşimi ardından, sitoplazmada yer alan adaptör proteinler reseptörün ölüm bölgesine bağlanırlar. Adaptör proteinlerin yapısında reseptörleri ile bağlantı kurmalarını sağlayan bir ölüm bölgesi ve bir ölüm etkili bölge “death effector domain” (DED) yer almaktadır. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması sonucu ölüm bölgesine FADD (Ölüm Bölgesi Fas Adaptör Proteini), TNFR1/TNF- α reseptör/ligand etkileşimi sonrasında ise ölüm bölgesine TRADD (Ölüm Bölgesi TNFR Adaptör Protein) bağlanmaktadır (Bkz. Şekil 1.4). Adaptör proteinin reseptör ile oluşturduğu yapıya, üzerinde DED bölgesi bulunan prokaspaz 8 ve 10 bağlanabilmektedir (Hsu, Xiong ve Goeddel, 1995; Kaufmann, Strasser ve Jost, 2012).



Şekil 1.4. Ölüm reseptörleri aracılığı ile gerçekleşen apoptoz mekanizması (Ricci ve El-Deiry, 2007).

Reseptör, adaptör ve kaspazın ölüm bölgeleri ve ölüm etkili bölgeleri ile dimerleşerek oluşturduğu yapıya ölüm indükleyici sinyal kompleksi “death inducing signalling complex” (DISC) adı verilir. Kompleksin oluşumu, prokaspaz 8 veya 10’un oto katalitik aktivite ile aktif kaspaz yapısına dönüşümünü sağlar. Aktif formdaki kaspaz-8 ve 10, başlatıcı kaspazlar olarak bilinmektedir ve enzimatik aktiviteleri ile kaspaz-3, 6 ve 7 gibi hücre ölümünü gerçekleştiren sonlandırıcı kaspazların aktive edilmelerini sağlarlar. Kaspaz-8 aynı zamanda, pro-apoptotik protein olan Bid’in proteolizini sağlayarak apoptozun mitokondriyal yolağını da aktif edebilir (Billen, Shamas-Din ve Andrews, 2008).

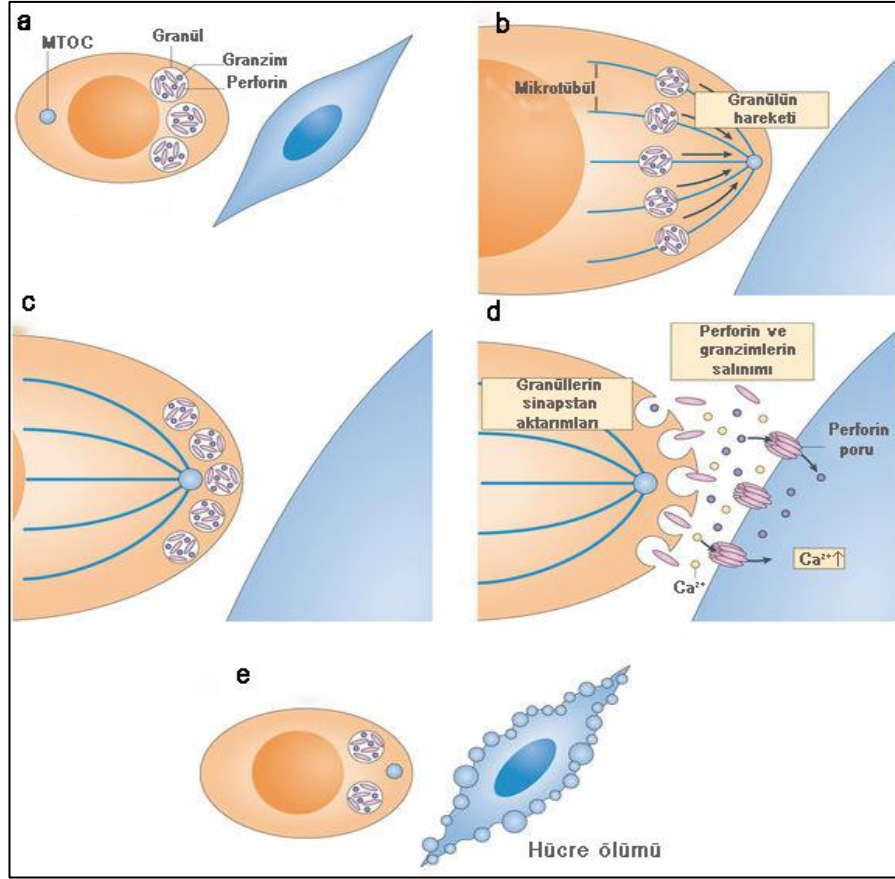
1.2.2.1.1. Ölüm reseptörü yolağının düzenlenmesi

Ölüm reseptörüne bağlı apoptozun pek çok düzenleme noktası bulunmaktadır. Öncelikle, ölüm reseptörlerinin ekspresyonu, hücre tipi ve gelişim aşamasına göre farklılıklar göstermektedir. Örneğin; DR4 ve DR5 reseptörleri yalnızca sağlıklı timüs dokusunda ve çeşitli kanser hücrelerinde belirlenebilmiştir (Burz vd., 2009).

Dış yolağın bir diğer kontrol mekanizması da hücre tarafından üretilen yem “decoy” proteinlerdir. DcR3 ve c-FLIP mekanizmaları en iyi aydınlatılmış yem proteinlerdir. Yem Reseptörü 3 “Decoy Receptor 3” (DcR3), Fas ligandı ile etkileşime girebilen ancak sitoplazmik bölümü olmadığı için apoptotik sinyal oluşturmeyen bir reseptördür. Bu reseptörün sağlıklı insan dokularındaki ekspresyon düzeyi oldukça düşüktür ancak kanser ve otoimmün hastalıklarda ekspresyonunun oldukça arttığı belirlenmiştir. c-FLIP; adaptör proteinler ve başlatıcı kaspazlarda bulunan ölüm etkili bölgeye (DED) sahip bir anti apoptotik proteindir. c-FLIP, DISC oluşumundan önce adaptör proteine bağlanarak prokaspaz-8 ve 10’un aktif forma geçmelerini önler. Pek çok kanser hücresi tipinde c-FLIP ekspresyon düzeyinin aşırı arttığı ve bu artışın hücrelerde ölüm reseptörlerine ve kemoterapötik ilaçlara bağlı gerçekleşecek apoptoza karşı direnç sağladığı belirlenmiştir (Fulda ve Debatin, 2006; Shakibaei, Harikumar ve Aggarwal, 2009; Zhan vd., 2011; Safa, 2012).

1.2.2.2. Granül ekzositoz yolağı

CTL ve NK hücrelerinin rol oynadığı bir diğer apoptoz yolağı da granül ekzositoz yolağıdır. Bağışıklık sisteminin önemli elemanlarından olan bu iki hücre tipi, perforin ve granzim gibi sitolitik molekülleri üreterek salgı lizozomu adı verilen sitotoksik granüller içerisinde depolarlar. Sitotoksik lenfosit hücreleri, enfekte veya kanserleşmiş hücre ile karşılaştıklarında, sitoplazmalarında konumlanan sitotoksik granüller, mikrotübüler sistem aracılığıyla hücre membranına taşınır. Granüller, lenfosit membranında oluşturulan sinapslar aracılığı ile hedef hücreye aktarılırlar. Granül içerisinde yer alan perforin proteini, hedef hücre membranında por yapıları oluşturarak, granzim enzimlerinin sitoplazmaya aktarımını sağlar (Bkz. Şekil 1.5). Granzimler, sitoplazmaya girişlerinin ardından çeşitli hücresel yapıları hedef alan enzimlerdir (Holt, Gallo ve Griffiths, 2006; Cullen, Brunet ve Martin, 2010; Ritter, Angus ve Griffiths, 2013).



Şekil 1.5. Lenfosit hücresi içerisindeki salgı lizozomları (a), granüllerin mikrotübüler sistem aracılığıyla hücre membranına taşınımı (b, c), granüllerin, membranda oluşturulan sinapslardan salgılanması sonucu hedef hücre membranında por oluşumu (d) ve hedef hücrede apoptoz kaskatının başlatılması (e) (Voskoboinik, Whisstock ve Trapani, 2015).

Granzimler, His-Asp-Ser katalitik üçlüsüne sahip serin proteazlardır. Substratlarında yer alan aspartat aminoasidinin peptit bağıni hedeflemeleri açısından kaspaz enzimlerine benzemektedirler. İnsanlarda, aralarında %40 sekans homolojisi bulunan beş adet granzim bulunmaktadır (GrA, GrB, GrK, GrM ve GrH). Granzim B, apoptotik etkisi ile bilinen ve üzerinde en çok çalışma yapılmış olan granzimdir (Ewen, Kane ve Bleackley, 2012). GrB'nin *in vitro* ortamda pek çok prokaspazı (-3, 6, 7, 8, 9 ve 10) substratı olarak kullanarak aktif kaspazların oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir. Kaspazlar dışında GrB'nin α -tubulin ve lamin B gibi hücre yapı proteinlerini hedef aldığı ve apoptozun mitokondriyal yolağında bahsedilecek olan Bid, ICAD, PARP, DNA-PK, ROCK-1 ve NUMA gibi enzim ve apoptotik proteinleri de substratı olarak kullanabildiği ve hücreleri hızlı bir şekilde apoptoza sürüklediği belirtilmiştir (Sutton vd., 2000;

Froelich, Metkar ve Raja, 2004; Ewen, Kane ve Bleackley, 2012; De Poot ve Bovenschen, 2014).

1.2.2.3. Mitokondriyal yolak

Mitokondrinin görev aldığı iç yolak, büyüme faktörü yetersizliği, DNA hasarı, oksidatif stres, hipoksi ya da sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonundaki aşırı artış gibi nedenler ile başlatılır. İç yolak kaskatı başlatıldığında, Bcl-2 ailesine ait pro-apoptotik proteinler olan Bax ve Bak, mitokondri membranında bir araya gelerek por yapısı oluştururlar. Oluşan bu porlar ile membran geçirgenliği artan mitokondriden çeşitli pro-apoptotik proteinler sitozole geçmekte ve hücre ölümünü gerçekleştirmektedir. Mitokondri, dış ve iç olmak üzere iki membrana sahip olan bir organeldir. Mitokondrinin membranlar arası alanında; sitokrom c (cyt C), apoptoz uyarıcı faktörler (AIF), Omi/HtrA2, En-doG, CAD ve Smac/DIABLO gibi pek çok apoptotik protein bulunmaktadır. Apoptotik kaskatın başlatılması ile mitokondriden sitozole geçen sitokrom C; apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1), dATP ve prokaspaz-9 ile bir araya gelerek apoptozom adı verilen bir yapı oluşturur. Apoptozom oluşumu ile başlatıcı kaspaz grubu üyesi olan kaspaz-9'un aktivasyonu sağlanır. Aktif kaspaz-9, proteolitik aktivitesi ile sonlandırıcı kaspazlar olan kaspaz-3, 6 ve 7'nin aktif forma geçmesini sağlamaktadır (Burz vd., 2009; Wong, 2011)

Apoptoz sırasında mitokondriden sitozole geçen apoptoz uyarıcı faktörler (AIF), hücre çekirdeğine girerek DNA'nın ~50– 300 kb'lik parçalara ayrılmasına ve kromatin yoğunlaşmasına neden olurlar. Çekirdeğe giren başka bir enzim olan Endonükleaz G (En-doG), yoğunlaşan kromatinlerin oligonükleozomal DNA parçalarına ayrılmasını sağlar. AIF ve En-doG'den farklı bir şekilde, sitozole geçişinin ardından kaspaz-3 tarafından aktive edilmesi gereken CAD enzimleri de oligonükleozomal DNA parçalarını oluşturmakta ve kromatinlerin çok daha yoğun bir hale geçmesine neden olmaktadır (Sakahira, Enari ve Nagata, 1998; Zhang ve Xu, 2000).

1.2.2.3.1. Mitokondriyal yolağın düzenlenmesi

Apoptozun iç yolağının düzenlenmesinde Bcl-2 ailesine üye proteinler kilit rol oynamaktadır. Bcl-2 proteinleri en az bir adet Bcl-2 homoloji bölgesine (BH-1, 2, 3 ve 4) sahiptir ve görevlerine göre: apoptoz inhibitörleri (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl-B ve A1), apoptoz uyarıcı (Bax, Bak, Bok ve Bcl-XS) ve yalnızca BH-3 bölgesine sahip apoptozu düzenleyici (Bad, Bik, Bid, HrK, Bim, Bmf, Noxa ve Puma) olmak üzere üç

ana grupta toplanmıştır. Bu proteinlerin işlevleri, sahip oldukları homoloji bölgelerine göre farklılaşmıştır. Bcl-2 ailesinin apoptoz inhibitörü grubuna ait olan proteinler, genellikle homoloji bölgelerinin dördünü de yapılarında barındırırlar. Bu proteinler, mitokondri dışı membranında Bax ve Bak proteinlerinin dimerleşerek por yapısı oluşturmasını engelleyerek apoptozun inhibisyonunu sağlarlar. Apoptotik sinyal başlatıldığında, apoptozu düzenleme görevi olan Bcl-2 proteinleri, inhibitör proteinlerin Bax ve Bak ile etkileşimini engeller (Burz vd., 2009; Koff, Ramachandiran ve Bernal-Mizrachi, 2015).

Apoptozu inhibe edici proteinler ailesi (IAP), apoptozun iç yolağının düzenlenmesinde görev alan başka bir önemli protein grubudur. Bu aileye ait olan proteinler çeşitli mekanizmalar ile kaspazların inhibisyonunu sağlarlar. Örneğin, xIAP, survivin ve cIAP1/2, yapılarında buluna N-terminal BIR bölgesi ile kaspaz-3 ve 7'nin aktif merkezine bağlanarak inhibisyon sağlamaktadır. xIAP aynı zamanda prokaspaz-9'un apoptozom yapısına bağlanarak aktif hale geçmesini de engeller. cIAP'ların kaspaz inhibisyonu dışında bir diğer görevi de NF- κ B ve JUNK1 gibi anti-apoptotik mekanizmaları aktif etmektir (Silke ve Meier, 2013; Jaiswal, Goel ve Mittal, 2015).

p53 tümör baskılayıcı geni, hücrelerin yaşam ya da ölüm kararını almasını sağlayan ve hücre ölümünde kritik işleve sahip olan bir gendir. p53 geni sağlıklı hücrelerde baskılanmış halde tutulmaktadır. Hücresel strese yanıt olarak, p53 geni p21 gen ekspresyonunu arttırarak hücre döngüsünü durdurabilir. Hücresel strese neden olan etmenlerin ortadan kalkmadığı veya hücrenin oluşan hasarı tamir edemediği durumlarda p53 geni; Bax, Puma, Noxa, ve p53 ile düzenlenen protein 1 (p53AIP1) gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu sağlayıp apoptozu başlatabilir. p53 proteini aynı zamanda mitokondriye girerek Bcl-2 ve Bcl-XL gibi apoptozu engelleyen proteinleri de inhibe edebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda pek çok kanser hücre hattında p53 geninin mutasyona uğramış olduğu belirlenmiştir (Fridman ve Lowe, 2003; Haupt vd., 2003; Amaral vd., 2010).

1.2.2.4. Endoplazmik retikulum yolağı

Endoplazmik retikulum (ER); protein ve lipidlerin sentezini ve farklılaşmasını gerçekleştiren bir organeldir. Bu organelin en önemli görevlerinden biri protein katlanmalarının gerçekleştirilmesi ve kontrolüdür. ER lümeninde, yeni sentezlenmiş olan proteinlerin doğru bir şekilde katlanmalarını, modifikasyonlarını ve tersiyer yapıya

geçebilmelerini sağlayan; şaperonlar, glikozilasyon enzimleri ve okside edici enzimler gibi elemanlar yer almaktadır. ER enzimlerinin büyük bir çoğunluğu Ca^{2+} bağımlıdır ve doğru çalışabilmek için okside edici bir ortama ihtiyaç duyarlar (Maag, Hicks ve Machamer, 2003; Logue ve Gorman, 2013).

Hipoksi, oksidatif stres, besin yetersizliği, pH değişimi, ER lümenindeki Ca^{2+} miktarının azalması ve doğru katlanmamış proteinlerin ER’de birikimi gibi durumlar genel olarak ER stresi olarak tanımlanır. ER stresi ile birlikte hücrelerde homeostazinin tekrar sağlanabilmesi için, katlanmamış protein yanıtı “unfolded protein response” (UPR) adı verilen bir mekanizma başlatılır. UPR mekanizmasının kontrolü; Pankreatik ER kinaz benzeri (PKR) ER kinaz (PERK), inositol bağımlı enzim 1 ($IRE1\alpha$) ve transkripsiyon aktifleştirici faktör 6 (ATF6) olmak üzere üç transmembran reseptörü tarafından gerçekleştirilir. ER stresinin olmadığı durumda, GRP78 şaperonu üç reseptörde bağlanarak inhibe eder. GRP78, katlanmamış proteinlere karşı reseptörlerden daha yüksek bir afinite göstermektedir ve bu sebeple katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesi ile GRP78 şaperonu reseptörlerden ayrılarak, hücrenin hayatta kalma mekanizmalarından biri olan UPR mekanizmasının çalışmasını tetikler (Kadowaki ve Nishitoh, 2013).

GRP78’in ayrılması ile birlikte aktive olan PERK, ökaryotik translasyon başlatıcı faktör ($eIF-2\alpha$)’ün fosforilasyonunu sağlar. Fosforile olmuş olan $eIF-2\alpha$, protein sentezini durdurur ve hücrenin G1 fazında sabitlenmesine neden olur. Bu durum hücreye, ER’da birikmiş olan katlanmamış proteinleri düzeltmesi ve ER stresini azaltması için zaman kazandırmış olur (Schröder ve Schroder, 2006).

GRP78’in ATF6 reseptöründen ayrılmasının ardından, ATF6 golgi organeline taşınır ve burada bölge-1 proteaz (S1P) ve bölge-2 proteaz (S2P) tarafından proteolitik etki ile aktive edilir. Aktive olmuş olan ATF6 bir transkripsiyon faktörüdür ve proteazlar tarafından aktivasyonu sonucu çekirdeğe yerleşerek: GRP78, GRP94, protein disülfit izomeraz (PDI), EDEM1 ve pro-survival transkripsiyon faktörü X Box Protein 1 (XBP1) gibi ER’deki katlanmamış proteinlerin düzeltilmesini sağlayacak şaperonların transkripsiyonlarını artırır (Schröder ve Schroder, 2006).

$IRE1\alpha$, GRP78’in UPR sonucu aktive ettiği bir diğer reseptördür. Aktif hale geçen $IRE1\alpha$ reseptörü RNaz işlevi kazanmaktadır ve aktivitesi ile sitozolde bulunan XBP1 adlı mRNA’nın 26 nükleotidlik intron bölgesini keserek XBP1s transkripsiyon faktörünün oluşumunu sağlar. XBP1s, doğru katlanmamış proteinlerin sitozolde yıkımını sağlayan

bir mekanizma olan ERAD'ın ve çeşitli transkripsiyon faktörlerinin sentezini sağlamaktadır (Schröder ve Schroder, 2006; Wu vd., 2016).

UPR'de görev alan üç reseptör yolağı da uzun süreli aktivasyon sonrası CHOP ya da GADD 153 adı verilen nükleer transkripsiyon faktörünün üretimine neden olur. ER stresinin UPR mekanizması ile azaltılmadığı durumda CHOP aşırı eksprese edilmeye başlar. CHOP, hücre büyümesini durdurucu ve apoptozu uyarıcı etkiye sahiptir. Anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin ekspresyonu CHOP tarafından inhibe edilmektedir (Zinszner vd., 1998).

Apoptoz sırasında dimerize olarak mitokondri membranında por oluşumuna neden olan Bax ve Bax proteinleri, ER membranında da lokalize olabilmektedir. Oluşan bu porlar, ER lümeninden sitozole Ca^{2+} salınmasına neden olurlar. Sitozoldeki Ca^{2+} derişiminin artması ile Ca^{2+} -bağımlı sistein proteaz (kalpain) enziminin aktivasyonu gerçekleşir. Kalpain, proteolitik aktivitesi ile apoptozu baskılayıcı protein olan Bcl-XL'nin inhibisyonuna ve prokaspaz-12'nin aktive edilmesine neden olur. Kaspaz-12, prokaspaz-9'u apoptozom oluşumuna gerek kalmadan aktive edebilmektedir (Shiraishi, 2006).

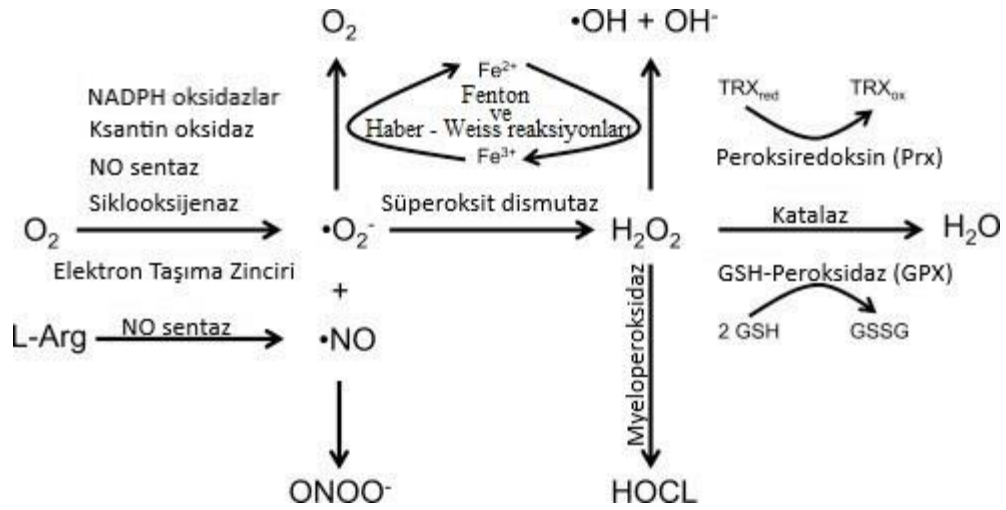
1.3. Serbest Radikaller

Son yörüngesinde eşleşmemiş elektrona sahip atom bulunduran, genellikle aşırı kararsız ve reaktif olan moleküllere serbest radikal adı verilmektedir. Serbest radikaller, başka molekülleri yükseltgeyerek ya da indirgeyerek yapılarında değişikliğe sebep olmaktadır. Serbest radikaller düşük derişimlerde hücre haberleşmesinde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda, bağışıklık sisteminde görev alan bazı hücreler tarafından, istilacı hücrelere karşı bir öldürücü ajan olarak da kullanılmaktadırlar. Serbest radikal derişimi, hücrelerde çok düşük bir seviyede tutulmaktadır. Bunun sebebi, kararsız yapıda olan bu moleküllerin protein, nükleik asit, karbonhidrat ve lipit gibi biyolojik moleküllerle de etkileşime girerek hücrelerde büyük hasar oluşturabilme potansiyelidir (Pham-Huy, He ve Pham-Huy, 2008).

Hücrelerde serbest radikallerin ana üretim merkezi mitokondri olmakla beraber, oluşumunda rol oynayan elemanlar arasında sitokrom p450 kompleksi, α -ketoglutarat dehidrojenaz, ksantin oksidoredüktaz ve NADPH oksidaz kompleksleri gibi enzimler ve peroksizom organeli de yer almaktadır. Oksijen, pek çok canlı için yaşamın temel kaynaklarından biri olmakla beraber, oksidatif fosforilasyon aracılığıyla hücrelerde

serbest radikal oluşumunun da temel nedenidir. İyonize edici ışınlar, morötesi ışınlar, kimyasal maddeler ve aşırı egzersiz, serbest radikal oluşumuna neden olan dış etmenlerdendir (Bylund vd., 2010; Agarwal, Banerjee ve Banerjee, 2011; Gupta vd., 2014).

Serbest radikaller, sahip oldukları kararsız atoma göre; reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS), reaktif kükürt türleri (RSS) ve reaktif klorür türleri (RCS) olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. Oksidatif metabolizma aracılığıyla oluşan ROS, hücrelerde en çok bulunan serbest radikal grubudur (Bkz Şekil 1.6). Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), tekil oksijen (1O_2), ozon (O_3), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), hidroperoksil radikali (HOO^{\cdot}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ROS grubunu oluşturan serbest radikallerdir. Metabolik faaliyetler sonucunda hücre içerisinde oluşabilen bir diğer serbest radikal grubu ise RNS'dir. Nitrik oksit (NO^{\cdot}), süperoksit anyonu ile etkileşime girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) ve ardından nitrit anyonu (NO_2^-) oluşumuna ve serbest radikaller arasında hücrelerde en çok hasar oluşturan OH^{\cdot} radikalinin oluşumuna neden olmaktadır. ROS elemanlarının tiyol yapıları ile etkileşime girmesi sonucu ise RSS'ler oluşmaktadır (Carocho ve Ferreira, 2013; Sosa vd., 2013).



Şekil 1.6. Reaktif oksijen türlerinin oluşum yolları (Helfinger ve Schröder, 2018).

Serbest radikallerin hücrelere verdiği zarar; protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asitleri okside etme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Serbest radikaller proteinler ile etkileşime girerek; aminoasit yapısının değiştirilmesi, peptit bağının yıkımı ve oksidasyon sonucu oluşan bazı yan ürünlerin proteinler ile çapraz bağlanması gibi hasarlar ortaya çıkarmaktadır. Serbest radikallerin oluşturduğu en büyük hücresel

hasarlardan biri de DNA ile etkileşime girmeleri sonucu ortaya çıkmaktadır. DNA’da baz olmayan alan ortaya çıkması, delesyonlar, baz yapısının bozulması, çerçeve kayması mutasyonu, sarmal kırıkları, DNA-protein çapraz bağı oluşması ve kromozom hasarı, serbest radikallerin DNA ile etkileşimi sonucunda ortaya çıkabilmektedir. Glikozilasyon sırasında oluşan glikoaldehit gibi kısa zincirli şekerler, oto oksidasyona açık moleküllerdir. Bu moleküllerin oksidasyonu sonucunda süperoksit radikali oluşarak zincirleme bir reaksiyonu başlatmaktadır. Zincirleme reaksiyon sonucunda, mutajenik olduğu bilinen α ve β dikarbonil oluşumu gerçekleşmektedir. Serbest radikallerin, yağ asidi zincirinde yer alan metilen karbonundan hidrojen alması sonucunda lipit radikali oluşmaktadır. Doymamış yağ asitleri, doymuş yağ asitlerine göre bu reaksiyona daha dayanıklı bir yapıdadırlar. Lipit radikali, ortamda bulunan oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalinin ($RO_2\cdot$) oluşumuna neden olmaktadır. $RO_2\cdot$ radikali ise çevrede bulunan diğer yağ asitlerinden hidrojen alarak zincirleme bir yağ asidi oksidasyonunu başlatmaktadır (Benov ve Beema, 2003; Valko vd., 2004; Lobo vd., 2010).

1.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, hücrelerin serbest radikallere karşı ana savunma sistemini oluşturmaktadır. Antioksidanlar; serbest radikalleri oluşturan oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ederek, serbest lipit radikallerinin oluşmasını önleyerek, zincirleme şeklinde ilerleyen oksidasyon reaksiyonlarını durdurarak, başka antioksidanlar ile sinerjistik etki göstererek, hidroperoksitleri indirgeyerek, metal pro-oksidan molekülleri kararlı yapıya sokarak ve pro-oksidatif enzimleri inhibe ederek etki gösterebilirler (Percival, 1998; Bonner ve Arbiser, 2014).

Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Hücreler tarafından üretilen enzimatik antioksidanlar; demir, bakır, çinko, mangan ve selenyum gibi kofaktörlerin varlığında serbest radikallerin daha kararlı yapılara dönüştürülmesini sağlarlar. Katalaz (CAT), H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye dönüştürülmesini sağlayan antioksidan bir enzimdir (Bkz. Tablo 1.1). Bu enzim, aerobik solunum yapan canlıların neredeyse tamamında aktif bir şekilde üretilmektedir. Katalaz, hücrelerde peroksizom ve mitokondri içerisinde tutulmaktadır. Hücrelerin $O_2\cdot$ karşısındaki ana savunma hattını süperoksit dismutaz (SOD) enzimi oluşturmaktadır. Bu enzim katalitik aktivitesi ile $O_2\cdot$ 'nin H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürülerek etkisiz hale getirilmesini sağlamaktadır. SOD'un memelilerde üç adet izoenzimi bulunmaktadır.

SOD1, hücre sitozolünde konumlanmıştır ve katalitik aktivitesini gerçekleştirebilmek için çinko ve bakır kofaktörlerine ihtiyaç duymaktadır. SOD2, mitokondride konumlanmakta ve kofaktör olarak mangan elementini kullanmaktadır. SOD3 ise, dışarıdan gelebilecek O₂'ye karşı hücreleri korumak amacı ile ekstraselüler alanda konumlanır ve kofaktör olarak çinko ve bakıra gereksinim duyar. Glutasyon peroksidaz (GPx), oksidatif strese karşı en etkili enzimatik antioksidandır. Kofaktör olarak selenyum bulunduran GPx'in, insanlarda 4 adet izoenzimi bulunmaktadır. GPx'ler tripeptid yapıda olan glutasyonu (GSH) kullanarak katalitik aktivitelerini gerçekleştirmektedir. Bu enzim, H₂O₂ ve organik peroksit (ROOH) gibi serbest radikalleri, aktif merkezinde yer alan selenosistein aminoasidinden iki elektron vererek indirger ve yükseltgenen selenosistein, selenol (Se-OH) formuna dönüşür. Selenol yapısı iki adet GSH kullanılarak indirgenir ve GSH'ler arasında disülfit bağı kurularak okside glutasyon (GSSG) oluşturulur. Oluşan GSSG ise glutasyon redüktaz enzimi tarafından, NADPH kullanılarak tekrar GSH formuna dönüştürülür (Stone ve Yang, 2006; Fukai ve Ushio-Fukai, 2011; Carocho ve Ferreira, 2013).

Tablo 1.1. Enzimatik antioksidanlar ve serbest radikaller ile girdikleri reaksiyonlar.

Enzim	Hüresel Konum	Substrat	Reaksiyon
CAT	Peroksizom, sitozol	H ₂ O ₂	2H ₂ O ₂ → O ₂ + H ₂ O
SOD	Mitokondri, sitozol, ekstraselüler alan	O ₂ ⁻	O ₂ ⁻ + O ₂ ⁻ + 2H ⁺ → H ₂ O ₂ + O ₂
GPx	Sitozol	ROOH, H ₂ O ₂	ROOH + 2GSH → ROH + GSSG + H ₂ O

Enzimatik olmayan antioksidan maddeler, hücreler tarafından üretilmekte ya da dışarıdan besin yolu ile alınmaktadır. Bu antioksidanlar peptit, vitamin, flavonoid, karotenoid, kofaktör, mineral veya çeşitli azotlu bileşik yapısında olabilmektedir. Retinol (A vitamini), karaciğer hücreleri tarafından β-karoten yıkımı sonucu ile üretilen bir antioksidan karotenoiddir. Bu karotenoid, lipid peroksidasyonunu başlatan peroksil radikallerinin etkisiz hale getirilmesini sağlamaktadır. Askorbik asit (C vitamini), bitkiler tarafından sentezlenen esansiyel bir moleküldür. Bu molekül, H₂O₂, OH⁻, O₂⁻, ¹O₂ gibi serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesinde görev alan kuvvetli bir antioksidan maddedir. α-tokoferol (E vitamini), kan ve dokularda zincirleme lipid oksidasyonunu önleyici özelliğe sahip olan bir moleküldür. Tokoferol, fenol halkası yapısında yer alan

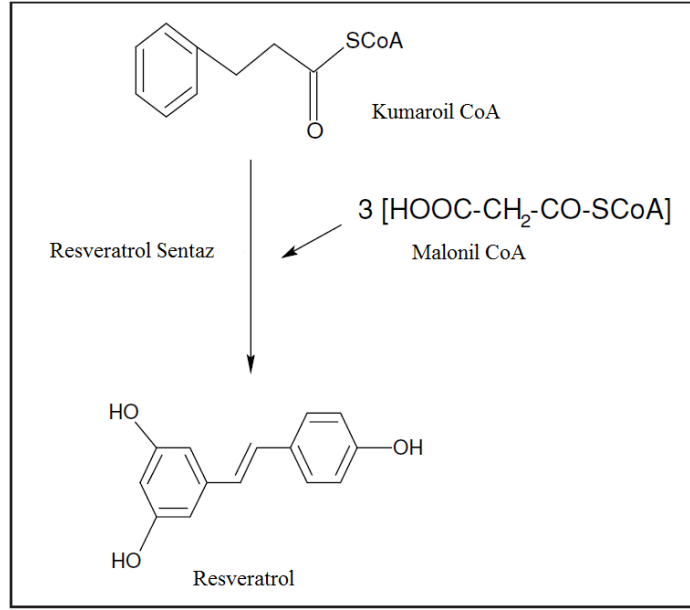
hidrojeni peroksil radikallerine vererek lipid peroksidasyonunu önlemektedir (Burton ve Traber, 1990; Jee vd., 2006; Barros vd., 2011; Nimse ve Pal, 2015).

Ubikinon (KoenzimQ₁₀, CoQ₁₀), özellikle elektron taşıma sisteminde oynadığı rol ile bilinen bir moleküldür. CoQ₁₀ hücreler tarafından sentezlenen, yağda çözünme özelliğine sahip olan tek antioksidandır. Bu lipidin indirgenmiş formu (CoQ₁₀H₂), membran ve lipoprotein peroksidasyonunu önleyerek membran bütünlüğünü korumaktadır. Ubikinon aynı zamanda α -tokoferolün prooksidan formunun da indirgenmesini ve aktif E vitaminine dönüşümünü de sağlamaktadır (Turunen, Olsson ve Dallner, 2004; Littarru ve Tiano, 2007).

Flavonoidler, bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen fenolik maddelerdir. Bu maddeler bitkileri fungal ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı korumaktadır. Aynı zamanda, bitkilerin morötesi ışınlarla maruz kalması ile ve fotosentezin aydınlık evresi sırasında oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesini sağladıkları da bilinmektedir. Flavonoidler, yapılarında bulundurdukları hidrojenleri serbest radikallere vererek doğrudan etki gösterebildikleri gibi; antioksidan enzimleri aktive ederek, oksidaz enzimleri inhibe ederek, metal şelatlayarak ve prooksidan moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak da antioksidan aktivite göstermektedirler (Pietta, 2000; Procházková, Boušová ve Wilhelmová, 2011).

1.4.1 Resveratrol

İlk kez 1940 yılında, *Veratrum grandiflorum* bitkisinin köklerinde tespit edilmiş olan resveratrol (3,4',5-trans-trihidroksi-stilben), stilbenler grubuna ait bir flavonoiddir. Resveratrolün doğada cis ve trans olmak üzere iki formu bulunmakla beraber, trans-resveratrol cis formuna göre çok daha kararlı bir yapıya sahiptir. Resveratrol doğada özellikle kırmızı üzümde ve bunun yanında böğürtlen, dut, fıstık ve çeşitli bitkilerin kökünde bulunmaktadır. Resveratrolün sentezi stilben sentaz enzimi tarafından, üç malonil koenzim A molekülü ve bir 4-kumaroil koenzim A molekülü kullanılarak gerçekleştirilir (Bkz. Şekil 1.7). Resveratrol bitkiler tarafından bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar, ani sıcaklık değişimleri, UV ışınlar ve ağır metaller gibi stres koşullarına karşı sentezlenmektedir (Perrone vd., 2017).



Şekil 1.7. Resveratrolün biyosentezi ve kimyasal yapısı (King, Bomser ve Min, 2006).

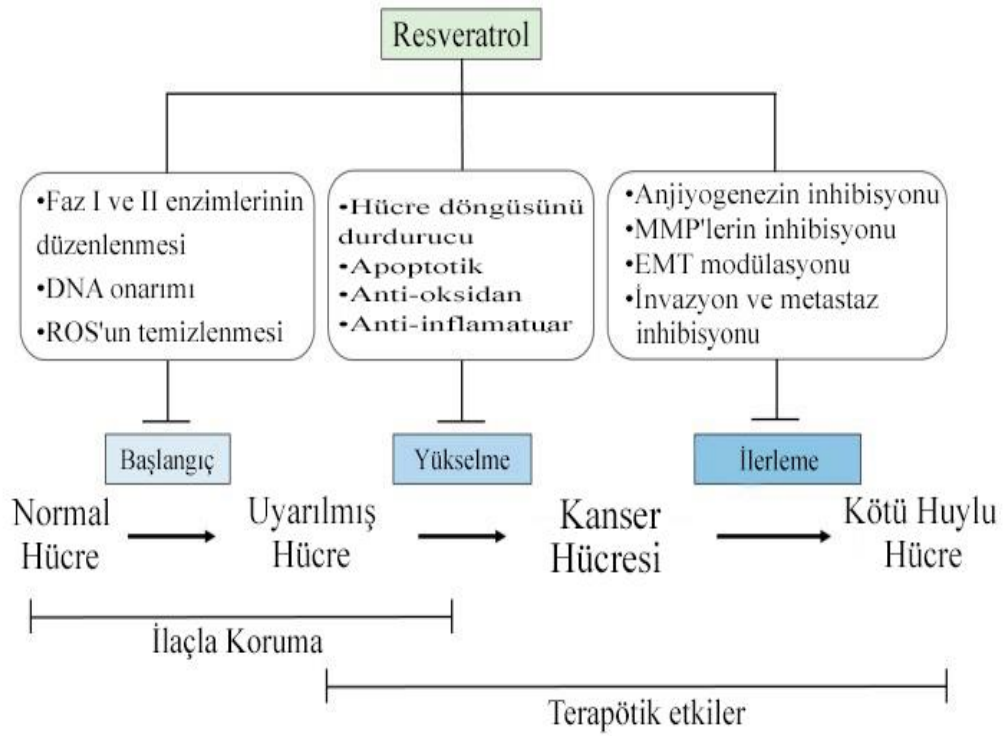
Resveratrolün anti-oksidan, östrojenik/anti-östrojenik, anti-inflamatuvar, anti-koagulant ve dolaşım sistemini koruyucu gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 1.8) (Shakibaei, Harikumar ve Aggarwal, 2009; Carter, D’Orazio ve Pearson, 2014; Akinwumi, Bordun ve Anderson, 2018). Resveratrolün aynı zamanda çeşitli kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı hassasiyetini arttırdığı bilinmektedir (Bkz. Tablo 1.2) (Gupta vd., 2011).

Tablo 1.2. Resveratrol ile uygulandığında hücrelere karşı terapötik etkisi artan ilaçlar ve etki mekanizmaları. NSCLC, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri; NHL, Non-Hodgkin lösemi; MM, multipl miyelom; 5-FU, 5-floroaçil; KBv200, serviks kanseri hücre hattı; AML, akut miyeloid lösemi. (Gupta vd., 2011).

Kemoterapötik madde	Tümör tipi	Mekanizma
Cisplatin, Gefitinib, Paclitaxel	NSCLC	Survivin ↓
Paclitaxel	NHL, MM	Bcl-xL ↓
5-FU	Kolon kanser hücreleri	Sentrozom artışı, Kaspaz-6 ↑
Velcade	MM, T hücreli lösemi	Fas/CD95 ↑
Doxorubicin	Melanom	Cyclin D1 ↓ ve p53 ↑
Vincristine, adriamycin	Ağız kanseri	P-glikoprotein ↓, Bcl-2 ↓
Paclitaxel	KBv200	
Doxorubicin	AML	MRP ↓
Paclitaxel	Akciğer kanseri hücreleri	p21 ^{waf1} ↑
Velcade, thalidomide	MM	NF-κB ↓ ve STAT3 ↓
Gemcitabine	Pankreas kanseri hücreleri	NF-κB ↓

In vitro ve *in vivo* ortamlarda yapılmış olan çalışmalar, resveratrolün anti-kanser etkisini, hücre döngüsü ve apoptoz yolları ile etkileşime girerek gerçekleştirdiğini

göstermektedir. Resveratrol apoptotik etkisini; aktivatör protein 1 (AP-1), nükleer faktör-kappaB (NF-κB), survivin ve siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibisyonu ve bununla beraber p53 yolağının aktivasyonu gibi etkiler göstererek gerçekleştirmektedir. Resveratrolün hücre kültürü çalışmalarında, kanserin başlatılması ve teşvik edilmesinde rol oynayan p53, FoxO ve ATF3 gibi transkripsiyon ve büyüme faktörlerinin etkilerini baskılayarak kanserin ilerlemesini önlediği ve meme, prostat, pankreatik, karaciğer ve kolorektal kanser dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. (Huang vd., 1999; Manna, Mukhopadhyay ve Aggarwal, 2000; Fulda ve Debatin, 2004).



Şekil 1.8. Resveratrolün antikanser etkilerinin altında yatan potansiyel mekanizmaları özetleyen şematik bir diyagram (Ko vd., 2017).

1.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres; hücrelerde oluşan serbest radikallerin, antioksidan sistemlere karşı baskınlık kurması sonucunda oluşan dengesizlik durumudur. Bu durum, hücrelerde bulunan biyolojik moleküllerin yapı ve fonksiyonlarının zarar görmesine ve lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı gibi hücre bütünlüğünü bozan durumların oluşmasına neden olmaktadır. Oksidatif stresin yaşlanma, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, bağışıklık sistemi bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklar

gibi 100'den fazla insan hastalığının patolojisinde rol oynadığı bilinmektedir (Halliwell, 2015; Araújo, Martins ve Borba, 2016).

Oksidatif DNA hasarı, hücrelerde oluşan mutasyonların ana kaynağı olarak görülmektedir. Hücrelerde her gün, serbest radikal aktivitesi sonucu 10^4 DNA hasarının olduğu düşünülmektedir. Serbest radikallerin guanozin ile etkileşimi sonucunda, DNA'da mutasyona yol açan 8-hidroksideoksi guanozin (8-OHdG) ve RNA'da mutasyona yol açan 8-hidroksi guanozin (8-OHG) molekülleri ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu iki molekülün çeşitli kanser türlerinde ve hayvan modellerinde yüksek oranda arttığını ortaya çıkarmıştır. 8-OHdG, sitozinin yanında adenin ile de eşleşebilme özelliğine sahiptir ve adenin ile eşleşmesi sonucunda, tümör baskılayıcı genlerde ve onkogenlerde sıklıkla karşılaşılan mutasyonları meydana getirmektedir. Bu iki molekül, oksidatif nükleik asit hasarının belirlenmesinde bir gösterge olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Gill, Piskounova ve Morrison, 2016; Klaunig ve Wang, 2018).

Oksidatif stres, kanser hücrelerinin oluşum, proliferasyon ve metastaz aşamalarının tümü ile ilişkisi olan bir durumdur. Bu perspektif ile, antioksidan enzimleri tümör baskılayıcı olarak düşünmek mümkündür. SOD1 ya da SOD2 enzimlerini kodlayan genleri susturulmuş olan farelerde yüksek oranda oksidatif hasar oluşumu ve bu hasara bağlı olarak çeşitli kanserlerin geliştiği gözlemlenmiştir. ATM, P53 ve BRCA1 gibi tümör baskılayıcı genlerin mutasyon sonucuyla fonksiyon kaybetmesi, hücre içi ROS seviyelerinin yükselmesine neden olmakta ve bu sayede başka genlerinde mutasyon riskini arttırarak kanserleşme sürecine katkı sağlamaktadır (Fraga vd., 1990; Van Remmen vd., 2003; Elchuri vd., 2005).

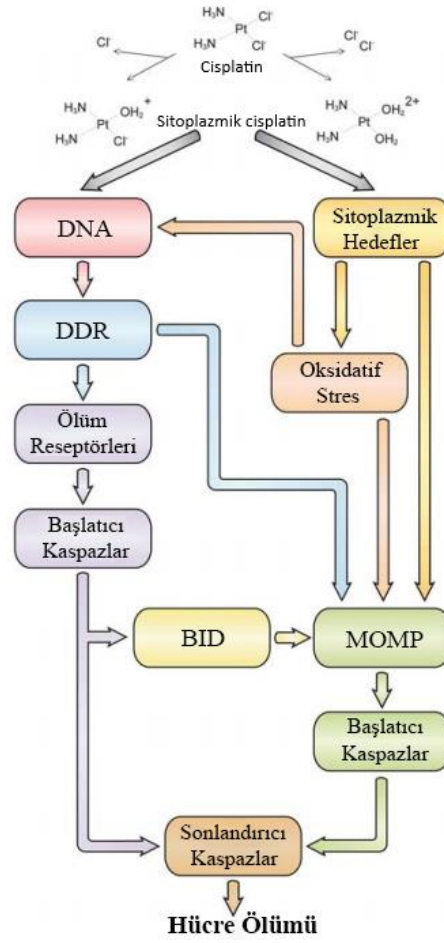
Hücre içerisindeki yüksek ROS miktarı, sağlıklı hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerinde de nekrotik ya da apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Ancak düşük miktardaki ROS miktarının hücreleri proliferere ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar bu proliferasyon etkisini, kanser hücrelerinde ROS konsantrasyonuna bağlı Nrf2, MAP kinaz, NF- κ B ve HIF-1a gibi faktörlerin üretim seviyelerindeki değişikliğe bağlamıştır (Kensler, Wakabayashi ve Biswal, 2007; Rankin ve Giaccia, 2008).

1.6. Cisplatin

Cisplatin (cis-diamminedichloridoplatinum(II)); meme, akciğer, kolon, rahim ve testis gibi pek çok kanserin tedavisinde, tek başına veya başka kemoterapötik ilaçlar ile kombinasyon şeklinde uygulanarak sıklıkla kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Cisplatinin moleküler yapısında; merkezde bir platin ve bu platine bağlı iki klorür ile iki metil grubu yer almaktadır. Cisplatin, hücre dışı klorür konsantrasyonunda kararlı bir yapıya sahiptir ve pasif difüzyon ya da CTR1 gibi taşıyıcı proteinler aracılığı hücre içerisine girebilmektedir. Sitoplazmadaki düşük klorür konsantrasyonu ile cisplatin hidrolize olmaktadır. Son derece elektrofilik olan hidrolize cisplatin, proteinlerin sülfidril grupları ve nükleik asitlerin azot verici bölgeleri gibi nükleofilik olan moleküller ile etkileşime girerek hücre sel hasara neden olmaktadır (Bkz. Şekil 1.9). İndirgenmiş glutatyon (GSH), metalloiyonein, metiyonin, proteinler ve pürin bazları, cisplatinin hücre içi hedeflerindenidir (Galluzzi vd., 2012; Dasari ve Tchounwou, 2014).

Cisplatin, pürinlerin N7 reaktif merkezine bağlanarak DNA'da sarmal içi ve sarmallar arası çapraz bağlar oluşturarak sitotoksik etkisini göstermektedir. Çapraz bağların büyük bir çoğunluğu 1,2 sarmal içi d(CpG) ve d(ApG) yapılarıdır. Cisplatinin oluşturduğu DNA hasarı hücre döngüsünü G2 ve S fazında durdurarak, nükleotid eksizyon onarımı (NER) ve yanlış eşleşme onarımı (MMR) gibi tamir mekanizmalarının devreye sokulmasını tetikler. DNA onarılamayacak kadar hasarlı bir halde ise Fas, p53, p73 ve Chk2 proteinlerinin aktivasyonu sağlanmakta ve hücre apoptoz mekanizması aracılığı ile ölmektedir (Eastman, 1987; Sancar vd., 2004; Vitale vd., 2011).

Cisplatinin sitotoksik etkisinin bir diğer nedeni de hücrelerde doz ve uygulanma süresi ile doğru orantılı bir şekilde oksidatif stres oluşturmasıdır. Tiyol grubu içeren antioksidanlar, hücrelerde serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesinde başrol oynamaktadır. Cisplatin, tiyol grupları ile etkileşime girerek tiyil radikali oluşumuna neden olmaktadır (Brozovic, Ambriović-Ristov ve Osmak, 2010).



Şekil 1.9. Cisplatinin oluşturduğu DNA hasarı ve oksidatif stres sonucunda oluşturulan apoptotik yanıt (Galluzzi vd., 2012).

2. GEREÇLER

2.1. Kullanılan Laboratuvarlar ve Hücre Hattı

MCF-7 (ATCC® HTB-22™) meme adenokarsinom hücre hattı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD'dan temin edilmiştir. Tezin deneysel aşaması Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmış olup, akış sitometri çalışmaları Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde (AÜBİBAM) gerçekleştirilmiştir.

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Resveratrol (Sigma-Aldrich – ABD); cis-diaminplatinyum (II) diklorid (cisplatin) (Sigma-Aldrich – ABD); Anneksin V-Floresanizotiyosiyanat (FITC)/Propidyum İyodür (PI) apoptoz kiti (Becton Dickenson - ABD); JC-1 kiti (Becton Dickenson - ABD.); TUNEL hücre ölüm tespiti kiti (Roche - Almanya); Total Antioksidan Durum (TAS) kiti (MEGA TIP – Türkiye); Total Oksidan Durum (TOS) kiti (MEGA TIP – Türkiye); dimetilsülfoksit (DMSO) (Applichem - Almanya); disodyum fosfat (Na₂HPO₄) (Merck - Almanya); etil alkol (Necm Kimya - Türkiye), fetal sığır serumu (FBS) (Biochrom - Almanya); sodyum piruvat (Thermo Fisher Scientific – ABD); Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri (Sigma-Aldrich – 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) (Merck - Almanya); sodyum bikarbonat (NaHCO₃) (Merck - Almanya); sodyum hidroksit (NaOH) (Merck - Almanya); sodyum klorür (NaCl) (Detsan - Türkiye); paraformaldehid (Sigma-Aldrich - ABD); tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich – ABD); tween 20 (Sigma-Aldrich - ABD); trisodyum sitrat-5,5-hidrat (C₆H₅Na₃O₇ * 5,5 H₂O) (Merck – Almanya).

2.3. Kullanılan Cihazlar

Akım sitometri cihazı (Becton Dickinson FACS Aria I Cell Sorter – ABD), 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 -

Japonya); etiv (Nüve FN500 - Türkiye); floresan mikroskop (Leica DMI 4000B - Almanya); hassas terazi (Ohaus AV264C - İsviçre); inverted mikroskop (Leica DM IL LED - 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).

3. YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

MCF-7 hücreleri, % 10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin – streptomisin, 1 mM sodyum piruvat ve 1 mM L-glutamin içeren RPMI – 1640 besiyerinde, %5 CO₂ ve %95 bağıl nem içeren etüvde 37 °C’de büyütülmüşlerdir.

3.1.1. Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması

Hücreler flask yüzeyini %75-80 kapladıktan sonra besi ortamı ortamdan uzaklaştırılıp, hücreler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 2 kere yıkanmıştır. 1x tripsin-EDTA ortama eklenerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Flask yüzeyinden kalkan hücreler 1000 µL besi yeri kullanılarak santrifüj tüplerine aktarılıp 1400 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant dökülerek hücre çöktelleri tekrar besi yerinde süspanse edilmiştir.

Hücrelerin stoklanması için her bir vialde 1900 µL hücre süspansiyonu aktarılmış ve üzerlerine 100 µL dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Hazırlanan vialer Mr.Frosty dondurucu kabında -86 °C’de bir gece bekletildikten sonra daha sonra kullanılmak üzere sıvı azot tankında saklanmıştır.

Hücrelerin pasajlanması için oluşturulan süspansiyon 1:3 oranında 10 mL besiyeri içeren flasklara aktarılmış ve %5 CO₂ ve %95 bağıl nem içeren etüvde 37 °C’de büyümeleri ve çoğalmaları sağlanmıştır.

3.2. Etken Madde Dozlarının Hazırlanması

3.2.1. Cisplatin

0,5 molar derişime sahip olan ana stok, toz halde bulunan cisplatinden 15 mg tartılıp 100 µL DMSO’da çözülerek oluşturulmuştur. Ana stok -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılan cisplatin dozları, 0,05 ve 0,005 molar derişimli ara stoklar kullanılarak, DMSO’nun %0,2’lik toksik dozu göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır.

3.2.2. Resveratrol

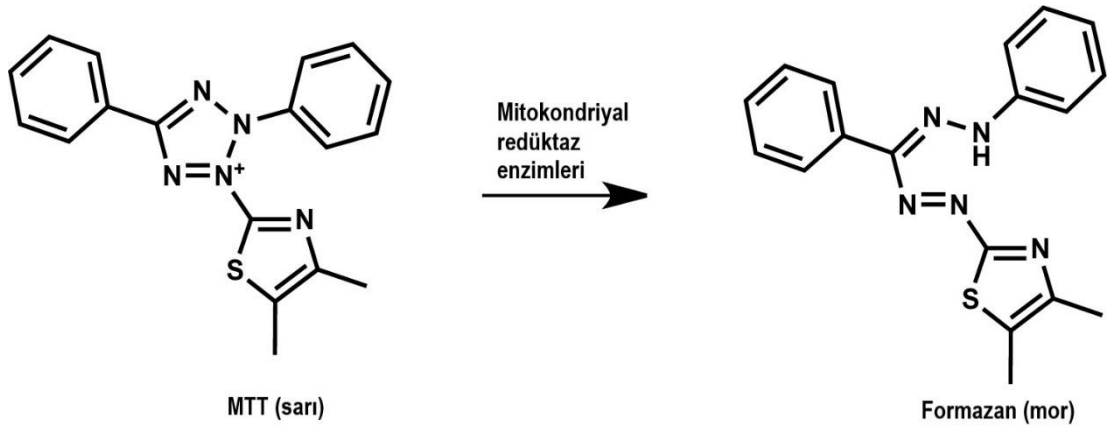
0,5 molar derişime sahip olan ana stok, toz halde bulunan resveratrolde 11,40 mg tartılıp 100 µL DMSO’da çözülerek oluşturulmuştur. Ana stok -20 °C’de muhafaza

edilmiştir. Deneylerde kullanılan resveratrol dozları, 0,05 ve 0,005 molar derişimli ara stoklar kullanılarak, DMSO'nun %0,2'lik toksik dozu göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır.

3.3. Sitotoksite Testleri

3.3.1 Cisplatin ve resveratrolün sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Maddelerin sitotoksitelerinin belirlenmesi için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi kullanılmıştır. MTT yöntemi ucuz, hızlı ve uygulanmasının kolay oluşu sebebiyle, hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir (Mosmann, 1983). Yöntem, normal şartlarda sarı renge sahip olan MTT'nin, hücre içerisinde bulunan oksidoredüktaz enzimleri tarafından indirgenerek suda çözünmeyen, mor renkli formazan tuzuna dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır (Bkz. Şekil 3.1). Formazan tuzunun spektrofotometrik olarak ölçülebilen absorbands değeri, kültürdeki hücrelerin sayısını ve metabolik aktivitelerini yansıtmaktadır ve proliferasyon arttıkça formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbands değeri artış gösterir (Carmichael vd., 1987).



Şekil 3.1. Formazan tuzunun oluşumu (http-6).

3.3.1.1 MTT yönteminin uygulanması

Flasklarda uygun yoğunluğa ulaşan hücreler, her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından cisplatin (CDDP) ve resveratrol (RSV) için oluşturulmuş olan 11 adet konsantrasyon (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,90, 1,95, 0,97 μM) 4 tekrar olacak şekilde kuyucuklara eklenmiş ve plakalar 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından her kuyucuğa 5 mg/mL derişime sahip 20 μL MTT boyası karanlık ortamda eklenerek kuyucuklar 3 saat etüvde bekletilmiştir. 3 saatin ardından besiyeri ve MTT boyası kuyucuklardan tamamen çekilip, her bir kuyucuğa formazan kristallerinin çözülmesini sağlamak amacıyla 200 μL DMSO eklenmiş ve plakalar 15 dakika boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. Çalkalayıcıdan alınan plakaların, ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.2 İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi

İnhibisyon konsantrasyonları, spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilen veriler kullanılarak belirlenmiştir. Hiçbir ilaç ile muamele edilmemiş olan kontrol grubunun canlılığı %100 olarak kabul edilip, hücrelerin %50'sini ve %80'ini inhibe eden konsantrasyonlar (IC_{50} ve IC_{80}) belirlenmiştir.

3.3.2 Kombinasyon dozlarının belirlenmesi ve sitotoksik etkilerinin araştırılması

Cisplatin ve resveratrolün IC_{50} dozlarının aynı yüzdeleri (%100, 75, 50, 40, 30, 20, 10) kullanılarak dokuz adet kombinasyon oluşturulmuştur. Örneğin denklem 3.1'de gösterildiği gibi % değerleri kullanılarak;

$$\%75 \text{ Kombin} = \text{CDDP } \text{IC}_{50} \%75 + \text{RSV } \text{IC}_{50} \%75 \quad (3.1)$$

Oluşturulan bu kombinasyonların hücreler üzerindeki inhibe edici etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

3.3.3 Kombinasyon indeksinin belirlenmesi

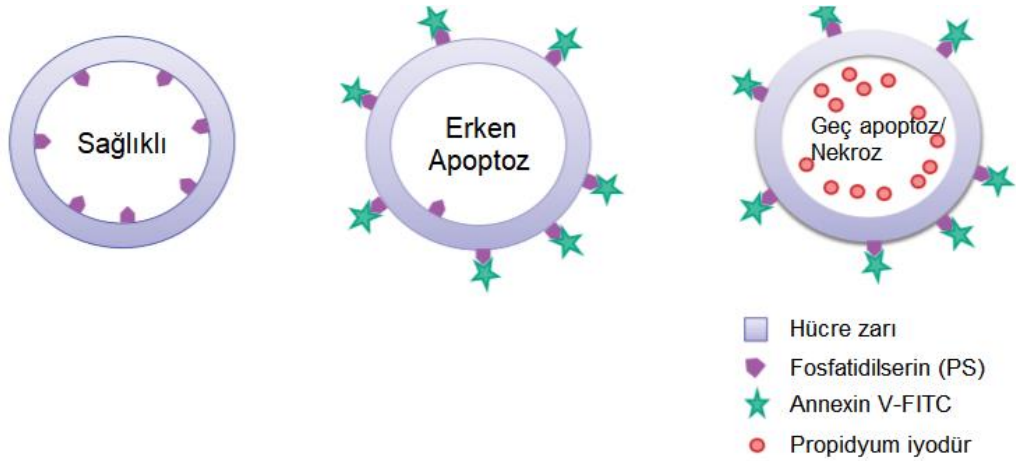
İlaç kombinasyonlarında araştırılması gereken önemli bir konu da ilaçların etkileşimlerinin belirlenmesidir. Bu amaçla, CompuSyn programında Chou-Talalay metodu ile kombinasyon indeksi (CI) hesaplanmıştır. Bu hesaplama sonucu ilaçların

sinerjistik (CI<1), aditif (CI=1) veya antagonistik (CI>1) etkiye sahip oldukları belirlenebilmektedir (Chou ve Talalay, 1984; T. C. Chou, 2010).

3.4 Apoptozun Belirlenmesi

3.4.1 Annexin V-FITC/PI yöntemi

Apoptozun erken safhalarında hücre membranında çeşitli değişiklikler gerçekleşmektedir. Apoptoz kaskatını başlatmış olan bir hücrede gerçekleşen ilk değişikliklerden biri, çift katmanlı hücre zarının iç tarafında konumlanmış olan fosfatidilserinlerin (PS) zarın dış tarafına yer değiştirerek açığa çıkmasıdır. Annexin V, Ca^{2+} varlığında dış zara çıkmış olan PS'ler ile bağlanabilen bir proteindir. Yeşil floresan özelliğe sahip olan floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmiş Annexin V kullanılarak (Annexin V-FITC) apoptozun erken safhalarında membran dışına konumlanan PS'lerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Apoptozun geç evresine gelmiş olan hücreler ve nekrotik olan hücreler membran bütünlüğünü kaybetmeye başlarlar. Erken apoptotik hücreler ile beraber bu hücrelerin de belirlenebilmesi için Annexin V-FITC ile birlikte kırmızı renge sahip floresan bir boya olan propidyum iyodür (PI) de sıklıkla kullanılmaktadır. PI, sağlıklı hücrelerin membranından geçemezken, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin dış ve çekirdek zarından geçerek DNA'ya bağlanmaktadır. Hücreler Annexin V-FITC ve PI ile muamele edilerek, boyanmamış olan sağlıklı hücreleri (FITC⁻/PI⁻), erken apoptotik hücreleri (FITC⁺/PI⁻) ve geç apoptotik ya da nekrotik olan hücreleri (FITC⁺/PI⁺) ayırmak mümkün olmaktadır (Bkz. Şekil 3.2) (Vermes vd., 1995; Fried, Perez, & Clarkson, 1976; Koopman vd., 1994).



Şekil 3.2. Annexin V-FITC/PI boyama ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi (<http://7>).

3.4.1.1 Yöntemin uygulanması

MCF-7 hücreleri, her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilerek CDDP, RSV ve bu iki maddenin kombinasyonları kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyonu sağlanmıştır. 24 saatin sonunda hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkanıp ardından 1x tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. Kalkan hücreler 1 mL besi ortamı kullanılarak tüplere aktarılmış ve 5 dakika boyunca 1400 rpm'de santrifüj edilmiştir. Kit içeriğinden çıkan ve 10X derişime sahip olan bağlanma tamponu (Binding Buffer), dH₂O kullanılarak 1X'lik derişime getirilmiştir. Santrifüjün ardından tüplerdeki süpernatant dökülmüş ve her bir tüpe 100 µL bağlanma tamponu eklenip pipetlenmiştir. Hiç boya eklenmeyen negatif kontrol grubu dışında her tüpe 5 µL FITC-Annexin V ve 5 µL PI boyası eklenmiş ve tüpler karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. 15 dakikanın ardından tüplere 400 µL daha bağlanma tamponu eklenerek akım sitometri cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.4.2 Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi

Mitokondri, apoptotik hücre ölümü sırasında önemli roller oynayan bir organeldir. Mitokondri membran potansiyeli ($\Delta\psi_{mt}$), hücrelerin fonksiyonel durumu ile ilgili önemli bir belirteçdir. Apoptozun başlatıcı ve sonlandırıcı elemanları olan kaspazların aktif hale getirilmesi için, mitokondri sitozolünden sitokrom c ve apoptozu uyarıcı faktörler gibi moleküllerin hücre sitoplazmasına aktarımı gerekmektedir. Bu moleküllerin mitokondriden sitozole geçişi mitokondri membran potansiyelindeki bozulma ile ilişkilendirilmiştir. Floresan özellikli lipofilik katyon bir madde olan JC-1, (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolokarbo-siyanın iyodür) mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimin belirlenmesi amacı ile sıklıkla kullanılmaktadır. JC-1, yüksek mitokondri membran potansiyeli etkisi altında J-agregatları adı verilen yapılar oluştururlar. Normal şartlar altında JC-1 boyası yeşil floresan ışığa yayarken, J-agregatları turuncu-kırmızı renkli ışığa yaymaktadır. Bu renk ayrımı kullanılarak hücrelerdeki mitokondri membran potansiyelinin durumu kantitatif ve kalitatif olarak incelenebilmektedir (Barbieri vd., 1998; Facompré vd., 2001; Perelman vd., 2012).

3.4.2.1 Yöntemin uygulanması

Deneye başlamadan önce kit içerisinde çıkan 10X derişimli deney tamponu (Assay Buffer) dH₂O kullanılarak 1X'lik derişime getirilmiştir. Stok solüsyonunun oluşturulması için kit içeriğinden çıkan JC-1 boyası 65 µL DMSO'da çözülmüştür. Hazırlanan stok solüsyonu 6.445 µL deney tamponuna eklenerek çalışma solüsyonu (Working Buffer) elde edilmiştir.

MCF-7 hücreleri, her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilerek CDDP, RSV ve bu iki maddenin kombinasyonları kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyonu sağlanmıştır. 24 saatin ardından hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkanıp ardından 1X tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. Kalkan hücreler 1 mL besi ortamı kullanılarak tüplere aktarılmış ve 5 dakika süresince 1400 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüp içeriğindeki süpernatant dökülmüş ve boya koyulmayan negatif kontrol grubu hariç her bir tüpe 0,5 mL çalışma solüsyonu eklenmiştir. Tüpler pipetlendikten sonra 15 dakika boyunca 37 °C'de etüvde bekletilmiştir. Etüvden çıkan tüplere iki kere yıkama işlemi uygulanmıştır. Birinci yıkamada tüplere 2 mL, ikinci yıkamada ise tüplere 1 mL deney tamponu eklenerek her yıkamadan sonra tüpler 5 dakika boyunca 1400 rpm'de santrifüj edilmiştir. Son santrifüjün ardından tüplere 0,5 mL deney tamponu eklenerek akım sitometri cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.4.3 TUNEL yöntemi

Apoptoz mekanizmasının son aşamalarından biri, endonükleaz enzimlerinin aktif hale getirilmesidir. Aktif hale geçen endonükleaz enzimler DNA çift sarmalını 300 – 500 kilobazlık (kb) parçalara ayırırlar. Oluşan DNA parçaları, Terminal deoksinükleotidil transferaz-aracılı d-UTP Açık Uç Etiketleme (TUNEL) yöntemi kullanılarak tespit edilip, apoptoz yolu ile ölmekte olan hücrelerin belirlenmesi amacı ile yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. TUNEL yönteminin temel prensibi, hücrelerde oluşan açık uçlu DNA parçalarının, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi aracılığıyla, modifiye edilmiş nükleotidlerle (örn; Biotin-dUTP, DIG-dUTP, floresin-dUTP) işaretlenmesidir. Kullanılan nükleotidler floresan moleküllerle etiketli oldukları için, yöntemin uygulanması sonucunda apoptozun geç aşamasına gelmiş olan hücreler yaptıkları

floresan ışığa ile kantitatif ve kalitatif olarak incelenebilmektedir (Gorczyca vd. 1992; Gavrieli vd. 1992; Li vd. 1996).

3.4.3.1 Yöntemin uygulanması

Deneye başlamadan önce deneyde kullanılacak üç çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden ilki olan paraformaldehit çözeltisi; 0,2 gr paraformaldehit, 8 mL PBS ve 2 mL 5N NaOH kullanılarak hazırlanmıştır. Geçirgenlik çözeltisi; 0,01 gr tri-sodyumsitrat, 10 µL, polisorbata 20 ve 10 mL dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Etiketleme çözeltisi, kit içeriğinden çıkan etiket solüsyonundan 450 µL ile enzim solüsyonundan 50 µL karıştırılarak hazırlanmıştır.

MCF-7 hücreleri, her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilerek CDDP, RSV ve bu iki maddenin kombinasyonları kuyucuklara eklenmiş ve tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin ardından kuyucuklardaki besiyeri çekilmiş ve her kuyucuğa 100 µL paraformaldehit çözeltisi eklenmiştir. 15 dakikanın ardından paraformaldehit çözeltisi kuyucuklardan çekilmiş ve her kuyucuk üç kere PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100 µL geçirgenlik çözeltisi eklenmiş ve plakalar buz üzerinde bekletilmiştir. 2 dakikalık bekleme sonrası kuyucuklardaki geçirgenlik çözeltisi kuyucuklardan çekilmiş ve her kuyucuk üç kere PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından karanlık bir ortamda her kuyucuğa 50 µL etiketleme çözeltisi ilave edilmiş, plakalar parafilm ve alüminyum folyo ile sarılarak bir saat, 37 °C’de etüvde bekletilmiştir. Bir saatin sonunda her kuyucuktaki etiketleme çözeltisi çekilerek kırmızı ışık altında üç kere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama sonrasında floresan işaretli DNA kırıkları, floresan mikroskopu kullanılarak 40X büyütmede incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.5 Hücrelerdeki Oksidatif Dengenin Belirlenmesi

3.5.1 Total Oksidan Durum (TOS) yöntemi

Hücrelerdeki antioksidan düzeyinin, oluşan serbest radikaller karşısında yetersiz kalması sonucunda oksidatif stres adı verilen durum ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stresin kanser oluşumu, ilerleyişi ve yayılışında rol oynadığı bilinmektedir. Serbest radikal grupları olan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS), kanser

hücrelerinde mitokondriyal solunum, peroksizomlar ve hücrelere uygulanan kemoterapötik ilaçlar sonucu oluşabilmektedir (Saed, Diamond ve Fletcher, 2017; Klaunig ve Wang, 2018). TOS yöntemi, hücrelerdeki serbest radikal miktarı hakkında genel bir bilgi vermektedir. TOS'un temel prensibi, örneklerde yer alan serbest radikallerin, yöntemde kullanılan şelatör kompleksi yapısında yer alan Fe^{2+} iyonunu Fe^{3+} iyonuna yükseltmesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon, yöntemin gerçekleştirildiği asidik ortamda renk değişikliği meydana getirmektedir. Oluşan renk şiddeti, örnekte bulunan oksidan moleküllerinin miktarı ile orantılıdır ve spektrofotometre ile ölçülerek, örneklerdeki total serbest radikal miktarı hakkında kantitatif bir sonuç elde edilmektedir (Erel, 2005).

3.5.1.1 Yöntemin uygulanması

MCF-7 hücreleri, her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilerek CDDP, RSV ve bu iki maddenin kombinasyonları kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyonu sağlanmıştır. 24 saatin sonunda hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkanıp ardından $1 \times$ tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. Kalkan hücreler 1 mL dH_2O kullanılarak tüplere aktarılmış ve pipetlenmiştir. Total oksidan durumun belirlenebilmesi için hücrelerin parçalanması gerekmektedir. Hücrelerin parçalanması işleminde ultra sonikatör kullanılmıştır. Hücrelerin yer aldığı tüpler buz içerisinde, 30 saniye boyunca, 60 MHz frekansta sonikasyon işlemine maruz bırakılarak deneyde kullanılacak örnekler oluşturulmuştur. Her bir tüpten 75 μL örnek alınmış ve 500 μL kit içeriğinden çıkan reaktif 1 ile karıştırılarak spektrofotometre küvetine aktarılmıştır. Kit içeriğinden çıkan standart çözeltisi kullanılarak bir standart küveti ve dH_2O kullanılarak bir kör küveti hazırlanmıştır. Küvetler, reaktif 1 eklendikten 30 saniye sonra spektrofotometre cihazında 530 nm'de okutulmuş ve absorbans değeri (A1) elde edilmiştir. A1 verileri alındıktan sonra her bir küvete kit içeriğinden çıkan reaktif 2'den 25 μL eklenmiştir. Küvetler 5 dakika 37 °C'de bekletilip, spektrofotometre cihazında 530 nm'de okutulmuş ve absorbans verileri (A2) kaydedilmiştir. TOS, denklem 3.2 ve 3.3'te gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

$$A2 - A1 = \Delta \text{Absorbans} \quad (3.2)$$

$$\text{TOS } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta \text{Örnek Absorbans}}{\Delta \text{Standart Absorbans}} \times 10 \quad (3.3)$$

3.5.2 Total Antioksidan Durum (TAS) yöntemi

Hücrelerde bulunan katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon gibi antioksidan moleküller, oluşan serbest radikaller ile sürekli yarış halindedir. Hücrelerin oksidatif denge durumunun belirlenebilmesi amacı ile total oksidan miktarına ek olarak antioksidan miktarının da incelenmesi gerekmektedir. Bu amaç için 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin -6-sülfonat) (ABTS⁺) temelli metotlar sıklıkla kullanılmaktadır. Renksiz olan ABTS⁺, asidik ortamda (pH 3.6) hidrojen peroksit tarafından yükseltildiğinde, koyu yeşil renge sahip olmaktadır. Ortamın pH değeri yükseltildiğinde (pH 5.8) ise koyu yeşil olan renk yavaş yavaş açılmaktadır. Reaksiyona eklenen antioksidan maddeler, madde yoğunluğu ile ters orantılı bir şekilde beyazlaşma işlemini kısaltmaktadır. Bu sayede, örneklerdeki antioksidan maddelerin yoğunluğu, ortamın beyazlaşma miktarına göre spektrofotometre cihazı ile belirlenebilmektedir (Erel, 2004).

3.5.2.1 Yöntemin uygulanması

MCF-7 hücreleri, her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilerek CDDP, RSV ve bu iki maddenin kombinasyonları kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyonu sağlanmıştır. 24 saatin sonunda hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkanıp ardından 1X tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. Kalkmış olan hücreler 1 mL dH₂O kullanılarak tüplere aktarılmış ve pipetlenmiştir. Total antioksidan durumun belirlenebilmesi için hücrelerin parçalanması gerekmektedir. Hücrelerin parçalanması işleminde ultra sonikatör kullanılmıştır. Hücrelerin yer aldığı tüpler buz içerisinde, 30 saniye boyunca, 60 MHz frekansta sonikasyon işlemine maruz bırakılarak deneyde kullanılacak örnekler oluşturulmuştur. Her bir tüpten 30 µL örnek alınmış ve 500 µL kit içeriğinden çıkan reaktif 1 ile karıştırılarak spektrofotometre küvetine aktarılmıştır. Kit içeriğinden çıkan standart çözeltisi kullanılarak bir standart küveti ve dH₂O kullanılarak bir kör küveti hazırlanmıştır. Küvetler, reaktif 1 eklendikten 30 saniye sonra spektrofotometre cihazında 660 nm'de okutulmuş ve absorbans değeri (A1) not edilmiştir. A1 verileri alındıktan sonra her bir küvete kit içeriğinden çıkan reaktif 2'den 75 µL eklenmiştir. Küvetler 5 dakika 37 °C'de bekletilip, spektrofotometre cihazında 660 nm'de okutulmuş ve absorbans verileri (A2) not edilmiştir. TAS, denklem 3.4 ve 3.5'te gösteriliği şekilde hesaplanmıştır.

$$A2 - A1 = \Delta \text{Absorbans} \quad (3.4)$$

$$\text{TAS (mmol/L)} = \frac{[(\Delta \text{Kör Absorbans}) - (\Delta \text{Örnek Absorbans})]}{[(\Delta \text{Kör Absorbans}) - (\Delta \text{Standart Absorbans})]} \quad (3.5)$$

3.5.3 Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) belirlenmesi

Hücrelerin oksidatif denge durumlarının tespiti için oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır. OSI, TOS ve TAS sonuçları belirlendikten sonra denklem 3.6'da gösterildiği şekilde hesaplanabilmektedir. TAS sonucu mmol/L cinsinden olduğu için, hesaplamadan önce $\mu\text{mol/L}$ cinsine çevirilmiştir.

$$\text{OSI} = \frac{\text{TOS} \times 100}{\text{TAS}} \quad (3.6)$$

3.6 İstatistiksel Analiz

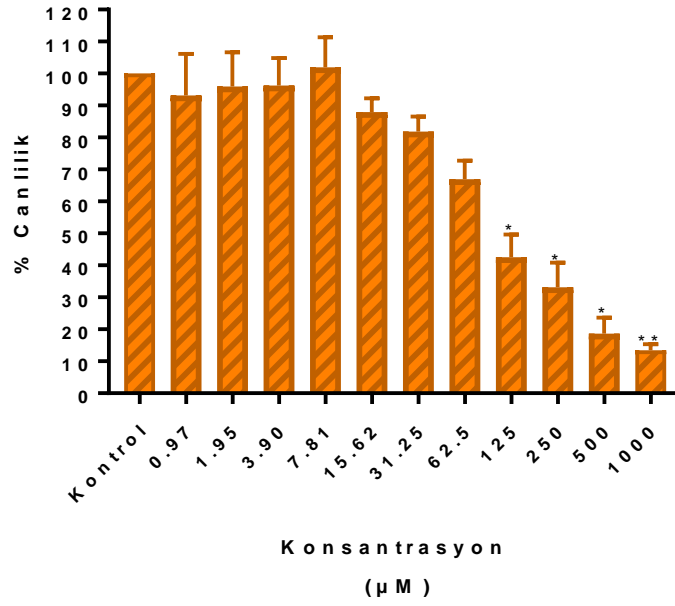
MTT deneylerinde her bir grup için dört kuyucuk kullanılmış ve deneyler 3 kere tekrarlanmıştır. Deney sonuçları, kontrol gruplarının canlılık değerleri %100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Hesaplanan değerlerin istatistiksel yönden anlamlılıkları, GraphPad Prism 7 programı kullanılarak tek yönlü varyans (one-way ANOVA) analizi ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

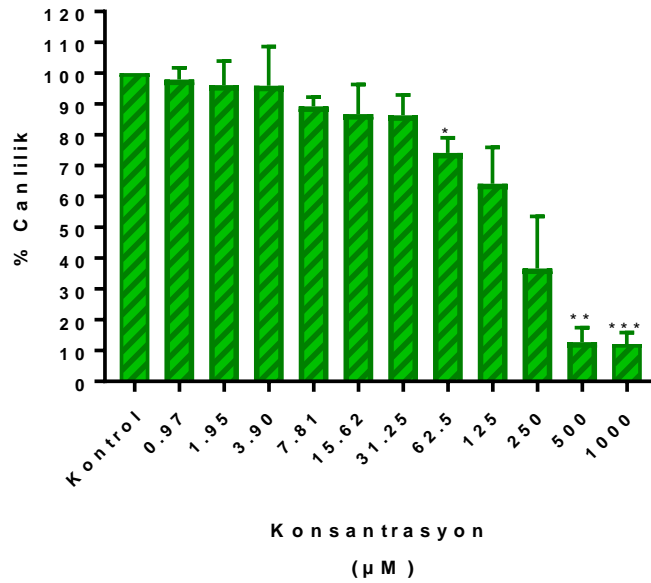
4.1 Sitotoksikite Bulguları

4.1.1 Cisplatin ve resveratrolün sitotoksik etkileri

CDDP ve RSV'nin 24 saatte hücre canlılığına etkileri belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1, 4.2). Elde edilen veriler ile maddelerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 96±12 µM ve 180±16 µM olarak hesaplanmıştır.



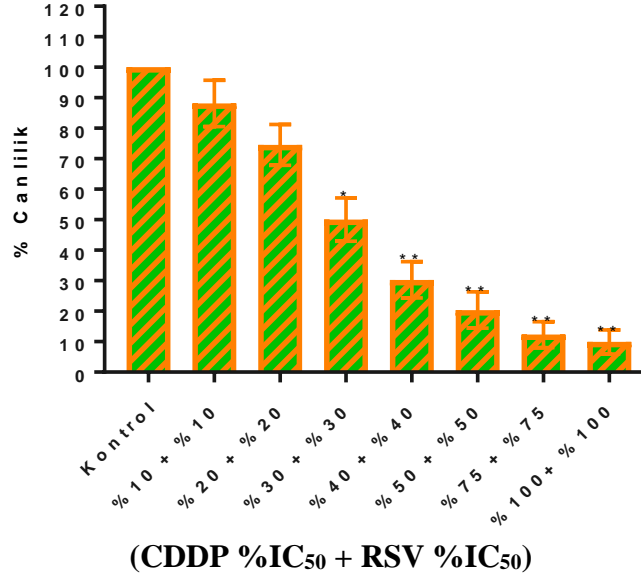
Şekil 4.1. Cisplatin konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda MCF-7 hücre canlılığına etkisi (kontrolle göre; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).



Şekil 4.2. Resveratrol konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda MCF-7 hücre canlılığına etkisi (kontrolle göre; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

4.1.2 Cisplatin ve resveratrol kombinasyonlarının sitotoksik etkileri

CDDP ve RSV'nin IC₅₀ değerlerinin yüzdeleri kullanılarak hazırlanan kombinasyonların, 24 saatte MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.3, Tablo 4.1). Sonuçların değerlendirilmesi ile IC₅₀ değerlerinin %30'u (KM30) ve %40'ı (KM40) ile hazırlanmış olan kombinasyonlar, diğer deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir.



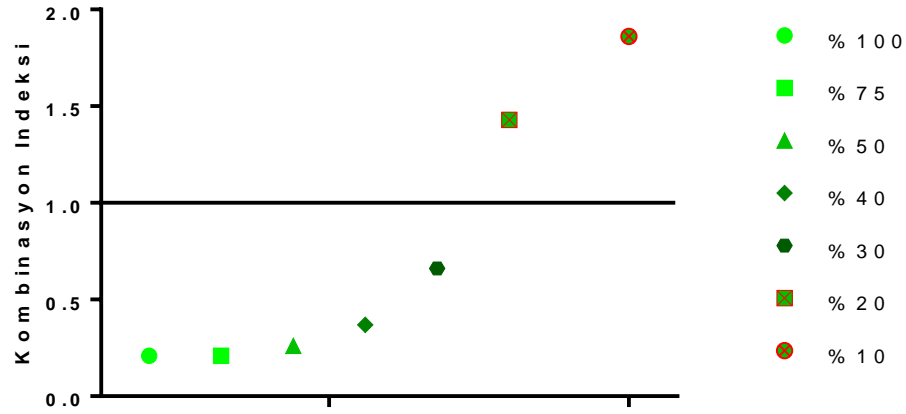
Şekil 4.3. Cisplatin ve resveratrolün IC₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda MCF-7 hücre canlılığına etkisi (kontrolle göre; **p < 0,01, *p < 0.05).

Tablo 4.1. Cisplatin ve resveratrolün IC₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda MCF-7 hücreleri canlılığına etkisi.

IC ₅₀ Yüzdesi	Dozlar (CDDP+RSV)	%İnhibisyon
% 100	96 µM + 180 µM	90,07
% 75	72 µM + 135 µM	87,69
% 50	48 µM + 90 µM	79,62
% 40	38,4 µM + 72 µM	69,73
% 30	28,8 µM + 54 µM	49,96
% 20	19,2 µM + 36 µM	25,42
% 10	9,6 µM + 18 µM	11,85

4.1.3 Kombinasyon indeksi bulguları

CDDP, RSV ve bu iki maddenin kombinasyonlarının sitotoksikite verilerine dayanarak, kombinasyon indeksi hesaplanmıştır ve bunun için CompuSyn programı kullanılmıştır (Bkz. Şekil 4.4, Tablo 4.2).



Şekil 4.4. Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri ($CI < 1$ (Sinerjistik), $CI = 1$ (Aditif), $CI > 1$ (Antagonist)).

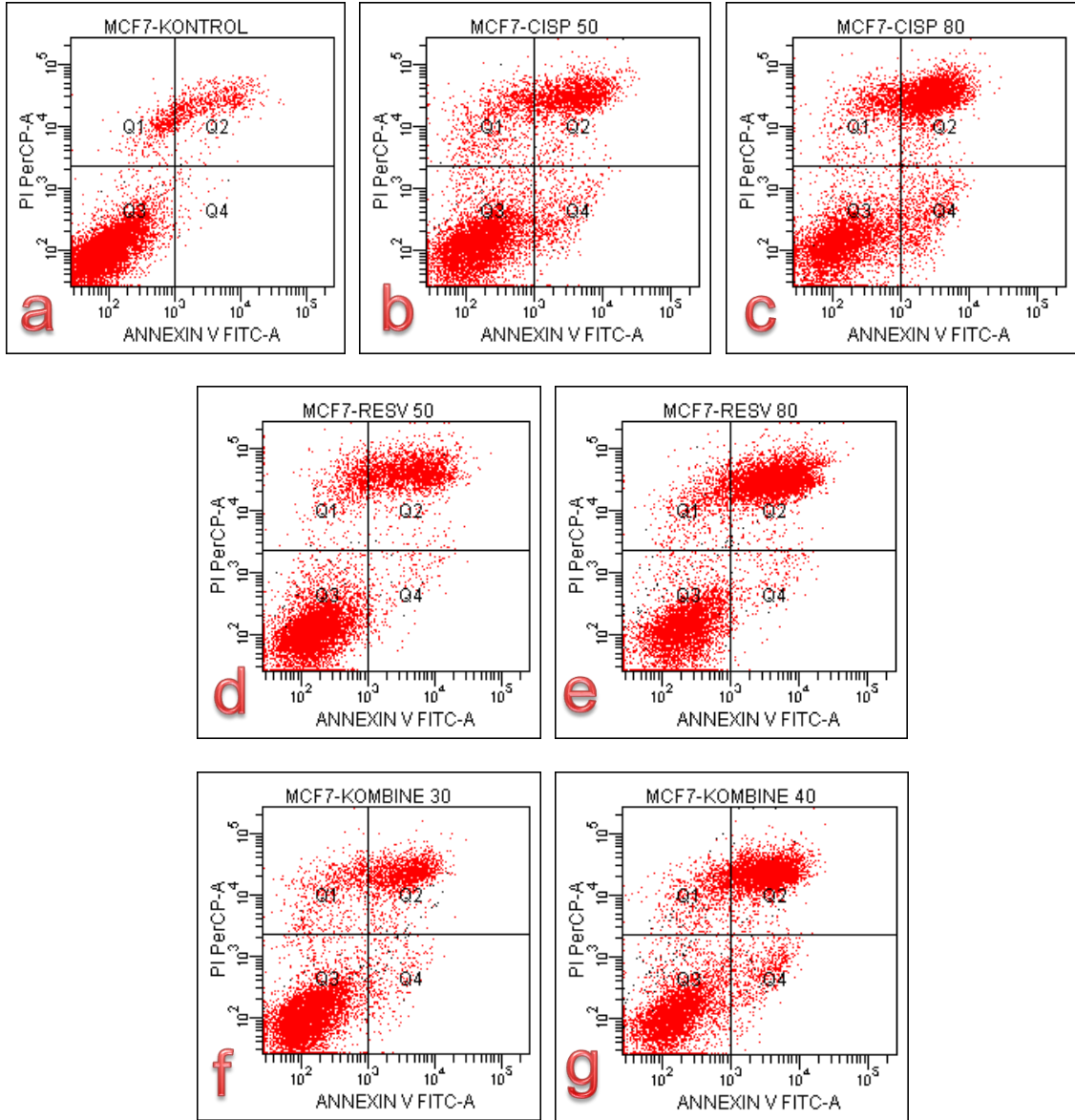
Tablo 4.2. Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri.

IC ₅₀ Yüzdesi	Dozlar (CDDP+RSV)	CI
%100	96 µM + 180 µM	0,21
%75	72 µM + 135 µM	0,21
%50	48 µM + 90 µM	0,26
%40	38,4 µM + 72 µM	0,37
%30	28,8 µM + 54 µM	0,66
%20	19,2 µM + 36 µM	1,43
%10	9,6 µM + 18 µM	1,86

4.2 Apoptoz Bulguları

4.2.1 Annexin V-FITC/PI

Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri, akış sitometri cihazı ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.5, Tablo 4.3).



Şekil 4.5. Cisplatin ve resveratrolün IC_{50} ile IC_{80} dozlarının ve [CDDP+RSV]

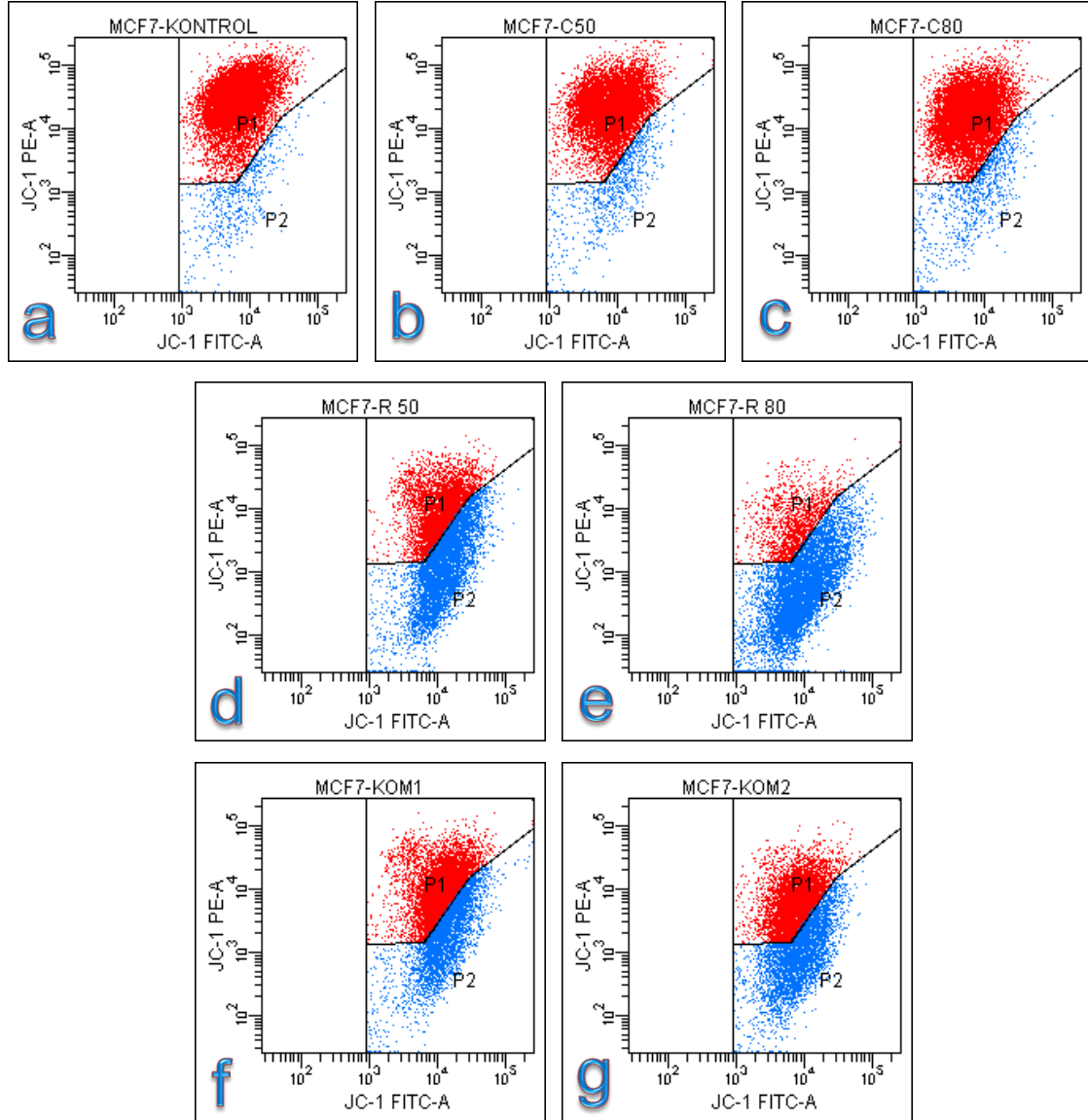
kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri (Kontrol grubu (a), CDDP IC_{50} dozu [96 μ M] (b), CDDP IC_{80} dozu [153 μ M] (c), RSV IC_{50} dozu [180 μ M] (d), RSV IC_{80} dozu [288 μ M] (e), KM30 kombinasyon dozu [28.8 μ M CDDP + 54 μ M RSV] (f), KM40 kombinasyon dozu [38.4 μ M CDDP + 72 μ M RSV] (g)).

Tablo 4.3. Akım sitometri cihazından alınan grafiklerde, hücrelerin alanlara göre dağılımı (canlı (Annexin- V^-/PI^- , Q3), erken apoptoz (Annexin- V^+/PI^- , Q4), geç apoptoz (Annexin- V^+/PI^+ , Q2, ve nekrotik (Annexin- V^-/PI^+ , Q1)).

Gruplar	%Q1	%Q2	%Q3	%Q4
Kontrol	2,5	5,7	90,9	2,3
CDDP IC_{50} [96 μ M]	17,2	19,6	65,2	4,3
CDDP IC_{80} [153 μ M]	11,4	35	46	7,5
RSV IC_{50} [180 μ M]	7,9	18,7	70,5	2,7
RSV IC_{80} [288 μ M]	5,5	33,3	56	5,1
KM30 [28,8 μ M CDDP + 54 μ M RSV]	15,6	20,1	60,7	3,5
KM40 [38,4 μ M CDDP + 72 μ M RSV]	15	31,3	49,3	4,2

4.2.2 Mitokondriyal membran potansiyeli bulguları

Cisplatin, resveratrol ve kombinasyon dozlarının MCF-7 hücreleri mitokondriyal membran potansiyeline etkileri, JC-1 kiti kullanılarak akış sitometri cihazı ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.6, Tablo 4.4).



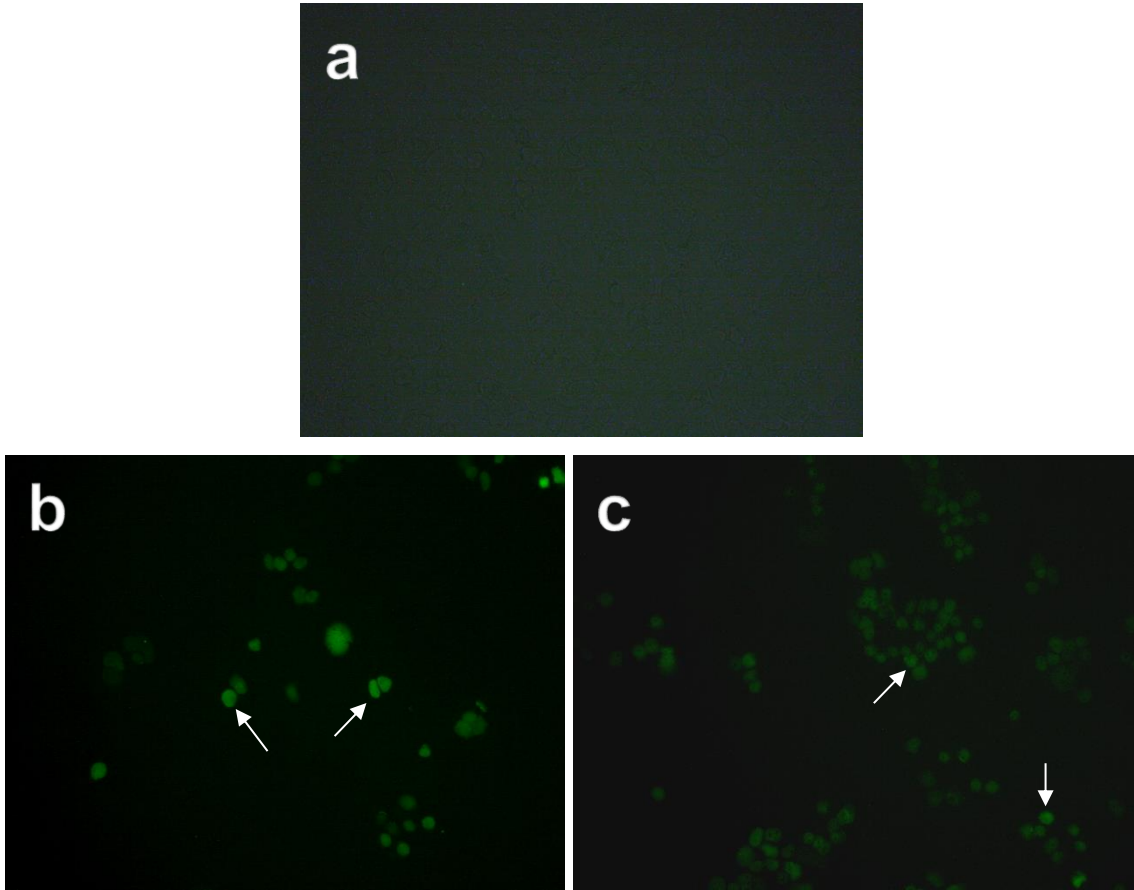
Şekil 4.6. Cisplatin ve resveratrolün IC_{50} , IC_{80} dozlarının ve [CDDP+RSV] kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, MCF-7 hücreleri mitokondriyal membran potansiyeline etkileri (Kontrol grubu (a), CDDP IC_{50} dozu [96 μM] (b), CDDP IC_{80} dozu [153 μM] (c), RSV IC_{50} dozu [180 μM] (d), RSV IC_{80} dozu [288 μM] (e), KM30 kombinasyon dozu [28,8 μM CDDP + 54 μM RSV] (f), KM40 kombinasyon dozu [38,4 μM CDDP + 72 μM RSV] (g)).

Tablo 4.4. Akım sitometri cihazından alınan grafiklerde, hücrelerin alanlara göre dağılımı (yüksek mitokondri membran potansiyeli (P1), depolarize mitokondri membranı (P2)).

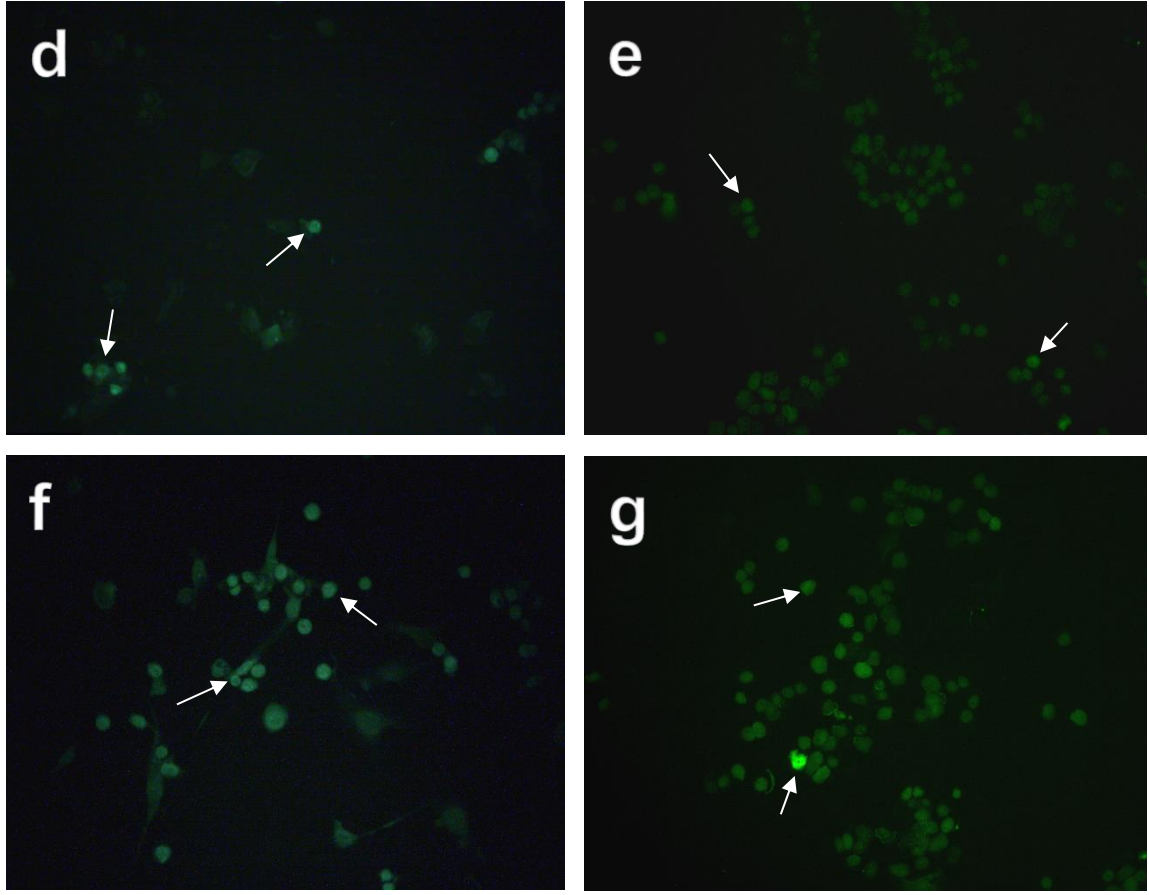
Gruplar	%P1	%P2
Kontrol	92	5
CDDP IC ₅₀ [96 µM]	88	8
CDDP IC ₈₀ [153 µM]	82	13
RSV IC ₅₀ [180 µM]	52	41
RSV IC ₈₀ [288 µM]	15	75
KM30 [28.8 µM CDDP + 54 µM RSV]	65	31
KM40 [38.4 µM CDDP + 72 µM RSV]	52	44

4.2.3 TUNEL

MCF-7 hücrelerinde apoptoz sonucu oluşan DNA parçaları, TUNEL yöntemi ile belirlenmiş ve floresan mikroskop ile görüntülenmiştir (Bkz. Şekil 4.7, Tablo 4.5).



Şekil 4.7. Cisplatin ve resveratrolün IC₅₀, IC₈₀ dozlarının ve [CDDP+RSV] kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, MCF-7 hücreleri DNA fragmentasyonuna etkileri (Kontrol grubu (a), CDDP IC₅₀ dozu [96 µM] (b), CDDP IC₈₀ dozu [153 µM] (c), RSV IC₅₀ dozu [180 µM]



Şekil 4.7. (devam) (d), RSV IC_{80} dozu [288 μM] (e), KM30 kombinasyon dozu [28.8 μM CDDP + 54 μM RSV] (f), KM40 kombinasyon dozu [38.4 μM CDDP + 72 μM RSV] (g) (20x büyüme).

Tablo 4.5. Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda MCF-7 hücreleri DNA fragmentasyonuna etkileri.

Gruplar	% Apoptoz
Kontrol	3
CDDP IC_{50} [96 μM]	12
CDDP IC_{80} [153 μM]	23
RSV IC_{50} [180 μM]	8
RSV IC_{80} [288 μM]	21
KM30 [28.8 μM CDDP + 54 μM RSV]	10
KM40 [38.4 μM CDDP + 72 μM RSV]	17

4.3 Hücrelerin Oksidatif Denge Durumları

4.3.1 TOS ve TAS bulguları

Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda MCF-7 hücreleri total oksidan ve antioksidan durumuna etkileri, spektrofotometre verileri üzerinden

hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.5). Elde edilen TAS verileri (mmol/L), $\mu\text{mol/L}$ cinsine çevirilmiştir.

Tablo 4.6. Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda MCF-7 hücreleri total oksidan ve antioksidan durumuna etkileri.

Gruplar	TOS ($\mu\text{mol/L}$)	TAS ($\mu\text{mol/L}$)
Kontrol	3,84	1140,78
CDDP IC ₅₀ [96 μM]	12,13	613,00
CDDP IC ₈₀ [153 μM]	16,42	734,79
RSV IC ₅₀ [180 μM]	7,91	1239,08
RSV IC ₈₀ [288 μM]	7,53	1275,12
KM30 [28,8 μM CDDP + 54 μM RSV]	7,27	1039,49
KM40 [38,4 μM CDDP + 72 μM RSV]	8,66	540,94

4.3.2 OSI değerinin hesaplanması

Oksidatif stres indeksi, TOS ve TAS deney sonuçları üzerinden hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.6). 1'den küçük OSI değeri hücrelerde antioksidan sistemlerin serbest radikallere karşı baskın durumda olduğuna, 1'den büyük OSI değeri ise hücrelerin oksidatif stres etkisi altında olduğuna işaret etmektedir.

Tablo 4.7. TOS ve TAS deney sonucu üzerinden hesaplanan ($[TOS/TAS] \times 100$) OSI değerleri.

Gruplar	OSI
Kontrol	0,33
CDDP IC ₅₀ [96 μM]	1,97
CDDP IC ₈₀ [153 μM]	2,23
RSV IC ₅₀ [180 μM]	0,63
RSV IC ₈₀ [288 μM]	0,59
KM30 [28,8 μM CDDP + 54 μM RSV]	0,70
KM40 [38,4 μM CDDP + 72 μM RSV]	1,60

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden birisidir (Abdel-Salam, 2011). Meme kanseri için kullanılan stratejiler; tümörün cerrahi yolla uzaklaştırılması, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavisidir. Günümüzde birçok kemoterapötik ilacın varlığına rağmen, kanser hücrelerinin bu ilaçlara karşı direnç geliştirme yeteneği, kanserin tedavisi için büyük zorluk teşkil etmektedir (Dewangan vd., 2017). Kanser oluşum, gelişim ve yayılma süreçleri ile mücadele etmek için yeni ve alternatif seçenekler araştırılmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri, geleneksel şifalı bitkiler veya tohumlardan izole edilen ve kanser hücrelerine karşı etkili doğal moleküllerin, tek başına ya da mevcut kemoterapötik ajanlar ile kombinasyon halinde kullanılmasıdır. Onkojenik süreçleri düzenleyici etkiye sahip maddeler, kanser tedavisi için potansiyel adaylardır (Sethi vd., 2018). Bu doğal ürünlerden biri de üzüm, çilek, soya fasulyesi, nar ve yer fıstığı gibi çeşitli bitkiler tarafından üretilen resveratrol'dür. Flavonoid bir polifenol olan resveratrolün, çeşitli kanser hücrelerine karşı kemopreventif ve antitümör potansiyelini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Resveratrolün aynı zamanda malign hücre büyümesini baskıladığı, hücreleri apoptoza sürüklediği ve kansere spesifik genleri down regüle ettiği bildirilmiştir (Sinha vd., 2016). Çeşitli tümör modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda resveratrolün; cisplatin, doksorubisin ve TRAIL gibi kemoterapötik maddelerin kanser hücreleri üzerindeki etkinliğini arttırdığı da bildirilmiştir (Hsieh & Wu, 2010).

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında, cisplatin (CDDP) ve resveratrolün (RSV) MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin doza bağlı arttığı belirlenmiştir. CDDP'nin sitotoksik etkisi 15 μM 'da başlamış ve özellikle 31 μM 'lık konsantrasyondan itibaren etkisi oldukça artmıştır (Bkz. Şekil 4.1). RSV'nin etkisinin ise 7 μM 'da başladığı ve 62 μM 'lık konsantrasyondan itibaren sitotoksik olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.2). RSV ve CDDP'nin IC_{50} sonuçları ve gösterdikleri doza bağlı etkilerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Costa vd., 2012; Gomez vd., 2013; Ma vd., 2015; Venkatadri vd., 2016).

CDDP ve RSV'nin %10 (9,6 μM CDDP + 18 μM RSV) ve %20'lik (19,2 μM CDDP + 36 μM RSV) kombinasyonları hücreler üzerinde sırasıyla %11,85 ve %25,42'lik sitotoksik etki oluşturmuş ancak iki maddenin bu dozlarda antagonistik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. %20'lik kombinasyondan itibaren tüm kombinasyonların hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin sinerjistik olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.4).

%30 (28,8 μ M CDDP + 54 μ M RSV), %40 (38,4 μ M CDDP + 72 μ M RSV), %50 (48 μ M CDDP + 90 μ M RSV), %75 (72 μ M CDDP + 135 μ M RSV) ve %100'lük (96 μ M CDDP + 180 μ M RSV) kombinasyonların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri sırasıyla %49,96, %69,73, %79,62, %87,69 ve %90,07 olarak bulunmuştur. Kombinasyonların apoptoz ve oksidatif stres üzerine etkilerinin belirlenmesi için %30 (KM30) ve %40'lık (KM40) kombinasyonlar deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Sitotoksik etkisi %49,96 olan KM30 kombinasyonunda kullanılan CDDP dozu (28,8 μ M), CDDP'nin IC₅₀ dozuna (96 μ M) göre oldukça düşüktür. Benzer bir şekilde, KM40 kombinasyonunun oluşturduğu %69,73 oranındaki sitotoksik etki, IC₅₀ değerine göre oldukça düşük miktarda CDDP kullanılarak (38,4 μ M) sağlanmıştır. CDDP, sağlıklı hücreler üzerinde de sitotoksik etki yaratan ve bu sebep ile kemoterapötik uygulamada yan etkileri oldukça fazla olan bir ilaçtır. Bu neden ile RSV'nin CDDP'nin etki dozunu düşürmüş olması önem arz etmektedir. RSV'nin bu etkisi; rahim (Rezk vd., 2006), yumurtalık (Li vd., 2001; Rezk vd., 2006; Nessa vd., 2012), akciğer (L. Ma vd., 2015; Hu vd., 2016) ve kolon (Osman, Al-Malki, vd., 2015) kanseri hücreleri üzerinde de belirlenmiştir. Literatürdeki pek çok çalışma, RSV'nin aynı zamanda sağlıklı hücreleri CDDP'nin sitotoksitesinden de koruduğunu göstermektedir. İç kulak hasarı (ototoksisite) ve böbrek hasarı (nefrotoksisite), CDDP'nin başlıca yan etkilerindedir. RSV'nin sağlıklı hücreleri CDDP ototoksitesinden koruduğu *in vitro* ortamda HEI-OC1 hücreleri üzerinde (Olgun vd., 2013; Im, 2015; Lee vd., 2015) ve *in vivo* ortamda; sıçan, Guinea Pig ve tavşanlarda yapılan çalışmalar (Erdem vd., 2012; Yumusakhuyulu vd., 2012; Şimşek vd., 2013; Valentovic vd., 2014) ile gösterilmiştir. RSV'nin CDDP'ye bağlı oluşan nefrotoksisiteye karşı korucu etkisini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Do Amaral vd., 2008; Cigremis vd., 2015; Osman, Telity, vd., 2015; Darwish vd., 2018).

Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin belirlenmesi Annexin V-FITC/PI ile boyanan hücreler akış sitometri cihazında incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.5, Tablo 4.3). Cisplatinin IC₅₀ dozu için apoptotik hücre oranı (Q2+Q4) %23,9 ve nekrotik hücre oranı %17,2, IC₈₀ dozunda ise apoptotik hücre oranı %42,5 ve nekrotik hücre oranı %11,4 olarak belirlenmiştir. Resveratrolün IC₅₀ dozu için apoptotik hücre oranı %21,4 ve nekrotik hücre oranı ise %7,9, IC₈₀ dozunda ise apoptotik hücre oranı %38,4 ve nekrotik hücre oranı %5,5 olarak belirlenmiştir. KM30 (28,8 μ M CDDP + 54 μ M RSV) kombinasyonu uygulanan hücrelerde apoptoz oranı %23,6 ve nekroz oranı %15,6, KM40 (38,4 μ M CDDP + 72 μ M RSV) kombinasyonu uygulanan

hücrelerde ise apoptoz oranı %35,5 ve nekroz oranı %15 olarak belirlenmiştir. Cisplatin ve resveratrolün kombine uygulanmasının hücreler üzerinde oluşan apoptotik etkiyi arttırdığı görülmektedir. KM30 kombinasyonunun oluşturduğu etki cisplatin IC₅₀ dozu ile kıyaslandığında %0,3'lük bir düşüş, resveratrolün IC₅₀ dozu ile kıyaslandığında ise %2,2'lik bir artış görülmektedir. KM40 kombinasyonu ise cisplatinin IC₅₀ dozu ile kıyaslandığında %11,6, resveratrolün IC₅₀ dozu ile kıyaslandığında %14,1 daha fazla apoptotik etki oluşturmuştur. Benzer bir sonuç, Lee ve arkadaşları tarafından malign mezotelyoma hücreleri (MSTO-211H ve H-2452) üzerinde yaptıkları çalışmada da gözlemlenmiştir. Bu çalışmada; cisplatin, resveratrol ve kombinasyonun (40 µM CDDP + 30 µM RSV) hücrelerde oluşturduğu apoptotik etki, Annexin V-FITC/PI kiti kullanılarak akış sitometri cihazında belirlenmiştir. Kombinasyon uygulaması ardından oluşan apoptotik hücre oranı (MSTO-211H, %49,66; H-2452, %24,41), cisplatin (MSTO-211H, %23,85; H-2452, %4,5) ve resveratrolün (MSTO-211H, %31; H-2452, %7,48) tek başına uygulandığı deney gruplarına kıyasla büyük bir artış göstermiştir (Lee vd., 2016).

Mitokondri membran depolarizasyonu, apoptozun mitokondriyal yolağının ana belirteçlerinden biridir. Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların apoptotik etki mekanizmalarının incelenmesi amacı ile MCF-7 hücrelerine mitokondri membran potansiyeli belirteci olan JC-1 boyası uygulanmış ve hücreler sitometri cihazında incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.6, Tablo 4.4). CDDP'nin IC₅₀ ve IC₈₀ değerleri sırası ile %8 ve %13 oranında mitokondri membran depolarizasyonuna neden olmuştur. Özellikle resveratrolün mitokondri membranı üzerinde kuvvetli bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. Resveratrolün IC₅₀ dozu uygulanan hücrelerin %41'inde depolarizasyon belirlenirken, bu değer yüksek doz resveratrol uygulanan hücrelerde (IC₈₀) %75'e çıkmıştır. Kombinasyonların, içerdikleri CDDP ve RSV dozları göz önüne alındığında, yüksek oranda mitokondri membran depolarizasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (KM30, %31; KM40, %44). Resveratrolün mitokondri metabolizması ve fonksiyonunu etkileyen bir madde olduğu bilinmektedir (Sassi vd., 2014; Gueguen vd., 2015; De Oliveira vd., 2016). Lin ve arkadaşlarının BTT739 hücreleri ile yaptığı çalışmada, 100 µM resveratrol %69 oranında, Zhang ve arkadaşlarının ASTC-a-1 hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada ise, 100 µM resveratrol %49 oranında mitokondri membran depolarizasyonuna neden olmuştur (Zhang, Wang ve Chen, 2011; Lin vd., 2012).

Endonükleaz enzimler aracılığıyla gerçekleştirilen DNA fragmentasyonu, geç apoptozun ana belirteçlerinden biridir (Saraste ve Pulkki, 2000). TUNEL (terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick uç etiketleme), kültürlenmiş hücre preparatlarında apoptotik hücre fraksiyonunun hızlı tanımlanması ve nicelenmesi için tercih edilen bir yöntemdir (Negoescu vd., 1996). Çalışmamızda cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların uygulandığı MCF-7 hücrelerinde apoptoz sonucu oluşan DNA parçaları, TUNEL yöntemi ile belirlenmiştir. Cisplatinin IC₅₀ ve IC₈₀ dozları sırasıyla %12 ve %23 oranındaki hücrenin işaretlenmesine neden olmuştur. Resveratrolün IC₅₀ ve IC₈₀ dozları uygulanan hücrelerin ise sırasıyla %8 ve %21'i işaretlenmiştir. KM30 uygulanan hücrelerin %10'u ve KM40 uygulanan hücrelerin ise %17'sinde DNA parçaları tespit edilmiştir. Costa ve arkadaşlarının MCF-7 hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, 100 µM resveratrolün yüksek oranda TUNEL pozitif hücre oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Costa vd., 2012).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) tümör oluşumunun birçok aşamasında kilit rol oynadığı düşünülmektedir. ROS üretimi ile antioksidanlar arasındaki denge ROS lehine değiştiğinde, oksidatif stres oluşmaktadır (Ligtenberg vd., 2016). Meme kanseri tedavisinde kemoterapi için kullanılan ilaç kombinasyonlarının, oksidatif stresi daha da arttırdığı bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, total antioksidan kapasite ölçümü oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul görmektedir. Antioksidan moleküllerin tek tek incelenmesi, hücre içi toplam oksidatif stresi göstermekte yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle TAS ve TOS düzeylerini ölçmek, konvansiyonel yöntemlere kıyasla avantaj sağlayabilir (Toy, 2012).

Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların MCF-7 hücrelerinin oksidatif denge durumlarına etkileri, TAS ve TOS verileri kullanılarak hesaplanan OSI değeri ile belirlenmiştir. Cisplatinin IC₅₀ ve IC₈₀ dozlarının OSI değeri sırasıyla 1,97 ve 2,23 olarak belirlenmiştir. Hücreler üzerindeki başlıca etkilerinden biri oksidatif stres oluşturmak olduğu bilinen cisplatinin (Marullo vd., 2013; Lu vd., 2016; Yu vd., 2018) OSI değerinde doza bağlı bir artış olduğu görülmektedir. Resveratrolün hücreler üzerinde kuvvetli antioksidan etkiye sahip olduğu bildirilirken (Tamaki vd., 2014; Chiang, Nicol ve Cheng, 2018), yüksek doz resveratrolün hücrelerde pro-oksidan etki göstererek oksidatif strese neden olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Martins vd., 2014). Yaptığımız çalışmalar sonucunda resveratrolün tek başına uygulandığında, MCF-7 hücreleri üzerinde pro-oksidan aktivitesi tespit edilmemiş olup, oksidatif stresi doza bağlı bir şekilde

düşürdüğü belirlenmiştir (IC₅₀, 0,63; IC₈₀, 0,59). KM30 kombinasyonunun OSI değeri 0.70 bulunurken, KM40 kombinasyonunda OSI değeri 1,60'a yükselmiştir. Kelle ve arkadaşları, ROS temizleyici bir madde olan etil piruvatın, cisplatinin farelerde oluşturduğu nefrotoksisiteye etkisini belirlemek amacı ile cisplatin+etil piruvat kombinasyonları kullanmış ve fare böbreklerinde oluşan oksidatif stresi TOS, TAS ve OSI düzeyleri ile belirlemiştirler (Kelle vd., 2014). Çalışmanın sonucunda cisplatinin OSI değeri 14,99, etil piruvatın 5,66 ve cisplatin+etil piruvatın OSI değerini ise 6,72 olarak tespit etmişlerdir. Kombinasyonun OSI değeri, tek başına cisplatin uygulanan fare böbrekleri ile kıyaslandığında oldukça düşmüştür. Bu veriler, etil piruvatın cisplatinin oksidatif stres yoluyla oluşturduğu nefrotoksisiteye karşı önemli bir korunma sağladığını göstermiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada da tek başına cisplatin uygulanan grubun OSI değeri (1,97) ile kombinasyonların OSI değeri (KM30: 0,70, KM40: 1,60) kıyaslandığında, oksidatif stresin azaldığı görülmektedir. Cisplatin uygulanan grubun TOS ve OSI düzeyleri, kontrol grubu ve RSV ile mukayese edildiğinde anlamlı olarak artmışken, TAS düzeyleri belirgin olarak azalmıştır. Diğer yandan cisplatin+resveratrol uygulaması, tek başına cisplatin uygulamasına göre TOS ve OSI seviyelerini düşürmüştür. KM30 grubunun TAS düzeyinde cisplatin grubuna göre artık belirlenmişken, KM40 dozunda bu etki gözlemlenememiştir. Bu bulgular, cisplatinin MCF-7 hücrelerinde oksidatif strese açtığı ve oksidatif stresin doza bağlı olarak RSV ile azaltıldığını göstermektedir. Çetin ve arkadaşlarının primer nöron hücreleri ile yaptığı çalışmada, cisplatinin hücreler üzerindeki oksidatif stresi arttırıcı etkisi gösterilmiştir. Kontrol grubunun TOS değeri 1,44, 100 µM cisplatin uygulanan grupta ise TOS değeri 1,78'e yükselmiştir (Cetin vd., 2016). Ulaşlı ve arkadaşlarının A549 hücreleri ile yaptığı çalışmada, resveratrolün oksidatif stresi oldukça arttırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmada kontrol grubunun OSI değeri 9,19, resveratrol uygulanan grubun ise OSI değeri 22,6 olarak belirlenmiştir (Ulaşlı vd., 2013). Lee ve arkadaşlarının CDDP+RSV kombinasyonlarının malign mezotelyoma hücreleri üzerindeki etkilerini aydınlattıkları çalışmada, kombinasyonların oksidatif stresi arttırdığı belirlenmiştir (Lee vd., 2016). Yaptıkları çalışmada kombinasyon uygulanan hücre grubundaki ROS birikiminin (%52,26), tek başına CDDP uygulanan hücre grubundan (%13,89) daha yüksek olduğu ortaya koyulmuştur. İnsan, sıçan ve fareler üzerinde yapılan pek çok *in vivo* çalışmada ise CDDP'nin oksidatif stres oluşturduğu ve CDDP+RSV kombinasyonun oksidatif stresi

engelleyici bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Olas vd., 2005; He, Zhang ve Wang, 2009; Santandreu vd., 2011; Attia, 2012; Özcan vd., 2015).

Sonuç olarak, elde edilen veriler ışığında, düşük dozda oluşturulan CDDP+RSV kombinasyonlarının (%10 ve %20) MCF-7 hücrelerinde antagonistik etkili olduğu ancak dozlar arttırıldıkça bu etkinin sinerjizme doğru kaydığı belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan kombinasyonlar, içerdikleri CDDP ve RSV dozları göz önüne alındığında, MCF-7 hücrelerinde kuvvetli apoptotik yanıt oluşturmuştur. Özellikle KM40 kombinasyonunun (38,4 µM CDDP + 72 µM RSV), cisplatin ve resveratrolün IC₅₀ dozları uygulanan grupların hepsinden daha yüksek oranda apoptotik etki oluşturduğu görülmektedir. KM40'ın bu etkisi; Annexin V/PI, MMP ve TUNEL deneylerinin tümünde belirlenmiştir. Resveratrolün oksidatif stres üzerine olan etkisini de incelediğimiz çalışmamızda, cisplatinin tek başına uygulandığı grup ile kıyaslandığında, KM30 kombinasyonunun OSI seviyesini azalttığı görülmüştür. Ancak oksidatif stres indeksi üzerinde net bir sonuç oluşturulabilmesi için kombinasyon dozlarının farklı zaman aralıklarında da incelenmesi gereklidir. CDDP ve RSV kombinasyonu, daha düşük konsantrasyonda apoptotik ölümü indükleyerek MCF-7 hücre büyümesini sinerjistik bir şekilde inhibe etmiş ve hücrelerde oluşan oksidatif stresi azaltmıştır. Kombinasyonların MCF-7 hücrelerinde gösterdikleri bu etkilerin, hangi spesifik yollar üzerinden nasıl ve ne şekilde gerçekleştiği, farklı zaman aralıklarındaki aktiviteleri ve kombinasyonların *in vivo* ortamdaki etkili olup olmadığı gibi sorulara cevap üretilebilmesi amacı ile ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Abdel-Salam, Omar, M.E., Eman, R., Hafez, F. (2011). The antioxidant status of the plasma in patients with breast cancer undergoing chemotherapy. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology.*, 1 (3), 29-35.
- Agarwal, A., Banerjee, A., & Banerjee, U.C. (2011). Xanthine oxidoreductase: A journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling. *Critical Reviews in Biotechnology.*, 31 (3), 264–280.
- Akinwumi, B.C., Bordun, M., & Anderson, H.D. (2018). Biological activities of stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences.*, 19 (3), 1–25.
- Amaral, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J., & Rodrigues, C.M. (2010). The role of p53 in apoptosis. *Discovery Medicine*, 9 (45), 145–152.
- Ameisen, J.C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation.*, 9 (4), 367–393.
- Anita, Sharma, H.P., Jain, P., & Amit, P. (2014). Apoptosis (Programmed Cell Death) - A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research.*, 3 (4), 1854–1872.
- Araújo, R.F.F., Martins, D.B.G., Borba, M.A.C.S.M. (2016). A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2. *Oxidative Stress and Disease.*, 185-199.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V.M. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science.*, 281 (5381), 1305–1308.
- Attia, S.M. (2012). Influence of resveratrol on oxidative damage in genomic DNA and apoptosis induced by cisplatin. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.*, 741 (1–2), 22–31.
- Barbieri, D., Abbracchio, M.P., Salvioli, S., Monti, D., & Cossarizza, A. (1998). Apoptosis by 2-chloro-2'-deoxy-adenosine and 2-chloro-adenosine in human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochemistry International*, 32 (5), 493–504.
- Barros, A.I.R.N.A., Nunes, F.M., Gonalves, B., Bennett, R.N., & Silva, A.P. (2011). Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry*, 128 (1), 165–172.
- Behzadi, P., & Ranjbar, R. (2015). Caspases and Apoptosis. *IMedPub Journals*, 1, 22-30.
- Benov, L., & Beema, A.F. (2003). Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 34 (4), 429–433.

- Berman-Frank, I., Bidle, K.D., Haramaty, L., & Falkowski, P.G. (2004). The demise of the marine cyanobacterium, *Trichodesmium* spp., via an autocatalyzed cell death pathway. *Limnology and Oceanography*, 49 (4), 997–1005.
- Billen, L.P., Shamas-Din, A., & Andrews, D.W. (2008). Bid: A Bax-like BH3 protein. *Oncogene*, 27 (1), S93–S104.
- Bonner, M.Y., & Arbiser, J. L. (2014). The antioxidant paradox: what are antioxidants and how should they be used in a therapeutic context for cancer. *Future Medicinal Chemistry*, 6 (12), 1413–1422.
- Brozovic, A., Ambriović-Ristov, A., & Osmak, M. (2010). The relationship between cisplatin-Induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology*, 40 (4), 347–359.
- Burton, G.W., & Traber, M.G. (1990). Vitamin E: Antioxidant Activity, Biokinetics, and Bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 10 (1), 357–382.
- Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., & Irimie, A. (2009). Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncologica*, 48 (6), 811–821.
- Bylund, J., Brown, K.L., Movitz, C., Dahlgren, C., & Karlsson, A. (2010). Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? *Free Radical Biology and Medicine*, 49 (12), 1834–1845.
- Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., & Mitchell, J.B. (1987). Evaluation of a Tetrazolium-based of Chemosensitivity Testing¹ Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Research*, 47 (4), 936–942.
- Carocho, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51 (1), 15–25.
- Carter, L.G., D’Orazio, J.A., & Pearson, K.J. (2014). Resveratrol and cancer: Focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer*, 21 (3), 209–225.
- Cetin, D., Hacimuftuoglu, A., Tatar, A., Turkez, H., & Togar, B. (2016). The in vitro protective effect of salicylic acid against paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity. *Cytotechnology*, 68 (4), 1361–1367.
- Chiang, M.C., Nicol, C.J., & Cheng, Y.C. (2018). Resveratrol activation of AMPK-

- dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against amyloid-beta-induced inflammation and oxidative stress. *Neurochemistry International*, 115, 1–10.
- Chou, T.C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27–55.
- Chou, T.C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*, 70 (2), 440–446.
- Cigremis, Y., Akgoz, M., Ozen, H., Karaman, M., Kart, A., Geçer, M., & Atalan, G. (2015). Resveratrol ameliorates cisplatin-induced oxidative injury in New Zealand Rabbits. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93 (8), 727–735.
- Comşa, Ş., Cîmpean, A.M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Research*, 35 (6), 3147–3154.
- Costa, D. C., Casanova, A.F., Quarti, J., Malheiros, M.S., Sanches, D., dos Santos, P.S., Fialho, E., Silva, J.L. (2012). Transient Transfection of a Wild-Type p53 Gene Triggers Resveratrol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *PLoS ONE*. 7 (11), e48746.
- Cullen, S.P., Brunet, M., & Martin, S. J. (2010). Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death and Differentiation*, 17 (4), 616–623.
- Darwish, M.A., Abo-Youssef, A.M., Khalaf, M.M., Abo-Saif, A.A., Saleh, I.G., & Abdelghany, T.M. (2018). Resveratrol influences platinum pharmacokinetics: A novel mechanism in protection against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology Letters*, 290, 73–82.
- Dasari, S., & Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 5 (0), 364–378.
- De Oliveira, M.R., Nabavi, S.F., Manayi, A., Daglia, M., Hajheydari, Z., & Nabavi, S.M. (2016). Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860 (4), 727–745.
- De Poot, S.A.H., & Bovenschen, N. (2014). Granzyme M: behind enemy lines. *Cell Death and Differentiation*, 21 (3), 359–368.
- Dewangan, J., Tandon, D., Srivastava, S., Verma, A. K., Yapuri, A., & Rath, S.K. (2017). Novel combination of salinomycin and resveratrol synergistically enhances the anti-proliferative and pro-apoptotic effects on human breast cancer cells. *International*

- Journal on Programmed Cell Death*, 22 (10), 1246–1259.
- Do Amaral, C.L., Francescato, H.D.C., Coimbra, T.M., Costa, R.S., Darin, J.D. arc C., Antunes, L.M.G., & Bianchi, M.D.L.P. (2008). Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Archives of Toxicology*, 82 (6), 363–370.
- Eastman, A. (1987). The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & Therapeutics*, 34 (2), 155–166.
- Elchuri, S., Oberley, T.D., Qi, W., Eisenstein, R.S., Jackson Roberts, L., Van Remmen, H., Epstein, J., Huang, T.T. (2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*, 24 (3), 367–380.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35 (4), 495–516.
- Erdem, T., Bayindir, T., Filiz, A., Iraz, M., & Selimoglu, E. (2012). The effect of resveratrol on the prevention of cisplatin ototoxicity. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 269 (10), 2185–2188.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37 (4), 277–285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38 (12), 1103–1111.
- Ewen, C.L., Kane, K.P., & Bleackley, R.C. (2012). A quarter century of granzymes. *Cell Death and Differentiation*, 19 (1), 28–35.
- Facompré, M., Wattez, N., Kluza, J., Lansiaux, A., & Bailly, C. (2001). Relationship between cell cycle changes and variations of the mitochondrial membrane potential induced by etoposide. *Molecular Cell Biology Research Communications*, 4 (1), 37–42.
- Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degant, P., & Amest, B.N. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy- 2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Medical Sciences*, 87, 4533–4537.
- Fridman, J.S., & Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22 (56 REV 8), 9030–9040.
- Fried, J., Perez, A.G., Clarkson, B.D. (1976). Flow cytofluorometric analysis of cell cycle

- distributions using propidium iodide: Properties of the method and mathematical analysis of the data. *Journal of Cell Biology*, 71 (1), 172-181.
- Froelich, C.J., Metkar, S.S., & Raja, S.M. (2004). Granzyme B-mediated apoptosis - The elephant and the blind men? *Cell Death and Differentiation*, 11 (4), 369–371.
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15 (6), 1583–1606.
- Fulda, S., & Debatin, K.M. (2004). Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene*, 23 (40), 6702–6711.
- Fulda, S., & Debatin, K.M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25 (34), 4798–4811.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31 (15), 1869–1883.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119 (3), 493–501.
- Gill, J.G., Piskounova, E., & Morrison, S.J. (2016). Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 81, 163–175.
- Gomez, L.S., Zancan, P., Marcondes, M.C., Ramos-Santos, L., Meyer-Fernandes, J.R., Sola-Penna, M., & Da Silva, D. (2013). Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase. *Biochimie*, 95 (6), 1336-1343
- Gorczyca, W., Bruno, S., Darzynkiewicz, R., Gong, J., & Darzynkiewicz, Z. (1992). DNA strand breaks occurring during apoptosis - their early insitu detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *International Journal Of Oncology*, 1 (6), 639-48.
- Green, D.R., & Fitzgerald, P. (2016). Just So Stories about the Evolution of Apoptosis. *Current Biology*, 26 (13), R620–R627.
- Gueguen, N., Desquirit-Dumas, V., Leman, G., Chupin, S., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Procaccio, V. (2015). Resveratrol directly binds to mitochondrial complex i and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice. *PLoS ONE*, 10 (12), 1–19.

- Güleç, K. (2016). *Kuersetin'in Siklodekstrin Nanopartiküllerinin Hazırlanması Ve İn Vitro Değerlendirilmesi*. Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, İleri Teknolojiler ABD, Nanoteknoloji ABD.
- Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Chaudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C., Gupta, P.K., Pakuwal, U. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (11), 4405–4409.
- Gupta, S.C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J.H., & Aggarwal, B.B. (2011). Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215 (1), 150–160.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*. 301, 5 - 17.
- Halliwell, B. (2001). Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–9.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., & Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science*, 116 (20), 4077–4085.
- He, D., Zhang, Q., & Wang, J. (2009). Resveratrol Protects Against Cisplatin-Induced, *Cancer Biothermal Radiopharmacology*, 24 (6), 675-680.
- Helfinger, V., & Schröder, K. (2018). Redox control in cancer development and progression. *Molecular Aspects of Medicine*, 5(12), 0–1.
- Holt, O.J., Gallo, F., & Griffiths, G.M. (2006). Regulating secretory lysosomes. *Journal of Biochemistry*, 140 (1), 7–12.
- Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Research*, 59 (7), 1701–1706.
- Hsieh, T., & Wu, J.M. (2010). Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. *BioFactors*, 36 (5), 360–369.
- Hsu, H., Xiong, J., & Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*, 81 (4), 495–504.
- http-1:** <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
(Erişim tarihi: 23.03.2018)
- http-2:** http://kanser.gov.tr/Dosya/2017Haberler/2017_4_subat.pdf
(Erişim tarihi: 22.03.2018)
- http-3:** http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
(Erişim tarihi: 22.03.2018)
- http-4:** <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-2.aspx#characteristics>

(Erişim tarihi: 27.03.2018)

http-5: <http://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/apoptosis/index.htm>

(Erişim tarihi: 21.03.2018)

http-6: <http://modernsteroid.blogspot.com.tr/2012/03/potent-antiproliferative-activity-of.html>

(Erişim tarihi: 11.04.2018)

http-7: https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf

(Erişim tarihi: 09.05.2018)

Hu, S., Li, X., Xu, R., Ye, L., Kong, H., Zeng, X., Wang, Hong., Xie, W. (2016). The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48 (6), 528–535.

Huang, C., Ma, W.Y., Goranson, A., & Dong, Z. (1999). Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis*, 20 (2), 237–242.

Hutchinson, L. (2010). Breast cancer: Challenges, controversies, breakthroughs. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7 (12), 669–670.

Hyndman, I.J. (2016). Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. *Cancer Microenvironment*, 9 (1), 63–69.

Im, G.J. (2015). International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 79 (7), 1173.

Jaiswal, P.K., Goel, A., & Mittal, R.D. (2015). Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian Journal of Medical Research*, 141, 389–397.

Jee, J.P., Lim, S.J., Park, J.S., & Kim, C.K. (2006). Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63 (2), 134–139.

Kadowaki, H., & Nishitoh, H. (2013). Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes*, 4 (3), 306–333.

Kaufmann, T., Strasser, A., & Jost, P.J. (2012). Fas death receptor signalling: Roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Differentiation*, 19 (1), 42–50.

Kelle, I., Akkoc, H., Tunik, S., Nergiz, Y., Erdinc, M. & Erdinc, L. (2014). Protective

- effects of ethyl pyruvate in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 28 (4), 674–680.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 89–116.
- Kerr, W.A.A.R.C. (1972). Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Journal of Internal Medicine*, 258 (6), 479–517.
- King, R.E., Bomser, J.A., & Min, D.B. (2006). Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5 (3), 65–70.
- Klaunig, J.E., & Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 116–121.
- Klevos, G.A., Ezuddin, N.S., Vinyard, A., Ghaddar, T., Gort, T., Almuna, A., Abisch, A., Welsh, C. F. (2017). A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient. *Journal of Radiology Nursing*, 36 (3), 158–165.
- Ko, J.H., Sethi, G., Um, J.Y., Shanmugam, M.K., Arfuso, F., Kumar, A.P., Bishayee, A., Ahn, K. S. (2017). The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (12), 1–36.
- Koff, J.L., Ramachandiran, S., & Bernal-Mizrachi, L. (2015). A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (2), 2942–2955.
- Koopman, C.P.M., Reutelingsperger, G.A.M., Kuijten, R.M.J., Keehnen, S.T., & Pals, M.H.J. (1994). Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood*. 84 (5), 1415-1420.
- Lee, S.H., Kim, H.S., An, Y.S., Chang, J., Choi, J., & Im, G.J. (2015). Protective effect of resveratrol against cisplatin-induced ototoxicity in HEI-OC1 auditory cells. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 79 (1), 58–62.
- Lee, A.V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107 (7), 1–4.
- Lee, Y.J., Lee, G.J., Yi, S.S., Heo, S.H., Park, C.R., Nam, H.S., Cho, M., Lee, S.H. (2016). Cisplatin and resveratrol induce apoptosis and autophagy following oxidative stress in malignant mesothelioma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 96–107.

- Li, J., Feng, Q., Kim, J.M., Schneiderman, D., Liston, P., Li, M., Korneluk, B., Tsang, B. K. (2001). Human ovarian cancer and cisplatin resistance: Possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology*, 142 (1), 370–380.
- Li, X., Malamed, M.R., & Darzynkiewicz, Z. (1996). Detection of apoptosis and DNA replication by differential labeling of DNA strand breaks with fluorochromes of different color. *Experimental Cell Research*, 222 (0004), 28–37.
- Ligtenberg, M.A., Mougiakakos, D., Mukhopadhyay, M., Witt, K., Lladser, A., Chmielewski, M., Abken, H., Kiessling, R. (2016). Coexpressed Catalase Protects Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells as well as Bystander Cells from Oxidative Stress-Induced Loss of Antitumor Activity. *Journal of Immunology*, 196 (2), 759–766.
- Lin, X., Wu, G., Huo, W.Q., Zhang, Y., & Jin, F.S. (2012). Resveratrol induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in bladder carcinoma cells. *International Journal of Urology*, 19 (8), 757–764.
- Littarru, G.P., & Tiano, L. (2007). Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: Recent Developments. *Molecular Biotechnology*, 37 (1), 31–37.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4 (8), 118.
- Logue, S.E., & Gorman, A.M. (2013). Current Concepts in ER Stress-Induced Apoptosis. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 6:002.
- Lu, J., Zhang, L., Xie, F., Zhu, L., Li, X., Ouyang, J., Han, S., Yi, C. (2016). Mild oxidative stress induced by a low dose of cisplatin contributes to the escape of TRAIL-mediated apoptosis in the ovarian cancer SKOV3 cell line. *Ocology Reports*, 35, 3427–3434.
- Ma, L., Li, W., Wang, R., Nan, Y., Wang, Q., Liu, W., & Jin, F. (2015). Resveratrol enhanced anticancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by inducing mitochondrial dysfunction and cell apoptosis. *International Journal of Oncology*, 47 (4), 1460–1468.
- Ma, W.Y., Hsiung, L.C., Wang, C.H., Chiang, C.L., Lin, C.H., Huang, C.S., & Wo, A.M. (2015). A Novel 96well-formatted Micro-gap Plate Enabling Drug Response Profiling on Primary Tumour Samples. *Scientific Reports*, 5:9656.
- Maag, R.S., Hicks, S.W., & Machamer, C.E. (2003). Death from within: Apoptosis and the secretory pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 15 (4), 456–461.

- Mackenzie, S.H., & Clark, A.C. (2012). Death By Caspase Dimerization. *Advanced Experimental Medical Biology*, 747, 1–20.
- Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., & Aggarwal, B.B. (2000). Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF- κ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation. *The Journal of Immunology*, 164 (12), 6509–6519.
- Martins, L.A.M., Coelho, B.P., Behr, G., Pettenuzzo, L.F., Souza, I.C.C., Moreira, J.C.F., Wang, X., Guma, F.C.R. (2014). Resveratrol induces pro-oxidant effects and time-dependent resistance to cytotoxicity in activated hepatic stellate cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68 (2), 247–257.
- Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S.S., & Doetsch, P.W. (2013). Cisplatin induces a mitochondrial-ros response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS ONE*, 8 (11), e81162.
- McIlwain, D.R., Berger, T., & Mak, T.W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7 (4), a026716.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1–2), 55–63.
- Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C., Brambilla, E. (1996). In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 44 (9), 959–968.
- Nessa, M.U., Beale, P., Chan, C., Yu, J.Q., & Huq, F. (2012). Combinations of resveratrol, cisplatin and oxaliplatin applied to human ovarian cancer cells. *Anticancer Research*, 32 (1), 53–59.
- Nimse, S.B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5 (35), 27986–28006.
- Olas, B., Wachowicz, B., Majsterek, I., & Blasiak, J. (2005). Resveratrol may reduce oxidative stress induced by platinum compounds in human plasma, blood platelets and lymphocytes. *Anticancer Drugs*, 16 (6), 659–665.
- Olgun, Y., Altun, Z., Aktas, S., Ercetin, P., Kirkim, G., Kiray, M., Serbetcioglu, B.,

- Guneri, E. A. (2013). Molecular mechanisms of protective effect of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity. *Journal of International Advanced Otolaryngology*, 9 (2), 145–152.
- Osman, A.M.M., Al-Malki, H.S., Al-Harhi, S.E., El-Hanafy, A.A., Elashmaoui, H.M., & Elshal, M.F. (2015). Modulatory role of resveratrol on cytotoxic activity of cisplatin, sensitization and modification of cisplatin resistance in colorectal cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 12 (1), 1368–1374.
- Osman, A.M.M., Telity, S. A., Damanhoury, Z.A., Al-Harthy, S.E., Al-Kreathy, H.M., Ramadan, W. S., Kamel, F. (2015). Chemosensitizing and nephroprotective effect of resveratrol in cisplatin -treated animals. *Cancer Cell International*, 15 (1), 1–8.
- Özcan, P., Fiçicioğlu, C., Yildirim, Ö.K., Özkan, F., Akkaya, H., & Aslan, I. (2015). Protective effect of resveratrol against oxidative damage to ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats. *Reproductive BioMedicine Online*, 31 (3), 404–410.
- Percival, M. (1998). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, 1–4.
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., & Tzur, A. (2012). JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death and Disease*, 3 (11), e430-7.
- Perrone, D., Fuggetta, M.P., Ardito, F., Cottarelli, A., de Filippis, A., Ravagnan, G., Lo Muzio, L. (2017). Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) and its properties in oral diseases (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14 (1), 3–9.
- Pham-Huy, L.A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4 (2), 89–96.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 (7), 1035–1042.
- Pop, C., & Salvesen, G.S. (2009). Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (33), 21777–21781.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82 (4), 513–523.
- Rankin, E.B., & Giaccia, A.J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation*, 15 (4), 678–685.
- Rezk, Y.A., Balulad, S.S., Keller, R.S., & Bennett, J.A. (2006). Use of Resveratrol to improve the effectiveness of cisplatin and doxorubicin: Study in human gynecologic cancer cell lines and in rodent heart. *American Journal of Obstetrics and*

- Gynecology*, 194 (5), 23–26.
- Ricci, S.M., & El-Deiry, W.S. (2007). The Extrinsic Pathway of Apoptosis. Gewirtz (Ed.). *In Apoptosis, Senescence, and Cancer* içinde (s.31–54). New York, ABD: Humana Press Inc.
- Ritter, A.T., Angus, K.L., & Griffiths, G.M. (2013). The role of the cytoskeleton at the immunological synapse. *Immunological Reviews*, 256(1), 107–117.
- Saed, G.M., Diamond, M.P., & Fletcher, N.M. (2017). Updates of the role of oxidative stress in the pathogenesis of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 145 (3), 595–602.
- Safa, A.R. (2012). C-Flip, A Master Anti-Apoptotic Regulator. *Experimental Oncology*., 34 (3), 176–184.
- Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391 (6662), 96–99.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73 (1), 39–85.
- Santandreu, F.M., Valle, A., Oliver, J., & Roca, P. (2011). Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28 (2), 219–228.
- Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45 (3), 528–537.
- Sassi, N., Mattarei, A., Azzolini, M., Bernardi, P., Szabo, I., Paradisi, C., Biasutto, L. (2014). Mitochondria-targeted Resveratrol Derivatives Act as Cytotoxic Pro-oxidants. *Current Pharmaceutical Design*, 20 (2), 172–179.
- Schröder, M., & Schroder, M. (2006). The unfolded protein response. *Molecular Biotechnology*, 34 (2), 279–290.
- Sethi, G., Shanmugam, M.K., Warriar, S., Merarchi, M., Arfuso, F., Kumar, A.P., & Bishayee, A. (2018). Pro-Apoptotic and Anti-Cancer Properties of Diosgenin: A Comprehensive and Critical Review. *Nutrients*, 10 (5), 645.
- Shakibaei, M., Harikumar, K.B., & Aggarwal, B.B. (2009). Review: Resveratrol addiction: To die or not to die. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53 (1), 115–28.
- Shiraishi, H. (2006). ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs

- downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *Journal of Cell Science*, 119 (19), 3958–3966.
- Silke, J., & Meier, P. (2013). Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins – Modulators of Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a008730.
- Şimşek, G., Tokgoz, S.A., Vuralkan, E., Caliskan, M., Besalti, O., & Akin, I. (2013). Protective effects of resveratrol on cisplatin-dependent inner-ear damage in rats. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 270 (6), 1789–1793.
- Sinha, D., Sarkar, N., Biswas, J., & Bishayee, A. (2016). Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology*, 40–41, 209–232.
- Slee, E.A., Adrain, C., & Martin, S.J. (2001). Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (10), 7320–7326.
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*, 12 (1), 376–390.
- Stone, J.R., & Yang, S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8 (3–4), 243–270.
- Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., Trapani, J.A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192 (10), 1403–1414.
- Tamaki, N., Cristina Orihuela-Campos, R., Inagaki, Y., Fukui, M., Nagata, T., & Ito, H.O. (2014). Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. *Free Radical Biology and Medicine*, 75, 222–229.
- Toy, A. (2012). *Meme kanserli hastalarda tedavi öncesi ve sonrası total antioksidan kapasite, eser elementler ve lipit peroksidasyonu*. Yayımlanmış Yüksek lisans Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD.
- Turunen, M., Olsson, J., & Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1660 (1–2), 171–199.
- Ulasli, S.S., Celik, S., Gunay, E., Ozdemir, M., Ozyurek, A., Koyuncu, T., & Unlu, M.

- (2013). Anticancer Effects of Thymoquinone , Caffeic Acid Phenethyl Ester and Resveratrol on A549 Non-small Cell Lung Cancer Cells Exposed to Benzo (a) pyrene. *Asian Journal of Cancer Prevention*, 14, 6159–6164.
- Valentovic, M.A., Ball, J.G., Brown, J.M., Terneus, M.V., McQuade, E., Van Meter, S., Roy, A.A., Williams, T. (2014). Resveratrol Attenuates Cisplatin Renal Cortical Cytotoxicity by Modifying Oxidative Stress. *Toxicology In Vitro*, 28 (2), 248–257.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266 (1–2), 37–56.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., Strong, R., Richardson, A. (2003). Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiological Genomics*, 16 (1), 29–37.
- Venkatadri, R., Muni, T., Iyer, A.V., Yakisich, J., & Azad, N. (2016). Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol- induced breast cancer cell death. *Cell Death and Disease*. 7 (2): e2104.
- Vermes, I., Clemens, H., Helga, A., Steffens, N., Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184 (95), 39–51.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., & Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 385.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*, 15, 388.
- Wong, R.S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30 (1), 87.
- Wu, J., He, G.T., Zhang, W.J., Xu, J., & Huang, Q.B. (2016). IRE1 α Signaling Pathways Involved in Mammalian Cell Fate Determination. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38 (3), 847–858.
- Wu, M., Ding, H.F., & Fisher, D.E. (2001). Apoptosis: Molecular Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*. 22(5), 38-45.
- Yu, W., Chen, Y., Dubrulle, J., Stossi, F., Putluri, V., Sreekumar, A., Lai, S., Sandulache,

- V.C. (2018). Cisplatin generates oxidative stress which is accompanied by rapid shifts in central carbon metabolism. *Scientific Reports*, 8 (1), 4306.
- Yumusakhuylyu, A.C., Yazici, M., Sari, M., Binnetoglu, A., Kosemihal, E., Akdas, F., Uneri, C., Tutkun, A. (2012). Protective role of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 76 (3), 404–408.
- Zhan, C., Patskovsky, Y., Yan, Q., Li, Z., Ramagopal, U., Cheng, H., Nathenson, G., Almo, S. C. (2011). Decoy strategies: The structure of TL1A:DcR3 complex. *Structure*, 19 (2), 162–171.
- Zhang, J.H., & Xu, M. (2000). DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research*, 10 (3), 205–211.
- Zhang, W., Wang, X., & Chen, T. (2011). Resveratrol induces mitochondria-mediated AIF and to a lesser extent caspase-9-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 354 (1–2), 29–37.
- Ziegler, U. (2004). Morphological Features of Cell Death. *News in Physiological Sciences*, 19(3), 124–128.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X.Z., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, L., Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes and Development*, 12 (7), 982–995.
- Zmasek, C.M., Godzik, A., Silke, J., Meier, P., & Chan, F.K. (2013). Evolution of the Animal Apoptosis Network, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (3), 1–12.