

**AKCİĞER KANSERİNDE KARBOLATİN VE KURKUMİN
KOMBİNASYONLARININ
OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİSİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Mine EZER

Eskişehir 2019

**AKCİĞER KANSERİNDE KARBOPLATİN VE KURKUMİN
KOMBİNASYONLARININ OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Mine EZER

**Yüksek Lisans Tezi
Biyokimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Aralık 2019**

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1806S236 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mine Ezer'in "Akciğer Kanseriinde Karboplatin ve Kurkumin Kombinasyonlarının Oksidatif Stres Üzerindeki Etkisi" başlıklı tezi 02.12.2019 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

AKCİĞER KANSERİNDE KARBOLATİN VE KURKUMİN KOMBİNASYONLARININ OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Mine EZER

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aralık 2019

Danışman: Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Akciğer kanseri kadın ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir. Karboplatin (CARB), platin grubu antineoplastik ilaçlardan biri olup yumurtalık, akciğer ve beyin gibi birçok kanser tipinde kullanılan etkili bir kemoterapi ajanıdır. Kurkumin (CUR), antioksidan, antienflamatuar ve antiproliferatif özellikler gösteren doğal bir polifenol bileşiktir. Bu tez çalışmasında CARB ve CUR'nin kombinasyon halinde kullanımının CCD-19Lu insan normal akciğer fibroblast ve A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattındaki oksidatif strese olan etkileri incelenmiştir. CARB ve CUR'nin sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle belirlenmiştir. CCD-19Lu'deki CARB ve CUR'un IC₅₀ değerleri sırasıyla 200±16 µM; 150±12 µM; A549 için 100±9 µM; 60±8 µM olarak hesaplanmıştır. Oksidatif stresin belirlenmesinde Total Oksidan (TOS) / Total Antioksidan (TAS) durumları ölçülerek Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplanmıştır. Her iki hücre hattında da tek başına kullanılan CARB'nin OSI değerini artırdığı, CUR ile oluşturulan kombinasyonlarda ise OSI değerini aşağıya çektiği tespit edilmiştir. Oksidatif stresin diğer belirteçleri olan süperoksit dismutaz (SOD), redükte glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri analiz edilmiştir. A549 hücre hattında CUR ile oluşturulan (KM30; KM40) kombinasyon gruplarındaki SOD değerleri kontrole göre (1,086±0,09 U/mL) sırasıyla 0,891±0,02 U/mL; 0,912±0,01U/mL, GSH değerleri kontrole göre (0,3590±0,02 µM) sırasıyla 0,3870±0,03 µM; 0,3905±0,02 µM, MDA değerleri ise kontrole göre (1,050±0,05 µM) sırasıyla 0,740±0,04 µM; 0,622±0,02 µM tespit edilmiştir.

Bu verilere göre çalışmamızda kullanmış olduğumuz kurkuminin tek başına kullanılan karboplatin ve kontrole göre OSI'yi azalttığı ve hüresel hasarı en aza indirdiği görülmektedir.

Anahtar Sözcükler: CCD-19Lu, A549, Karboplatin, Kurkumin, Oksidatif Stres

ABSTRACT

THE EFFECT OF CARBOLATIN VE KURKUMİN COMBINATIONS ON OXIDATIVE STRESS IN LUNG CANCER

Mine EZER

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, December, 2019

Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Lung cancer is one of the the primary causes of cancer related deaths both in men and women. Carboplatin (CARB) which is one of the antineoplastic agents of the platinum group is efficiently used as a chemotherapy agent in a various of cancer types such as ovary, lung, and brain cancer. Curcumin (CUR) is a natural polyphenol compound which has antioxidant, antiinflammatory and antiproliferative features. In this dissertation effects of use of CARB and CUR a combination to cell lines in CCD-19Lu lungs fibroblast and oxidative stress in the A549 lung adenocarcinoma were examined. The cytotoxic effects of CARB and CUR's were determined by using MTT method. IC₅₀ values of CARB and CUR in the CCD-19Lu were calculated respectively 200±16 µM; 150±12 µM and 100±9 µM; 60±8 µM in A549 cell lines. While determining oxidative stress, Oxidative Stress Index (OSI) was calculated by measurement of Total Oxidant (TOS) / Total Anti-Oxydant (TAS) phases. In both cell lines it is monitored that single use of CARB increased the OSI value while combination generated with CUR decreased the OSI value. Other markers of oxydative stress; such as superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) levels were also analysed.

It was determined that combination groups generated with CUR in the A549 cell line (KM30; KM40), SOD levels was monitored (1,086±0,09 U/mL) respectively as 0,891±0,02 U/mL; and GSH levels was monitored (0,3590±0,02 µM) respectively as 0,3870±0,03 µM; 0,3905±0,02 µM, and MDA levels was monitored (1,050±0,05 µM) respectively 0,740±0,04 µM; 0,622±0,02 µM.

In this study, curcumin decresed the OSI level and minimises the cellular damage when compared to single use of Carboplatin and contol

Keywords: CCD-19Lu, A549, Karboplatin, Kurkumin, Oxidative Stress

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca ikinci annem olup her zaman her konuda yardımcı olan, çalışmaların boyunca bilgisini ve yardımlarını esirgemeyip yol gösteren, farklı bir bakış açısıyla yüksek lisans danışmanım olmaktan çok hayat danışmanım olan güler yüzlü sevgili hocam Filiz ÖZDEMİR'e

Bilgisi ve geniş bakış açısıyla bölümdeki tüm öğrencilere her konuda yardım eden, tez çalışmam boyunca tecrübesiyle yol gösterip tavsiyede bulunan sevgili hocam Zerrin SELLER'e,

Geç tanıma fırsatı bulduğum güler yüzlü sevgili hocam Seda Mehtap KILIÇASLAN'a,

Yüksek lisans ders dönemim boyunca bilgilerinden faydalandığım sevgili hocalarım Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ, Halide Edip TEMEL ve Şükrü BEYDEMİR'e,

Laboratuvar çalışmalarında bana yardımlarını esirgemeyip her konuda bilgilerine ihtiyaç duyduğum Arda SEVER ve Kadri GÜLEÇ'e,

Bana hücre hattı konusunda yardımcı olan Şennur GÖRGÜLÜ'e,

Yüksek lisansım boyunca sonsuz katkılarını gördüğüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanları Nesrin EREN, Tuba İNÇELİ, Ömer CAN, Gökhan DİLSİZ ve İlver CANDEMİR'e,

Hem çalışmalarımnda hem de hayatımda sonsuz desteği ile yanımda olup bana hep moral veren, bana güç veren sevgili Hüseyin OKTAY'a

Bana her zaman düşünmeyi, sorgulamayı, çalışmayı ve vazgeçmemeyi öğreten, ne olursa olsun arkamda olan çok değerli sevgili aileme, en içten teşekkürleri sunarım.

Fatih Ezer'e...

02.12.2019

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 çalışmanın 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.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. Akciğer kanseri.....	2
2.1.1.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi.....	2
2.1.1.2. Akciğer kanseri etiyolojisi	3
2.1.1.3. Akciğer kanseri histopatolojisi.....	4
2.1.2. Küçük hücreli akciğer kanseri	4
2.1.3. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri	4
2.1.3.1. Adenokarsinom	5
2.1.3.2. Skuamöz hücreli	5
2.1.3.3. Büyük hücreli karsinom	5
2.1.4. A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı	5
2.1.4.1. A549 hücre hattı ve kemoterapi.....	5
2.2. Karboplatin.....	6
2.2.1. Karboplatin kimyasal yapısı.....	6
2.2.2. Karboplatin etki mekanizması	7
2.3. Serbest Radikaller	7
2.3.1. Serbest radikal oluşum nedenleri.....	7
2.3.2. Serbest radikaller oluşturan başlıca mekanizmalar	8
2.3.2.1. Otooksidasyon	8
2.3.2.2. Geçiş metal iyonlarının etkisi.....	9
2.3.2.3. Fotooksidasyon	9

	<u>Sayfa</u>
2.3.2.4. Enzimatik oksidasyonlar	9
2.3.3. Serbest radikal türleri	10
2.3.3.1. Reaktif oksijen türleri	10
2.3.3.1.1. Tekli (singlet) oksijen ($^1\text{O}_2$)	10
2.3.3.1.2. Süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	10
2.3.3.1.3. Hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$)	10
2.3.3.1.4. Hidrojen peroksit (H_2O_2)	10
2.3.3.2. Reaktif nitrojen türleri	11
2.3.3.2.1. Nitrik oksit ($\text{NO}^{\cdot}$)	11
2.3.3.2.2. Peroksinitrit anyonu ($\text{ONOO}^{\cdot-}$)	11
2.3.4. Serbest radikal etkileri	11
2.4. Oksidatif Stres	11
2.5. Antioksidan Sistemi	12
2.4.1. Hücre içi antioksidanlar	12
2.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	12
2.4.1.2. Katalaz (CAT)	13
2.4.1.3. Redükte glutatyon (GSH)	13
2.4.1.4. Glutatyon peroksidaz (GPx)	14
2.4.1.5. Glutatyon redüktaz (GR)	14
2.4.1.6. Glutatyon -S- transferaz (GST)	14
2.5. Kurkumin	14
3. GEREÇLER	18
3.1. Kullanılan Hücre Hatları	18
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.3. Kullanılan Cihazlar	19
4. YÖNTEMLER	19
4.1. Hücre Kültürü Uygulamaları	19
4.1.1. Hücrelerin stoktan çıkartılması	19
4.1.2. Hücre hatlarının pasajlanması	20
4.1.3. Hücre hatlarının stoklanması	20
4.2. Etken Madde Dozlarının Hazırlanması	20
4.2.1. Karboplatin	20

	<u>Sayfa</u>
4.2.2. Kurkumin	20
4.3. Sitotoksosite Testleri	21
4.3.1. Karboplatin ve kurkumin CCD-19Lu ve A549 hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	21
4.3.2. MTT yönteminin uygulanması.....	22
4.3.3. İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi	22
4.3.4. Kombinasyon dozlarının ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	22
4.3.5. Kombinasyon indeksinin belirlenmesi.....	22
4.4. Hücrelerdeki Oksidatif Dengenin Belirlenmesi	23
4.4.1. Total Oksidan Durum (TOS) yöntemi.....	23
4.4.1.1. Yöntemin uygulanması	23
4.4.2. Total Antioksidan Durum (TAS) yöntemi	24
4.4.2.1. Yöntemin uygulanması	24
4.4.3. Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) belirlenmesi.....	25
4.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Ölçümü	25
4.5.1. Yöntemin uygulanması	26
4.6. Redükte glutasyon (GSH) ölçümü	26
4.6.1. Yöntemin uygulanması	27
4.7. Malondialdehit (MDA) Ölçümü	28
4.7.1. Yöntemin uygulanması	28
4.8. İstatistiksel Analiz	29
5. BULGULAR.....	29
5.1. Sitotoksosite Bulguları.....	29
5.1.1. Karboplatin ve kurkuminin normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücrelerindeki sitotoksik bulguları.....	29
5.1.2. Karboplatin ve kurkumin kombinasyonlarının normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücrelerinde sitotoksik bulguları.....	34
5.1.3. Kombinasyon indeksi bulguları	36
5.2. Hücrelerdeki Oksidatif Denge Durumları.....	38
5.2.1. TOS ve TAS bulguları.....	38
5.2.2. OSI değerinin hesaplanması.....	38

	<u>Sayfa</u>
5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivasyon Bulguları.....	40
5.4. Redükte Glutasyon (GSH) Bulguları.....	44
5.5 Malondialdehit (MDA) Bulguları	48
6. TARTIŞMA.....	52
KAYNAKÇA.....	58
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 5.1. Karboplatin konsantrasyonlarının normal CCD-19Lu hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi.....	30
Tablo 5.2. Kurkumin konsantrasyonlarının normal CCD-19Lu hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi.....	31
Tablo 5.3. Karboplatin konsantrasyonlarının A549 adenokarsinom hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi.....	32
Tablo 5.4. Kurkumin konsantrasyonlarının A549 adenokarsinom hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi.....	33
Tablo 5.5. Karboplatin ve kurkumin IC ₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda normal CCD-19Lu hücrelerindeki inhibisyonu.....	34
Tablo 5.6. Karboplatin ve kurkumin IC ₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda A549 adenokarsinom hücrelerindeki inhibisyonu	35
Tablo 5.7. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların normal CCD-19Lu hücre hatlarındaki sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri.....	36
Tablo 5.8. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri.....	37
Tablo 5.9. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda normal CCD-19Lu hücrelerindeki total oksidan ve antioksidan durumuna etkileri.	38
Tablo 5.10. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda A549 adenokarsinom hücrelerindeki total oksidan ve antioksidan durumuna etkileri.	38
Tablo 5.11. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki TOS ve TAS deney sonucu üzerinden hesaplanan (TOS / [TAS x10]) OSI değerleri.	39
Tablo 5.12. A549 adenokarsinom hücre hattındaki TOS ve TAS deney sonucu üzerinden hesaplanan (TOS / [TAS x10]) OSI değerleri.	39

Tablo 5.13. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin SOD aktivasyonu sonuçları.....	41
Tablo 5.14. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin SOD aktivasyonu sonuçları.....	42
Tablo 5.15. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin GSH sonuçları	45
Tablo 5.16. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin GSH sonuçları	46
Tablo 5.17. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin MDA sonuçları	49
Tablo 5.18. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin MDA sonuçları	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Dünya sağlık örgütü 2014 kanser nedenli ölüm verileri.	3
Şekil 2.2. Platin bazlı sisplatin ve karboplatinin moleküler yapısı.....	6
Şekil 2.3. Kurkuminin kimyasal yapısı.	15
Şekil 2.4. Zerdeçal ve kurkumin metabolitlerinden gelen doğal türevler	16
Şekil 2.5. Kurkuminin doğada bulunan türevleri	17
Şekil 4.1. Formazan tuzunun oluşumu	21
Şekil 4.2. SOD deney prensibi.....	26
Şekil 4.3. GSH deney prensibi.....	27
Şekil 4.4. MDA deney prensibi	28
Şekil 5.1. Karboplatin konsantrasyonlarının normal CCD-19Lu hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi.....	30
Şekil 5.2. Kurkumin konsantrasyonlarının normal CCD-19Lu hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi	31
Şekil 5.3. Karboplatin konsantrasyonlarının A549 adenokarsinom hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi	32
Şekil 5.4. Kurkumin konsantrasyonlarının A549 adenokarsinom hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi	33
Şekil 5.5. Karboplatin ve kurkumin IC ₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda normal CCD-19Lu hücrelerindeki inhibisyonu	34
Şekil 5.6. Karboplatin ve kurkumin IC ₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda A549 adenokarsinom hücrelerindeki inhibisyonu	35
Şekil 5.7. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların normal CCD-19Lu hücre hattında sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri	36
Şekil 5.8. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların A549 adenokarsinom hücre hattında sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri	37
Şekil 5.9. SOD standart grafiği.....	40

Şekil 5.10. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin SOD aktivasyonu sonuçları.....	41
Şekil 5.11. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin SOD aktivasyonu sonuçları.....	42
Şekil 5.12. Normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki SOD düzeyleri.....	43
Şekil 5.13. GSH standart grafiği.....	44
Şekil 5.14. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin GSH sonuçları ...	45
Şekil 5.15. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin GSH sonuçları.....	46
Şekil 5.16. Normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki GSH düzeyleri.....	47
Şekil 5.17. MDA standart grafiği	48
Şekil 5.18. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin MDA sonuçları..	49
Şekil 5.19. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin MDA sonuçları.....	50
Şekil 5.20. Normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki MDA düzeyleri.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\cdot\text{O}_2^-$	: Süperoksit anyon radikali
$^1\text{O}_2$	: Tekli Singlet Oksijen
A549	: Akciğer insan epitel kanser hücre hattı
ATP	: Adenozin trifosfat
CARB	: Karboplatin
CAT	: Katalaz
CCD-19Lu	: Akciğer insan normal fibroblast hücre hattı
CI	: Kombinasyon indeksi
Cu/Zn SOD	: Bakır/çinko süperoksit dismutaz
CUR	: Kurkumin
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EMEM	: Eagle's minimal essential medium
FBS	: Fetal bovine serum
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon-S- transferaz
IC ₅₀	: %50 inhibe eden konsantrasyon
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KM	: Kombinasyon
L $\cdot$	: Lipid radikali
LH	: Yağ asiti
LOO $\cdot$	: Lipid peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksit
Mn-SOD	: Mangan süperoksit dismutaz
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)
NADP $^+$	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF- κ B	: Nükleer faktör kappa B

NHL	: Non-Hodgkin Lenfoması
NK	: Doğal öldürücü hücre
NO [•]	: Nitrik oksit
Notch-1	: Notch-1 sinyal yolağı
OH [•]	: Hidroksil radikali
ONOO ⁻	: Peroksinitrit anyonu
OSI	: Oksidatif stres indeksi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
RO [•]	: Alkoksi
ROO [•]	: Peroksi
ROOH	: Organik peroksit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RPMI-1640	: Roswell park memorial institute
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAC	: Total antioksidan kapasite
TAS	: Total antioksidan durum
TBARS	: Tiyoarbitürik asit reaktif maddesi
TNB	: 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
TOS	: Total oksidan durum
UV	: Ultraviyole
X [•]	: Herhangi bir radikal

1. GİRİŞ

Kanser, sağlıklı hücrelerin yerini kontrolsüzce çoğalan sağlıklı hücrelerin aldığı dünya genelinde önüne geçilemeyen çok geniş bir hastalık grubudur. Büyüme sinyallerinin normale oranla artmış olması, apoptoza direnç geliştirmesi, anjiyogenez ve metastaz özelliklerini kazanması gibi faktörlerin gerçekleşmesiyle normal hücreler kanserli hücrelere dönüşmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Dünya Sağlık Örgütüne göre ölümün en önde gelen nedenlerin başında kanser gelmektedir. Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok rastlanan ikinci hastalıktır. Birleşik devletlerdeki 2012 yılı verilere bakıldığında 226,160 yeni vaka doğrultusunda 160,340 ölüm kayıtlara geçmiştir. Dünyadaki kanser vakaların büyük bir çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde olup ölüm oranı %50'nin üzerindedir. Düşük ve orta gelirli ülkelerde kanser, 2005 yılında 7,6 milyon insanın ölümüne neden olmakla beraber bu oran 2012 yılında 8,2 milyona ulaşmıştır. Dünya nüfusunun büyük bir kısmının az gelişmiş ülkelerde yaşaması, nüfusun artması ve yaşlanmayla beraber kanserden ölen sayısının daha da artacağı düşünülmektedir (Stewart ve Wild, 2014).

Akciğer kanseri dünya çapında mortalitesi hızla artan ve kansere bağlı ölüm nedenlerinin başında gelen bir kanser çeşididir. Küçük hücreli dışı akciğer (KHDAK), akciğer kanseri vakalarının %80'nini oluşturan bir kanser türüdür. Son 5 yıldaki değerler göz önüne alındığında KHDAK'da sağ kalım %15'tir. KHDAK için radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi gibi seçenekler olmasına rağmen invazyon ve metastazdan dolayı ölüm kaçınılmaz olmaktadır (Wang vd., 2018).

Sisplatin analogu olan ikinci yeni bir platin ajanı karboplatin, 10 yıldan beri akciğer, kafa, boyun ve yumurtalık kanseri tedavisinde kullanılan güçlü bir anti tümör ilaçtır (Sreenivasan ve Krishnakumar, 2015).

Kaynağı zerdeçal (*Curcuma Longa*) baharatı olan ve diyet maddesi olarak çok uzun yıllardır kullanılan kurkumin (1,7-bis (4-hidroksi-3- metoksifenil)-1, 6-heptadiene-3,5-dione), yaygın olarak çeşitli alanlarda kullanılan doğal bir hidrofobik polifenol bileşiktir (Dorai vd., 2001). Kurkumin, bazı transkripsiyon faktörlerini ve protein kinazları etkileme, malign tümörlerde apoptozu indükleyebilme özellikle ile önemli bir potansiyele sahiptir. Yapılan kapsamlı çalışmalarda kurkuminin; antienflamatuar, antienfektif ve anti tümorigenez etkiye sahip olduğu görülmüştür (Sela, Epelbaum ve Schaffer, 2010; Mukhopadhyay vd., 2002).

Kanseri oluşturan faktörlerden biri de fazla miktarda biriken serbest radikallerdir. Serbest radikallerin artması oksidan seviyesinin giderek yükselmesine ön ayak olurken buna karşın savunma sistemi olarak vücudumuzda üretilen ve besinlerden alınan antioksidanlar devreye girer. Oksidan ve antioksidan dengenin bozulması durumunda oksidatif stres açığa çıkmaktadır. Artan oksidatif stresle birlikte hücre ölümleri artmaktadır. Bu faktörler göz önüne alındığı zaman kansere bağlı ölüm oranını en aza indirme yönünde doğal antioksidan konulu birçok araştırma yapılmaktadır.

Yapmış olduğumuz literatür çalışmalarında CCD-19Lu akciğer fibroblast ve A549 akciğer adenokarsinom hücre hatlarında karboplatin ve kurkuminin kombine kullanımının oksidatif stres üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda çalışmamızda, karboplatin ve kurkuminin kombine kullanımlarının normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatları üzerindeki oksidatif stres etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

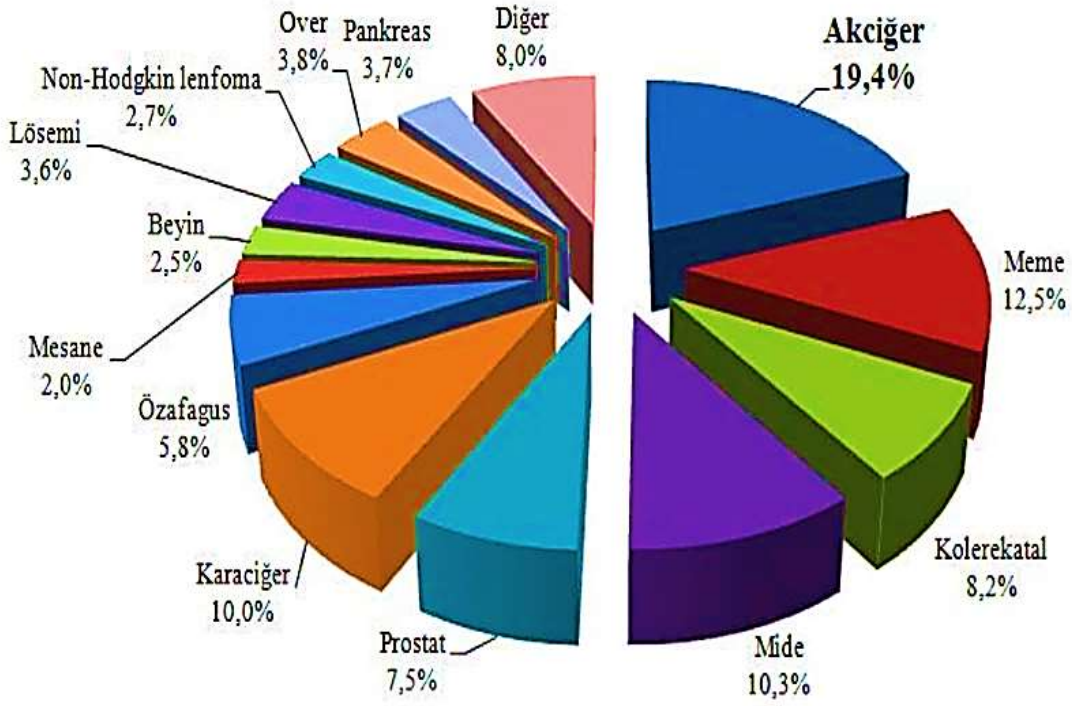
Kanser; işlev bozuklukları, mutasyonlar ve genetik değişikliklerin birikimiyle ölmesi gereken hasarlı hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemesi ile genetik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanseri; insan sağlığı üzerinde sosyal ve ekonomik etki oluşturan ciddi bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Uygulanan tedavilerin, korunma yöntemlerin ve hızlı teşhislerin olmasına rağmen ölüme neden olduğu görülmektedir (Özenoğlu vd., 2013).

2.1.1. Akciğer kanseri

2.1.1.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi

Akciğer kanseri sigara içme, sigara tüketim sıklığı ve sigara dumanına maruz kalma ile doğru orantılı olarak artmakta olup dünyada en sık gözlenen kanser türlerinden biridir. Tütün kullanımıyla beraber kansere yakalanma oranları arasında neden sonuç ilişkisi klinik ve ekolojik olarak da kanıtlanmıştır. Artan nüfusla beraber tüketilen tütün miktarı doğru orantı gösterip buna bağlı olarak akciğer kanserine yakalanma ve ölüm oranı git gide artmaktadır. Akciğer kanseri yeni oluşan kanser türlerinin %12,8'ini oluşturmaktadır. Açıklanan bu değerler zamana bağlı olarak hızla artmaktadır (Bingöl,

2014; Travis, 2013). Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda ve erkeklerde en öldürücü kanser türü akciğer kanseri olup 2014 itibarıyla 224,210 yeni vaka ve 159,260 ölüm kayıtlara geçmiştir (American Cancer Society, 2014). Bu rakamlar akciğer kanserinin sebep olduğu ölümlerin, en ölümcül 4 kanser tiplerinden daha fazla olduğunu göstermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Dünya sağlık örgütü 2014 kanser nedenli ölüm verileri (Mona ve Kristen, 2014).

Akciğer kanserine yakalanma sıklığı yaşın ilerlemesiyle artmakta olup 50 yaş üstü için önemli bir tehdittir (Spiro ve Porter, 2002). Geçirilen akciğer hastalıkları, tütün kullanımı, hava kirliliği, çevresel faktörler ve genetik faktörler akciğer kanserine yakalanmak için en etkili neden olarak gösterilmektedir (Alberg, Ford ve Samet, 2007).

2.1.1.2. Akciğer kanseri etiyolojisi

Akciğer kanserinin hızla artması ve yayılmasında en önemli faktör sigara tüketimi gözükse de genetik ve çevresel faktörler de etkilemektedir. Tütün ve tütün ürünleri akciğer kanserini tetikleyen en önemli faktörlerin başında gelmektedir. Tütün yoğunluğunun ve tüketim sıklığının artması akciğer kanserine yakalanma riskini normal bir insana oranla 40-50 kat arttırmaktadır (Fraser vd., 1999). Sigarada 40.000'den fazla kimyasal madde bulunmakla beraber bunların 60'dan fazlası karsinojen maddedir

(Yüksek, 2015). Çevresel faktörlerin başında pasif içicilik gelmekte olup sigara dumanında 6000 kadar kimyasal madde bulunmakla beraber bunların da 50'den fazlası karsinojendir. Sigara içindeki kimyasal ve karsinojen maddelerin oranı düşülmesi durumunda akciğer kanserine yakalanma oranı çok az miktar azalmaktadır (Özbaşıoğlu, 2013). Pasif içicilikten etkilenen kadınların oranı erkeklere göre azdır. Pasif içicilikte akciğer kanserine yakalanma riski normal sigara tüketenlere göre az olsa da pasif içiciliğe çok erken yaşlarda maruz kalanlar akciğer kanserine daha çabuk yakalanmaktadır (Alberg, Ford ve Samet, 2007).

Akciğer kanserine yakalanmada en fazla tütün kullanımı ve tütüne maruz kalma etkiliyken bireysel, mesleki ve çevresel faktörler de bu oranı değiştirebilen etiyolojik faktörlerdir.

2.1.1.3. Akciğer kanseri histopatolojisi

Akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere 2 gruba ayrılır. KHDAK; adenokarsinoma, skuamöz hücreli karsinoma, ve büyük hücreli karsinoma olmak üzere 3 alt kanser türünü oluşturur. KHAK, bu kanser türlerinin büyük kısmını kapsar (Chang vd., 2004; Kuo vd., 2005).

2.1.2. Küçük hücreli akciğer kanseri

KHAK, akciğer kanserinin yaklaşık %15'ini kapsamaktadır. KHAK'ın KHDAK'tan farklı bir yanı da tanı anında metastaz yapması ve kromatin yapısıdır. Bu yüzden tanısı konulduğunda ileri evrede olmaktadır (Diniz, Ünlü ve Kömürcüoğlu, 2017).

2.1.3. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

KHDAK; adenokarsinoma, skuamöz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinoma olarak sınıflandırılmış olup akciğer kanserinin büyük bir kısmını oluşturur (Akkoçlu ve Öztürk, 1999).

2.1.3.1. Adenokarsinom

Daha yavaş büyüyüp kitle halinde yapıya sahiptir. Akciğerdeki mukus üreten hücrelerden oluşmaktadır. En çok gözlenen akciğer kanser türü olarak bilinmektedir. Sigara içmeyenlerde ve kadınlarda daha fazla görülmektedir (Yener ve Düşmez, 2017).

2.1.3.2. Skuamöz hücreli

Günümüzde adenokarsinoma hücreli akciğer kanserinden sonra en fazla gözlenen skuamöz hücreli akciğer kanseridir. Genellikle bronşlarda bulunan kanser türüdür. Morfolojik olarak 4 gruba ayrılmaktadır (Yener ve Düşmez, 2017).

2.1.3.3. Büyük hücreli karsinom

Küçük hücreli dışı akciğer kanser türünün yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Küçük hücreli karsinoma özelliklerini göstermeyip büyük hacimlidir. Diğerleri gibi büyük hücreli karsinoma da sigara ile ilişkilidir (Travis vd., 2015).

2.1.4. A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı

Küçük hücreli olmayan adenokarsinomik insan epitelyal hücrelerdir. Kanserli akciğer doku kültürü pulmoner adenokarsinoması bulunan 58 yaşındaki Kafkaslı bir erkekten alınmıştır. A549 hücre hattı, akciğer hücrelerine maddelerin taşınmasından sorumludur. A549 hücreleri hipotriploid bir insan hücre hattıdır. Bazı analizlere bakıldığında kromozom kayıplarına rastlanmıştır. *In vitro* çalışmalarda kullanılan hücre tipidir (Lieber vd., 1976).

2.1.4.1. A549 hücre hattı ve kemoterapi

KHDAK hastalarında tümör tam olarak yayılmadığından dolayı cerrahi müdahale uygundur. KHDAK için genel olarak en uygun görülen tedavi yöntemi kemoterapidir. KHDAK'lı hastaların ilerleyen evrelerinde kemoterapi ve radyoterapi kabul görülen bir tedavi olmuştur. Kemoterapi ve radyoterapinin aynı zamanda uygulanması ard arda uygulanmasından daha etkili olduğu görülmüştür (Robinson vd., 2007).

Amerikan Klinik Onkoloji Derneği, daha fazla sağkalım için platin bazlı ikili kemoterapi tedavilerini tavsiye etmektedir. Kemoterapi ilaçlarının nefrotoksisite, nörotoksisite ve ilaç direnci gibi etkilerden dolayı kullanımına kısıtlama getirilmiştir. Bu

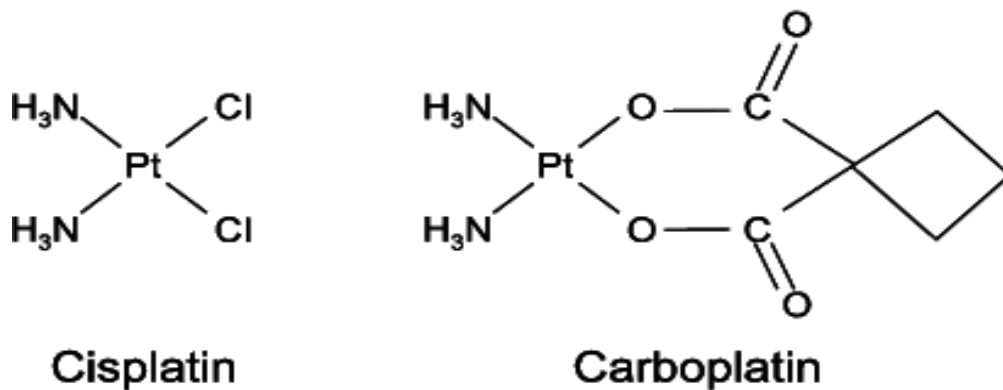
nedenden dolayı platin komplekslerinin geliştirilmesi yönünde daha fazla odaklanılmıştır. Platin gruplu ilaçlar sisplatinden daha fazla stabiliteye ve azaltılmış kimyasal reaktiviteye sahip olsalar da sisplatine göre daha avantajlıdır. Klinik uygulamada platin bazlı kemoterapik ajanlar en fazla bir yıllık bir yaşam süresi sunarken bu oran KHDAK'larda %50'leri bulmaktadır. Bu sonuç sinyal yollarının kemoterapi ile uyarılması esasına dayanır (Christopher vd., 2010).

2.2. Karboplatin

Karboplatin (CARB) veya cis-diammine (1,1-cyclobutanecarboxylato) platinum (II), kanser tedavisinde kullanılan bir anti kanser ilaçtır. Cisplatin analogu olan karboplatin; akciğer, kafa, boyun ve yumurtalık kanserinde sıklıkla kullanılmaktadır (Xiao vd., 2017). Karboplatin, sisplatine çok benzer yapıda olmasına rağmen sisplatinden daha az toksiktir (Dasarı ve Tchounwou, 2014). Karboplatin, FDA tarafından onaylanmış olup sisplatin ile birlikte kullanılmaktadır. Karboplatin, sisplatine benzer şekilde iki klorür ligandı bulundurmaz. Klorür iyonları ortama yayılarak DNA ile etkileşime girer. Klorür iyonları DNA zincirinde çapraz bağlar oluşturarak DNA'nın farklı bir yapı ile çapraz bağlar oluşturmasıyla inhibisyonları gerçekleştirir (Boulikas ve Vougiouka 2003; Ernest ve Christen, 1999).

2.2.1. Karboplatin kimyasal yapısı

Karboplatin, sisplatinden farklı olarak organik karboksilat grubu içermektedir. Bu farklılık molekülün daha hızlı suda çözünmesini ve daha yavaş hidroliz olabilmesini sağlar. Böylelikle vücuttan daha yavaş atılır. Karboplatinin büyük kısmı idrarla atılmaktadır (Bernard ve Claudie, 2002; Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Platin bazlı sisplatin ve karboplatinin moleküler yapısı (Kuruoğlu, 2017).

2.2.2. Karboplatin etki mekanizması

Kanser tedavilerinde kemoterapi tek başına veya radyoterapi ile beraber kullanılarak adjuvan bir tedavi hedeflenmektedir. Karboplatin adjuvan tedavide sıklıkla tercih edilen bir anti kanser ilaçtır. Adjuvan tedavi ile hastaların hayatta kalma süresini ve yaşam kalitesini artırmaktadır (Johnstone, Ruefli ve Lowe, 2002).

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, atomların dış orbitallerinde bir veya birden daha fazla elektron bulunduran bileşiklerdir. Bu radikaller anyon, katyon veya nötral yapıda olabilirler (Valko vd., 2007). Serbest radikal moleküllerinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgi ile diğer moleküllerden ayırt etmek mümkündür. Bu bileşikler yüksek enerjili olup stabil değildirler. Eşleşmemiş elektron bulundurduklarından dolayı daha kolay eşleşebilme yapısındadırlar (Betteridge, 2000). Son yörüngelerinde çiftleşmemiş elektron bulundurmeyen atom veya moleküller kararlı yapıda olduklarından dolayı diğer moleküllerle reaksiyona girme eğilimleri serbest radikallerdeki kadar yüksek değildir. Bu çiftleşmemiş elektronlar serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırarak birçok makromoleküler yapılara (lipid, protein, DNA ve nükleotid koenzimler) zarar vermektedir. Açığa çıkan bu zararlar yaşlanma ile beraber birçok hastalığa da davetiye çıkarmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1985).

Serbest radikallerin kaynağı sadece oksijen gibi gözüke de serbest radikaller azot, kükürt ve karbon kaynaklı da olabilmektedir.

2.3.1. Serbest radikal oluşum nedenleri

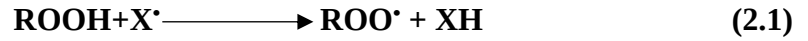
Serbest radikallerin oluşmasındaki nedenler, endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere iki alt başlıkta incelenmektedir. Güneş ışığı, radyasyon, lipid peroksidasyonu, ksantin oksidaz, nötrofiller, bilinçsiz ilaç tüketimi, hava kirliliği, diyet ürünleri, sigara dumanı, kükürt dioksit, ozon, ısı şoku gibi faktörleri ekzojen kaynaklar olarak sıramak mümkündür (Cadenas, 1989).

2.3.2. Serbest radikaller oluşturan başlıca mekanizmalar

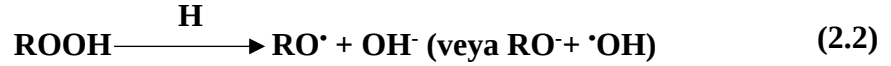
2.3.2.1. Otooksidasyon

Otooksidasyon, oksijenin katalizlediği serbest radikal zincirinden oluşmaktadır. Serbest radikaller oksijenle çok hızlı bir şekilde reaksiyona girmektedir. Ana ürünün oluşması için üç mekanizma gerekir (Nawar, 1996).

1. Peroksi (ROO•) radikalinin oluşması için organik peroksit (ROOH), başka kaynaklardan gelen bir radikal (X•) ile reaksiyona girer.



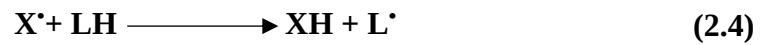
2. Alkoksil (RO•) radikalinin oluşması için organik peroksit, farklı bir indirgenle reaksiyona girer ve indirgenir.



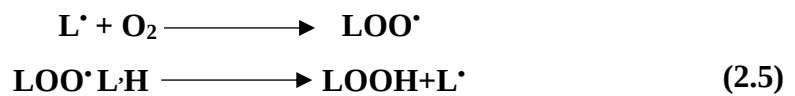
3. Alkoksil ve hidroksil radikali oluşturmak için organik peroksitteki O-O bağı parçalanır. Diğer mekanizmalara göre daha az önemlidir.



Lipid peroksidasyonu; başlangıç, ilerleme ve sonuç kısmından oluşmaktadır. Başlangıç aşamasında, başlatıcı bir radikal (X•) ile yağ asiti (LH) reaksiyonu ile lipid radikali oluşur.



L• radikale eklenen oksijen (O₂), lipid peroksil radikalini (LOO•) oluşturur. Lipid peroksil radikale diğer yağ asitinden ayrılan hidrojen atomuyla birleşip tekrar lipid hidroperoksite (LOOH) dönüşmektedir.

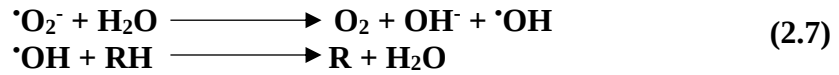


Oluşan radikaller birbirleriyle beraber reaksiyona girerek radikal olmayan eter, ester, aldehit, keton ve alkol gibi stabil ürünlere dönüşmektedir (Koca ve Karadeniz, 2016).

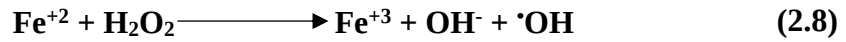


2.3.2.2. Geçiş metal iyonlarının etkisi

Geçiş metal iyonları serbest radikal oluşumunu gerçekleştiren yapılardır. Demir, oksidatif reaksiyonları teşvik etmede etkili metaldir. Demir, biyolojik sistemde birçok önemli görevde yer alırken canlı hücrelerde toksik etki oluşturabilmektedir. Demirin oluşturmuş olduğu toksik etki ile açığa çıkan aktif oksijen türleri lipid peroksidasyonunu teşvik etmektedir. Süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\bullet-}$), su ile reaksiyona girerek zararlı hidroksil ($\text{OH}^{\bullet}$) radikalini oluşturur (Halliwell ve Gutteridge, 1985).



Fe iyonları, “Fenton reaksiyonları” ile hidrojen peroksitlerin hidroksil radikallerine dönüştürür (Miller, 1996).



2.3.2.3. Fotooksidasyon

Fotooksidasyon, oksidasyonların başlamasında önemli olan peroksitlerin oluşmasında önemlidir. Işığın absorbe olmasıyla süperoksit oluşmasını sağlamaktadır. Bir molekülün ışığı doğrudan absorbe etmesi diğer başka türlerin de oksidasyonuna neden olabilmektedir (Koca ve Karadeniz, 2016).

2.3.2.4. Enzimatik oksidasyonlar

Reaktif oksijen türleri, vücutta birçok enzimin aktivitesi sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Meydani, 2001).

2.3.3. Serbest radikal türleri

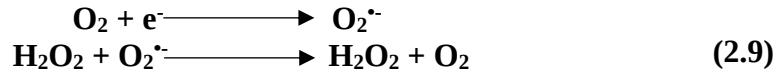
2.3.3.1. *Reaktif oksijen türleri*

2.3.3.1.1. *Tekli (singlet) oksijen (1O_2)*

Eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayıp oksidan özellik gösterebilen reaktif oksijen türüdür. Serbest radikallerin reaksiyonu sonucu oluşan ve serbest radikal oluşmasına neden olan bir oksijen türüdür (Koca ve Karadeniz, 2016).

2.3.3.1.2. *Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$)*

Oksijenli solunum yapan çoğu hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) indirgenmesi sonucu oluşan serbest radikal türüdür. Oksijenin suya indirgenmesiyle oluşan ilk radikal olup çeşitli hastalıkların patofizyolojisinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Ömrü çok kısa olan ve daha az reaktif olan radikaldir (Fantel, 1996; Valko vd., 2007).



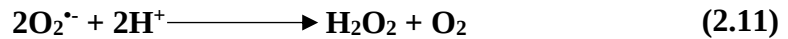
2.3.3.1.3. *Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)*

Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), oksijene üçüncü bir radikalin eklenmesiyle oluşan reaktivitesi çok yüksek bir radikaldir. Suyun çok yüksek radyasyona maruz kalması sonucu oluşurken ayrıca Fenton, Haber- Weiss ve peroksitnitrit reaksiyonları sonucu da oluşmaktadır. Hücrenin büyük kısmına zarar verebilme kapasitesindedir (Cheeseman ve Slater, 1993).

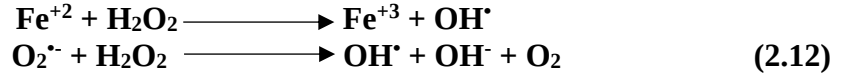


2.3.3.1.4. *Hidrojen peroksit (H_2O_2)*

Hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijenin indirgenmesi sonucu ya da süperoksitin dismutasyonu sonucu meydana gelir (Tokaç, 2007).



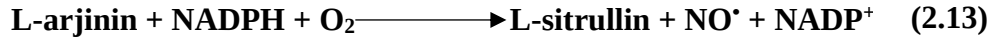
Hidrojen peroksit, reaksiyonlarla serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlar ile en reaktif hidroksil radikalini oluşturmaktadır (Mates, Perez-Gomez ve Nunez de Castro, 1999).



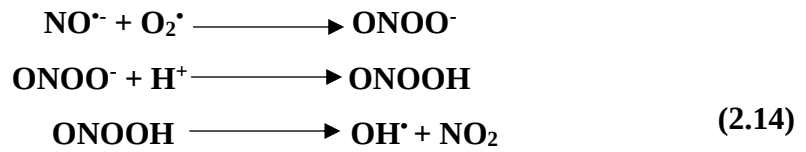
2.3.3.2. *Reaktif nitrojen türleri*

2.3.3.2.1. *Nitrik oksit (NO[•])*

L-arginin'den nitrik oksit sentaz enzimi ile nitrik oksit (NO[•]) sentezlenir.



Nitrik oksit serbest radikal olmasına rağmen çoğu molekülle reaksiyona girmemektedir. Süperoksit miktarına göre artan bir radikaldir (Antemen, 2005).



2.3.3.2.2. *Peroksinitrit anyonu (ONOO⁻)*

Oksidatif olarak daha aktif olacak peroksinitrit anyonu (ONOO⁻) üretmek için nitrik oksit ve süperoksit anyonunun reaksiyonu sonucu oluşur. İki radikalın birleşmesiyle ortaya çıkan peroksinitrit anyonu, DNA ve lipid hasarlarına neden olacak bir oksidan seviyesindedir (Valko vd., 2007).



2.3.4. *Serbest radikal etkileri*

Serbest radikaller çok reaktif olup hücrede toksik etkilere sebep olmaktadır. Lipid peroksidasyonun oluşması, lipid ve proteinlerde bağların oluşması, hücrelerin zar yapısındaki değişimler ve hasarlar, hücrede belli oranlarda bulunan değerlerin değişimi, hücre işleyişinin değişimi, DNA yapısındaki değişimler, koenzim yıkımları gibi serbest radikallerin neden olduğu hasarları sıralamak mümkündür. Serbest radikallerin derişimi hücre içinde az tutulmaya çalışılmaktadır. Fazlaştığı taktirde hücre içerisindeki dengeyi bozup birçok sisteme zarar vermektedir (Halliwell, 1991).

2.4. *Oksidatif Stres*

Sağlıklı bireylerde de bulunan reaktif oksijen türleri vücutta bulunan antioksidanlar tarafından baskılanır veya uzaklaştırılır. Sağlıklı hücrelerde bu reaksiyonlar tam bir denge halinde gerçekleşmektedir. Serbest radikallerin antioksidanlara karşı baskın bir durumda

olup dengenin bozulması durumunda oksidatif stres açığa çıkmaktadır (Pinnell, 2003). Oksidatif stres, dengelenmemiş serbest radikal saldırısı olarak da tanımlanmaktadır. Dengenin kurulamaması sonrasında fazla miktarda bulunan serbest radikaller, lipitler ile reaksiyona girdiğinde oluşan lipit peroksidasyonu, hücrenin fonksiyonu için çok ciddi hasarları doğurur. Lipit peroksidasyonu, toksik ürünlerin üretilmesine sağlar. Bu ürünler ikinci haberciler gibi davranıp üretildikleri alandan uzak bölgede etkilerini gösterirler (Altan, Dinçel ve Koca, 2006; Devasagayam, Boloor ve Ramsarma, 2003).

Oksidatif stresin hücrelerde bulunan biyolojik moleküllerin yapı ve fonksiyonlarının zarar görmesine, işleyişin bozulmasına, lipid peroksidasyonu, tiyol oksidasyonu, ATP'nin azalması, membran geçirgenliğinin artması ve DNA hasarı gibi etkiler göstererek hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Bununla beraber organizmada yaşlanma, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, bağışıklık sistemi bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir (Halliwell, 2001).

2.5. Antioksidan Sistemi

Reaktif oksijen türlerini kontrol altında tutmak ve oluşturabileceği zararlı etkilere karşı vücutta bulunan savunma sistemine “antioksidan savunma sistemi” veya kısaca “antioksidanlar” denmektedir (Elliot, 1999). Antioksidanlar, farklı bölgelerde farklı etki mekanizmalarıyla serbest radikalleri kontrol altına alır. Bunlar hücre içinde üretilen antioksidanlar (endojen) olarak bilinmektedir. Bunlar: süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), redükte glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR)'dır. Birincil derecedeki antioksidanlar grubunda bulunan enzimler serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. İkincil antioksidanlar ise toplayıcı, baskılayıcı, zincir kırıcı ve onarıcı etkisiyle serbest radikal oluşumunu önler. İkincil antioksidanlar, oksidan radikalini yakalayıp radikal zincir reaksiyonlarını kıran vitamin C, vitamin E, hemoglobin, seruloplazmin, albümin, bilirubin, ürik asit ve polifenol gibi bileşiklerdir (Altan, Dinçel ve Koca, 2006).

2.4.1. Hücre içi antioksidanlar

2.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Antioksidan etkisi ilk defa 1969 yılında McCord Fridovich tarafından gösterilmiştir. Metalloenzim ailesinin üyesidir (McCord ve Fridovich, 1969).

Organizmada toplam SOD miktarı 4 gram olarak tahmin edilmektedir. Oksijen kullanımının yüksek olduğu bütün hücrelerde bulunan SOD enzimi, süperoksit anyonunu (O_2^-) hidrojen perokside (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüştürerek radikallerin oluşturmuş olduğu toksik etkiyi ortadan kaldırır. SOD enzimi bu reaksiyonu hızlandırarak serbest radikallerin oluşturduğu toksik etkiyi daha kısa sürede baskılamış olmaktadır (Deaton ve Marlin, 2003). SOD enzimi hem mitokondri hem de sitozolde bulunmaktadır. İçerisinde bulunan metal iyonlarına bağlı olarak yeri değişmektedir. Sitozolde bulunan SOD enzimine sitozolik dimerik bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) denir. Mitokondride bulunan SOD enzimine ise mitokondriyal tetramerik mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) denilmektedir. Sitozolde ve mitokondride bulunan SOD enzimlerinin aktiviteleri yapılarında bulunan metal iyonları ile belirlenmektedir. (Nakazawa, Genka ve Fujishima, 1996).

2.4.1.2. *Katalaz (CAT)*

Sığır karaciğerinden izole edilen katalaz enzimi (CAT), moleküler ağırlığı 240 kDa olan hemoprotein yapıda bir enzimdir. Aerobik solunum yapan tüm hücrelerde bulunmaktadır. Bulunduğu yerler; peroksizom, endoplazmik retikulum ve sitozoldür (Halliwell, 1999). SOD enziminin aktivitesi sonucu oluşan toksik hidrojen peroksit (H_2O_2), katalaz enzimi (CAT) ile su (H_2O) ve oksijene (O_2) dönüşmektedir (Duthie, Wahle ve James, 1989).



2.4.1.3. *Redükte glutatyon (GSH)*

Sistein, glisin ve glutamik asitten sentezlenmektedir. Suda kolaylıkla çözülebilmektedir. Yapısındaki tiyol gurubu nedeniyle bir tripeptit olup en fazla nükleus, sitozol ve mitokondride yer almaktadır (Halliwell, 1999). Glutatyonun önemli bir kısmı tiyol formunda bulunurken okside glutatyon, okside glutatyon (GSSG) formundadır. Yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutatyon lipid peroksidasyonuna karşı organizmayı korumaktadır (Di Mascio, Murphy ve Sies, 1991). Karaciğer başta olmak üzere bütün hücrelerde bulunan glutatyon, bazı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve aminoasitlerin tranportunu sağlar. GSH, oksidoredüksiyon dengesini sağlayarak oksidasyonun zararlı etkilerine karşı hücreleri korur (Pastore vd., 2003).

2.4.1.4. *Glutasyon peroksidaz (GPx)*

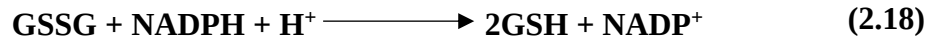
Memeli eritrositlerden elde edilen glutasyon peroksidaz (GPx), hücre içinde bulunan enzimatik bir antioksidandır. GPx’de katalaz enzimi gibi H₂O₂’in suya (H₂O) dönüşümünü katalizleyerek lipid peroksidasyonun başlamasını önlemiş olur.



GPx’ in selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız iki izomeri bulunur. Sahip oldukları alt ünite, bulundukları yer ve selenyuma bağlanma şekilleriyle farklılık göstermektedir. Selenyum bağımlı olan GPx, tetramerik yapıda olup her bir alt biriminde selenyum taşımaktadır. Selenyuma bağlı GPx, hem H₂O₂’yi hem de lipid hidroperoksitleri (LOOH) katalizler. Selenyum bağımsız GPx ise sadece lipid hidroperoksitleri (LOOH) katalizler (Deponte, 2013).

2.4.1.5. *Glutasyon redüktaz (GR)*

Glutasyon redüktaz (GR), GSSG’ nin tekrardan GSH’a indirgenmesini sağlayan enzim yapıda hücre içi antioksidandır. GR, sitozol ve mitokondride bulunmaktadır. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH gereklidir (Urso ve Clarkson, 2003).



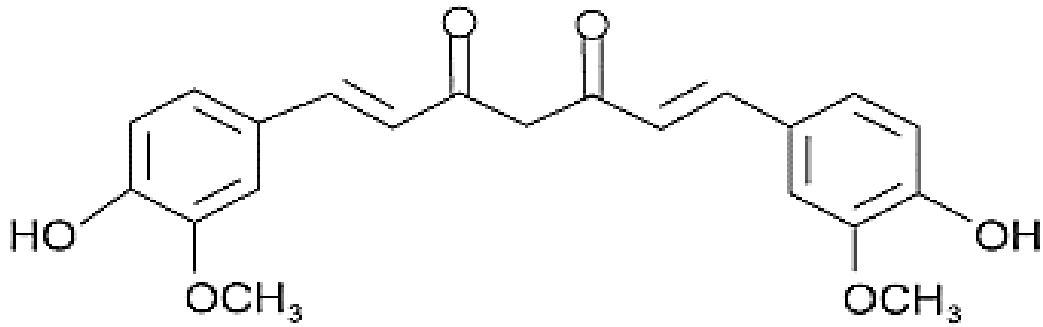
2.4.1.6. *Glutasyon -S- transferaz (GST)*

Glutasyon-S-transferaz insanda, geniş spektruma sahip kendine özgü substrat yapısına sahip olan enzim yapıda antioksidandır. En fazla eritrositlerde bulunan GST, toksik kimyasallarla savaşarak organizmayı korumaktadır (Urso ve Clarkson, 2003).

2.5. *Kurkumin*

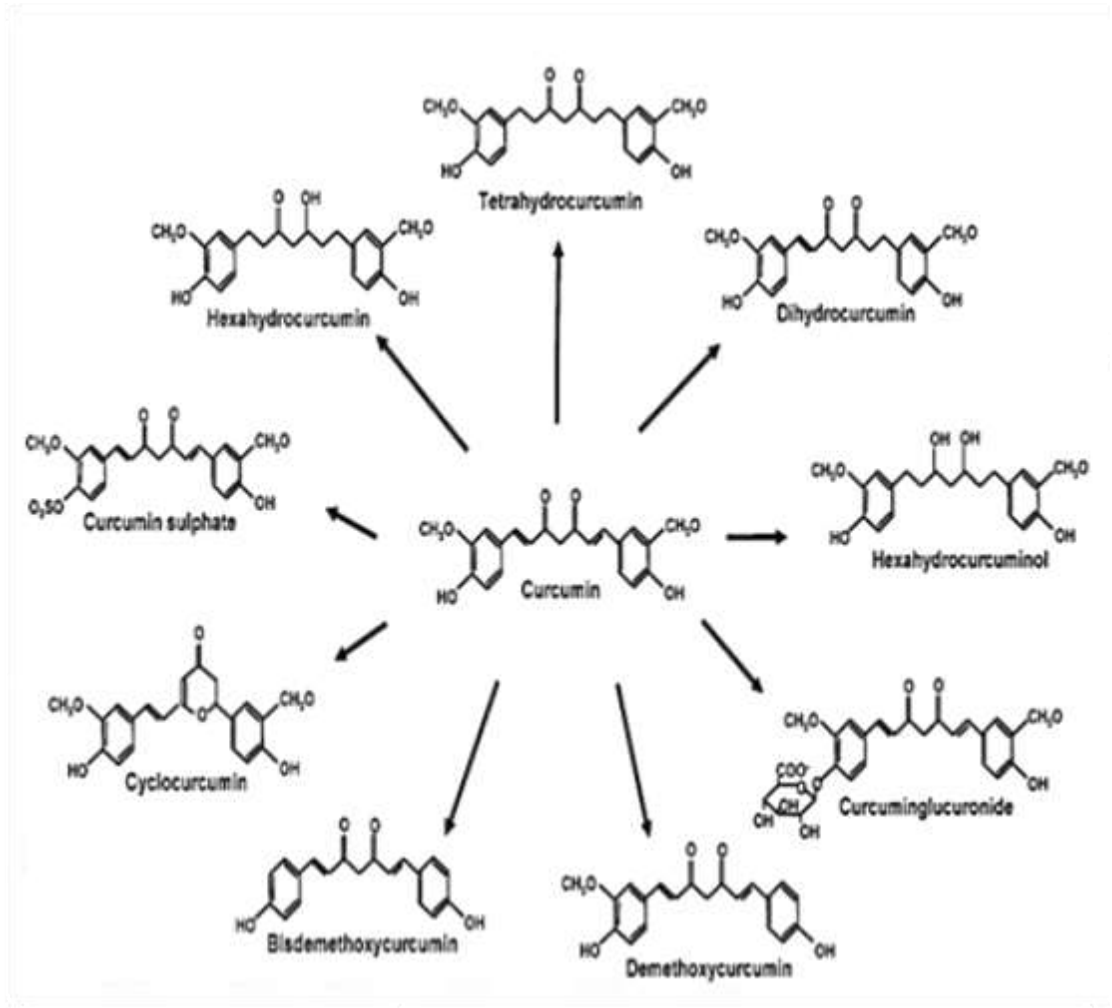
Ana vatanı Doğu Hindistan olan kurkumin (CUR), *Curcuma longa* L’nin (zerdeçal veya tümerik) ana bileşeni olup Çin ve Hindistan sıklıkla kullanılan küçük molekül ağırlıklı baharat olarak kullanılan polifenolik bir bileşiktir. İlk olarak Vogel ve Pelletier tarafından 1815 yılında izole edilmiş olup 1870 yılında Daube tarafından kristalize edilmiştir. En sonunda sentezi gerçekleştirilip Lampe ve çalışma arkadaşları, 1910 yılında

yapısını açıklığa kavuşturmuşlardır (Dorai vd., 2001). Kurkuminoidlerin en önemlisi olup yapısı (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroksi-3metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion şeklinde olan kurkumin; sarı çiçekli, büyük yapraklı çok yıllık otsu bir bitki olan zerdeçalın sarı renginden sorumludur. Zerdeçalın ana bileşeni kurkumin (diferulolmetan) (%3) olup kurkumin I (%94), kurkumin II (%6) ve kurkumin III'ten (%0,3) oluşmaktadır. Zerdeçal bitkisi yapısında; protein (%6,3), yağ (%5,1), mineraller (%3,5), karbonhidratlar (%69,4) ve su (%13,1) bulundurmaktadır (Warunyoupalin, 2007; Şekil 2.3).

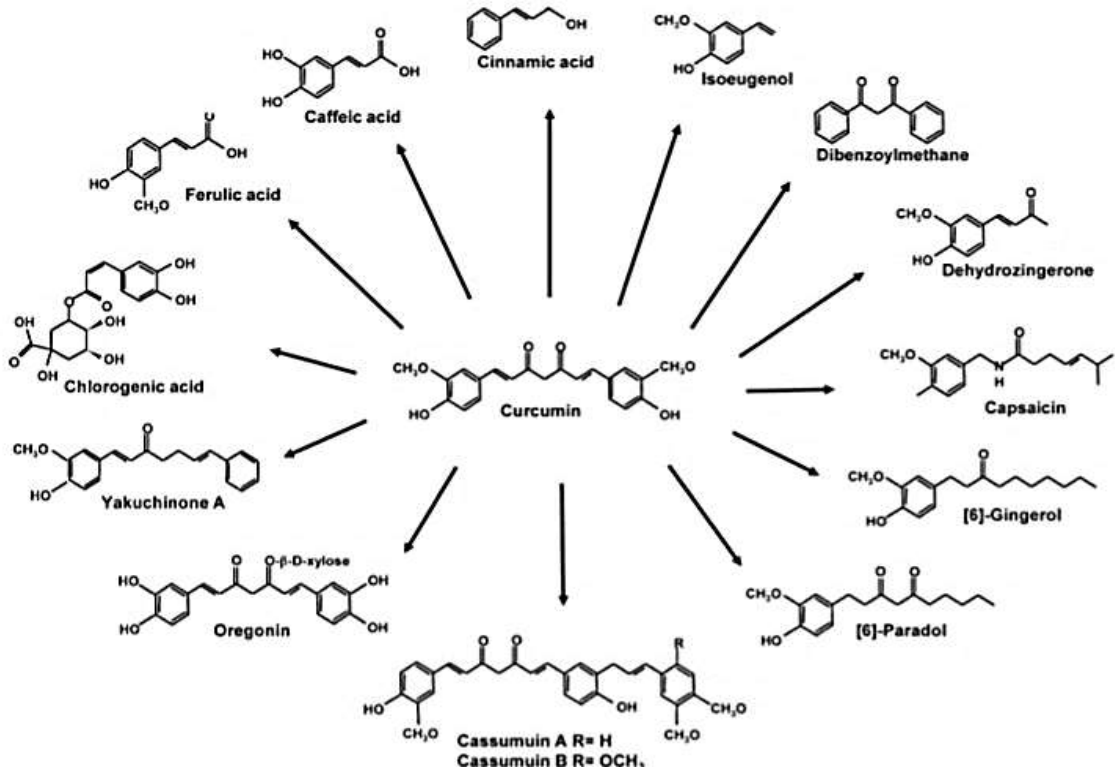


Şekil 2.3. Kurkuminin kimyasal yapısı (Pandya vd., 2000).

Kurkumin; zerdeçal ve kurkumin metabolitlerinden gelen doğal türevleri, doğada bulunan doğal kurkumin ve deneysel çalışmalar ile sentezlenen sentetik kurkumin türevleri olmak üzere doğada 3 şekilde bulunabilmektedir (Şekil 2.4; Şekil 2.5).



Şekil 2.4. Zerdeçal ve kurkumin metabolitlerinden gelen doğal türevler (Akgün, 2016)



Şekil 2.5. Kurkuminin doğada bulunan türevleri (Akgün, 2016)

Lipofilik bir madde olan ve suda çözünmeyen kurkumin, dimetilsülfoksit, etanol ve aseton gibi organik çözücülerde kolayca çözülebilmektedir. Biyolojik olarak aktif olan bir molekülün biyo-yararlılığı; çözünürlüğüne, absorpsiyonuna ve kararlılığına bağlı olarak değişmektedir. Geniş kapsamlı aktiviteye sahip olan kurkumin antiinflamutar, antibakteriyel, antikanserojen ve antioksidan özelliklere sahiptir (G. Villanueva vd., 2013; Wang vd., 1996). Antioksidan özelliğine kimyasal yapısı neden olmaktadır. Kurkumin ve analoglarının birçok kanser türünde etkili olduğu bilinmektedir. Kurkuminin türevleri olan diasetildemetoksikurkumin, triasetildemetilcurkumin ve 4-etoksikarboniletil kurkuminin, prostat kanserine karşı kurkuminden daha etkili olduğu bulunmuştur (Lin vd., 2006). Kurkumin doymamış yağ asidi olan linoleat vasıtasıyla lipid peroksidasyonu önlediği bilinmektedir. Ratların makrofaj hücrelerinde kurkuminin serbest radikalleri temizleyici olarak görev yaptığı da bilinmektedir. Kurkumin ile yapılan çalışmalara bakıldığında diyet destekleyici, karaciğer hastalıklarında, romatizmada, sinüzit, deri hastalıkları, öksürük ve kanser vakaları gibi birçok tıbbi alanda kullanılan etkili bir antioksidandır (Warunyoupalin, 2007). Kurkuminin meme kanseri hücre hatlarında G1/S ve G2/M hücre döngüsünün durdurulmasını sağlayan güçlü bir anti-

karsinogenik ajan olduğu görülmüştür (Nagaraju vd., 2012). Yapılan çalışmalarla kurkuminin, hücre proliferasyonu, hücre invazyonu, metastaz ve angiogenezele alakalı transkripsiyon faktörü olan NF- κ B' yi inhibe ettiği bilinmektedir (Gurkan vd., 2018). Kurkuminin pankreas kanseri hücrelerinde Notch-1 sinyalini düzenleyerek, NF-Kb aktivitesini inhibe ettiği ve hücre çoğalmasına engel olarak apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Wang vd., 2006). Kurkumin kanser hücrelerinde hücre döngüsünde tutulmasını indükleyerek apoptoz aracılı hücre ölümünü sağlamaktadır (Kang vd., 2015; Han vd., 2016; Xia vd., 2014).

Kurkumin düşük biyoyararlanıma sahip olmasına rağmen, molekül ağırlığının düşük olması ve tümör hücrelerinin gelişimini engellemede yüksek aktiviteye sahip olması nedeniyle kemoterapötik ilaçların geliştirilmesinde ideal bir moleküldür (Aggarwal, Kumar ve Bharti, 2003).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Hücre Hatları

CCD-19Lu (ATCC® CCL-210™) akciğer fibroblast hücre hattı ve A549 (ATCC® CCL-185™) akciğer kanser hücre hattı Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nden (AÜBİBAM) temin edilmiştir. Tezin deneysel aşaması Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

(Merck, Almanya); sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Merck, Almanya); sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya); sodyum klorür (NaCl) (Detsan, Türkiye); HEPES (Sigma-Aldrich, ABD); Ethylene Glycol bis(2-aminoethyl) Tetraacetic Acid (EGTA) (ROTH-Gelmany); mannitol (Sigma-Aldrich, ABD); metafosforik asit (Sigma-Aldrich, ABD); tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, ABD);

3.3. Kullanılan Cihazlar

Sıvı azot tankı (Taylor Wharton, Almanya); buzdolabı (Arçelik, Türkiye); derin dondurucu (-20°C) (Arçelik No Frost, Türkiye); ultra düşük sıcaklıklı dondurucu (Eppendorf U410, Almanya); karbondioksitli (CO_2 'li) inkübatör (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); inkübatör (Nüve FN500, Türkiye); 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 Heraus Megafuge 1.0R, ABD); sterilizatör (Nüve FN 500, Türkiye); homojenizatör (MIULAB MT-30K, ABD); su banyosu (Nüve BM 302, Türkiye); vorteks (IKA Yellowline TTS2, Çin); manyetik karıştırıcı (Sigma Aldrich Heidolph 3001, ABD); çalkalayıcı (Biometra WT 17, Almanya).

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Kültürü Uygulamaları

CCD-19Lu hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM besiyerinde, %5 CO_2 ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 37°C 'de büyütülmüşlerdir.

A549 hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin, 1 mM sodyum piruvat ve 1 mM L-glutamin içeren RPMI – 1640 besiyerinde, %5 CO_2 ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 37°C 'de büyütülmüşlerdir.

4.1.1. Hücrelerin stoktan çıkartılması

Azot tankından çıkarılan viallerin hızlıca çözünmesi sağlanıp santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısım (süpernatant) uzaklaştırılıp hücre çökeltileri (pellet) besiyer ile süspanse edilerek uygun

görülen flasklara ekimi yapıldı. Süspansiyon 1:3 oranında 10 mL besiyeri içeren flasklara %5 CO₂ ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 37°C’de büyümeleri ve çoğalmaları sağlanmıştır.

4.1.2. Hücre hatlarının pasajlanması

Hücreler %90 yoğunluğa ulaştıktan sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak hücreler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 2 kere yıkanmıştır. Tripsin-EDTA ortama eklenip inkübatör 3 dk bekletirilerek hücrelerin tutunmuş olduğu yüzeyden kalkması sağlanır. Hücreler 1000 µL besiyeri kullanılarak santrifüj tüplerine aktarılıp 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice uzaklaştırılarak pellet tekrar besiyer ile süspanse edilmiştir. Hücrelerin pasajlanması için oluşturulan süspansiyon 1:3 oranında 10 mL besiyeri içeren flasklara aktarılmış ve %5 CO₂ ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 37 °C’de büyümeleri ve çoğalmaları sağlanmıştır.

4.1.3. Hücre hatlarının stoklanması

Hücrelerin stoklanması için her bir vial 1900 µL hücre süspansiyonu aktarılmış ve üzerlerine 100 µL DMSO eklenmiştir. Hazırlanan vialler -20 °C’de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra -80 °C’de bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına alınıp saklanmıştır.

4.2. Etken Madde Dozlarının Hazırlanması

4.2.1. Karboplatin

0,025 M derişime sahip olan ana stok, toz halde bulunan karboplatinden 9,25 mg tartılıp 1000 µL distile suda çözülerek oluşturulmuştur. Ana stok -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Kullanılacak olan karboplatin dozları, 2,5; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 µM derişimli ara stoklar hazırlanmıştır.

4.2.2. Kurkumin

0,2 M derişime sahip olan ana stok, toz halde bulunan kurkumin 73 mg tartılıp 1000 µL DMSO’da çözülerek hazırlanmıştır. Ana stok ışığa maruz kalmasını engelleyecek şekilde -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Kullanılacak olan kurkumin dozları, 2,5; 5; 10;

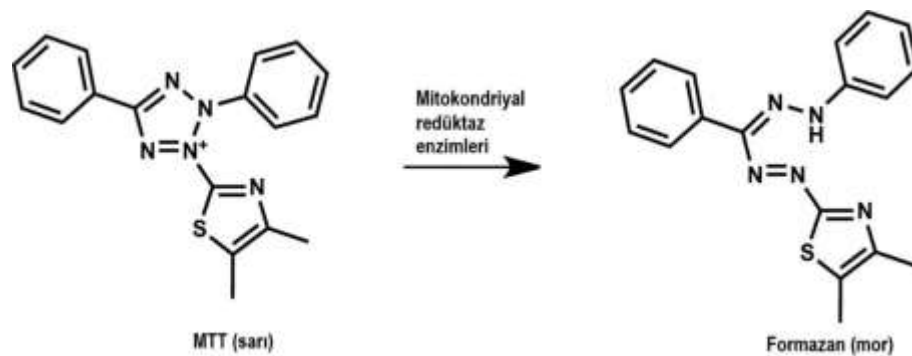
20; 40; 60; 80; 100; 150 μ M derişimli ara stoklar kullanılacak olup DMSO'nun %0,2'lik toksik dozu göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır.

4.3. Sitotoksisite Testleri

4.3.1. Karboplatin ve kurkumin CCD-19Lu ve A549 hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Maddelerin sitotoksisitelerini belirlenmek için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi kullanılmıştır. MTT yöntemi; canlılığı ve sitotoksisiteyi belirlemek için kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Ucuz, hızlı ve uygulamasının kolay olması nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Mosmann, 1983).

Yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilme ilkesi ile canlılığı belirlemektedir. Tetrazolium tuzu (MTT), suda çözünen ve sarı renkli bir yapıya sahip olup hücelere absorbe olur ve suda çözünemeyen mor-mavi renkli formazan tuzuna indirgenir. Oluşan formazan tuzu hücre dizisindeki hücre sayısı ile orantılıdır. MTT'nin bu indirgeme özelliği, hücre canlılığını ölçmek için kullanılan etkin bir yöntemdir (Mosmann, 1983). Canlı olan hücelere sarı renkli MTT boyasını indirgeyerek formazan tuzuna dönüştürür. Formazan kristalleri DMSO ve isopropanol gibi uygun çözücü ilave ederek çözünmesi sağlanıp 540nm'de kolorimetrik olarak ölçümü sağlanır. Formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri artış gösterir (Mosmann, 1983).



Şekil 4.1. Formazan tuzunun oluşumu (Sever, 2018).

4.3.2. MTT yönteminin uygulanması

Flasklarda hücre yoğunluğu %90'a ulaşan CCD-19Lu ve A549 hücreler, her bir kuyucukta 8×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında farklı konsantrasyonlardaki karboplatin ve kurkumin her bir konsantrasyondan 4 kuyucuğa hücrelerin ekimleri yapılır. 24 saatin ardından her kuyucuğa 5 mg/mL derişime sahip 20 μ L MTT boyası karanlık ortamda eklenerek kuyucuklar 3 saat inkübatörde bekletilmiştir. 3 saatin ardından besiyeri ve MTT boyası ortamdaki uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa formazan kristallerinin çözülmesini sağlamak amacıyla 150 μ L DMSO eklenmiş ve plakalar 15 dakika boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. Çalkalayıcıdan alınan plakaların, ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır.

4.3.3. 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 (IC_{50}) belirlenmiştir.

4.3.4. Kombinasyon dozlarının ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Karboplatin ve kurkumin IC_{50} dozlarının aynı yüzdeleri (%100, 75, 50, 40, 30, 20, 10) kullanılarak yedi adet kombinasyon oluşturulmuştur. Oluşturulan bu kombinasyonların hücreler üzerindeki inhibe edici etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

4.3.5. Kombinasyon indeksinin belirlenmesi

Kombinasyon oranını belirlemede kullanılan CompuSyn programı ile kombinasyon indeksi (CI) hesaplanmıştır. Bu hesaplamayla ilaçların sinerjistik ($CI < 1$), aditif ($CI = 1$) veya antagonistik ($CI > 1$) etkiye sahip oldukları belirlenebilmektedir (Chou ve Talalay, 1984; Chou, 2010).

4.4. Hücrelerdeki Oksidatif Dengenin Belirlenmesi

4.4.1. Total Oksidan Durum (TOS) yöntemi

Hücrelerdeki artan miktardaki serbest radikallere karşı antioksidanlar yetersiz kalmaktadır. Oluşan dengesizlik oksidatif stresi oluşturur. 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 yükseltmesi esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon, renk değişikliği meydana getirmektedir. Oluşan renk değişimi spektrofotometre ile ölçülür. (Erel, 2005).

4.4.1.1. Yöntemin uygulanması

CCD-19Lu ve A549 hücreleri, her kuyucukta 8×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat inkübatör bekletilmiştir. 24 saatin ardından kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilerek karboplatin, kurkumin veya kombinasyonları kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyonu sağlanmıştır. 24 saatin sonunda hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkanıp ardından tripsin-EDTA kullanılarak toplanmıştır. Daha sonra hücreler 1 mL distile su kullanılarak tüplere aktarılmış ve pipetlenmiştir. Hücreler Mıulab markalı ultra sonikatör kullanılarak lizat haline getirilmiştir. Hücrelerin yer aldığı tüpler buz içerisinde, 30 saniye boyunca, 60 MHz frekansta sonikasyon işlemine maruz bırakılarak deneyde kullanılacak örnekler oluşturulmuştur. Her bir tüpten 45 μ L örnek alınmış ve 300 μ L reaktif I ile karıştırılarak spektrofotometre küvetine aktarılmıştır. Standart çözeltisi kullanılarak bir standart küveti hazırlanmıştır. Küvetler, reaktif I eklendikten 30 saniye sonra spektrofotometre cihazında 530 nm'de okutulmuş ve absorbans değeri (A1) elde edilmiştir. A1 verileri alındıktan sonra her bir küvete reaktif II'den 15 μ L eklenmiştir. Küvetler 5 dakika 37 °C'de bekletilip, spektrofotometre cihazında 530 nm'de okutulmuş ve absorbans verileri (A2) kaydedilmiştir. TOS, denklem 4.1 ve 4.2'te gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

$$A2 - A1 = \Delta \text{Absorbans} \quad (4.1)$$

$$\text{TOS } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta \text{Örnek Absorbans}}{\Delta \text{Stveart Absorbans}} \times 20 \quad (4.2)$$

4.4.2. Total Antioksidan Durum (TAS) yöntemi

Hücrelerde bulunan antioksidan miktarını belirlemede sıklıkla 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiyazolin-6-sülfonat) (ABTS⁺) temelli yöntemler kullanılmaktadır. Renksiz olan ABTS⁺, asidik ortamda (pH 3,6) hidrojen peroksit tarafından yükseltgendiğinde, koyu yeşil renge sahip olmaktadır. Ortamın pH değeri yükseltildiğinde (pH 5,8) ise koyu yeşil olan renk açılmaktadır. Reaksiyona eklenen antioksidan maddeler, madde yoğunluğu ile ters orantılı bir şekilde renk değişikliğine uğramaktadır. Total antioksidan madde yoğunluğu renk değişimine göre spektrofotometre cihazıyla belirlenebilmektedir (Erel, 2004).

4.4.2.1. Yöntemin uygulanması

CCD-19Lu ve A549 hücreleri, her kuyucukta 8×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. 24 saatin ardından kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp, karboplatin, kurkumin ve kombinasyon solüsyonu kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkanıp ardından tripsin-EDTA kullanılarak hücreler toplanmıştır. Kalkmış olan hücreler 1 mL distile su kullanılarak tüplere aktarılmıştır. Hücreler Mıulab markalı ultra sonikatör kullanılarak lizat haline getirilmiştir. Hücrelerin yer aldığı tüpler buz içerisinde, 30 saniye boyunca, 60 MHz frekansta sonikasyon işlemine maruz bırakılmıştır. Her bir tüpten 18 µL örnek alınarak 300 µL reaktif I ile karıştırılarak spektrofotometre küvetine alınmıştır. Standart çözeltisi kullanılarak bir standart küveti ve distile su kullanılarak bir kör küveti hazırlanmıştır. Küvetlere reaktif I eklendikten 30 saniye sonra spektrofotometre cihazında 660 nm'de okutulmuş ve absorbans değeri (A1) ölçülmüştür. A1 verileri alındıktan sonra reaktif II'den 45 µL eklenmiştir. Küvetler 5 dakika 37 °C'de bekletilip, spektrofotometre cihazında 660 nm'de okutulup A2 absorbansları belirlenmiştir.

$$A2 - A1 = \Delta \text{Absorbans} \quad (4.3)$$

$$\text{TAS (mmol/L)} = \frac{[(\Delta \text{Kör Absorbans}) - (\Delta \text{Örnek Absorbans})]}{[(\Delta \text{Kör Absorbans}) - (\Delta \text{Stveart Absorbans})]} \quad (4.4)$$

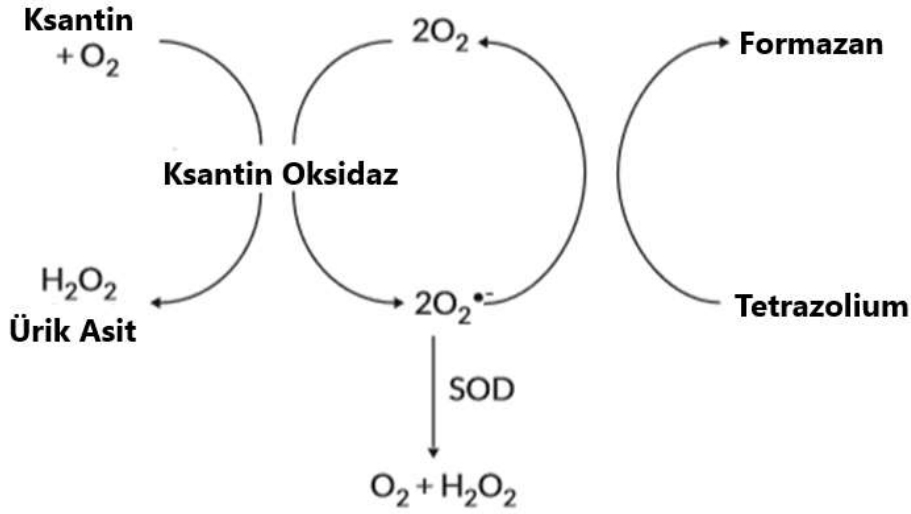
4.4.3. Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) belirlenmesi

Hücrelerin oksidatif denge durumlarının tespiti için oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır. OSI, TOS ve TAS sonuçları belirlendikten sonra denklem 4.5’da gösterildiği şekilde hesaplanabilmektedir. TAS sonucu mmol/L cinsinden olduğu için, hesaplamadan önce µmol/L cinsine çevirilmiştir.

$$OSI = \frac{TOS}{TAS \times 10} \quad (4.5)$$

4.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Ölçümü

SOD, süperoksit anyonunun moleküler oksijene ve hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden ve dolayısıyla hücrel antioksidan savunma mekanizmasının kırılğan bir parçasını oluşturan enzimlerdir (Malstrom, Vereasson ve Reinhammer, 1975). SOD; beyin, karaciğer, kalp ve eritrositlerde yüksek oranda bulunmaktadır. İnsanlarda üç çeşit SOD bulunmaktadır. Bunlar: sitosolik Cu/Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve hücre dışı SOD. İntraselüler ve ekstraselüler bölgelerde bulunan SOD miktarı oksidatif strese bağlı değişmektedir. Süperoksit dismutazlar tarafından katalize edilen reaksiyon son derece hızlı olmaktadır. Hücrelerde ve dokularda yeterli miktarda enzim bulunması tipik olarak süperoksit konsantrasyonunun düşük olmasına neden olur (Malstrom, Vereasson ve Reinhammer, 1975). SOD ölçümü, hücredeki total süperoksit dismutaz enzimi hakkında bilgi vermektedir. SOD ölçümleri ‘Cayman’ Süperoksit Dismutaz Kit’i kullanılarak ölçülmüş olup bu kitin temel prensibi; ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen süperoksit radikallerinin tespiti için bir tetrazolyum tuzu kullanılarak ölçüme dayanır. Bir birim süperoksit dismutaz, süperoksit radikalının %50'sinin dismutasyonunu göstermek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. SOD deney prensibi (Cayman)

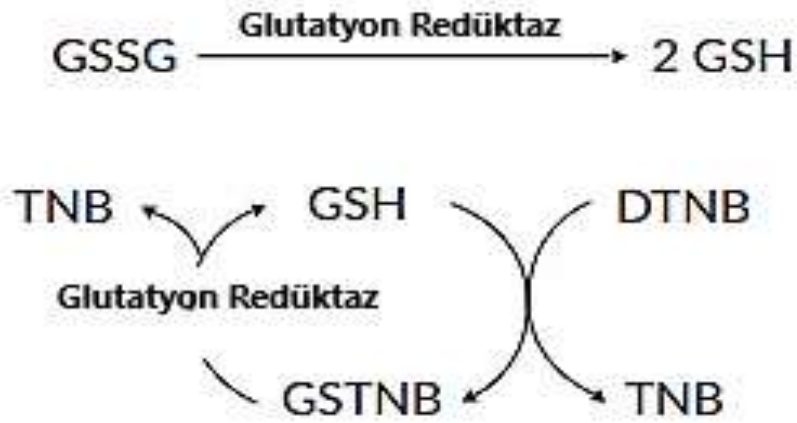
4.5.1. Yöntemin uygulanması

6 adet flaskın her birine 1×10^6 adet hücre ekilip 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulanmamıştır. Hücreler inkübe edildikten sonra 5 mL soğuk PBS ile yıkanmıştır. Hücreler kazıyıcı ile alınıp ependorf tüplerine alınmıştır. 10.000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet soğuk tamponla yıkanarak 30 saniye boyunca 60 MHz sonikasyona maruz bırakılmıştır. 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra süpernatant çekilerek tüplere alınıp buz içerisinde bekletilmiştir. 96 kuyucuklu plakaya standart ve numune kuyucukların her birine olan radikal detektör solüsyonundan 200 μ L eklenmiştir. Standart kuyucuğunun her birine standart solüsyonundan, numune kuyucuklarına da 10 μ L numune eklenmiştir. Kullanılan bütün kuyucuklara en son olarak 10 μ L ksantin oksidaz eklenmiştir. 30 dakika boyunca oda sıcaklığından çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 440-460 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

4.6. Redükte glutatyon (GSH) ölçümü

Glutatyon (GSH), hem bitkilerde hem de hayvanlarda yaygın şekilde dağıtılan bir tripeptittir. GSH, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda glutatyon transferazlarına yardımcı substrat görevi görür ve hidroperoksitlerin indirgenmesinde glutatyon peroksidazlarına önemli bir elektron donörüdür. GSH ayrıca amino asit taşınımı ve protein sülfidril indirgeme statüsünün korunmasında rol oynar. Dokularda ve plazmada

GSH miktarı değişmektedir. GSH ölçümleri ‘Cayman’ Glutasyon Kit’i kullanılarak ölçülmüş olup bu kitin temel prensibi; glutasyon miktarını ölçmek için geri dönüşümlü enzimatik glutasyon redüktaz yöntemini kullanır (Tietze, 1969). Sülfhidril grubundan GSH, DTNB (5,5’-ditiyo-bis-2-(nitrobenzoik asit)) ile reaksiyona girer ve sarı renkli TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) üretir. GSTNB (GSH + TNB) daha fazla GSH ve TNB üretmek için geri dönüşümlü glutasyon redüktaz enzimi ile azalmaktadır. TNB üretim hızı, numunedeki GSH konsantrasyonuyla doğrudan orantılıdır. Konumundaki TNB absorbansının 405-414 nm de ölçülmesi GSH seviyesini vermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. GSH deney prensibi (Cayman)

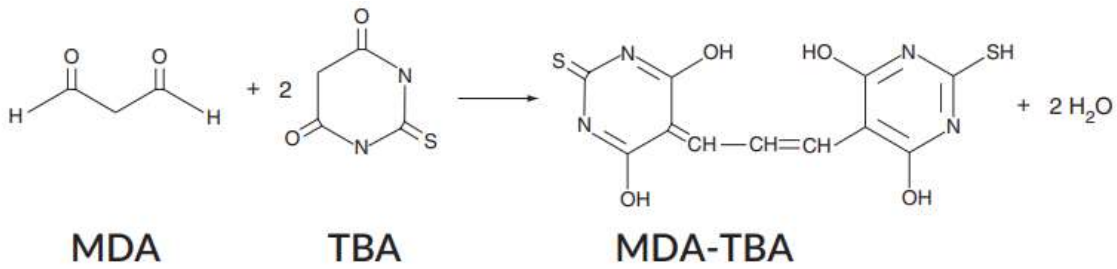
4.6.1. Yöntemin uygulanması

6 adet flaskın her birine 1×10^6 adet hücre ekilip 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulanmamıştır. Hücreler inkübe edildikten sonra 5 mL soğuk PBS ile yıkanmıştır. Hücreler kazıyıcı ile alınıp santrifüj tüplerine alınmıştır. 1500 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet soğuk 50 mM GSH MES tamponuyla yıkanarak buz içerisinde alınmıştır. Daha sonra 30 saniye boyunca 60 MHz sonikasyona maruz bırakılmıştır. 10 000 rpm devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant tüplere alınıp üzerine MPA reaktifi eklenip vortekslenmiştir. Daha sonra 1200 rpm devirde 3 dakika santrifüj edilmiştir. 1000 µL olacak şekilde süpernatant çekilip üzerine 50 µL TEAM reaktifi eklenip vortekslenmiştir. 96 kucuklu plakanın standart kuyucuklarına 50 µL eklenmiştir. Numune kuyucukların her birine 50 µL numune eklenmiştir. Kullanılan tüm kuyucuklara 150 µL hazırlanan

kokteylden eklenip tabakayı karanlık odada çalkalayıcıda 25 dakika inkübe edilmiştir. ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 405-414 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

4.7. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Lipid peroksidasyonu hem bitkilerde hem de hayvanlarda gözlenen bir mekanizma olup oksidatif stresin bir göstergesidir. Lipid peroksitleri reaktif karbonil bileşikleri içeren kompleks bir bileşik olan malondialdehiti (MDA) oluşturmaktadır (Armstrong ve Browne, 1994; Yagi, 1998). MDA ölçümleri ‘Cayman’ TBARS Kit’i kullanılarak ölçülmüş olup bu kitin temel prensibi; tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin ölçümü (TBARS), lipid peroksidasyonunun taranması ve izlenmesi için iyi bilinen bir yöntemdir. Doymamış lipidler daha yüksek TBARS değeri vermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. MDA deney prensibi (Cayman)

4.7.1. Yöntemin uygulanması

6 adet flaskın her birine 1×10^6 adet hücre ekilip 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulanmamıştır. Hücreler inkübe edildikten sonra 5 mL soğuk PBS ile yıkanmıştır. Hücreler tercih edilen bir tampon yardımıyla tüplere alınmıştır. Buz içerisinde alınan tüpler 30 saniye boyunca 60 MHz sonikasyona maruz bırakılıp homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Standart ve numune şişelerine (5mL) 100 µL standart ve 100 mL numune eklenmiştir. Numune ve standart şişelerin her birine 100 µL SDS çözeltisi eklenip karıştırılmıştır. Şişeler dik tutulmasına özen gösterilerek en alt kısmına 4 mL renk reaktifi eklenmiştir. Şişeleri 1 saat boyunca suda kaynatılır vaziyette bekletilmiştir. Şişeler 10 dakika buzda inkübe edilir. 10 dakika sonrasında 1600 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilir. 96 kuyucuklu platenin standart ve

numune kuyucuklarına 150 µL ekleme yapılmıştır. ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

4.8. 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, SPSS Statistics 17 programı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

5. BULGULAR

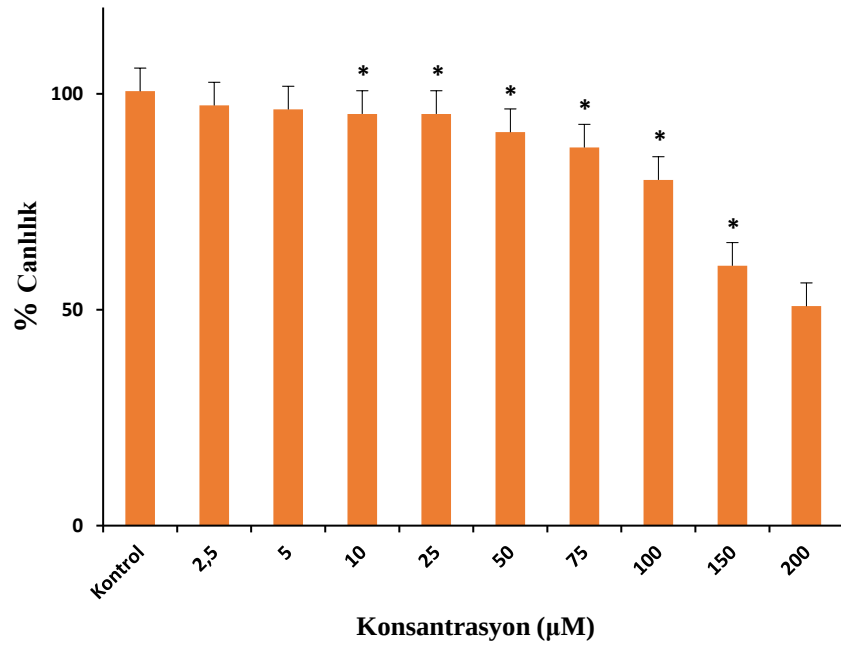
5.1. Sitotoksisite Bulguları

5.1.1. Karboplatin ve kurkuminin normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücrelerindeki sitotoksik bulguları

Normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarına karboplatin ve kurkumin maddelerini belirlenen dozlarda verilip, 24 saat sonra hücre canlılığına etkileri belirlenmiştir. Karboplatin ve kurkuminin normal CCD-19Lu hattındaki 24 saatte hücre canlılığına etkisi belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile maddelerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 200±16 µM (Tablo 5.1; Şekil 5.1) ve 150±12 µM (Tablo 5.2; Şekil 5.2) olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5.1. Karboplatin konsantrasyonlarının normal CCD-19Lu hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi (kontrole göre $*p < 0,05$)

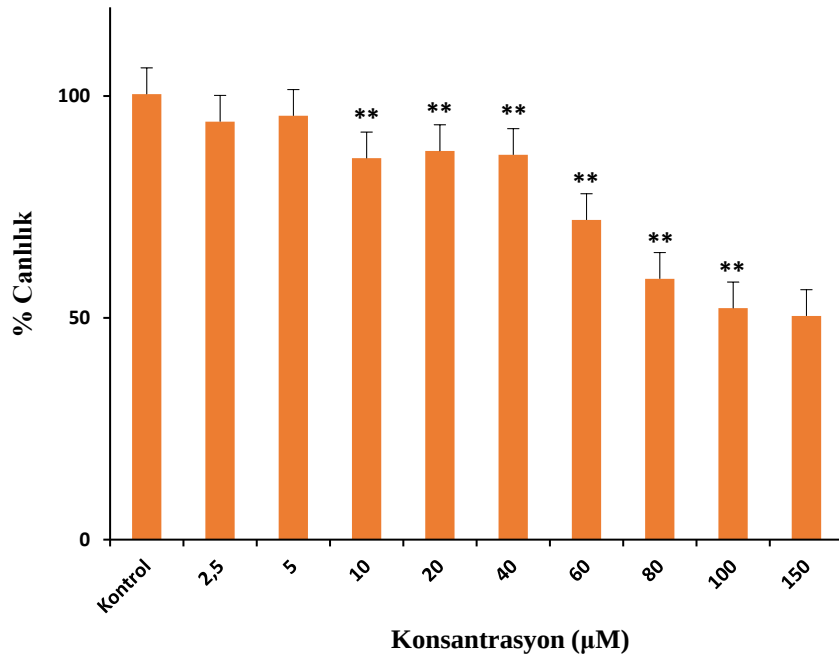
Dozlar	IC ₅₀ (%)
Kontrol	100
2,5 µM	97,322
5 µM	96,400
10 µM	95,347
25 µM	95,347*
50 µM	91,133*
75 µM	87,577*
100 µM	80,070*
150 µM	60,184*
200 µM	50,834*



Şekil 5.1. Karboplatin konsantrasyonlarının normal CCD-19Lu hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi (kontrole göre $*p < 0,05$)

Tablo 5.2. Kurkumin konsantrasyonlarının normal CCD-19Lu hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi (kontrole göre $**p < 0,01$)

Dozlar	IC ₅₀ (%)
Kontrol	100
2,5 µM	94,239
5 µM	95,543
10 µM	85,978
20 µM	87,609**
40 µM	86,739**
60 µM	72,065**
80 µM	58,804**
100 µM	52,174**
150 µM	50,435**

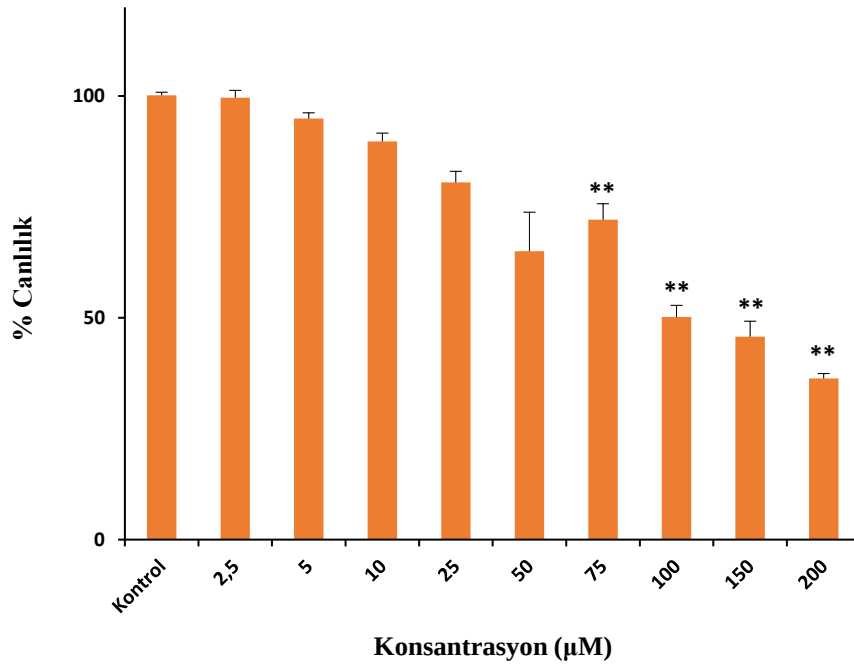


Şekil 5.2. Kurkumin konsantrasyonlarının normal CCD-19Lu hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi (kontrole göre $**p < 0,01$)

Karboplatin ve kurkuminin A549 adenokarsinom hücre hattındaki 24 saatte hücre canlılığına etkisi belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile maddelerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 100±9 µM (Tablo 5.3; Şekil 5.3) ve 60±8 µM (Tablo 5.4; Şekil 5.4) olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5.3. Karboplatin konsantrasyonlarının A549 adenokarsinom hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi (kontrole göre **p < 0,01)

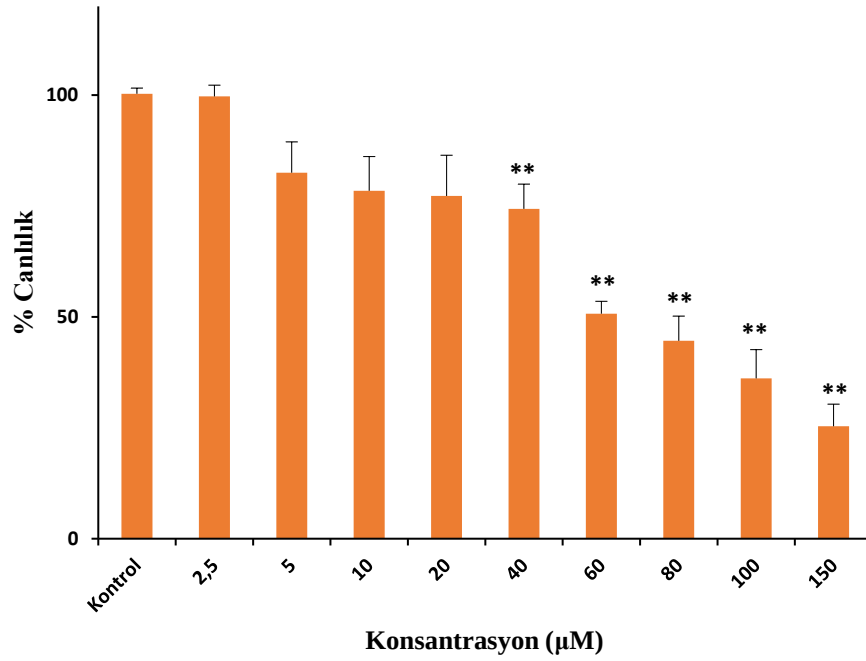
Dozlar	IC ₅₀ (%)
Kontrol	100
2,5 µM	99,629
5 µM	94,917
10 µM	89,777
25 µM	80,525
50 µM	65,020
75 µM	72,130**
100 µM	50,200**
150 µM	45,745**
200 µM	36,322**



Şekil 5.3. Karboplatin konsantrasyonlarının A549 adenokarsinom hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi (kontrole göre **p < 0,01)

Tablo 5.4. Kurkumin konsantrasyonlarının A549 adenokarsinom hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi (kontrole göre $**p < 0,01$)

Dozlar	IC ₅₀ (%)
Kontrol	100
2,5 µM	99,708
5 µM	82,507
10 µM	78,426
20 µM	77,259
40 µM	74,344**
60 µM	50,729**
80 µM	44,606**
100 µM	36,152**
150 µM	25,364**



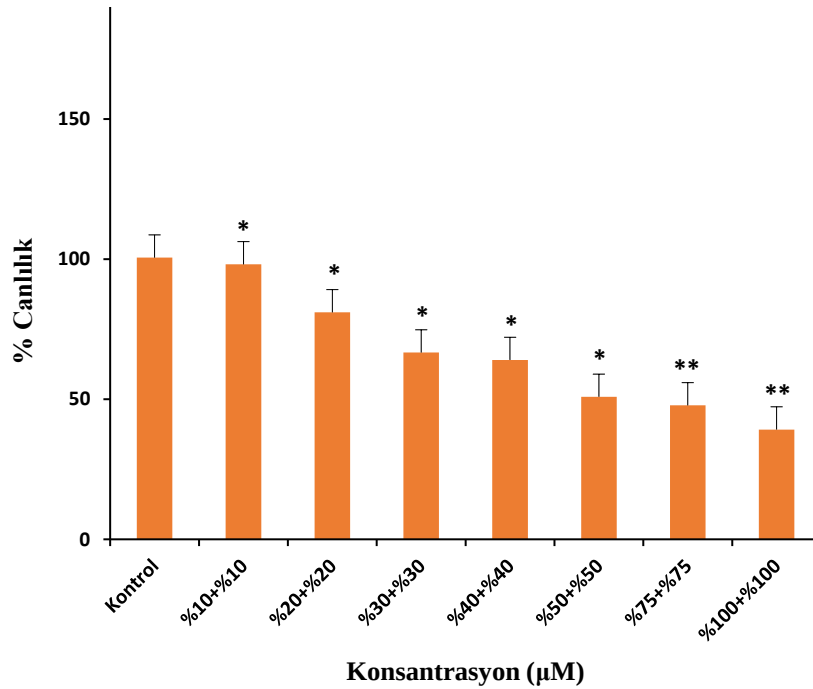
Şekil 5.4. Kurkumin konsantrasyonlarının A549 adenokarsinom hücre hattında 24 saat sonucunda hücre canlılığına etkisi (kontrole göre $**p < 0,01$)

5.1.2. Karboplatin ve kurkumin kombinasyonlarının normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücrelerinde sitotoksik bulguları

Karboplatin ve kurkumin'in IC_{50} değerlerinin yüzdeleri kullanılarak hazırlanan kombinasyonların, 24 saatte normal CCD-19Lu hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir (Tablo 5.5; Şekil 5.5).

Tablo 5.5. Karboplatin ve kurkumin IC_{50} dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda normal CCD-19Lu hücrelerindeki inhibisyonu (kontrole göre; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

IC_{50} Yüzdesi	Dozlar (CARB + CUR)	% İnhibisyon
%100	200 μ M + 150 μ M	60,823**
%75	150 μ M + 112,5 μ M	52,191**
%50	100 μ M + 75 μ M	49,137*
%40	80 μ M + 60 μ M	35,989*
%30	60 μ M + 45 μ M	33,333*
%20	40 μ M + 30 μ M	18,991*
%10	20 μ M + 15 μ M	1,859*

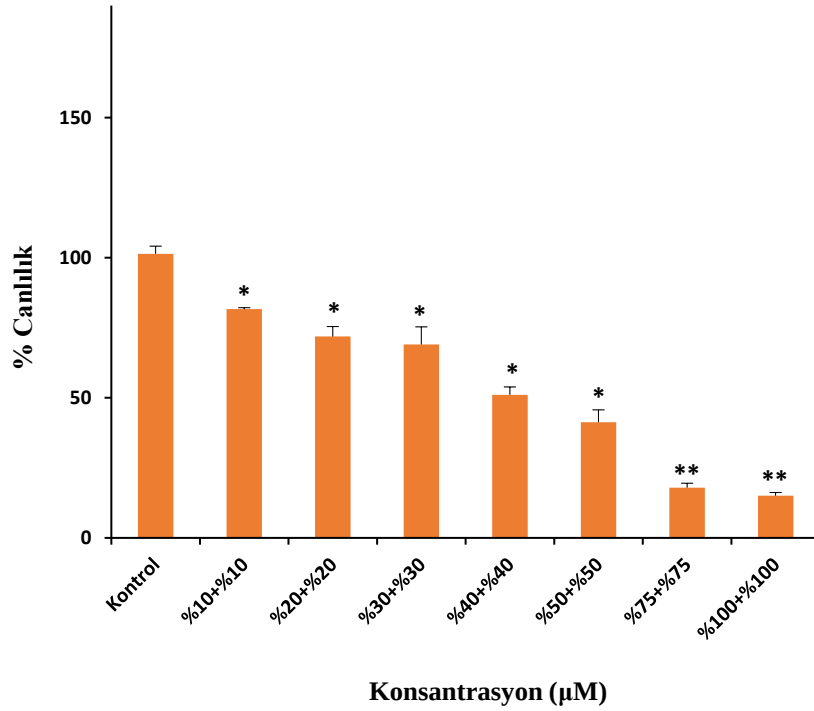


Şekil 5.5. Karboplatin ve kurkumin IC_{50} dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda normal CCD-19Lu hücrelerindeki inhibisyonu (kontrole göre; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

Karboplatin ve kurkumin'nin IC₅₀ değerlerinin yüzdeleri kullanılarak hazırlanan kombinasyonların 24 saatte A549 adenokarsinom hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir (Tablo 5.6; Şekil 5.6).

Tablo 5.6. Karboplatin ve kurkumin IC₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda A549 adenokarsinom hücrelerindeki inhibisyonu (kontrole göre; ***p* < 0,01, **p* < 0,05)

IC ₅₀ Yüzdesi	Dozlar (CARB + CUR)	% İnhibisyon
%100	100 µM + 60 µM	84,952**
%75	75 µM + 45 µM	82,074**
%50	50 µM + 30 µM	58,693*
%40	40 µM + 24 µM	48,921*
%30	30 µM + 18 µM	30,935*
%20	20 µM + 12 µM	28,118*
%10	10 µM + 6 µM	18,345*



Şekil 5.6. Karboplatin ve kurkumin IC₅₀ dozlarının yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyonların 24 saat sonucunda A549 adenokarsinom hücrelerindeki inhibisyonu (kontrole göre; ***p* < 0,01, **p* < 0,05)

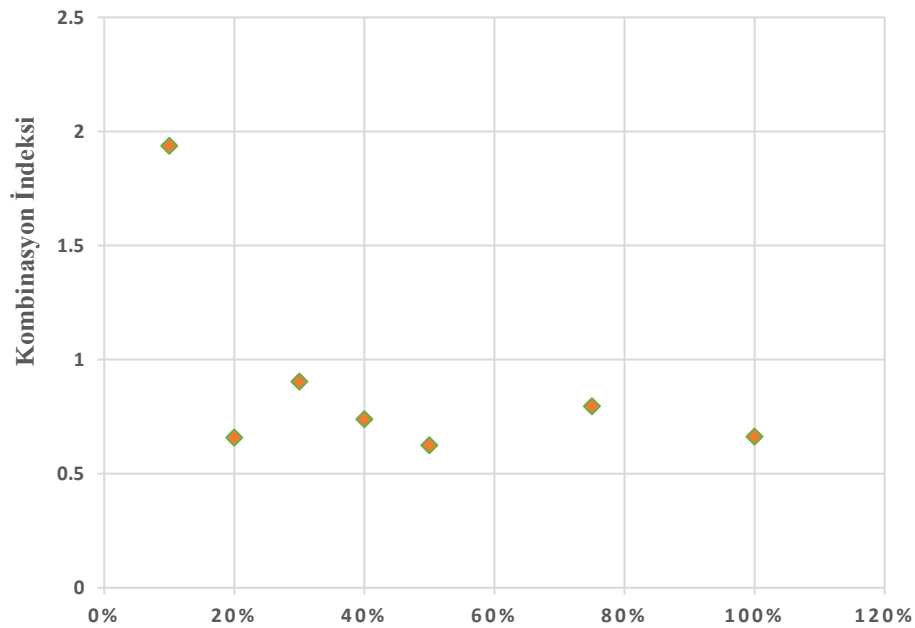
5.1.3. Kombinasyon indeksi bulguları

Karboplatin, kurkumin ve bu iki maddenin kombinasyonlarının normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki sitotoksosite verilerine dayanarak, kombinasyon indeksi hesaplanmıştır.

Normal CCD-19Lu hücre hattındaki kombinasyonların oksidatif stres üzerine etkilerinin belirlenmesi için %40 (KM40), %50'lık (KM50) ve %80 canlılık gösteren (40 μ M CARB + 30 μ M CUR) kombinasyonları deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir (Tablo 5.7; Şekil 5.7).

Tablo 5.7. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların normal CCD-19Lu hücre hatlarındaki sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri (CI)

IC ₅₀ Yüzdesi	Dozlar (CARB + CUR)	CI
%100	200 μ M + 150 μ M	0,66247
%75	150 μ M + 112,5 μ M	0,79554
%50	100 μ M + 75 μ M	0,62447
%40	80 μ M + 60 μ M	0,73911
%30	60 μ M + 45 μ M	0,90364
%20	40 μ M + 30 μ M	0,65799
%10	20 μ M + 15 μ M	1,93711

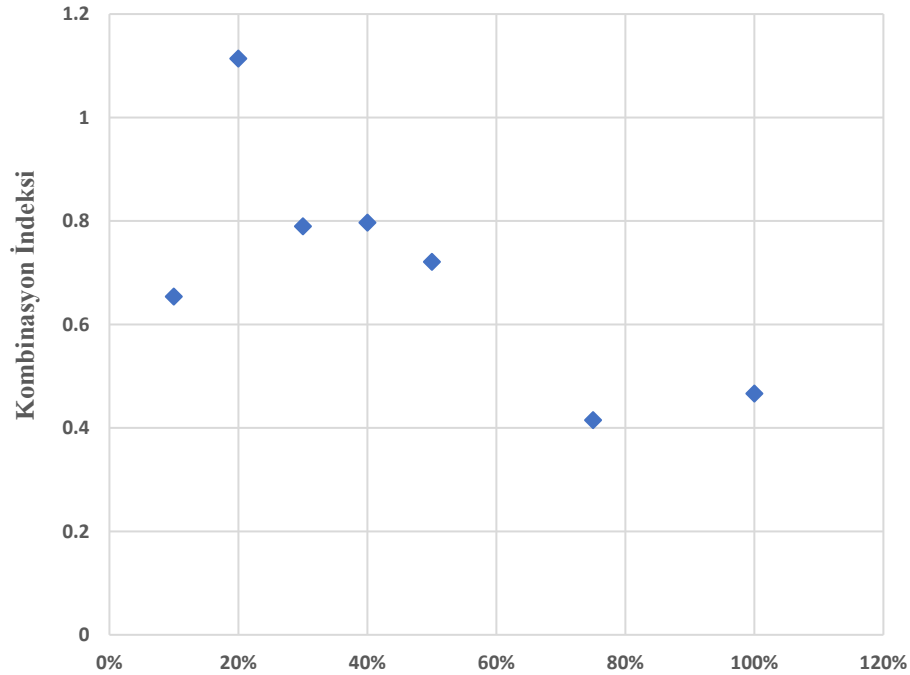


Şekil 5.7. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların normal CCD-19Lu hücre hattında sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri

A549 adenokarsinom hücre hattındaki kombinasyonların oksidatif stres üzerine etkilerinin belirlenmesi için %30 (KM30), %40'lık (KM40) ve %80 canlılık gösteren (10 μ M CARB + 60 μ M CUR) kombinasyonları deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir (Tablo 5.8; Şekil 5.8).

Tablo 5.8. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri (CI)

IC ₅₀ Yüzdesi	Dozlar (CARB +CUR)	CI
%100	100 μ M + 60 μ M	0,46637
%75	75 μ M + 45 μ M	0,41513
%50	50 μ M + 30 μ M	0,72098
%40	40 μ M + 24 μ M	0,79672
%30	30 μ M + 18 μ M	0,78977
%20	20 μ M + 12 μ M	1,11384
%10	10 μ M + 6 μ M	0,65377



Şekil 5.8. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların A549 adenokarsinom hücre hattında sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri

5.2. Hücrelerdeki Oksidatif Denge Durumları

5.2.1. TOS ve TAS bulguları

Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücrelerindeki total oksidan ve antioksidan durumuna etkileri, spektrofotometre verileri üzerinden hesaplanmıştır (Tablo 5.9; Tablo 5.10).

Tablo 5.9. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda normal CCD-19Lu hücrelerindeki total oksidan ve antioksidan durumuna etkileri (kontrole göre; * $p < 0,05$)

Gruplar	TOS ($\mu\text{mol/L}$)	TAS (mmol/L)
Kontrol	8,74 $\pm$ 1,20	4,701 $\pm$ 1,80
CARB IC ₅₀ [200 μM]	25,454 $\pm$ 8,20 *	1,576 $\pm$ 0,50*
CUR IC ₅₀ [150 μM]	20,336 $\pm$ 5,20*	4,5 $\pm$ 1,50*
KM40 [80 μM CARB + 60 μM CUR]	25,319 $\pm$ 10,80*	4,048 $\pm$ 1,08*
KM50 [100 μM CARB + 75 μM CUR]	21,548 $\pm$ 8,94*	3,086 $\pm$ 1,20
%80 Canlılık [40 μM CARB + 30 μM CUR]	15,218 $\pm$ 5,64*	6,307 $\pm$ 2,35

Tablo 5.10. Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda A549 adenokarsinom hücrelerindeki total oksidan ve antioksidan durumuna etkileri (kontrole göre; * $p < 0,05$)

Gruplar	TOS ($\mu\text{mol/L}$)	TAS (mmol/L)
Kontrol	4,7808 $\pm$ 0,05	7,947 $\pm$ 1,56
CARB IC ₅₀ [100 μM]	43,738 $\pm$ 8,10*	3,274 $\pm$ 0,5*
CUR IC ₅₀ [60 μM]	39,133 $\pm$ 5,50*	6,906 $\pm$ 1,05*
KM30 [30 μM CARB + 18 μM CUR]	28,795 $\pm$ 4,45*	6,156 $\pm$ 0,98*
KM40 [40 μM CARB + 24 μM CUR]	48,710 $\pm$ 5,56*	6,260 $\pm$ 0,90*
%80 Canlılık [10 μM CARB + 6 μM CUR]	36,926 $\pm$ 11,18	24,876 $\pm$ 10,8

5.2.2. OSI değerinin hesaplanması

Oksidatif stres indeksi, CCD-19Lu ve A549 hücre hatlarının TOS ve TAS deney sonuçları üzerinden hesaplanmıştır. 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 5.11. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki TOS ve TAS deney sonucu üzerinden hesaplanan ($TOS / [TAS \times 10]$) OSI değerleri (kontrole göre; * $p < 0,05$)

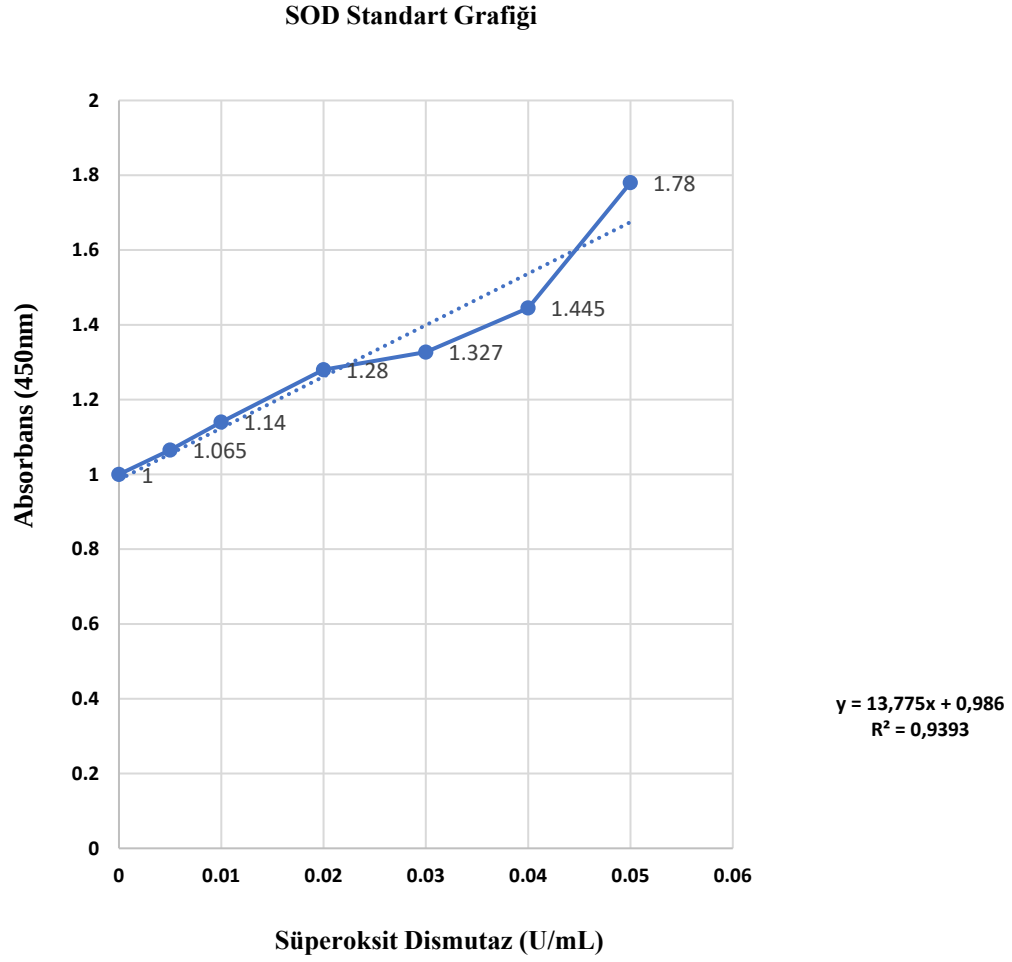
Gruplar	OSI
Kontrol	0,185±0,005
CARB IC ₅₀ [200 µM]	1,615±1,20*
CUR IC ₅₀ [150 µM]	0,451±0,02*
KM40 [80 µM CARB + 60 µM CUR]	0,625±0,02*
KM50 [100 µM CARB + 75 µM CUR]	0,698±0,04*
%80 Canlılık [40 µM CARB + 30 µM CUR]	0,241±0,02*

Tablo 5.12. A549 adenokarsinom hücre hattındaki TOS ve TAS deney sonucu üzerinden hesaplanan ($TOS / [TAS \times 10]$) OSI değerleri (kontrole göre; * $p < 0,05$)

Gruplar	OSI
Kontrol	0,601±0,20
CARB IC ₅₀ [100 µM]	1,335±1,0*
CUR IC ₅₀ [60 µM]	0,566±0,15*
KM30 [30 µM CARB + 18 µM CUR]	0,467±0,20*
KM40 [40 µM CARB + 24 µM CUR]	0,778±0,05*
%80 Canlılık [10 µM CARB + 6 µM CUR]	0,148±0,02*

5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivasyon Bulguları

SOD standardı için stok çözeltiden, belirtilen dilüsyonların ölçümü yapılarak, standart eğri grafiği elde edilmiştir (Şekil 5.9).

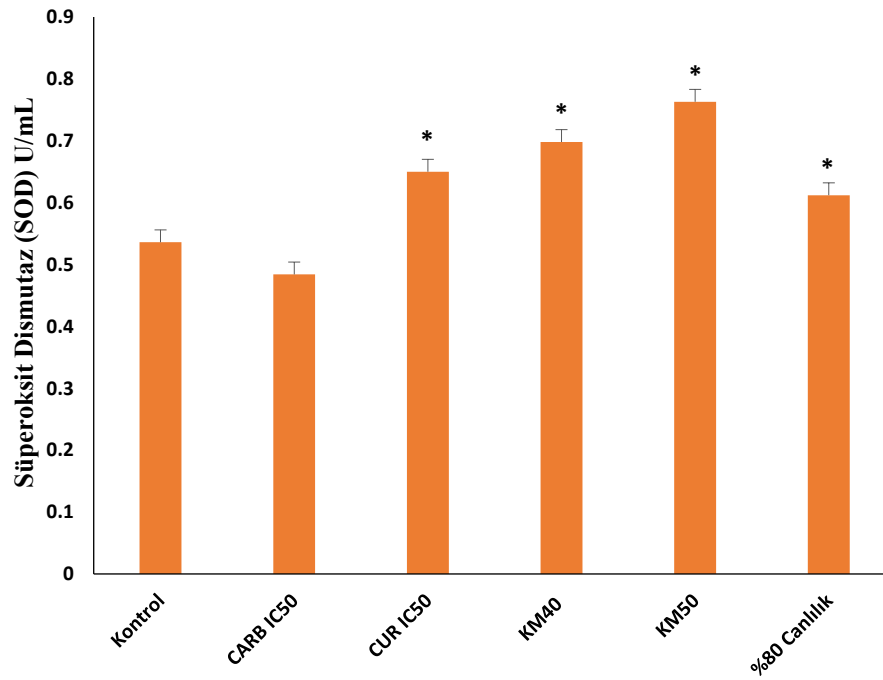


Şekil 5.9. SOD standart grafiği

Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, normal CDD-19Lu hücreleri üzerindeki 24 saat sonucunda SOD aktivasyon bulguları (Tablo 5.13; Şekil 5.10) elde edilmiştir.

Tablo 5.13. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin SOD aktivasyonu sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)

Gruplar	SOD (U/mL)
Kontrol	0,536±0,02
CARB IC ₅₀ [200 µM]	0,484±0,02
CUR IC ₅₀ [150 µM]	0,650±0,01*
KM40 [80 µM CARB + 60 µM CUR]	0,698±0,02*
KM50 [100 µM CARB + 75 µM CUR]	0,763±0,01*
%80 Canlılık [40 µM CARB + 30 µM CUR]	0,612±0,02*

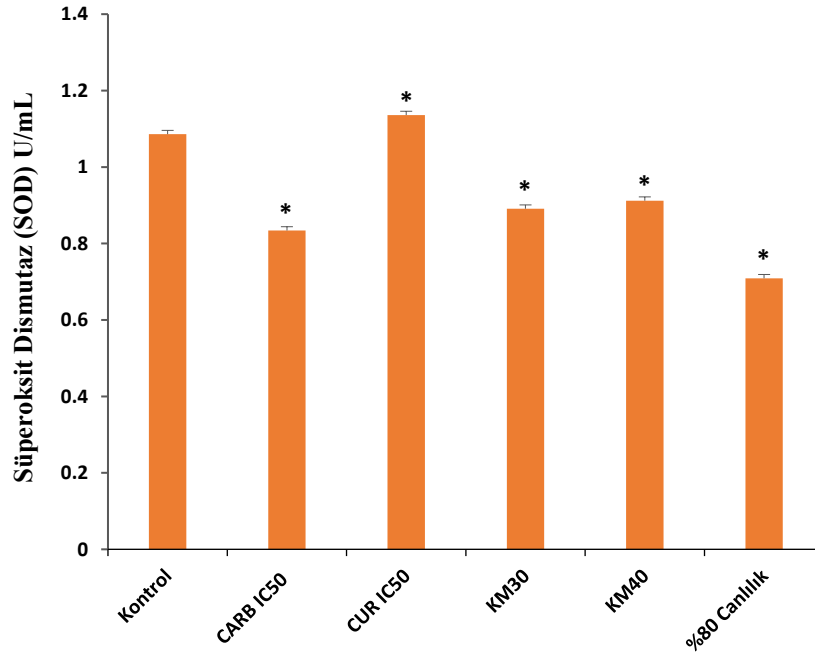


Şekil 5.10. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin SOD aktivasyonu sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$).

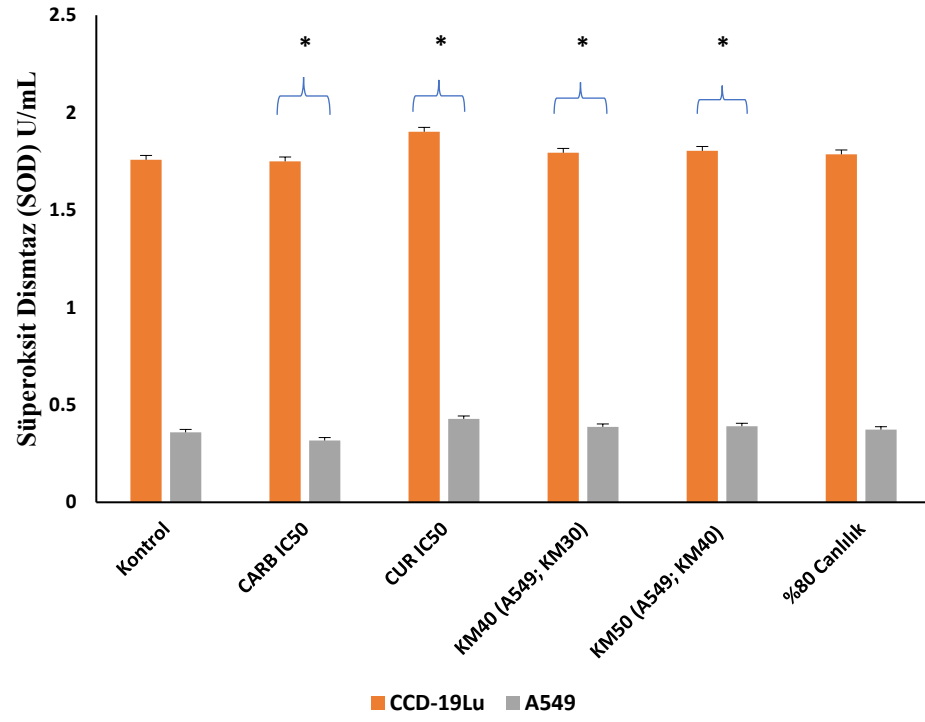
Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, A549 adenokarsinom hücreleri üzerindeki 24 saat sonucunda SOD aktivasyon bulguları (Tablo 5.14; Şekil 5.11) elde edilmiştir.

Tablo 5.14. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin SOD aktivasyonu sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)

Gruplar	SOD (U/mL)
Kontrol	1,086±0,01
CARB IC ₅₀ [100 µM]	0,834±0,01*
CUR IC ₅₀ [60 µM]	1,136±0,02*
KM30 [30 µM CARB + 18 µM CUR]	0,891±0,02*
KM40 [40 µM CARB + 24 µM CUR]	0,912±0,01*
%80 Canlılık [10 µM CARB + 6 µM CUR]	0,709±0,01*



Şekil 5.11. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin SOD aktivasyonu sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$).

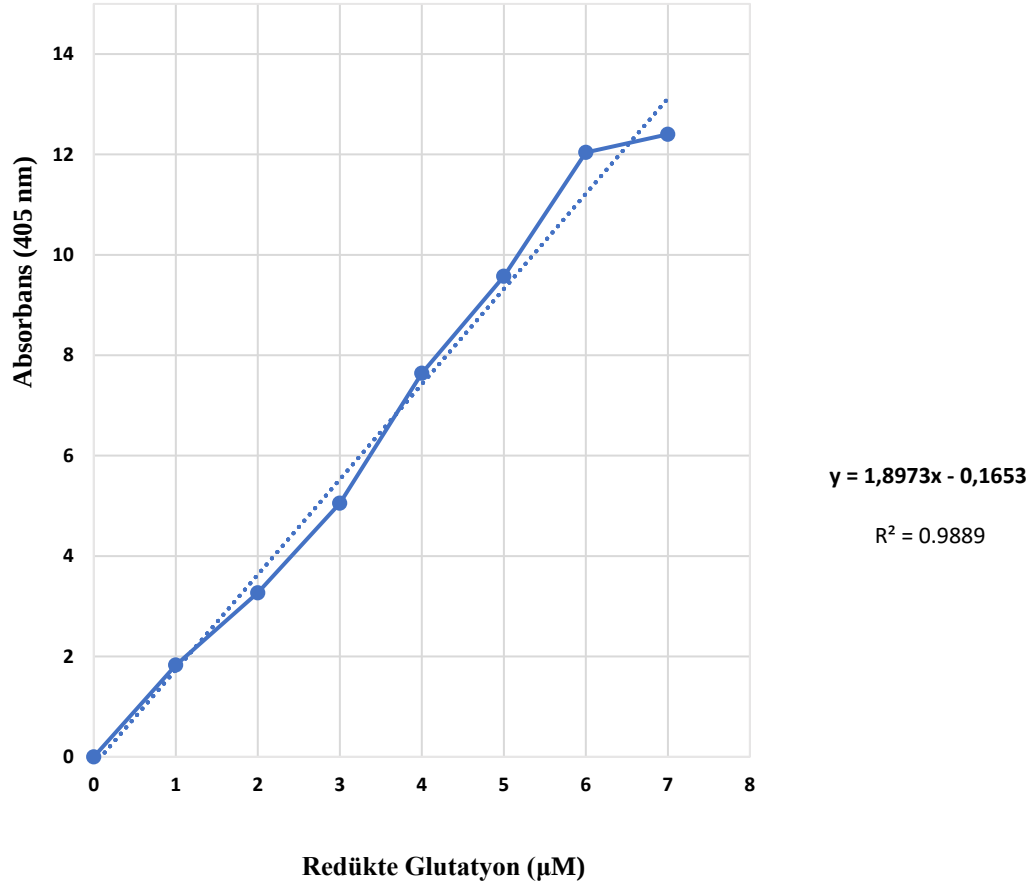


Şekil 5.12. Normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki SOD düzeyleri (* $p < 0,05$)

5.4. Redükte Glutasyon (GSH) Bulguları

GSH standardı için stok çözeltiden, belirtilen dilüsyonların ölçümü yapılarak, standart eğri grafiği elde edilmiştir (Şekil 5.13).

GSH Standart Grafiği

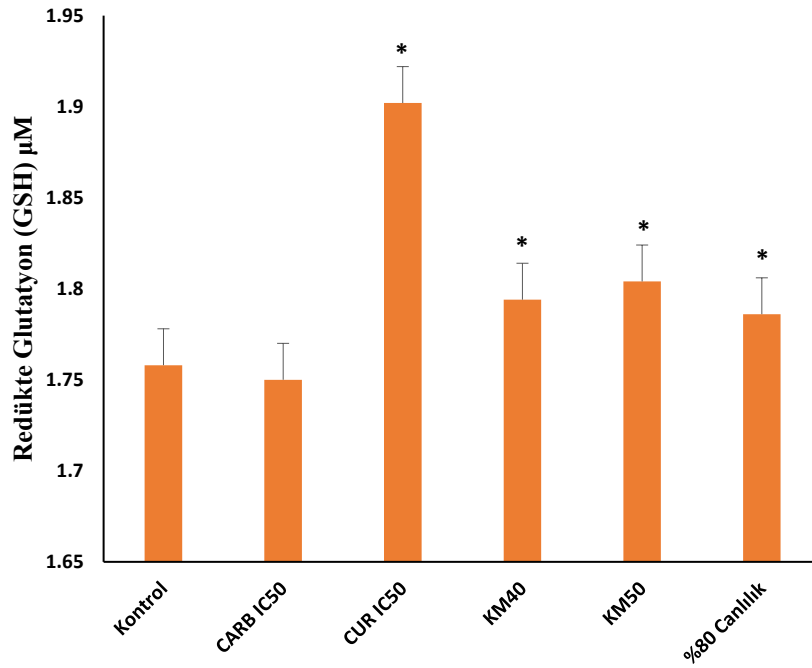


Şekil 5.13. GSH standart grafiği

Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, normal CDD-19Lu hücreleri üzerindeki 24 saat sonucunda GSH bulguları (Tablo 5.15; Şekil 5.14) elde edilmiştir.

Tablo 5.15. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin GSH sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)

Gruplar	GSH (μM)
Kontrol	1,758 $\pm$ 0,02
CARB IC ₅₀ [200 μM]	1,750 $\pm$ 0,05*
CUR IC ₅₀ [150 μM]	1,902 $\pm$ 0,02*
KM40 [80 μM CARB + 60 μM CUR]	1,794 $\pm$ 0,01*
KM50 [100 μM CARB + 75 μM CUR]	1,804 $\pm$ 0,02*
%80 Canlılık [40 μM CAR + 30 μM CUR]	1,786 $\pm$ 0,01*

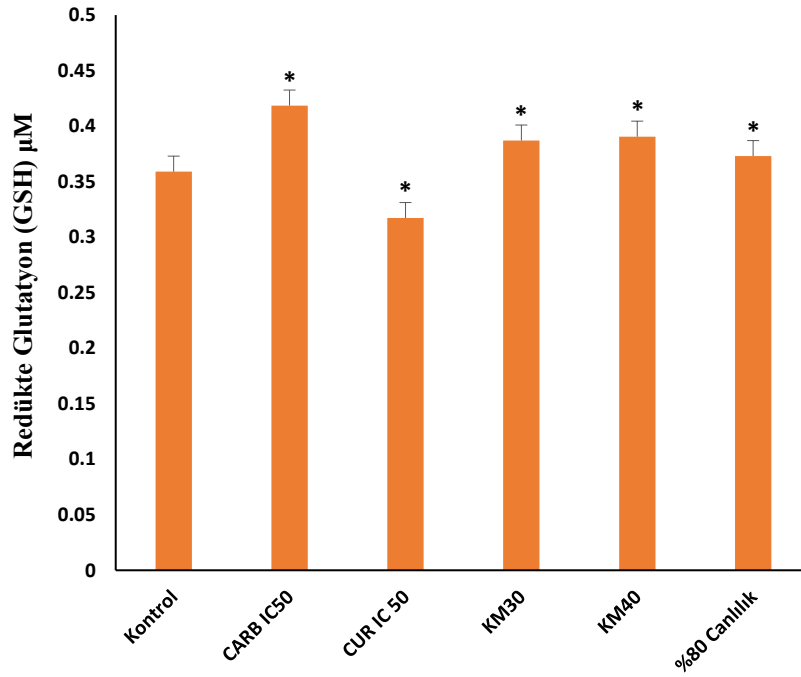


Şekil 5.14. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin GSH sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)

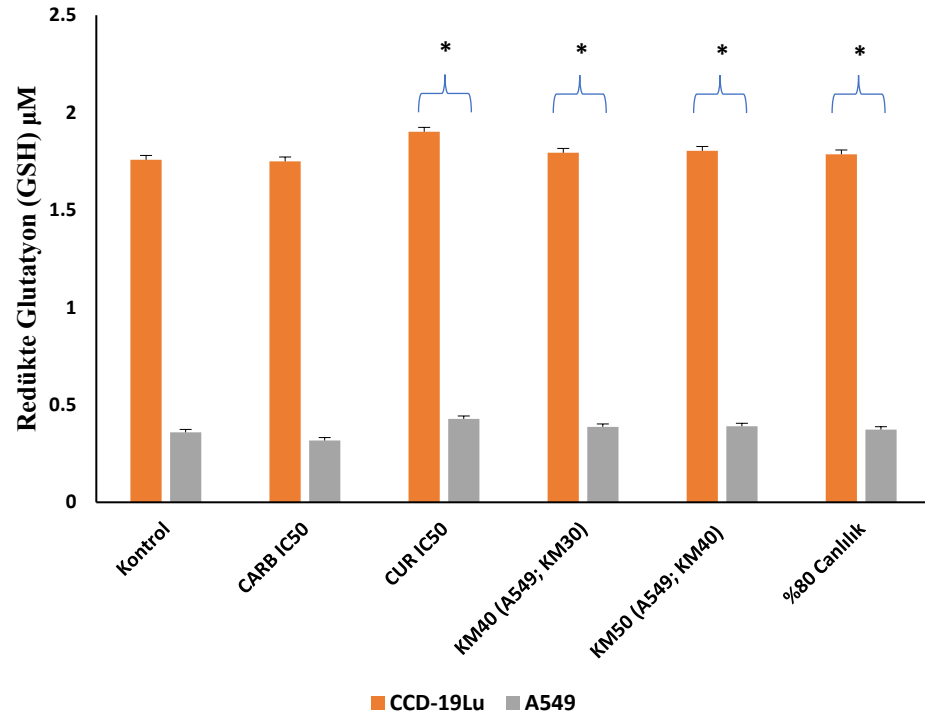
Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, A549 adenokarsinom hücreleri üzerindeki 24 saat sonucunda GSH aktivasyon bulguları (Tablo 5.16; Şekil 5.15) elde edilmiştir.

Tablo 5.16. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin GSH sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)

Gruplar	GSH (μM)
Kontrol	0,3590 $\pm$ 0,02
CARB IC ₅₀ [100 μM]	0,3172 $\pm$ 0,01*
CUR IC ₅₀ [60 μM]	0,4280 $\pm$ 0,05*
KM30 [30 μM CARB + 18 μM CUR]	0,3870 $\pm$ 0,03*
KM40 [40 μM CARB + 24 μM CUR]	0,3905 $\pm$ 0,02*
%80 Canlılık [10 μM CARB + 6 μM CUR]	0,3730 $\pm$ 0,05*



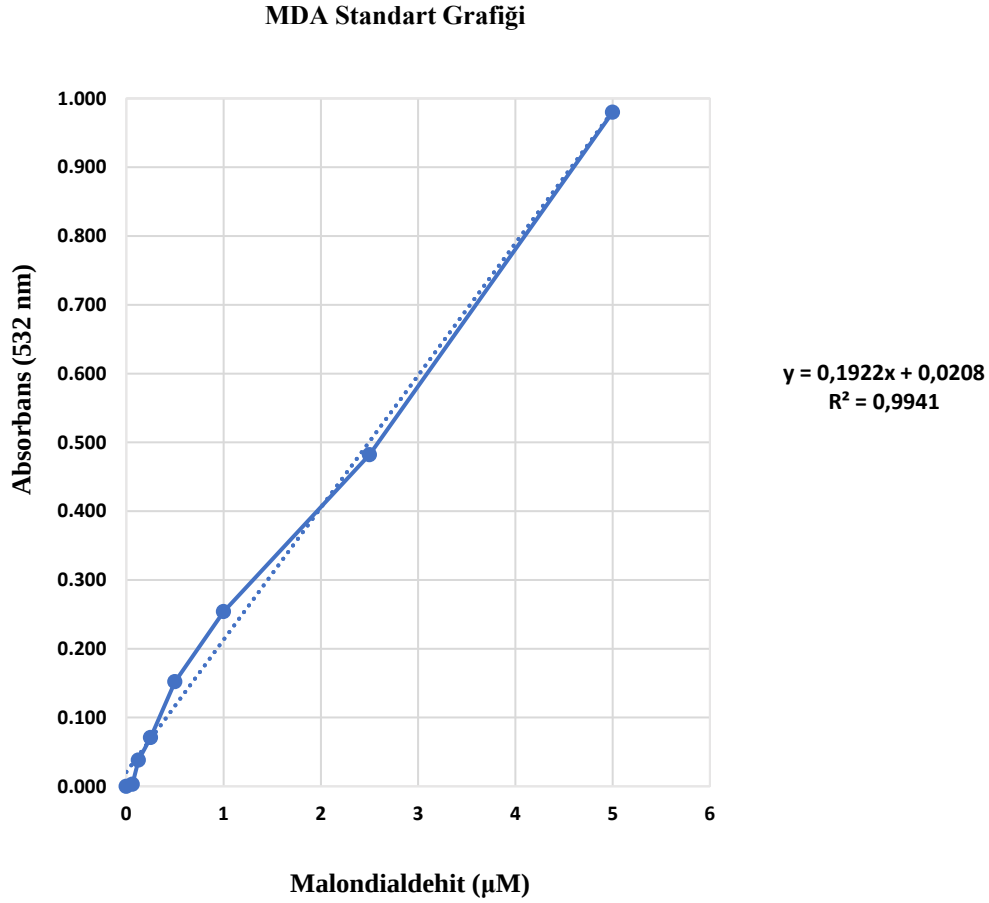
Şekil 5.15. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin GSH sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)



Şekil 5.16. Normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki GSH düzeyleri (* $p < 0,05$)

5.5 Malondialdehit (MDA) Bulguları

MDA standardı için stok çözeltiden, belirtilen dilüsyonların ölçümü yapılarak, standart eğri grafiği elde edilmiştir (Şekil 5.17).

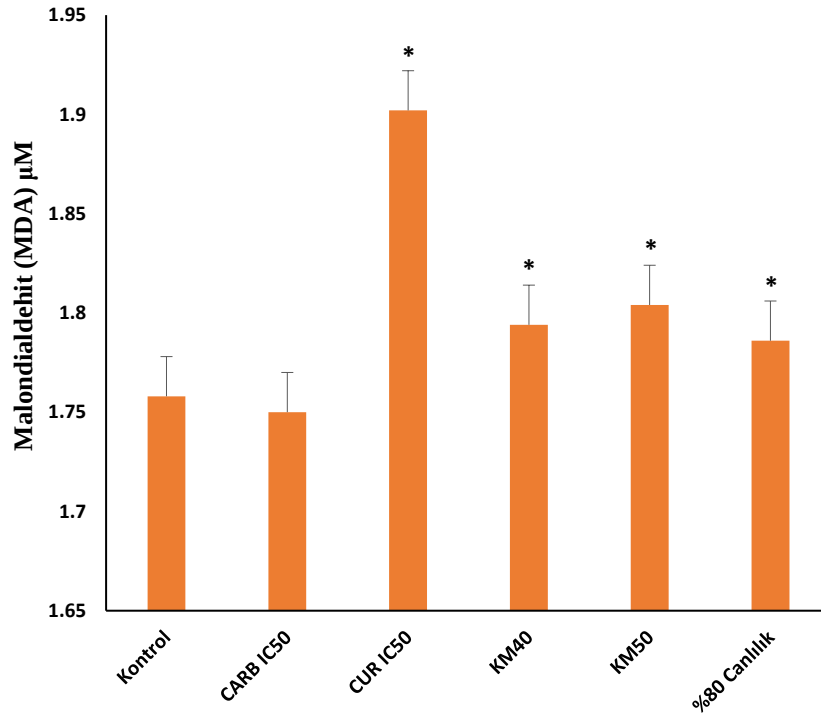


Şekil 5.17. MDA standart grafiği

Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların, normal CCD-19Lu hücreleri üzerindeki 24 saat sonucunda MDA bulguları (Tablo 5.17; Şekil 5.18) elde edilmiştir.

Tablo 5.17. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin MDA sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)

Gruplar	MDA (μM)
Kontrol	0,055 $\pm$ 0,01
CARB IC ₅₀ [200 μM]	0,065 $\pm$ 0,02*
CUR IC ₅₀ [150 μM]	0,020 $\pm$ 0,01*
KM40 [80 μM CARB + 60 μM CUR]	0,038 $\pm$ 0,02*
KM50 [100 μM CARB + 75 μM CUR]	0,042 $\pm$ 0,02*
%80 Canlılık [40 μM CARB+ 30 μM CUR]	0,048 $\pm$ 0,02*

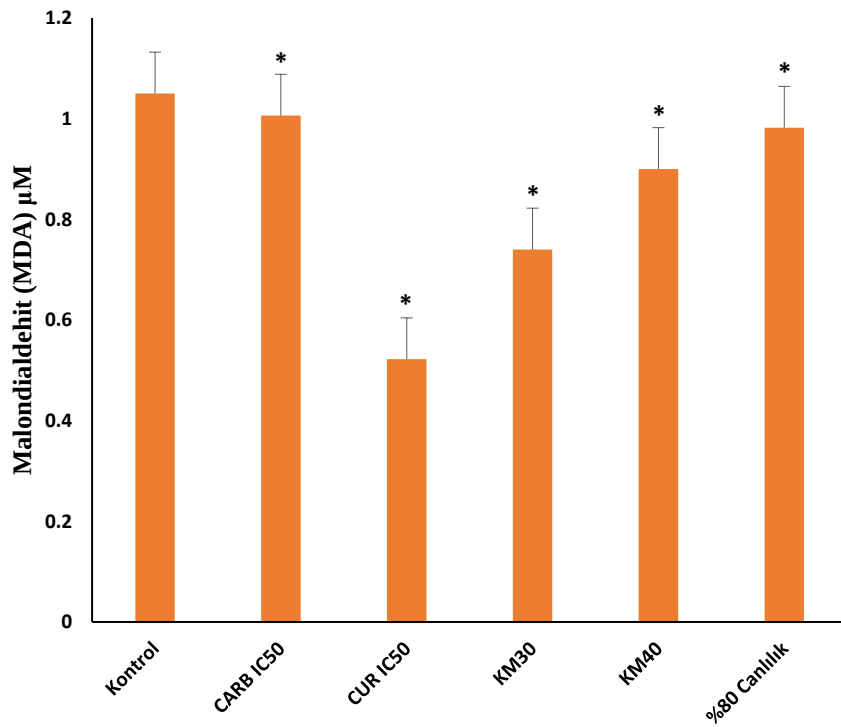


Şekil 5.18. Normal CCD-19Lu hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin MDA sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)

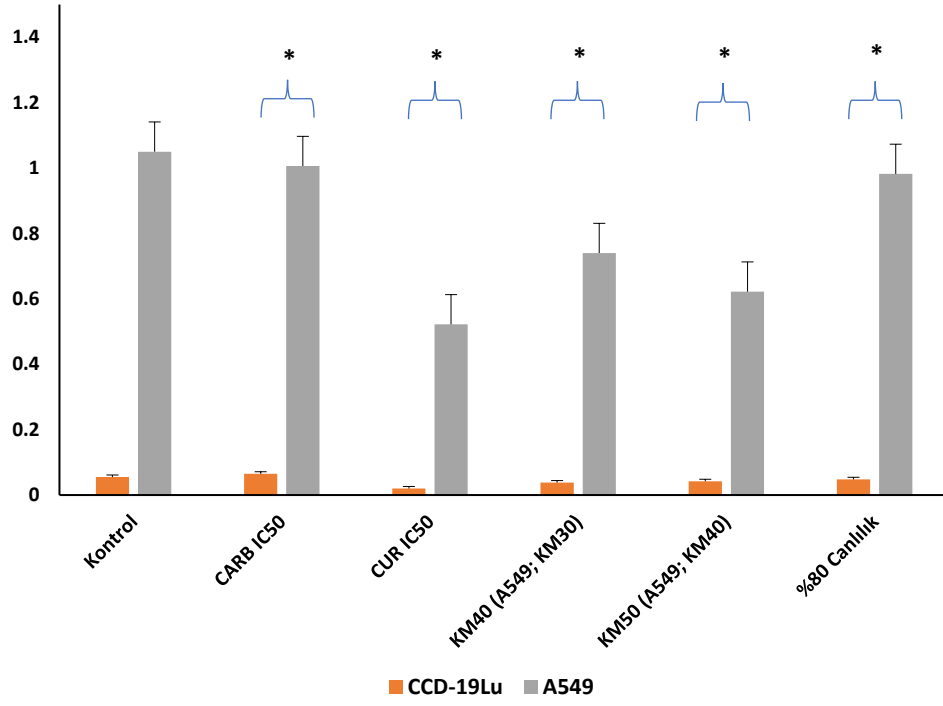
Karboplatin, kurkumin ve kombinasyonların A549 adenokarsinom hücreleri üzerindeki 24 saat sonucunda MDA aktivasyon bulguları (Tablo 5.18; Şekil 5.19) elde edilmiştir.

Tablo 5.18. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin MDA sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)

Gruplar	MDA (μM)
Kontrol	1,050 $\pm$ 0,05
CARB IC ₅₀ [100 μM]	1,006 $\pm$ 0,08*
CUR IC ₅₀ [60 μM]	0,522 $\pm$ 0,03*
KM30 [30 μM CARB + 18 μM CUR]	0,740 $\pm$ 0,04*
KM40 [40 μM CARB + 24 μM CUR]	0,622 $\pm$ 0,02*
%80 Canlılık [10 μM CARB + 6 μM CUR]	0,982 $\pm$ 0,02*



Şekil 5.19. A549 adenokarsinom hücre hattındaki karboplatin, kurkumin ve kombine uygulamalarının 24 saatlik doza bağımlı muamelerinin MDA sonuçları (kontrole göre; * $p < 0,05$)



Şekil 5.20. Normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki MDA düzeyleri (*p < 0,05)

6. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, istatistiksel olarak dünya çapında en yaygın hastalıklardan biridir ve insan sağlığı ve yaşamı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Özellikle KHDAK, en sık görülen akciğer kanseri türüdür. Kemoterapi KHDAK tedavisi için en yaygın yöntemlerden biridir (Wang vd., 2018). Kemoterapi, kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyen ve sitotoksik etki göstererek bu hücrelerin ölmesini sağlayan kimyasal ajanlarla yapılan bir tedavi şeklidir (Kedar, 2004). Akciğer kanserinde karboplatin ve sisplatin en sık kullanılan platin bazlı kemoterapötiklerden birisidir. Karboplatin nükleotidlerin onarımı yapılmadan DNA ve RNA polimerazı engelleyerek antineoplastik etki gösterir. Karboplatin DNA nükleozom yapısının yeniden düzenlenmesini sağlayarak hücre bölünmesini, büyümesini ve çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (Unger vd., 2009). Karboplatinin, platinyum içeriğinden dolayı hücrelerde öncelikle DNA hasarına yol açtığı ve böylece tümör hücrelerinin vücuttaki gelişimlerini ve yayılmasını yavaşlattığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Chen, Chen ve Lin, 2010). Kemoterapinin meydana getirmiş olduğu etkiler, normal hücrelere de ciddi hasarlar vermektedir. Bu hasarların en başında DNA hasarı gelmektedir. Vermiş olduğu bu zararı en aza indirmek için yeni yöntemler geliştirilmeye devam etmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda antikanser ajanları olarak fitokimyasallara odaklanılmıştır. Hücresel hasarı önleyebilmek için terapötik ajanlar olarak diyetel antioksidanlar önerilmektedir. Diyet ile alınan antioksidanların tümör hücrelerini küçülttüğü, hücresel hasarı onardığı, reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu zararlı etkiyi ortadan kaldırdığı bilinmektedir. Ayrıca normal hücrelerin bütünlüğü koruduğu da birçok çalışmada belirtilmiştir (Barjot vd., 2007; Lima, Ferreira ve Wilson, 2006; Wang vd., 2018). Kurkumin, C. Longa bitkisinin kökünden elde edilen zerdeçal rizomlarında (kök-sap) bulunan ve çeşitli anti-enflamatuar, anti-anjiyojenik, anti-proliferatif özellikler sergilediği bildirilen sarı renkli polifenolik yapıda bir antioksidandır. Daha da önemlisi, sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkileri tetiklemediği bildirilmiştir (Wang vd., 2018). Polifenoller kanser hücrelerinde oksidatif stresi düzenleyerek sinyal aktarımını, redoks hassas transkripsiyon faktörlerini, hücre proliferasyonunu (Nagaraju vd., 2012; Syng, Kumari ve Khar, 2004) ve apoptozu etkileyen yolları düzenleyerek kanser oluşumunu engellediği bilinmektedir (Yao vd., 2004). Kurkumin cilt, meme, akciğer, karaciğer, kolon gibi birçok kanser türünde terapötik bir etki göstermektedir (Chuang vd., 2000; Srimal ve Dhawan, 1973). Kurkumin, serbest radikalleri temizleyip antioksidan enzim kapasiteyi artırarak hücreleri

oksidatif hasara karşı koruduğu görülmüştür (David vd., 1998; Waly, Al Moundhri ve Ali, 2011).

Karboplatin, kurkumin ve [Karboplatin + Kurkumin] kombinasyonlarının normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki sitotoksitelerini değerlendirmek için MTT metodunu kullanılarak büyümeye olan etkileri incelendi ve yüzde canlılıkları hesaplanmıştır. Bu iki ajan arasındaki sinerjizmi araştırmak için yapılan bir çalışmada A549 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda kurkumin (5, 10, 20 ve 50 μ M), karboplatin (25, 50, 100, 250 ve 500 μ M) ve kombinasyonları uygulanmıştır. 24 saat sonundaki MTT sonucunda tek başına kurkumin ve karboplatinin doza bağlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığını göstermiştir. Kurkuminin karboplatin ile birleştirilmesi, A549 hücrelerinde artmış sitotoksite ile sonuçlanmıştır. (Kang vd., 2015; Subhajit vd., 2017). Kurkumin, kemoterapinin olumsuz etkilerini azalttığı özellikle de platin grubu içeren kemoterapi ajanlarının hücreleri oksidatif hasarlara karşı koruduğu da bildirilmiştir (Kang vd., 2015; Zangui vd., 2019). Yapılan bazı araştırmalarda docetaksel, gensatamib gibi çeşitli kemoterapötik ilaçlar ile beraber kurkumin uygulamasının kanser tedavi etkinliğini arttırdığı saptanmıştır (Gurkan vd., 2018). Yapılan başka bir çalışmada karboplatin, etoposid ve vinkristin gibi antitümör ilaçlarla kombine olarak kullanılan kurkuminin, insan retinoblastoma (RB) hücrelerini tek başına kullanılan ilaçlara kıyasla daha fazla apoptoza götürdüğü bildirilmiştir (Duthie vd., 1996). A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre soyları hücrelerinde yapılan bir çalışmada, hücreler farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda kurkumin ile tedavi edilmiştir. Tedavi sonrasında kurkumin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini inhibe etmiştir (Pillai vd., 2004) A549 insan akciğer adenokarsinoma hücre soyunda yapılan bir çalışmada, MTT deneyi ile hücrelerin canlılığı ölçülmüştür. Konsantrasyona ve zamana bağlı olarak kurkumin tedavisini takiben bu hücrelerde hücre canlılığı inhibe olmuştur (Liu vd., 2017).

Reaktif oksijen türleri (ROT) kanseri oluşturan en önemli nedenlerden biri olarak görülmektedir. ROT ile antioksidanlar arasındaki dengesizlik, oksidatif stresi oluşturmaktadır (Wells vd., 2009). Birçok kanser hücre hattında oksidatif strese dayalı Total Oksidan/Antioksidan durumlarının ölçümü yapılan çalışmalar bulunmaktadır ancak akciğer kanseri hücre hattında bu çalışmalara daha az rastlanmaktadır (Chukka, 2013; M. Erhola, vd., 1997; Lin vd., 2009). A549 hücre hatlarına uygulanan karboplatin, kurkumin ve kombinasyonlarının, oksidatif strese olan etkileri TAS ve TOS verileri ölçülerek OSI (Oksidatif Stres İndeksi) değerleri belirlenmiştir. Karboplatinin OSI değeri her iki hücre

hattında da doza bağılı olarak arttığı görülmüştür. A549 adenokarsinom hücre hattındaki KM30 kombinasyonundaki (30 μ M CARB + 18 μ M CUR) OSI değeri $0,467\pm0,20$ bulunurken, KM40 kombinasyonundaki (40 μ M CARB + 24 μ M CUR) OSI değeri $0,778\pm0,05$ 'e yükselmiştir. Aynı şekilde normal CCD-19Lu hücre hattındaki KM40 kombinasyonundaki (80 μ M CARB + 60 μ M CUR) OSI değeri $0,625\pm0,02$ iken KM50 kombinasyonundaki (100 μ M CARB + 75 μ M CUR) OSI değeri $0,698\pm0,04$ 'e yükselmiştir. A549 ve CCD-19Lu hücre hattı baz alınarak CUR'un tek başına kullanımında oksidatif stresi azalttığı, CARB ile yapılan kombinasyonlarda CARB'nin yaratmış olduğu OSI en aza indirdiği görülmüştür. Yapılan bir *in vivo* çalışmada akciğer kanser hastalarında TAS/TOS düzeylerine bakılmış ve OSI değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmaya göre TAS düzeyleri düşük bulunurken TOS ve OSI düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. (Katarzyna vd., 2018). 1 μ M sisplatin ve 1 μ M oxaliplatin antitümör ilaçlarının HEK293 hücrelerine ayrı ayrı verilmesiyle TAC düzeylerine bakılmış ve kontrole göre (81,23 nmol/mg) sırasıyla 39,56 nmol/mg; 36,27 nmol/mg şeklinde azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte hücreler 1mM kurkuminle kombine edildiklerinde TAC düzeylerinde (80,41; 79,16 nmol/mg) kontrole göre herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Mostafa, Wally ve Al Moundhri & Badreldin, 2011).

SOD süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene ayrışmasını katalize ederken, oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rolü olduğu bilinen antioksidandır. Serbest radikallerin artması SOD ve GSH'ı tüketirken lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'yı biriktirir. Bir hücrede azalmış olan antioksidan durum beraberinde oksidatif stresi de artırır (Zhang vd., 2013). Birçok antioksidan akciğerde önemli ve koruyucu rol oynamaktadır. (Cho ve Kleeberger, 2009). Yapmış olduğumuz çalışmada normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki tek başına kullanılan CARB'in SOD değeri, kontrole göre azaltmıştır. Karboplatinin Kurkuminle oluşturulan kombinasyonlardaki SOD değerleri tek başına kullanılan CARB dozuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Embriyonik fibroblast hücrelerine sodyum arsenit (As) ve CUR uygulanan bir çalışma da elde edilen SOD enzim sonuçlarında 0,01 ve 0,1 μ M sodyum arsenit konsantrasyonların da SOD enziminde anlamlı bir fark yaratmadığı ancak 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarında SOD düzeylerinde önemli bir azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. Aynı hücrelere As+CUR verildiğinde 1 μ M As+CUR grup hariç tüm gruplarda konsantrasyona bağılı anlamlı bir azalma gözlemlendiği, bununla birlikte kurkuminin SOD aktivitesi üzerindeki iyileştirici rolü sadece 10 μ M As de gözlemlendiği

tespit edilmiştir (Perker vd., 2019). Yapılan başka bir çalışmada A549 hücre hattında formaldehitin neden olduğu genotoksisite, SOD değerlerini azaltırken kurkumin verilmesiyle SOD düzeyinde artma olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2013). Katarzyna ve arkadaşlarının hem akciğer kanser hastaları hem de sağlıklı bireylerde yaptıkları bir çalışmada SOD aktivitesinin akciğer kanseri hastalarında kontrole göre düşük olduğu bulunmuştur (Katarzyna vd., 2018).

Serbest radikallerin direkt ölçüm yönteminin zorluğu nedeniyle GSH ölçümünün yapılması oksidatif stresin ve antioksidan savunma sistemi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada A549 adenokarsinom hücre hattındaki tek başına kullanılan karboplatin dozundaki GSH düzeyi, kontrole göre mukayese edildiğinde düştüğü, kurkumin ile karboplatinin kombine verildiği gruplarda karboplatin dozunu da beraberinde azalttığı tespit edilmiştir. Mostafa ve arkadaşlarının insan embriyonik böbrek hücre hattında (HEK293) üzerinde 1µM sisplatindeki GSH düzeyi (4.3 ± 2.1 nmol/mg) ve 1µM oxaliplatin düzeyindeki GSH düzeyi (5.10 ± 3.1 nmol/mg) olup kontrole göre (20.34 ± 2.3 nmol/mg) düşüğe neden olduğu bildirilmiştir (Mostafa, Wally ve Al Moundhri & Badreldin, 2011). Antunes ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, erkek Wistar sıçanlarına ilk önce 2 doz halinde (24 saat ve 10 dk) sisplatin verilmiştir. Bu uygulaması sonucu oluşan nefrotoksite ve GSH kaybını önlemek için sisplatin uygulamasından 24 saat ve 10 dk önce 8 mg/kg toplam iki doz halinde kurkumin verilmiştir. Kurkumin, sisplatinin neden olduğu GSH kaybını engelleyemediğini ve böbrekleri sisplatine bağlı oluşan nefrotoksisiteden koruyamadığını rapor edilmiştir (Antunes, Darin ve Bianchi, 2001). Platin bazlı antikanser ilaçların kullanımında GSH miktarını hızlı bir şekilde azaltmaktadır (Pabla ve Dong, 2008).

Oksidatif hasarın belirlenmesinde kullanılan en yaygın testlerden biri Tiyobarbütirik asit-reaktif maddeler (TBARS) yöntemidir. Bu yöntem oksidatif düzeyin belirteci olan MDA ölçümüne dayanmaktadır (Çekiç vd., 2013). Malondialdehit, oksidatif stresin yaratmış olduğu lipid peroksidasyonunu belirlemede en güvenilir ve kabul görülen belirteçlerden biridir. Yapmış olduğumuz çalışmada normal CCD-19Lu ve A549 adenokarsinom hücre hatlarındaki kombinasyon gruplarının MDA düzeyi, tek başına verilen karboplatindeki MDA düzeyinden daha düşüktür. A549 hücre dizisinde kontrol grubunun MDA seviyeleri $1,050 \pm 0,05$ µM ve 100 µM karboplatinde $1,006 \pm 0,08$ µM olarak tespit edilmiştir, bununla birlikte tek başına verilen kurkumin grubunun MDA düzeyleri $0,522 \pm 0,03$ µM'a kadar azaldığı tespit edilmiştir. KM40 kombinasyon [40µM

CAR+24 μ M CUR] grubunda anti-tümör ilaç olarak kullanılan karboplatin dozunu 100 μ M dan 40 μ M'a kadar azalttığı ve MDA seviyesini de $0,622\pm0,02$ ye kadar düşürdüğü görülmektedir. A549 hücre hattına verilen ve genotoksik bir madde olduğu bilinen formaldehitin MDA seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı bununla birlikte bir antioksidan olan kurkuminle kombine verildiğinde MDA düzeylerini azaltarak oksidatif stresi önlediği bildirilmiştir (Zhang vd., 2013). Başka bir çalışmada sisplatinle tedavi edilen erkek Wistar sıçanlarındaki MDA düzeylerinin ilk başta yüksek daha sonra kurkumin ilavesiyle bu oranın azaldığı görülmüştür (Kuhad vd., 2007). Revant ve arkadaşları oral prekanser ve oral kanser de MDA düzeylerini inceledikleri bir çalışmada kontrol grubundaki ortalama MDA düzeyini $5,107\pm2,32$ nmol/ml, oral prekanser ve oral kanserdeki ortalama MDA düzeylerini sırasıyla $9,33\pm4,89$ nmol/ml ve $14,34\pm1,43$ nmol/ml olarak bulduklarını bildirmişlerdir (Revant vd., 2010). Sahin ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada akciğer kanserinde ($20,5\pm7,9$ nmol/ml) olan MDA seviyeleri sağlıklı kontrollere göre ($12,6\pm7,1$ nmol/ml) anlamlı olarak artmıştır (Sahin vd., 2001). Perker ve arkadaşları 3T3 fibroblast hücrelerinde sodyum arsenit ile oluşturmuş olan oksidatif hasarın bir antioksidan kurkumin verilerek koruyucu etkisini incelemişlerdir. Sodyum arsenitin 3T3 hücrelerinde lipid peroksidasyonu arttırdığını ve oksidasyon hasarını indüklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte kurkuminin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Perker vd., 2019).

Sonuç olarak elde edilen veriler ışığında, CCD-19Lu ve A549 hücre hatlarında CARB+CUR kombinasyonlarının düşük dozları hariç diğer dozlarında sinerjik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Çalışmamızda her iki hücre hattı içinde oluşturulan kombinasyonlar, (A549 için KM30 ve KM40; CCD-19Lu için KM40 ve KM50) içerdikleri CARB ve CUR dozları göz önüne alındığında oksidatif stresi iyileştirdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte tek başına kullanılan karboplatinin yüksek dozu bir antioksidan olan kurkumin ilavesiyle daha da düşürülmüş ve olası toksik etkinin azaldığı gözlemlenmiştir. Kurkuminin karboplatinle kombine kullanımının oksidatif stres üzerindeki etkilerini incelediğimiz çalışmamızda, her iki hücre hattında da karboplatinin tek başına uygulanan gruplarındaki OSI seviyesi kombine gruplarına göre daha yüksek bulundu ancak oksidatif stres hakkında daha net bir sonuca ulaşmak için bu çalışmanın farklı zaman aralıklarında da incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Kombinasyonların bu etkisi SOD, GSH ve MDA deneylerinde de görülmüştür. [CARB+CUR] kombinasyonlarının her iki hücre hattında da tek başına kullanılan CARB grubuna göre

azalmış olan SOD ve GSH düzeylerini arttırdığı saptanmıştır aynı şekilde kombinasyon grupları, tek başına kullanılan CARB grubuna göre artmış olan MDA düzeyini aşağıya çektiği görülmüştür. Kombinasyonların CCD-19Lu ve A549 hücre hatlarındaki gösterdikleri bu etkilerin, nasıl ve ne şekilde gerçekleştiği, aktiviteleri ve *in vivo* ortamda etkili olup olmadıkları gibi soruların cevabını bulabilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Aggarwal, B.B., Kumar, A. and Bharti, A.C. (2003). Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*, 23(1), 363-398.
- Akgün, G.H. (2016). *Kurkumin-Oksim Bileşiğinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antioksidan Özelliklerinin Değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Akkoçlu, A. ve Öztürk, C. (1999). Akciğer Kanseri. Toraks Kitapları, *Bilimsel Tıp Yayınevi*, 23-47.
- Alberg, A.J., Ford, J.G. and Samet, J.M. (2007). Epidemiology of lung cancer; ACCP evidencebased clinical practice guidelines (2th edition). *Chest.*, 132(3), 29-55.
- Altan, N., Dinçel A.S. ve Koca C., (2006). Diabetes mellitus and oksidatif stress. *Turk J. Biochem.*, 31(2), 51-56.
- American cancer society, (2014). Cancer Facts & Figures 2014, *Amer. Canc. Society*, 15.
- Antemen, Ş.E. (2005). *Beta talasemide oksidatif stres*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Antunes, L.M., Darin, J.D. and Bianchi, N.L. (2001). Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol. Res.*, 43(2), 145-150.
- Armstrong, D. and Browne, R. (1994). The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 366:43-58.
- B. Sela, G., Epelbaum, R. and Schaffer M. (2010). Curcumin as an anti-cancer agent: Review of the gap between basic and clinical applications. *Curr. Med. Chem.*, 17(3), 190–197.
- Barjot, C., Tournaire, M., Castagnino, C., Vigor, C., Vercauteren, J., Rossi JF. (2007). Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: comparison with resveratrol. *Life Sci.*, 81(23-24),1565-1574.
- Bernard, D. and Claudie, M. (2002). Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 42(3), 317–325.
- Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2), 3-8.
- Bingöl, Z., (2014). “Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.”, Türkiye Klinikleri. *J. Pulm. Med- Special Topics*, 7(1),1-5.

- Boulikas, T. and Vougiouka, M. (2003). Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol. Rep.*, 10(6), 1663–1682.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 79–110.
- Chang, G.C., Hsu, S.L., Tsai, J.R., Liang, F.P., Lin, S.Y., Sheu, G.T., Chen, C.Y. (2004). Molecular mechanisms of ZD1839-induced G1-cell cycle arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 68(7), 1453–1464.
- Cheeseman, K.H. and Slater. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 49(3), 481-493.
- Chen, H.H., Chen, T.W. and Lin, H. (2010). Pravastatin attenuates carboplatin-induced nephrotoxicity in rodents via peroxisome proliferator activated receptor alpha–regulated heme oxygenase-1. *Mol. Pharmacol.*, 78(1), 36-45.
- Cho, H.Y. and Kleeberger, S.R. (2009). Nrf2 protects against airway disorders. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 244(1), 43-56.
- Chou, T.C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.*, 70(2), 440–446.
- Chou, T.C. and Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.*, 22, 27–55.
- Christopher, G.A., Sherman, B.J., Sarah, T., William, P., Timothy, A., Julie, B., David, H.J., Janessa, L.L., Gregory, M., Daniel, M., Luke, N., David, G.P., Steven, P., Joan, H.S., Reily, S., Thomas, J.S., John, R.S., David, T., Giuseppe, G. (2010). American society of clinical oncology clinical practice guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J. Oncol. Pract.*, 13(3), 171-189.
- Chuang, S.E., Kuo, M.L., Hsu, C.H., Chen, C.R., Lin, J.K., Lai, G.M., Hsieh, C.Y., Cheng A.L. (2000). Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(2), 331-335.
- Chukka, K.Z. (2013). Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in esophageal cancer patients. *International Journ. Health Scien. Res.*, 3,11.
- Çekiç, S.D., Çetinkaya A., Avan, A.N., Apak, R. (2013). “Correlation of total antioxidant capacity with reactive oxygen species (ROS) consumption measured by oxidative conversion” *J. Agric. Food Chem.*, 61(22), 5260–5270.

- Dasarı, S. and Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.*, 740, 364–378.
- David, A., Balogh, E., Csoka, G., Racz, I. (1998). The preparation and examination of polymorphous vincristine sulphate. *Interna. J. Pharmacol.*, 161(2), 245-251.
- Deaton, C.M. and Marlin D.J. (2003). Exercise associated oxidative stress. *Clin. Tech. Equine Pract.*, 2(3), 278-291.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1830(5), 321-766.
- Devasagayam, T.P.A., Bloor, K.K. and Ramsarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits. *Indian. J. Biochem. Biophys.*, 40(5), 300-308.
- Di Mascio, P., Murphy, M.E. and Sies, H. (1991). Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53(1), 194-200.
- Diniz, G., Ünlü, İ. ve Kömürcüoğlu, B. (2017). Akciğer kanserinin histopatolojik ve moleküler özellikleri. *Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi*, 27(2), 77-87.
- Dorai, T., Cao, Y.C., Dorai, B., Buttyan, R., Katz, A.E. (2001). Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate.*, 47(4), 293-303.
- Duthie, G.G., Wahle, K.W.J. and James, W.P.T. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.*, 2(1), 51-62.
- Duthie, S.J., Ma, A., Ross, M.A., Collins, A.R. (1996). Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.*, 56(6), 1291– 1295.
- Elliot, J.G. (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.*, 53(2), 46-48.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.*, 37(4), 277–285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.*, 38(12), 1103–1111.

- Ernest, W. and Christen, M.G. (1999). Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Am. Chem. Soc.*, 99(9), 2451–2466.
- Fantel, AG. (1996). Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis. *Teratology.*, 53(3), 196-217.
- Fraser, RS, Müller, NL, Colman, N., Pare, PD. (1999). Diagnosis of Diseases of the Chest Pulmonary Carcinoma. 4th edition. *Philadel.*, 1070-1228.
- Gurkan, C.A., Celik, M., Ugur, M., Arisan, E.D., Yerlikaya, O.P., Durdu, Z.B., Palavan Unsal, N. (2018). Curcumin inhibits autocrine growth hormone-mediated invasion and metastasis by targeting NF-kB signaling and polyamine metabolism in breast cancer cells. *Am., Acids.*, 50(8), 1045–1069.
- G. Villanueva, D., El-Sherbiny, İ.M., H. Ruiz, D., Smyth, H.D.C. (2013). Design and in vitro evaluation of a new nanomicroparticulate system for enhanced aqueous-phase solubility of curcumin. *Bio. Med. Res. Inter.*, 9, 724-763.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91(3), 14-22.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Res.*, 31(4), 261-272.
- Halliwell, B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease. *Encyc. Life Sci.*, 1–9.
- Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Asp. Medi.*, 8(2), 89-193.
- Han, X., Deng, S., Wang, N., Liu, Y., Yang, X. (2016). Inhibitory effects and molecular mechanisms of tetrahydrocurcumin against human breast cancer MCF-7 cells. *Food Nutr. Res.*, 60(1), 30616.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A. and Lowe, S.W. (2002). Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108(2), 153-164.
- Kang, J.H., Kang, H.S., Kim, I.K., Lee, H.Y., Ha, J.H., Yeo, C.D., Kang, H.H., Ay, H.S., Lee, S.H. (2015). Curcumin sensitizes human lung cancer cells to apoptosis and metastasis synergistically combined with carboplatin. *Exp. Bio. Med.*, 240(11), 1416–1425.

- Katarzyna Z.S., Sylwia P., Anna P., Konrad P., ĩrena, P., Monika K., Lilla P.S., Halina G. (2018). Serum and whole blood Zn, Cu and Mn profiles and their relation to redox status in lung cancer patients, *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, 45, 78-84.
- Kedar, N.P. (2004). Multiple dietary antioxidants enhance the efficacy of standard and experimental cancer therapies and decrease their toxicity. *Integr. Cancer Ther.*, 3(4), 310-322.
- Koca, N. ve Karadeniz, F. (2016). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 32-37.
- Kuhad, A., Pilkhwai, S., Sharma, S., Tirkey, N., Chopra, K. (2007). Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J. Agric. Food Chem.*, 55(25), 10150-10155.
- Kuo, P.L., Hsu, Y.L., Lin, T.C., Lin, C.C. (2005). The antiproliferative activity of prodelpinidin B-2 3'-O-gallate from green tea leaf is through cell cycle arrest and Fas-mediated apoptotic pathway in A549 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 43(2), 315-323.
- Kuruoğlu, A. (2017). *Karboplatinin etoposide dirençli A549 hücre hattında sitotoksik ve anti-metastatik özelliklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., N. Rees, W. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer*, 17(1), 62-70.
- Lima, C.F., F. Ferreira, M. and P. Wilson C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sci.*, 79(21), 2056-2068.
- Lin, J.C., Kuo, W.R., Chiang, F.Y., Hsiao, P.J., Lee, K.W., Wu, C.W., Juo, S.H. (2009). Glutathione peroxidase 3 gene polymorphisms and risk of differentiated thyroid cancer. *Surgery*, 145(3), 508-513.
- Lin, L., Shi, Q., Nyarko, A.K., Bastow, K.F., Wu, C.C., Su, C.Y. (2006). Antitumor agents. 250. Design and synthesis of new curcumin analogues as potential anti-prostate cancer agents. *J. Med. Chem.*, 49(13):3963-72.
- Liu, F., Gao, S., Yang, Y., Zhao, X., Fan, Y., Ma, W., Yang, D., Yang, A. and Yu, Y. (2017). Curcumin induced autophagy anticancer effects on human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncol. Lett.*, 14(3), 2775-2782.

- M. Erhola, M.M., Nieminen, P., K. Lehtinen, T., M. Keelä, T., Poussa, H.A. (1997). Plasma Peroxyl Radical Trapping Capacity in Lung Cancer Patients: A Case-Control Study. *Free Rad. Res.*, 26, 439-447.
- Malstrom, B., Andreasson, L. and Reinhammer, B. (1975). In The Enzymes. Boyer, P., editor. XIIB, *Aca. Press.*, 533.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.*, 32(8), 595-603.
- Mccord, J.M. and Fridovich I (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244(22), 6049-6055.
- Meydani, M. (2001). Antioxidants and cognitive function. *Nut. Rev.*, 59(8), 75-82.
- Miller, D.D. (1996). Minerals. In "Food Chemistry", O.R. Fennema. *Mar. Dek.*, 617-649.
- Mona C. and Kristen M.R. (2014). Considerations for payers in managing hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Clin. Eco. Out. Res.*, 6, 331-339.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunolog. Met.*, 65 (1–2), 55–63.
- Mostafa, I., Wally, M.S., Al Moundhri & Badreldin, H.A. (2011). Effect of curcumin on cisplatin- ve oxaliplatin-induced oxidative stress in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. *J. Real Fail.*, 33(5), 518-523.
- Mukhopadhyay, A., Banerjee, S., Stafford, L.J., Xia, C., Liu, M., Aggarwal, B.B. (2002). Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with downregulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene.*, 21(57), 8852–8861.
- Nagaraju, G.P., Aliya, S., Zafar, S.F., Basha, R., Diaz R., El-Rayes B.F. (2012). The impact of curcumin on breast cancer. *Integ. Biology.*, 4 (9), 996-1007.
- Nakazawa, H., Genka, C. and Fujishima M. (1996). Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn. J. Physiol.*, 46(1), 15-32.
- Nawar, W.W. (1996). Lipids in "Food Chemistry". 3rd ed. O.R. fennema. New York: *Mar. Dek.*, 225-319.
- Özbaşoğlu, K. (2013). *Akciğer Kanseri ve Akciğer Kanserinde Kullanılan Tümör Markırları*. Bitirme Tezi, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri.

- Özenoğlu, S., Aydoğdu, G., Dinçsoy, A.B., Taghizidaj, A.A., Derici, K., Yılmaz, E., Aras, S., C. Duman, D. (2013). Liken Sekonder Bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70 (4), 215-226.
- Pabla, N. and Dong, Z. (2008). Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective. *Kid. Int.*, 73, 994–1007.
- Pandya, U., Saini, M.K., Jin, G.F., Awasthi, S., Godley, B.F., Awasthi, Y.C. (2000). Dietary curcumin prevents ocular toxicity of naphthalene in rats. *Toxicol. Lett.*, 115(3),195-204.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.*, 333(1), 19-39.
- Perker, M.C., Yilmaz, B.O., Yıldızbayrak, N., Aydın, Y., Erkan, M. (2019). Protective effects of curcumin on biochemical and molecular changes in sodium arsenite-induced oxidative damage in embryonic fibroblast cells. *Bioch. Mol. Toxicol.*, 33(7), 22320.
- Pillai, G.R., Srivastava, A.S., Hassanein, T.I., Chauhan, D.P., Carrier, E. (2004). Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer Lett.*, 208(2), 163-170.
- Pinnell, S.R. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 48(1), 1-19.
- Revant, H.C., Ranjitkumar, N.P., Anjan, B., Kamlesh, P., Rahul, B. (2010). Estimation of serum malondialdehyde in oral cancer ve precancer ve its association with healthy individuals, gender, alcohol, and tobacco abuse. *J. Cancer Res. Ther.*, 6(4), 487-491.
- Robinson, L.A., Ruckdeschel, J.C., Wagner, H.J., Stevens, C.W. (2007). Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132(3), 243-265.
- Sahin, U., Unlu, M., Ozguner, M.F., Tahan, V., Akkaya, A. (2001). Lipid peroxidation ve erythrocyte superoxide dismutase activity in primary lung cancer. *Biomed. Res.*, 12,13-16.
- Sever, A., (2018). *Mcf-7 Hücrelerinde Oksidatif Hasara Karşı Sisplatin ile Kombinasyonda Resveratrolün Sinerjik Etkisi ve Oksidatif Stres İndeksi*, Yüksek

Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir.

- Spiro, S.G. and Porter, J.C. (2002). Lung Cancer-Where Are We Today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166(9), 1166-1196.
- Sreenivasan, S. and Krishnakumar, S. (2015). Synergistic effect of curcumin in combination with anticancer agents in human retinoblastoma cancer cell lines. *Curr. Eye. Res.*, 40(11), 1153-1165.
- Srimal, R.C. and Dhawan, B.N. (1973). Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *J. Pham. Pharmacol.*, 25(6), 447-452.
- Stewart, B.W. and Wild, C.P. (2014). World Cancer Report. WHO, Lyon, France. strategies. *Kid. Int.*, 13, 978-992.
- Subhagit, M., Ishani, M., Venkata, P., Reddy, B., Chverani, F., Sveip, M., Subarna, G., Urmi, C., Sankar, C.M. (2017). Effect of Pt (II) complexes on cancer and normal cells compared to clinically used anticancer drugs: Cell cycle analysis, apoptosis and DNA/BSA binding study. *J. Molecul. Liquids*, 247, 126-140.
- Syng, A. C., Kumari, A.L. and Khar, A. (2004). Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione ve bcl-2. *Molecul. Cancer Ther.*, 3(9), 1101-1108.
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Biochem.*, 27(3), 502 – 522.
- Tokaç, D.D., (2007). *Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Travis, D., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A., Nicholson, A. (2015). WHO classification of tumors, pathology ve genetics of tumours of the lung. *J. Thorac. Oncol.*,10(9), 1243-1260.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K., Yatabe, Y., Ishikawa, Y., Wistuba, I., Flieder, D.B., Franklin, W., Gazdar, A., Hasleton, P.S., Henderson, D.W., Kerr, K.M., Nakatani, Y., Petersen, I., Roggli, V., Thunnissen, E., Tsao, M. (2013). Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 137(5), 685-705.

- Unger, F.T., Klasen, H.A., Tchatchian, G., Wilde R.L., Witte, I. (2009). DNA damage induced by cis- and carboplatin as indicator for in vitro sensitivity of ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer*, 10(9), 359.
- Urso, M.L. and Clarkson, P.M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol.*, 189, 41-54.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MT., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem Cell Biol.*, 39(1), 44-84.
- Waly, M.I., Al Moundhri, M.S. and Ali, B.H. (2011). Effect of curcumin on cisplatin- and oxaliplatin-induced oxidative stress in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. *Ren. Fail.*, 33(5), 518-523.
- Wang, J.Y., Wang, X., Wang, X.J., Zheng, B.Z., Wang, Y., Wang, X., Liang, B. (2018). Curcumin inhibits the growth via Wnt/ β -catenin pathway in non-small-cell lung cancer cells. *Eur. Rev. Med. Pharm. Sci.*, 22(21), 7492-7499.
- Wang, X., Wang, Q., Ives, K.L., Evers, B.M. (2006). Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 12(18), 5346-5355.
- Wang, Y., Pan, M., Cheng, A., Lin, L., Ho, Y., Hsieh, C., Lin, J. (1996). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1867-1876.
- Warunyoupalin, R. (2007). Study on the complex formation between curcumin and metal ions by spectrophotometric method. *Cent. Euro. J. Chem.*, 7(3).
- Wells, P.G., McCallum, G.P., Chen, C.S., Henderson, J.T., Lee, C.J., Perstin, J., Preston, T.J., Wiley, M.J., Wong, A.W. (2009). Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol. Sci.*, 108(1), 4–18.
- Xia, Y.Q., Wei, X.Y., Li, W.L., Kanchana, K., Xu, C.C., Chen, D.H., Chou, P.H., Jin, R., Wu, J.Z., Liang, G. (2014). Curcumin analogue A501 induces G2/M arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15(16), 6893-6898.
- Xiao, C., Jigang, W., Zhongping, F., Bo, Z., Jie, W., Shengwen, G., Zichun, H. (2017). Curcumin activates DNA repair pathway in bone marrow to improve carboplatin-induced myelosuppression. *Sci. Rep.*, 11.

- Yagi, K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol. Biol.*, 108, 101-6.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., T. Barberán, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plants Food Hum. Nutr.*, 59(3), 113-122.
- Yener, N.A. ve Düşmez, A.D. (2017). “Histopathological ve molecular features of lung cancer.”, Trd Sem 2014; 2: 281-289, *Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi*, 27(2), 77-87.
- Yüksek, G.E. (2015). *Akciğer Adenokarsinomlarının, 2011 Uluslararası Akciğer Karsinomları Çalışma Grubu (Iaslc/Ats/Ers) ’nun Sınıflandırmasına Göre Yeniden Sınıflandırılması ve Olguların Gözden Geçirilmesi*. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mersin.
- Zangui, M., Atkin, S.L., Majeed, M., Sahebkar, A. (2019). Current evidence and future perspectives for kurkumin and its analogues as promising adjuncts to oxaliplatin: state-of-the-art. *Pharmacol. Res.*, 343-356.
- Zhang, B.Y., Shi, Y.Q., Chen, X., Dai, J., Jiang, Z.F., Li, N., Zhang, Z.B. (2013). Protective effect of curcumin against formaldehyde-induced genotoxicity in A549 Cell Lines. *J. Appl. Toxicol.*, 33(12),1468-1473.