

**SERVİKAL KANSERDE RESVERATROL'ÜN  
APOPTOZDAKİ ROLÜ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Selin DEĞİRMENCİ**

**Eskişehir 2022**

**SERVİKAL KANSERDE RESVERATROL'ÜN APOPTOZDAKİ ROLÜ**

**Selin DEĞİRMENCİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyokimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR**

**Eskişehir Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Eylül 2022**

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

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Selin Değirmenci'nin "Servikal Kanserde Resveratrol'ün Apoptozdaki Rolü" başlıklı tezi 22/09/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Filiz Özdemir	.....
Üye : Prof. Dr. Hülyam Gün KURT	.....
Üye : Doç. Dr. Behiye ŞENEL	.....

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

## ÖZET

### SERVİKAL KANSERDE RESVERATROL'ÜN APOPTOZDAKİ ROLÜ

Selin DEĞİRMENÇİ

Biyokimya Anabilim Dalı Anadolu Üniversitesi,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eylül 2022

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Kanser, normal genlerin mutasyona uğrayarak, işlevlerinin bozulması ya da tamamen kaybolması sonucu ortaya çıkan hastalık türlerinden biridir. Rahim ağzı kanseri, kadınlar arasında en sık görülen ikinci kanser türü olup kadın sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Kemoterapötik ajanlar, hücrelerin biyokimyasal süreçlerini değiştiren, doğrudan ya da dolaylı yollardan hücrenin çoğalmasını engelleyen ve tümör gelişimini baskılamak gibi belirtileri kontrol altına almak amacı ile kullanılan biyokimyasal bileşiklerdir. Cisplatin, rahim, meme, testis ve beyin kanseri gibi pek çok kanser türüne karşı sıklıkla uygulanan bir kemoterapötik ajandır. Doğal bir antioksidan olan Resveratrol (RSV) kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Birçok çalışma, doğal ürünler ve kemoterapi ajanlarının birlikte kullanımının kemoterapi ajanlarının duyarlılığını ve sitotoksitesini artırabileceğini de göstermiştir. Bu tez çalışması kapsamında, CDDP ve RSV'nin kombinasyon halinde kullanımının, HeLa servikal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri ele alınmıştır. CDDP ve RSV'nin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacı ile MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT sonuçları doğrultusunda CDDP ve RSV'nin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 30±12 µM ve 60±16 µM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen IC<sub>50</sub> değerlerinin yüzdeleri üzerinden kombinasyon 50 (KM50) (15 µM CDDP, 30 µM RSV) ve kombinasyon 40 (KM40) (12 µM CDDP, 24 µM RSV) olmak üzere CDDP ve RSV kombinasyonları oluşturulmuştur. CDDP, RSV ve kombinasyonların hücreler üzerindeki apoptotik etkileri, Annexin-V FITC/PI, kaspaz-9 yöntemleri ile belirlenmiştir. Annexin-V FITC ile çalışılan yöntemde, 60 µM RSV'nin HeLa hücresine uygulandığı grup, CDDP'ye ve kombinasyonlara göre daha yüksek oranda apoptoza neden olmuştur. HeLa hücrelerinde (%83,8) negatif kaspaz-9, (%16,0) pozitif kaspaz-9 aktivitesi gözlemlenmiştir. CDDP ve RSV ayrı ve kombine uygulamalarında pozitif kaspaz-9 yüzdelerinde düşme meydana gelmiştir. Sonuç olarak düşük doz CDDP ve RSV içeren KM50 ve KM40 kombinasyonları, apoptotik ölümü indükleyerek HeLa hücre büyümesini sinerjistik bir şekilde inhibe etmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Cisplatin, Resveratrol, HeLa, Apoptoz.

## ABSTRACT

### THE ROLE OF RESVERATROL IN CERVICAL CANCER IN APOPTOSIS

Selin DEĞİRMENÇİ

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, September 2022

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Cancer is one of the types of diseases that occur as a result of the normal genes being mutated and their functions impaired or completely lost. Cervical cancer is the second most common type of cancer among women and poses a great threat to women's health. Chemotherapeutic agents are biochemical compounds that change the biochemical processes of cells, prevent the proliferation of cells directly or indirectly, and are used to control symptoms such as suppressing tumor development. Cisplatin is a chemotherapeutic agent that is frequently applied against many types of cancer such as uterine, breast, testicular and brain cancer. Resveratrol (RSV), a natural antioxidant, is known to have antiproliferative and apoptotic effects on cancer cells. Many studies have also shown that the combined use of natural products and chemotherapy agents can increase the sensitivity and cytotoxicity of chemotherapy agents. In this thesis, the apoptotic effects of CDDP and RSV in combination on HeLa cervical cancer cells were discussed. MTT method was used to determine the cytotoxic effects of CDDP and RSV on HeLa cells. Based on the MTT results, the IC<sub>50</sub> values of CDDP and RSV were calculated as 30±12 µM and 60±16 µM, respectively. Combinations of CDDP and RSV were formed based on the percentages of the IC<sub>50</sub> values obtained, as combination 50 (KM50) (15 µM CDDP, 30 µM RSV) and combination 40 (KM40) (12 µM CDDP, 24 µM RSV). Apoptotic effects of CDDP, RSV and combinations on cells were determined by Annexin-V FITC/PI, caspase-9 methods. In the method studied with Annexin-V FITC, the group in which 60 µM RSV was applied to HeLa cell caused a higher rate of apoptosis than CDDP and combinations. Negative caspase-9 activity (83,8%) and positive caspase-9 activity (16,0%) were observed in HeLa cells. A decrease in the percentages of positive caspase-9 occurred in separate and combined treatments of CDDP and RSV. In conclusion, combinations of KM50 and KM40 containing low dose CDDP and RSV synergistically inhibited HeLa cell growth by inducing apoptotic death.

**Keywords:** Cisplatin, Resveratrol, HeLa, Apoptosis.

## **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.

.....

(İmza)

Selin DEĞİRMENCİ TİP

## TEŞEKKÜR

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

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

Yüksek lisans ders dönemim boyunca bilgilerinden faydalandığım sevgili hocalarım Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ, Doç. Dr. Halide Edip TEMEL'e ve Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e

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

Hem çalışmalarımda hem de hayatımda sonsuz desteği ile yanımda olup bana hep moral veren, bana güç veren sevgili Gülin Bilgenoğlu'na

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

Fatih Tip'e...

## İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Kanser.....	3
1.1.1. Kanserın Tanımlayıcı Özellikleri.....	4
1.1.1. Serviks Kanser .....	5
1.1.1.1. HeLa Hücre Hattı .....	5
1.2. Apoptoz.....	7
1.2.1. Apoptotik Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler.....	7
1.2.2. Apoptoz Mekanizması.....	8
1.2.2.1. Ekstrinsik Yolak.....	9
1.2.2.2. Perforin/ Granzim Yolağı.....	10
1.2.2.3. İntrensik Yolak .....	10
1.2.3. Kaspazlar .....	11
1.3. Serbest Radikaller .....	12
1.4. Antioksidanlar .....	13
1.4.1. Resveratrol.....	13

1.4.1.1. Resveratrolün Kimyasal yapısı.....	14
1.5. Cisplatin.....	15
2. GEREÇLER.....	16
2.1. Kullanılan Cihazlar .....	18
2.2. Kullanılan Laboratuvarlar ve Hücre Hattı.....	19
3. YÖNTEMLER .....	20
3.1. Hücre Kültürü Uygulamaları.....	20
3.1.1. Hücrelerin Stoktan Çıkarılması .....	20
3.1.2. Hücre Hatlarının Pasajlanması.....	20
3.2. Etken Madde Dozlarının Hazırlanması.....	20
3.2.1. Cisplatin .....	20
3.2.2. Resveratrol.....	20
3.3. Sitotoksik Testleri.....	21
3.3.1. Cisplatin ve Resveratrolün Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi .....	21
3.3.2. Kombinasyon Dozlarının Belirlenmesi ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması.....	21
3.4. Apoptozun Belirlenmesi .....	22
3.4.1. Annexin V-FITC/PI Yöntemi.....	22
3.4.1.1. Yöntemin Uygulanması.....	23
3.4.2. Kaspaz-9 Yöntemi.....	23
3.4.2.1. Yöntemin uygulanması .....	23
3.5 İstatistiksel Analiz.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Sitotoksik Bulguları .....	25
4.1.1. Cisplatin ve Resveratrolün Sitotoksik Etkileri .....	25
4.1.2. Kombinasyon indeksi bulguları.....	27
4.2. Apoptoz Bulguları.....	27

4.2.1. Annexin V-FITC/PI.....	28
4.2.2. Kaspaz9... ..	30
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	32
KAYNAKÇA .....	38
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLolar / ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

**Tablo 1.1.** Apoptozis ve Genler.....8

**Tablo 4.1.** Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların sitotoksisite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri.....26

**Tablo 4.2.** Akım sitometri cihazından alınan grafiklerde, hücrelerin alanlara göre dağılımı...28

**Tablo 4.3.** Akım sitometri cihazından alınan grafiklerde, hücrelerin alanlara göre dağılım yüzdeleri.....30

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1.1	Kanser hücrelerinin özellikleri.....	4
Şekil 1.2	HeLa hücrelerinin mikroskopik görünümü.....	6
Şekil 1.3	Hela hücrelerinin mikroskopik görünümü (100X) .....	6
Şekil 1.4	Apoptoz görülen bir hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler.....	8
Şekil 1.5	İç (mitokondri) ve Dış (ölüm reseptörü) Apoptotik Sinyal Yolları.....	11
Şekil 1.6.	Trans-resveratrol, cis-resveratrol ve piceit formüller.....	14
Şekil 1.7.	Resveratrol ve türevleri, piceatannol ve piceid'in kimyasal yapış.....	15
Şekil 4.1.	Cisplatin konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda HeLa hücre canlılığına etkisi.....	24
Şekil 4.2.	Resveratrol konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda HeLa hücre canlılığına etkisi.....	25
Şekil 4.3.	Cisplatin, Resveratrol ve kombinasyonların HeLa hücre hattında sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksileri ( $CI < 1$ (Sinerjistik), $CI = 1$ (Aditif), $CI > 1$ (Antagonist)).....	26
Şekil 4.4.	Cisplatin ve resveratrolün $IC_{50}$ dozunun ve [CDDP+RSV] kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik.....	27
Şekil 4.5.	Cisplatin ve resveratrolün $IC_{50}$ dozunun ve [CDDP+RSV] kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, HeLa hücreleri üzerindeki.....	29

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b><math>\Delta\psi_{mt}</math></b>	: Mitokondri membran potansiyeli
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	: Mikro molar
<b>AIF</b>	: Apoptoz uyarıcı faktör
<b>Apaf-1</b>	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
<b>Bcl-2</b>	: B hücreli lenfoma – 2
<b>Bcl-XL</b>	: B-hücreli Lenfoma
<b>BH</b>	: Bcl-2 homoloji bölgesi
<b>CAD</b>	: Kaspaz ile aktifleşen DNaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CDDP</b>	: Cisplatin
<b>CoQ10</b>	: Koenzim Q10
<b>cyt C</b>	: Sitokrom C
<b>c-FLIP</b>	: Hücresel FLICE inhibitörü protein
<b>dATP</b>	: Deoksiadenozin trifosfat
<b>DD</b>	: Ölüm bölgesi

<b>DED</b>	: Ölüm etkili bölge
<b>DISC</b>	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>DNA-PK</b>	: DNA bağımlı protein kinaz
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetra asetik asit
<b>FADD</b>	: Fas ilişkili ölüm bölgesi protein
<b>FASL</b>	: Fas ligandı
<b>FITC</b>	: Floresin izotiyosiyonat
<b>GR</b>	: Granzim
<b>GSH</b>	: Redükte glutatyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>IC<sub>50</sub></b>	: %50 inhibe eden konsantrasyon
<b>KM</b>	: Kombinasyon
<b>UV</b>	: Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

İnsanları fiziksel, sosyal ve psikolojik olarak etkileyen, bu tür faktörlerden dolayı yaşam kalitesini ciddi anlamda düşüren birçok hastalık bulunmaktadır. Bu hastalıkların başında kanser gelmektedir. Kanser en basit tanım itibari ile hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları olarak tanımlanabilir. Gün geçtikçe daha yaygın görülmesi var olan istatistiksel verilerle desteklenmektedir. Morbidite ve mortalite riskinin yüksek olması sebebiyle önemi gittikçe artan bir hastalık olmaya başlamıştır.

Kanser gelişimine sebep olan bazı etkenler bulunmaktadır; bunların başında, sigara dumanı ve katranında bulunan kimyasal ve karsinogenik ajanlar, ağır metaller, radyasyon, güneş ışığından gelen zararlı ultraviyole ışınlar olarak sıralanabilir. Ayrıca, günümüz şartları dolayısıyla antioksidan bakımından zengin gıdaların yeterince tüketilmemesi sonucu hücre savunma mekanizmalarının zayıflaması ve buna bağlı olarak hücre hasarının oluşumundan dolayı kanser gelişimi ön görülebilir hale gelebilir. Kanser, dünyamızda ve ülkemizde %22'lik görülme ile kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni haline gelmiş bulunmaktadır. 2000'li yılların başında dünyada 6 milyon insanın kanserle mücadele ettiği bildirilmiştir. Önümüzdeki yirmi yılda bu sayının 12 milyona ulaşacağı istatistiksel sonuçlara dayalı bir ön görülme söz konusudur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre 2030 yılında 24 milyon insanın kanser ile mücadele edeceği, 17 milyon insanın ise kanserden yaşamını kaybedeceği tahminler doğrultusundadır.

Servikal kanser (rahim ağzı kanseri), dünyada kadınlar arasında görülen en yaygın ikinci kanserdir. 2020 verilerine göre Dünya çapında 604.127 serviks kanser tanısı konulmuştur. Ülkemizde ise 2020 yılında 60.674 vaka sayısı bulunmaktadır. 2020 yılından 2040 yılına kadar tahmini yeni vaka sayısı 58.945 olması ön görülmektedir ([http-1](http://)). Serviks kanseri görülme sıklığı açısından Türk popülasyonunda onuncu sırada yer almaktadır (Gökçe, 2011). Servikal kanserin tedavisinde günümüzde kullanılan ilaçlar genellikle çok toksiktir ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu durum da kanser tedavisi sırasında hastaya zarar vererek hayatta kalma şansını azaltmaktadır. Bu nedenle güvenli, etkili ve düşük toksisiteye sahip antikanser ilacın belirlenmesi araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Qin vd., 2018).

Kanserin ölüm nedenleri arasında bu kadar üst sıralarda olması ve yaşam kalitesini en alt seviyelere taşınması sebebiyle birçok moleküler, genetik, biyokimya araştırma laboratuvarlarında araştırmacıların öncelikli hedefi bu hastalığa çözüm bulmak olmasıdır. Birçok kanserli hastada kesin çözüm bulmak için yoğun araştırmalar devam etmektedir. Fakat hastalığın seyrini düzeltebilmek, hastanın yaşam süresini uzatmak ve hayat kalitesini bir nebze arttırmak bile çok önemlidir. Bu nedenle araştırmacılar, tedaviye yönelik pek çok farklı çalışmalar yapmaktadır. Farklı maddeler kullanılarak kanser üzerindeki etkilerini yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. İnsan sağlığı, yaşam süresi ve yaşam kalitesini arttırmak için yapılan bu konudaki çalışmalar çok popüler hale gelmiştir. Kansere mücadelede kemoterapi haricinde cerrahi operasyon veya radyoterapi de tek başına ya da birlikte kullanılmaktadır. Klinikte, farklı antikanser ilaçlar tek başına veya kombine olarak hastalara uygulanmaktadır.

Resveratrol (*trans* -3,5,4'-trihidroksistilben), çeşitli bitkilerin yanı sıra özellikle asma tarafından sentezlenen bir stilben fitoaleksindir. Resveratrol üzüm ve kırmızı şarapta yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve antioksidan etkisi yapılan çalışmalar neticesinde iyi bir şekilde belirlenmiştir (Bosquesi vd., 2020). Resveratrol, insan sisteminde düşük bir toksisiteye sahip, geniş çapta çalışılmış bir stilben bileşiği olmasının yanı sıra, kanser ilerlemesi ile doğrudan bağlantılı birkaç yolu modüle ettiği de yapılan çalışmalar doğrultusunda belirlenmiştir. *In vitro* ve *in vivo* kanser çalışmaları sonucunda, resveratrolün proapoptotik özellikleri indüklemesi ve hücre proliferasyonu, anjiyogenezi inhibe ettiğini gösterilmiştir (Chatterjee ve Burns, 2018).

Cisplatin (*cis*-diamindikloroplatin II), yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ilaçtır. Germ hücreli tümörler, lenfomalar ve sarkomlar dahil olmak üzere çeşitli birçok kanser türlerine karşı etkili olduğu birtakım araştırmalar neticesinde belirlenmiştir. Cisplatinin etki şekli, DNA'daki pürin bazlarıyla çapraz bağlanması yeteneğiyle bağlantılıdır; DNA onarım mekanizmalarına müdahale etmesi, DNA hasarına neden olması ve ardından kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Ancak cisplatinin birçok istenmeyen yan etkileri bulunmaktadır. Bunlar, hastalarda böbrek sorunları, enfeksiyonlara karşı bağışıklığın azalması, kanama ve işitme kaybı gibi nedenlerdir. Bu tür yan etkilerden dolayı cisplatin diğer ilaçlarla kombine edilebilir ve kombinasyon tedavilerinin, ilaç direncinin üstesinden geldiği toksisiteyi azalttığı yapılan çalışmalar sonucunda büyük ölçüde kabul edilmiştir (Dasari ve Tchounwou, 2014).

Yukarıda bahsedilen bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışması kapsamında, resveratrolün tek başına ve servikal kanser tedavisinde kullanılan bir antikanser ilaç olan cisplatin ile kombine halde serviks kanser hücre (HeLa) hattındaki olası sitotoksik etkisinin 3-(4,5- *Dimetiltiyazol-2-il*)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve apoptotik veriler doğrultusunda değerlendirilmesi açısından Annexin V-FITC, Kaspaz-9 aktivitelerinin incelenmesi, hesaplanması ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 1.1.Kanser

Kanser kelimesi latince yengeç anlamında gelen “*carsinos*” ya da “*carsinoma*” kelimelerinden türetilmiştir. Tümör terimi ilk defa MÖ. 3yy’da bir tümörün etrafında oluşan şişmiş damarları yengecin bacağına benzettiği için Hipokrat tarafından kullanılmış ve Yunan bir doktor olan Galen ise şişme anlamına gelen “*oncos*” terimini kullanmıştır (Baykara, 2016).

“Kanser kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada ikinci en yaygın ölüm nedenidir. Kanser, hücrenin sağkalımını, poliferasyonunu ve farklılaşmasını yöneten kontrol mekanizmalarındaki kayıp ile tanımlanan bir hastalık türüdür (Chu ve Sartorelli, 2014)”. Canlıların temel yapı taşı hücrelerdir ve hücreler enzimler, hormonlar canlının ihtiyacına göre düzenli bir şekilde büyür, çoğalır, yaşlanır akabinde ölürlür. Çeşitli etkenlere maruz kalmış hücreler düzensiz ve kontrolsüz bir şekilde devamlı olarak büyürler, çoğalırlar ve ölmezler (Topal vd., 2009).

Kanser hücrelerinin hepsi, DNA dizisinin anormallikleri ile oluşmaktadır. Kanser hastalığının %10 ila %15’inin, kalıtsal olduğu ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan yüzdeler ise canlı hücrelerdeki DNA’nın mutajenlere maruz kalması, hücre DNA’sındaki progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması şeklinde bildirilmiştir (Yokuş ve Çakır, 2012). Kanser hücreleri bir araya gelerek tümörleri oluştururlar ve oluşan tümörler herhangi bir nedenden dolayı ayrılırsa, kan ve lenf dolaşımı ile vücudun diğer bölgelerine taşınabilirler.

### 1.1.1. Kanserin Tanımlayıcı Özellikleri

Kanserin normal hücelere göre farklılıkları;

- Hücre yüzeyindeki reseptörler normal hücelere göre daha sık sinyaller alırlar.
- Kendi sinyal sistemleri olduğu için kontrolsüz bir biçimde çoğalırlar.
- Sürekli olarak bölünme ve çoğalmaya devam edebilirler.
- Warburg etkisi adı verilen bir mekanizmaya sahiptir. Şöyle ki; sağlıklı ve normal hüceler her tipte besinleri kullanabilirken kanser hüceleri glukozdan gelen glukozu kullanabilirler. Normal hücelere oranla şekeri 100 kat daha fazla kandan alırlar ve laktat üreterek enerji sağlarlar.
- Yeni damar sistemleri oluşturarak, gerekli besin ve oksijeni almak için çevredeki stromayı etkilerler.
- Telomeraz aktivitesini koruyarak veya telomerlerini sabitleyerek sonsuz replike olup çoğalabilirler.
- Dolaşım sisteminin içine girip bir başka yere hareket edebilirler ve böylece yeni bir yere yerleşerek orada kanserleşmeyi başlatabilirler (Metastaz).
- Apoptoza uğramazlar.
- Genetik ve epigenetik olarak stabil halde değildirler (Baykara, 2016).



Şekil 1.1. Kanser hücelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).

### 1.1.2. Serviks Kanseri

Rahim ağzı kanseri, gelişmekte olan ülkelerde kanser insidansında yer almaktadır ve dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (Jiang, vd., 2022). GLOBOCAN 2020'nin tahmini verilerine göre ~604.127 rahim ağzı kanseri vaka sayısı bildirilirken ~341.831 ölüm gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Bahsedilen bu tahmini verilerin akabinde 2040 yılında tahmini veri vaka sayısı ~847.306 ve tahmini yeni ölüm sayısı ~524.214 olarak bildirilmiştir(http-1). Rahim ağzı kanserinin ortalama görülme yaşı 52 olarak bildirilmiş olup, 35-39 ve 60-64 yaş aralığında görülme sıklığı zaman geçtikçe artmaktadır (Gökçe, 2011). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından yapılan araştırmalardaki verilere göre, 50 yıl sonra kansere bağlı ölümlerin ikiye katlanacağı beklenmektedir (Moga vd., 2016).

Serviks kanseri, jinekolojik neoplazi olup ölümcüldür ve kadınları üreme çağında etkilemektedir (Kamzol vd., 2012). Serviks kanserin en önemli risk faktörleri *human papillomovirus* (HPV), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve son olarak klamidya enfeksiyonları, kötü ve yetersiz beslenme, çok fazla sayıda gebelik durumu, sigara ve ailesel genetik öyküsü olarak bildirilmiştir (Koç vd., 2013).

İnsan papilloma virüsü (HPV) cinsel yolla bulaşan yaygın bir enfeksiyon türüdür ve serviks kanserinin birincil nedeni olarak tanımlanmıştır. İnsan papilloma virüsü (HPV) vulva, serviks, vajina, penis ve anüs bölgelerinde kalıcı olarak enfeksiyona ve akabinde kansere neden olmaktadır (Şenol, 2019). HPV, parvovirüs ailesindedir ve çift sarmallı zarfsız bir DNA virüsüdür. İnsan papilloma virüsünün 200'den fazla tipi vardır fakat HPV tip 16 ve 18 serviks kanserin yaklaşık olarak %70 ila %80'nini oluşturmaktadır (Martel, vd., 2017).

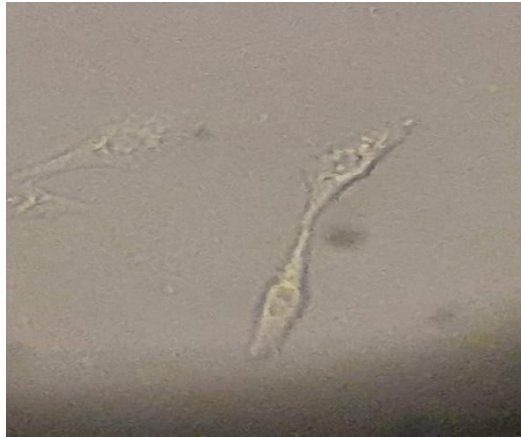
#### 1.1.1.1. HeLa Hücre Hattı

HeLa hücre hattı, 1951 yılında genç bir Afro-Amerikalı hasta olan Henrietta Lacks'den alınan ve ailenin izni olmadan kullanılan rahim ağzı kanseri hücrelerinden kurulmuştur (Gilgenkrantz, 2014). Henrietta Lacks 1951 yılında serviksin agresif adenokarsinomundan ölmüştür. Henrietta Lacks'ın ölümünden 20 yıl sonra, HeLa hücrelerinin diğer hücre dizilimlerini kontamine ettiği ve aşırı büyüme gösterdiği bildirilmiştir (Akçalı, 2010). HeLa hücrelerinin ölümsüz olduğu Henrietta Lacks'ın

ölümünden 20 yıl sonra anlaşılmıştır. Stanley Gartley Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC) 1966 yılında, 20 insan hücresinin içinden 18 tane hücrenin kromozomal ve biyokimyasal olarak HeLa hücreleri ile tamamen aynı olduğu belirlenmiştir. ATCC kayıtlarına göre Afro-Amerikalı'larda gözlemlenen A tipi glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesi göstermektedir ve saklama aşamasında HeLa hücreleri diğer hücreler ile kontaminasyona uğradığını bildirmişlerdir. Bu bilgi verileri ışığında Nature dergisi tarafından 1968 yılında yayınlanmıştır (Akçalı, 2010). Hela hücreleri epitel karakterli bir morfoloji göstermektedir ( Gilgenkrantz, 2014).



**Şekil 1.2.** *HeLa hücrelerinin mikroskopik görünümü*



**Şekil 1.3.** *Hela hücresinin mikroskopik görünümü (100X)*

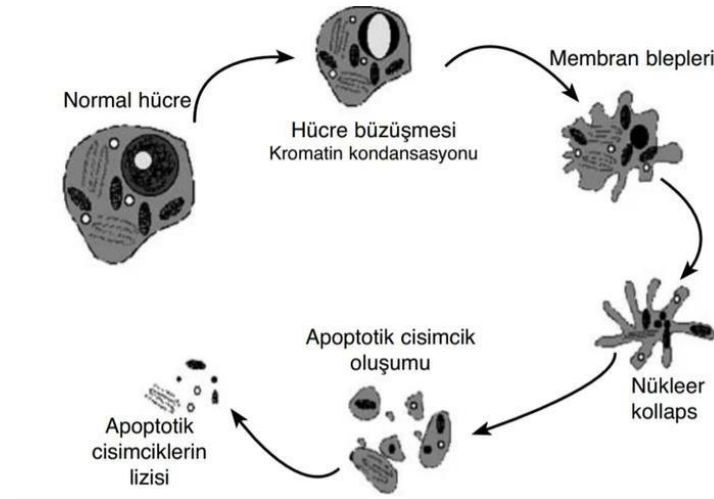
## 1.2. Apoptoz

İlk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 de tanımlanmıştır. DNA'sı hasar görmüş, biyolojik olarak görevini tamamlamış, yapısal elemanları zarar görmüş dokulara ve hücrelere zarar vermeyecek biçimde ortadan kaldırılmasını gerçekleştiren ve genler aracılığı ile kontrol altında tutulan, gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyulan programlı bir hücre ölümüdür (Dinçel ve Kul 2016). Canlının kendi otonom mekanizması tarafından düzenlenen; yaşlanmış, zarar görmüş ve istenmeyen hücrelerin iz bırakmadan ortadan kaldırılması yani öldürülmesi "apoptoz" olarak tanımlanır (Kaya, 2012).

"Apoptozis, Yunanca'da "ağaç yapraklarının dökülmesi" anlamına gelmektedir. İlk kez 1972 yılında Kerr tarafından "mitozun karşıt anlamı" olarak tanımlanmıştır (Kerr, 2014)". Embriyonik dönemden başlayarak yaşam boyunca immun sistem, gastrointestinal ve deri gibi birçok sistem mitoz hücre ölümü ve apoptozis arasındaki mükemmel bir denge ile sağlanmaktadır. Organ büyüklükleri açısından incelendiğinde karaciğerin büyüklüğü sürekli olarak sabit haldedir. Bu söz konusu denge apoptozis ve mitoz arasındaki hassas bir ilişki ile sağlanmaktadır (Dinçel ve Kul, 2016).

### 1.2.1. Apoptotik Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler

Hücrede, apoptoz sinyali aldıktan sonra bir takım biyokimyasal ve morfolojik değişimler gözlenmektedir. Öncelikle hücre küçülmeye başlar ve hücre iskeleti dağılıp çekirdek zarı erir, çekirdek DNA'sı ise parçalara ayrılır (Güleş ve Eren, 2008). Tüm süreçlerin sonunda hücre çok sayıda ve farklı boyutlarda apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptoz sonucunda meydana gelen bu cisimler makrofajlar ya da parankimal hücreler aracılığı ile fagositoza uğrayarak ya da epitel yüzeylerden dökülerek vücuttan uzaklaştırılır (Bkz. Şekil 1.4.). Son basamak olarak, fagositozu gerçekleştiren hücrenin lizozomu tarafından apoptotik cisimciklerle birlikte çekirdek ve sitoplazma kalıntıları otoliz ile sindirilir (İrgit, 2021).



Şekil 1.4. Apoptoz görülen bir hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler (İrgit, 2021)

### 1.2.2. Apoptoz Mekanizması

Apoptozis hazır olan hücrelerde primer olarak başlatabilirler ya da sekonder olarak gelişebilirler. Hücre dışı uyaranlar olarak; Tümör Nekroz Faktör (TNF), nöron büyüme faktörü (NGF) insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) IL-2 gibi maddelerin ortam şartlarında azalması, glukokortikoidler, radyasyonlar, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli bir yere sahiptirler. Fas/FasL sFas proteinleri, virüslerde hücreyi apoptozise götürür. Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen birçok gen bulunmaktadır (bkz. Tablo 1.1). Hücre içi uyaranlar ise; sitokinler, kalsiyum miktarında artış tümör nekroz faktör, P53'ün aktive olması, viral bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve antijenlerin yer aldığı bildirilmiştir (Kaya, vd., 2012).

Tablo 1.1. Apoptozis ve Genler (Akşit ve Bildik 2008)

Apoptozisi Baskılayan Genler	Apoptozisi İndükleyen Genler
<ul style="list-style-type: none"> <li>Bcl-2 grubundan;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bcl-2 grubundan;</li> </ul>
BHRL-1, Bcl-x1, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, mcl-, A1	Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk 1
<ul style="list-style-type: none"> <li>c-abl geni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>c-myc</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras onkogeni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>p53, p21</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Çözünebilir fas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>fas (CD95/AP01)</li> </ul>
	EADD/MORT, RIP, FAST
<ul style="list-style-type: none"> <li>p35</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>interlökin dönüştürücü enziö benzeri proteinler (İCE)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>A20</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LOH (MTS1/CDK41)</li> </ul>

Apoptoz mekanizmaları oldukça kompleks ve enerji bağımlı moleküler kaskadlarla ilişkilidir. Apoptoz üç farklı yolakla gerçekleşmektedir. Bunlar ekstrinsik, perforin/granzim ve intrinsik yolaklardır. Yolaklar birbirleri ile ilişkilidir ve bir yolaktaki molekül diğer bir yolağı da etkilemektedir.

Kaspazlar apoptozu ve inflamasyonu kontrol eden sistein proteaz enzimlerdir. Kaspazlar apoptozu hem başlatıp hem de durdurabilirler (Rahmanian vd., 2016). Kaspaz-2,8,9,10 başlatıcı, kaspaz-3,6 ve 7 sonlandırıcı kaspazlardır (Pistritto vd., 2016). Kaspazlar normalde inaktiftirler ama apoptoz ve inflamasyon durumlarında dimerize olarak aktif forma geçerek apoptozu başlatırlar (Shalini vd., 2015). Ekstrinsik yolaktaki başlatıcı kaspazlar, prokaspaz 8 ve 10, intrinsik yolaktaki başlatıcı kaspaz ise prokaspaz-9'dur. Kaspaz-8 hem ekstrinsik hem de intrinsik yolağı aktive edebilmektedir (Madencioğlu, 2020). Apoptoz esnasında, kaspazlar spesifik substratları parçalarlar ve akabinde hücre büzüşmesi, kromotinlerin yoğunlaşması DNA fragmantasyonu ve plazma membran kabarması gibi biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin birçoğuna aracılık ederler. Bu tür nedenlerden dolayı, aktive edilmiş kaspazların tespiti birçok hücre tipinde çeşitli uyarılar tarafından apoptoz için önemli bir biyobelirteç olarak kullanılır (Coşkun ve Özgür, 2011).

### **1.2.2.1. Ekstrinsik Yolak**

Ekstrinsik yolakta apoptoz hücre dışı ve hücresele seviyede oluşan çeşitli sinyallerle tetiklenebilir (Grell vd., 1994). Ekstrinsik yolak, ölüm reseptörü olarak da bilinmektedir. Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılığı ile başlamaktadır. Bahsedilen ölüm reseptörleri tümör nekroz faktör (TNFR) süper ailesine ait homotrimer yapıda transmembran proteinlerdir (Johnson vd., 2015). Bu ölüm reseptörleri, TNFR1-TNF  $\alpha$ , FAS, FasL, TRAILR1(DR-4)-TRAIL, TRAILRR (DR-5)-TRAIL'dir. Bahsi geçen ölüm reseptörleri kendisine uygun ligantı stimüle ederler (Pistritto, vd., 2016). En fazla bilinen ligantlar arasında FasL/FasR, TNF $\alpha$  TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2/DR4 ve Apo2/DR5 ligandlarıdır (Elmore, 2007). Reseptörler ligantın stimüle olmasıyla birlikte oligomerizasyon ve konformasyonel değişikliğe uğrarlar ve akabinde sitoplazmik ölüm domaini oluştururlar. Oluşan ölüm domaini sonraki aşamada ölüm domaini içeren proteinlerle etkileşime geçer (Madencioğlu, 2020). Prokaspaz-8'e bağlanan ölüm proteini ile ligantlar ölüm indükleyici sinyalizasyon kompleksini oluştururlar (Pistritto vd., 2016). Apoptozun son basamağı kaspaz-8'in aktive olmasıyla gerçekleşir (Elmore, 2007).

Ekstrinsik hücre ölüm mekanizmasında en iyi olan reseptörler Fas reseptörü ve TNF reseptörü-1'dir. TNFR-1 Fas sitozolik ölüm kısmı (death domain) bulunduran TNF reseptör ailesine dahildir. TRAIL, TNF ailesinin bir diğer üyesidir ve hücrede DR4 ve DR5 reseptörlerine bağlanırlar. Bu reseptörlere bağlanması sonucunda FasL'ye benzer şekilde apoptoz mekanizmasının hızlı bir şekilde yürütülmesinde rol alırlar (Yıldırım vd., 2012).

### **1.2.2.2.Perforin/ Granzim Yolağı**

T-hücre aracılı sitotoksikite ve perforin-granzim bağımlı ölümünün gerçekleştiği apoptotik yoldur. T- hücre ekstrinsik yolak öncülüğünde tetikleyiciler (Elmore, 2007).

Perforin-granzim yolağı granzim A ya da granzim B ile apoptozu indükleyebilir. Granzim A yolu tek iplikli olan DNA hasarı aracılığı ile paralel olan, kaspaz bağımlı hücre ölüm yolunu tetikler ve aktive eder (Ersöz vd., 2012). Granzim B yolağı, kaspaz-3'ün parçalanması ile başlar. DNA'nın fragmentasyonunu, çekirdek proteini ve hücre iskeletinin parçalanması, apoptotik yapı oluşumu, protein çapraz bağlanması, fagositik hücreler tarafından yutulma basamaklarını içerir (Martinalet vd., 2005). Granzim A apoptozisi uyaran ve kaspaz bağımsız yolu aktive eden T hücrelerinde de önemlidir. Granzim A aktivasyonu DNAaz NM23-H1 vasıtasıyla DNA nicking'i aktive ettiğinde bir tümör süpresör gen üretilir (Fan vd., 2003). Endoplazmik retikulum ilişkili (SET) proteinler, NM23-H1 genini inhibe eder. SET kompleksini granzim A proteaz parçalar ve akabinde NM23-H1 'in inhibasyonunu serbest bırakır. Bu durumda apoptotik olan DNA parçalanmasına yol açar (Ersöz, 2012).

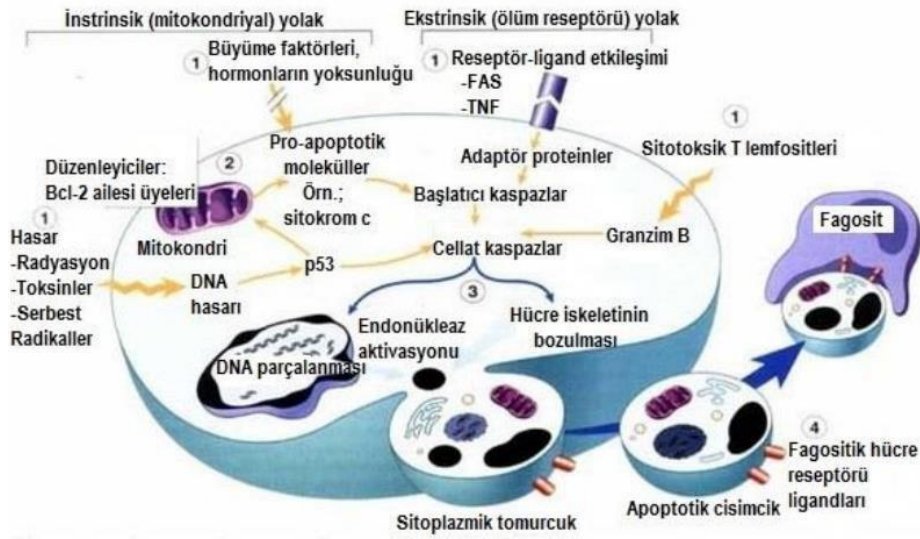
### **1.2.2.3. İntersik Yolak**

Doğrudan hücre içi reseptörlere etkisi olan ve reseptörlerden bağımsız olarak uyarıların farklı bir düzenini içerir. İntersik ya da mitokondriyal yol olarak da adlandırılır (Ersöz, 2012). İntersik yolak DNA hasarı, ER stresin ve gelişimsel ipuçları gibi çeşitli hücrel streslere yanıt olarak aktive edilir (Silke vd., 2013).

İntersik yolda en önemli rol oynayan proteinler; Bcl-2 proteinleridir. Bcl-2 ailesi proapoptotik hem de antiapoptotik fonksiyonlara sahiptirler. Bahsedilen Bcl-2 ailesi

proteinleri mitokondriyal yolak için düzenleyici proteinlerdir ve en önemlisi, etkileşimleri hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceğini belirler ( Gökhan vd., 2020).

Bcl-2 proteinleri en az bir adet Bcl-2 homoloji (BH-1,2,3 ve 4) bölgelerine sahiptirler. Görevlerine göre; apoptoz inhibitörleri (Bcl-2, BclXL, Bcl-W, MCI-1, Bcl-B ve A1) apoptoz uyarıcı olarak (Bak, Bax, Bok ve Bcl-XS) sadece BH-3 bölgesine sahip olarak apoptoz düzenleyici (Bad, Bid, Bik, HrK, Bim, Bmf, Noxa ve puma) toplam 12 ana gruptan oluşmaktadır (Burz vd., 2009). Bu bahsedilen proteinler, mitokondri dış membranda Bax ve Bak proteinlerinin dimerleşerek por yapısını oluşturmasını engellerler ve apoptoz inhibisyonu sağlanır. Apoptozu düzenleme görevi olan Bcl-2 proteinleri inhibitör proteinleri olan Bax ve Bak ile etkileşimi engellerler (Burz vd., 2009).



Şekil 1.5. İç (mitokondri) ve Dış (ölüm reseptörü) Apoptotik Sinyal Yolları (Kumar, 2005)

### 1.2.3. Kaspazlar

Kaspazlar, spesifik bir sistein proteaz ailesidir ve apoptotik hücre ölümü programı hücrenin yok edilmesi için kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır (Silke vd., 2013). Kaspazlar apoptoz sırasında aktive olan ve hücreyi içeriden sökmeyi devam eden zimojenler (inaktif öncü enzimler) olarak ifade edilir (Creogh vd., 2003). Kaspaz gen ailesi iki ana alt gruptan oluşmaktadır. Bunlar; inflamatuvar kaspazlar ve apoptotik kaspazlardır. Apoptotik kaspazlarda kendi içlerinde başlatıcı ve uyarıcı kaspazlar olarak iki alt gruba ayrılırlar. Kaspazlar hücrelerin kaderinin belirlenmesi, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, hücresel çoğalma ve farklılaşma için apoptotik sinyallerin uyarılması ve iletilmesinde merkezi rol oynayan kaspaz-kaskad sistemi oluştururlar. Oluşturulan bu kaspaz-kaskad sisteminin aktivasyonu ve işlevleri, apoptoz proteini (IAP), FLICE, kapoin  $Ca^{+2}$  inhibitörü gibi düzenleyici moleküller tarafından düzenlenir (Chowdhury vd., 2008).

Kaspaz-9 aktivasyonu, bölünme yerine dimerizasyon ile uyarılır. Kaspaz-9'un apoptozom içerisindeki dimerizasyonu büyük ve küçük alt birimleri birbirine bağlama işlevinden bağlayıcı döngüsünün hareket ettiği ve bölünme meydana gelmeden aktif bölgeye yerleştiği bildirilmiştir. Kaspaz-9'un dimerizasyonu kaspaz-9'u (P35/P12) üreterek hızlı otokatalitik bir bölünmeye yol açmaktadır (Balkan vd., 2017). Kaspaz-9 yaşam boyunca onarılmaz hücrelerin, proliferatif hastalıkları inhibe etmek için vazgeçilmez bir yoldur. Kaspaz-9 gelişme aşamasında erken apoptotik evreye götürerek hücreleri ortadan kaldırır (Murray vd., 2008).

### 1.3.Serbest Radikaller

Dış yörüngesinde çift oluşturmamış bir elektron bulunan reaktif bileşiklere serbest radikaller denir. Vücutta indirgeyici ve yükseltgeyici olarak davranabilirler. Çünkü diğer moleküllerden elektron alabilirler ya da elektron verebilirler (Valko vd., 2007). Serbest radikaller reaktif oldukları gibi kısa ömürlüdürler. Normal bir metabolizmanın devamı olarak ya da hücrede enerji üretimi için gerekli olan bir dizi reaksiyon tarafından üretilmektedirler (Bylund vd., 2010). Serbest radikaller üç şekilde meydana gelir. Bunlar; kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak olan elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi, normal molekülün elektron kaybına uğraması, normal olan bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi olarak bildirilmiştir (Valko vd., 2007).

Meydana gelen radikaller membran lipitlerine, nükleik asitlere ve proteinlere etki ederek bu makromoleküllerin yapılarını ve fonksiyonlarını değişikliğe uğratırlar ve akabinde hücrel hasarlar meydana gelir (Özcan vd., 2015).

Serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklar tarafından meydana gelmektedirler. Oksijen molekülünün kısmi indirgenmesinden reaktif oksijen türleri (ROS) olan hidroksil (OH•) radikali ve süperoksit iyonu (O<sup>2</sup>) oluşmaktadır. ROS hücrel işlemlerin yan ürünü olarak üretilmektedir (Carocho vd., 2013). Başlıca reaktif oksijen türleri süperoksit radikali (O<sup>•-2</sup>), hidroksil radikali (OH•) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) olarak bildirilmiştir. Hidrojen peroksit prooksidan olup bahsedilen ilk iki reaktif oksijen türü ise serbest radikaldir (Özcan vd., 2015).

#### **1.4. Antioksidanlar**

Reaktif oksijen türlerinin oluşmasını engellemek, ROS'un meydana getirdiği hasarları önlemek amacıyla hücrede detoksifikasyonu sağlamak için vücutta görev yapan savunma sistemlerine "antioksidan" adı verilir (Çiftçi, 2017). Hücre içinde üretilen antioksidanlar yani endojenler, farklı bölgelere farklı etki mekanizmalarıyla serbest radikalleri kontrol altına alır. Endojen antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), redükte glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR)'dir (Ezer, 2019).

Serbest radikalleri yok etme yeteneğine sahip antioksidanlar birincil derecedeki antioksidanlardır. Toplayıcı, baskılayıcı, zincir kırıcı ve onarıcı etkisi olan ikincil antioksidanlar serbest radikal oluşumunu engellemektedir. İkincil olan antioksidanlar oksidan radikalini yakalayıp radikal zincir reaksiyonlarını kıran vitamin C, vitamin E, hemoglobin, seruloplazmin, albümin, bilirubin, ürik asit ve polifenol gibi bileşikler olarak bildirilmiştir (Altan, Dinçel ve Koca, 2006).

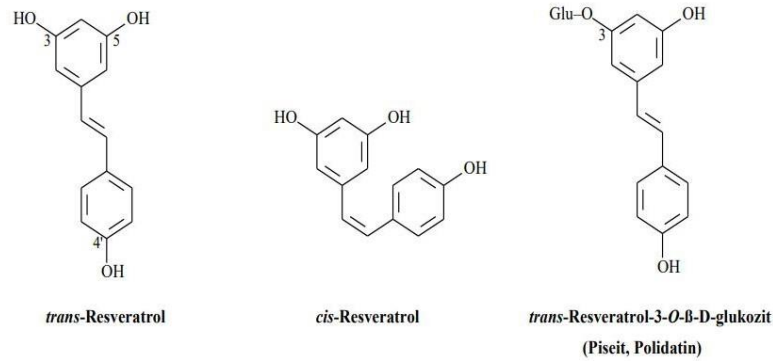
##### **1.4.1. Resveratrol**

Resveratrol doğal olarak oluşan bir bileşiktir ve kanser dahil birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisi için birçok araştırma yapıp çalışılmıştır. Fareler üzerinde deri kanseri modelinde 1997'de yapılan bir çalışmada topikal olarak uygulanan resveratrolün fareleri tümör oluşumundan koruduğunu gösterilmiştir.

Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan çalışmalarda bilim insanları yaşamı uzatan ilaç olarak bildirdikten sonra resveratrolün popülerliği iyice artmıştır. Yapılan bu çalışmalar neticesinde resveratrolün farklı organ ve dokularda etkili olduğu bildirilmiştir. Akabinde resveratrol etkilerinin araştırılmasıyla; antikanser aktivite gösterdiği, yaşamı uzatma etkisi, kalbi koruyucu etkisi, platelet agregasyonunu inhibe edici etki, antiinflamatuvar aktivitesi, damar gevşetici etkisi ve antioksidan etkisi olduğu ortaya konulmuştur (Ergin ve Yaylalı, 2013). Resveratrolün, antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı ve akabinde gen ekspresyonlarını değiştirerek hücreleri oksidatif stresten koruduğu bildirilmiştir. Tüm bu etkilerinin haricinde idrarla protein atılımını, oksidatif stresi ve böbrek fonksiyon bozukluklarında iyileştirici etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca resveratrol, kemorezistans mekanizmalarını aşarak çok sayıda dirençli kanser hücrelerini anti kanser ilaçlara karşı duyarlı hale getirdiği yapılan birçok çalışmada ortaya konulmuştur (Almatroodi vd., 2022).

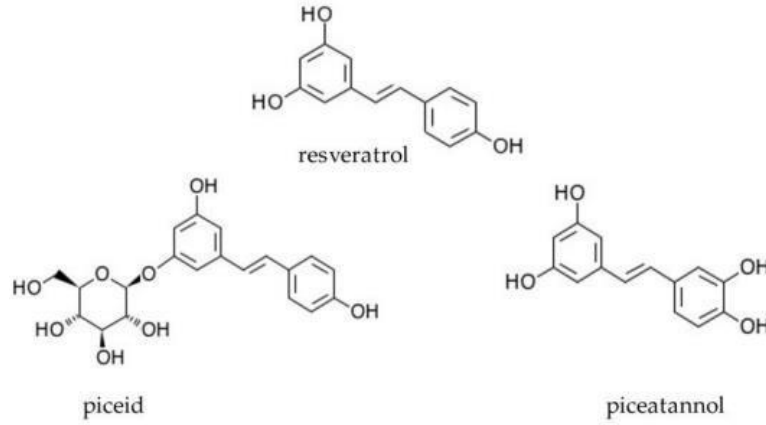
#### 1.4.1.1. Resveratrolün Kimyasal yapısı

Resveratrol kimyasal yapı olarak trans-3,5,4'-trihidroksi stilben yapıda olup birbirine etilen köprüsü ile bağlanmış iki fenolik halkadan oluşmaktadır. Resveratrol etanol ile çözünebilir bir özelliğe sahiptir (Dybkowski vd., 2018). Resveratrolün iki geometrik izomeri bulunmaktadır. Bunlar, trans- ve cis- izomerleridir. (Bkz. Şekil 1.6) Bahsedilen bu iki izomer birbirine benzerlik gösterirler fakat ; trans- çoğunluk olarak üzümde bulunur cis- ise kırmızı şarap da daha yoğun olarak gözlemlenmektedir (Yeung vd., 2019).



Şekil 1.6. *Trans-resveratrol, cis-resveratrol ve piseit formülü (Gündoğdu vd., 2021)*

Resveratrolün majör formu olarak bilinen glikozit trans-resveratrol-3-O- $\beta$ -D glikozittir. Resveratrolün bahsedilen bu formu “piceid” veya “piceatannol” olarak da adlandırılır (Gupta vd., 2014) (Bkz. Şekil1.7).



Şekil 1.7. Resveratrol ve türevleri, piceatannol ve piceid'in kimyasal yapısı (Komorowska vd., 2021)

*In vitro* ve *in vivo* ortamlarda yapılmış olan çalışmalarda, resveratrolün anti-kanser etkisi, hücre döngüsü ve apoptoz yolları ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Resveratrol apoptotik etkisini; aktivatör protein 1 (AP-1), survivin ve siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibisyonu ve bununla beraber p53 yolağının aktivasyonu gibi etkileri neticesinde gerçekleştirilmektedir. Resveratrol, p53, FoxO ve AFT3 gibi kanserin başlatılmasında rol oynayan transkripsiyon ve büyüme faktörlerinin etkisini bastırarak kanserin ilerlemesini önlediği bildirilmiştir. Resveratrolün; kolon, meme, akciğer, karaciğer, kolorektal kanser dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerini etki ettiği ve kanser türlerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Kim vd., 2003; Fulda ve Debatin, 2006; Madencioğlu, 2020; Özdemir vd., 2021).

## 1.5.Cisplatin

Cisplatin ilk defa 1970 yılında *Escherichia coli*'nin büyüme inhibitörü olarak keşfedilmiştir. Daha sonraki yıllarda antikanser etkisi farkedilerek testis, serviks, baş ve boyun gibi birçok kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Çetintaş ve Eroğlu, 2013).

Cisplatin veya *cis-dimmedichlorplatinum(II)*, iyi bilinen kemoterapötik bir ilaçtır. Karsinomlar, germ hücreli tümörler, lenfomalar ve sarkomlar olmak üzere birçok kanser türlerine karşı etkilidir (Dasari ve Tchounwou, 2014). Cisplatin, DNA'ya zarar veren bir anti kanser ilacıdır ve hücre DNA ile reaksiyona girerek iki işlevli etkiler oluşturmaktadır. Cisplatin iki klorür gruptan birini sulandırır ve DNA'ya kovalent olarak bağlanır, daha sonra DNA eklentileri oluşturarak hücre içerisinde aktive olur (Sever, 2018). Cisplatin düşük klorür konsantrasyonu ile hidrolize olmaktadır. Bu elektrofilik olan hidrolize cisplatin, nükleik asitlerin azot verici bölgeleri, proteinlerin sülfidril grupları gibi nükleofilik olan moleküller ile etkileşime girmektedir ve bu etkileşimler sonucunda hücre oldukça hasara uğramaktadır (Galluzzi vd., 2012).

Cisplatin birçok kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak duyarlı tümörlerin çoğu tedavi başlangıçlarından sonra kazanılmış bir direnç göstermektedir. Cisplatin direncinin gelişmesine neden olabilecek bazı faktörler; hücrede ilaç birikimi azalması, sülfür içeren bazı bileşiklerin inaktivasyonu, apoptozda görevli olan proteinlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler olarak bildirilmiştir (Çetintaş ve Eroğlu, 2013).

Cisplatin, pürinlerin N7 reaktif merkezine bağlanarak DNA'da sarmal içinde ve sarmallar arası çapraz bağlar oluşturur ve akabinde sitotoksik etkisini göstermektedir. Oluşan DNA hasarı hücre döngüsünü G2 ve S fazında durdurmakta ve nükleotit eksizyon onarımı (NER) ve yanlış eşleşme onarımı (MMR) gibi tamir mekanizmalarının devreye sokulmasını tetiklemektedir. Eğer ki; DNA onarılmayacak kadar hasarlı bir halde ise p53, Fas, Chk2 proteinlerinin aktivasyonu sağlamak ve sonrasında hücre apoptoz mekanizmasının aktivasyonu ile ölmektedir (Galluzzi vd., 2012).

## 2. GEREÇLER

Resveratrol (Sigma-Aldrich – ABD); Cis-diaminplatinyum (II) diklorid (cisplatin) (Sigma-Aldrich – ABD); Anneksin V-Floresanizotiyosiyanat (FITC)/Propidyum İyodür (Becton Dickenson - ABD); Dimetilsülfoksit (DMSO) (Applichem - Almanya); Disodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck - Almanya); Etil alkol (Necm Kimya - Türkiye); Fetal sığır serumu (FBS) (Biochrom - Almanya); Sodyum pirüvat (Thermo Fisher Scientific- ABD); MTT [(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] (Applichem - Almanya); Penisilin- streptomisin solüsyonu (Thermo Fisher Scientific – ABD); Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck - Almanya); Sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Merck - Almanya); Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck - Almanya); Sodyum klorür (NaCl) (Detsan - Türkiye); Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich –ABD).

### 2.1.Kullanılan Cihazlar

Akım sitometri cihazı (Becton Dickinson FACS Aria I Cell Sorter – ABD), sıvı azot tankı (Taylor Wharton - Almanya); buzdolabı (Arçelik - Türkiye); derin dondurucu (-20°C) (Arçelik No Frost-Türkiye); ultra düşük sıcaklıklı dondurucu (Eppendorf U410 – Almanya); karbondioksitli ( $\text{CO}_2$ 'li) etüv (Thermo Fisher Scientific Hera Cell 240 – ABD); distile su cihazı (Nüve ND12 - Türkiye); Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntem (ELISA) okuyucu (BioTek ELx800 - US); UV-Vis spektrometre (Shimadzu UV-160A - 25 Japonya); etüv (Nüve FN500 - Türkiye); floresan mikroskop (Leica DMI 4000B - Almanya); hassas terazi (Ohaus AV264C - İsviçre); inverted mikroskop (Leica DM IL LED - Almanya); laminar kabin (Steril Kabin) (Thermo Fisher Scientific Heracell 150i – ABD); otoklav (ALP CL32L - Japonya); santrifüj (Thermo Fisher Scientific Heraeus Megafuge 1.0R – ABD); sterilizatör (Nüve FN 500-Türkiye); su banyosu (Nüve BM 302 - Türkiye); vorteks (IKA Yellowline TTS2 - Çin); manyetik karıştırıcı (Sigma Aldrich Heidolph 3001 – ABD); çalkalayıcı (Biometra WT 17 – Almanya).

## **2.2.Kullanılan Laboratuvarlar ve Hücre Hattı**

HeLa hücre hattı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD'dan temin edilmiştir. Tezin deneysel aşaması Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmış olup, akış sitometri çalışmaları Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarın da gerçekleştirilmiştir.

### **3. YÖNTEMLER**

#### **3.1. Hücre Kültürü Uygulamaları**

HeLa hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren MEM besiyerinde, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 37°C'de büyütülmüştür.

##### **3.1.1.1.Hücrelerin Stoktan Çıkartılması**

Sıvı azot tankından çıkarılan hücrelerin hızlıca çözünmesi sağlanıp santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 1300 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısım (süpernatant) uzaklaştırılıp hücre çöktelleri (pellet) besiyer ile süspanse edilerek uygun görülen flasklara ekimi yapılmıştır. Süspansiyon 1:3 oranında 10 mL besiyeri içeren flasklara %5 CO<sub>2</sub> ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 37 °C'de büyümeleri ve çoğalmaları sağlanmıştır.

##### **3.1.1.2.Hücre Hatlarının Pasajlanması**

Hücreler flask yüzeyini %75 -80 kapladıktan sonra besi ortamı ortamdaki uzaklaştırılıp, hücreler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 2 kere yıkanmıştır. 1x tripsin-EDTA ortamına eklenerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Flask yüzeyinden kalkan hücreler 10000 µL besi yeri kullanılarak santrifüj tüplerine aktarılıp 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant dökülerek hücre çöktelleri tekrar besi yerinde süspanse edilmiştir.

##### **3.1.2.Etken Madde Dozlarının Hazırlanması**

###### **3.1.2.1.Cisplatin**

0,5 molar derişime sahip olan ana stok, toz halde bulunan cisplatinden 6,001 mg tartılıp 100 µL DMSO'da çözülerek oluşturulmuştur. Ana stok -20°C'de muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılan cisplatin dozları, 0,02 ve 0,002 M derişimli ara stoklar kullanılarak, DMSO'nun %0,2'lik toksik dozu göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır.

### **3.1.2.2.Resveratrol**

0,5 M derişime sahip olan ana stok, toz halde bulunan resveratrol'den 11,40 mg tartılıp 100 µL DMSO'da çözümlenerek oluşturulmuştur. Ana stok -20°C'de muhafaza edilmiştir. Deneşlerde kullanılan resveratrol dozları, 0,05 ve 0,005 M derişimli ara stoklar kullanılarak, DMSO'nun %0,2'lik toksik dozu göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır.

### **3.3. Sitotoksik Testleri**

#### **3.3.1.1.Cisplatin ve Resveratrolün Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi**

Maddelerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi kullanılmıştır. MTT yöntemi ucuz, hızlı ve uygulanmasının kolay oluşu sebebiyle, hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. Yöntemin aslı, normal şartlar altında sarı renge sahip olan MTT'nin, hücre içerisinde bulunan oksidoredüktaz enzimleri tarafından indirgenerek suda çözülmeyen, mor renkli formazan tuzuna dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır.

##### **3.3.1.1.1. MTT Yönteminin Uygulanması**

Flasklarda uygun yoğunluğa ulaşan hücreler, her bir kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından cisplatin (CDDP) için (100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 10 µM) ve resveratrol (RSV) için oluşturulmuş olan 10 adet konsantrasyon (150, 120, 100, 90, 85, 75, 50, 30, 10 µM) 6 tekrar olacak şekilde kuyucuklara eklenmiş ve plakalar 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından her kuyucuğa 5 mg/mL derişime sahip 20 µL MTT boyası karanlık ortamda eklenerek kuyucuklar 3 saat etüvde bekletilmiştir. 3 saatin ardından besiyeri ve MTT boyası kuyucuklardan tamamen çekilip, her bir kuyucuğa formazan kristallerinin çözülmesini sağlamak amacıyla 150 µL DMSO eklenmiş ve plakalar 15 dakika boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. Çalkalayıcıdan alınan plakaların, ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.1.2.Kombinasyon Dozlarının Belirlenmesi ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması**

Cisplatin ve resveratrolün IC<sub>50</sub> dozlarının aynı yüzdeleri (%100, 75, 50, 40, 30, 20, 10) kullanılarak dokuz adet kombinasyon oluşturulmuştur.

Örneğin denklem 3.1'de gösterildiği gibi % değerleri kullanılarak;

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

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

### **3.3.1.3. Kombinasyon indeksinin belirlenmesi**

İlaç kombinasyonlarında araştırılması gereken önemli bir konu da ilaçların etkileşimlerinin belirlenmesidir. Bu amaçla, CompuSyn programında Chou-Talalay metodu ile kombinasyon indeksi (CI) hesaplanmıştır. Bu hesaplama sonucu ilaçların sinerjistik (CI1) etkiye sahip oldukları belirlenebilmektedir (Chou, 2010).

## **3.4. Apoptozun Belirlenmesi**

### **3.4.1.1. Annexin V-FITC/PI Yöntemi**

Apoptozun erken safhalarında hücre membranında çeşitli değişiklikler gerçekleşmektedir. Normal hücrede, hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde yer alan ve zar lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunur. Fosfatidilserin (PS) çift katmanlı hücre zarının iç tarafına konumlanmış olarak bulunur ve apoptoz kaskadını başlattıktan sonra gözlemlenen ilk değişim, fosfatidilserin (PS)'nin, zarın dış tarafına yer değiştirmesidir. Bu yer değiştirme, hücre zarı bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken aşamalarında meydana gelir (Güleş ve Eren, 2008). Annexin V ise; Ca<sup>2+</sup> varlığında dış zara çıkmış olan PS'ler ile bağlanabilen bir proteindir. Annexin V proteini, floresan bir madde olan floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. Nekrotik hücrelerin yüzeyinde Annexin V bağlanması görülebildiğinden ikinci bir boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenmektedir (Güleş ve Eren, 2008).

Propidyum iyodür (PI) kırmızı renge sahip floresan bir boyadır. PI, sağlıklı hücrelerin membranlarına geçemez fakat geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin dış ve çekirdek zarlarından geçerek DNA'ya bağlanabilirler (Koopman vd., 1994).

Canlı olarak kabul edilen hücreler FITC Annexin V ve PI negatiftir; erken apoptozda olan hücreler FITC Annexin V pozitif ve PI negatif; geç apoptozda olan veya zaten ölü olan hücreler hem FITC Annexin V hem de PI pozitifdir.

Annexin V-FITC, bir popülasyondaki aktif olarak apoptoz geçiren hücrelerin yüzdesini nicel olarak belirlemede kullanılır. Apoptozun erken evrelerinde hücrelerin membran asimetrisini kaybetme özelliğine dayanır. Annexin V-FITC hem de PI için pozitif boyanan ya apoptozun son aşamasıdır, nekroz geçirmemiştir ya da zaten ölüdür.

#### **3.4.1.1. Yöntemin Uygulanması**

HeLa hücreleri, her kuyucukta  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilerek CDDP, RSV ve bu iki maddenin kombinasyonları kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyonu sağlanmıştır. 24 saatin sonunda hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkanıp ardından 1x tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. Kalkan hücreler 1 mL besi ortamı kullanılarak tüplere aktarılmış ve 5 dakika boyunca 1400 rpm'de santrifüj edilmiştir. Kit içeriğinden çıkan ve 10X derişime sahip olan bağlanma tamponu (Binding Buffer), dH<sub>2</sub>O kullanılarak 1X'lik derişime getirilmiştir. Santrifüjün ardından tüplerdeki süpernatant dökülmüş ve her bir tüpe 100 µL bağlanma tamponu eklenip pipetlenmiştir. Hiç boya eklenmeyen negatif kontrol grubu dışında her tüpe 5 µL FITC-Annexin V ve 5 µL PI boyası eklenmiş ve tüpler karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. 15 dakikanın ardından tüplere 400 µL daha bağlanma tamponu eklenerek akım sitometri cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir.

#### **3.4.1.2. Kaspaz-9 Yöntemi**

Kaspaz-9 aktif maddeyi tespit etmek için tüm reaktifleri içerir. Kaspaz-9, memeli hücrelerinde yüksek duyarlılığa sahiptir.

Floresin (FITC)-LEHD-FMK spesifik bir inhibitörü saptamak için kullanılır. Bu reaktif hücre geçirgendir, toksik değildir ve hücreye geri dönüşümsüz olarak bağlanır.

Kaspazlar, bir dizi bölünmeye aracılık eden aspartata özgü sistein proteazların bir ailesini oluşturur. Aktif olamayan proenzim oligomerize reseptöre alınması kaspaz aktivasyonuna yol açar. Bu aktif enzimler daha sonra diğer kaspazları parçalayabilir ve böylece kaspaz üretilebilir.

#### **3.4.1.2.1. Yöntemin uygulanması**

Negatif kontrol için işlem görmemiş bir numune hazırlanır. Negatif kontrol, 1µL/mL'de Z-VAD-FMK inhibitörü kullanılarak hazırlanır. HeLa hücreleri, her kuyucukta  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saatin ardından kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilerek CDDP, RSV ve bu iki maddenin kombinasyonları kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyonu sağlanmıştır. 24 saatin sonunda hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkayıp ardından 1x tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. Kalkan hücreler 1 mL besi ortamı kullanılarak tüplere aktarılmış ve 5 dakika boyunca 1400 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yaklaşık  $1.10^6$  ml konsantrasyonda flow tüplerine hücreler ekilir ve 300µL medium konulur. Her tüpe 1µL FITCH-LEHD-FMK eklenir ve %5 CO<sub>2</sub> ve 37 ° C'lik bir inhibitörde 30-60 dk inkübe edilir. Hücreler 3000 rpm'de 5 dk santrifüjden sonra süpernatant atılır. Pelette kalan hücrelerin üzerine 0,5 Ml yıkama tamponu eklenir. Bu işlemler bir kez daha tekrarlandıktan sonra 1 saat buzda bekletilip BD Accuri cihazında ölçüm yapılmıştır.

### **3.5. İstatistiksel Analiz**

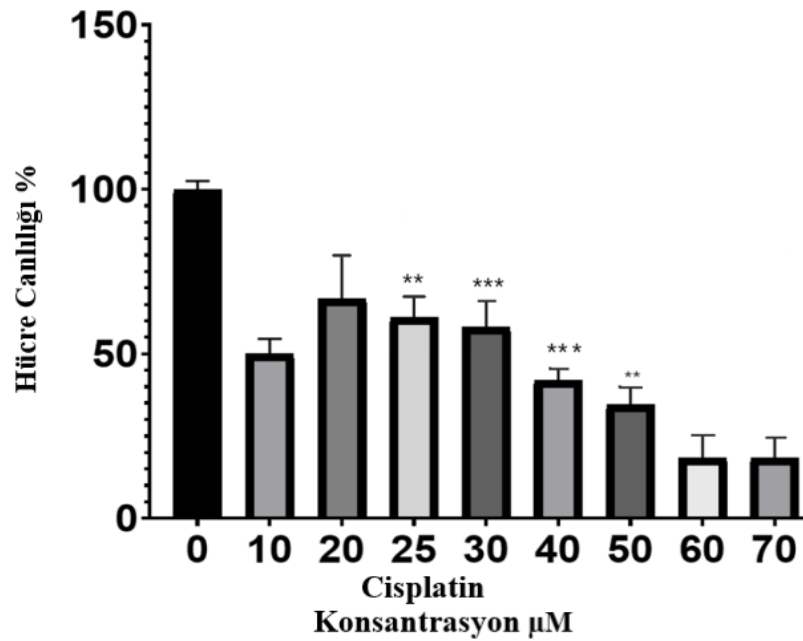
MTT deneylerinde her bir grup için dört kuyucuk kullanılmış ve deneyler 3 kere tekrarlanmıştır. Deney sonuçları, kontrol gruplarının canlılık değerleri %100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Hesaplanan değerlerin istatistiksel yönden anlamlılıkları, GraphPad Prism 9 programı kullanılarak tek yönlü varyans (one-way ANOVA) analizi ile gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksosite Bulguları

#### 4.1.1. Cisplatin ve Resveratrolün Sitotoksik Etkileri

CDDP ve RSV'nin 24 saatte HeLa hücre canlılığına etkileri belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1, 4.2). Elde edilen veriler ile maddelerin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 30±12 µM ve 60±16 µM olarak hesaplanmıştır.

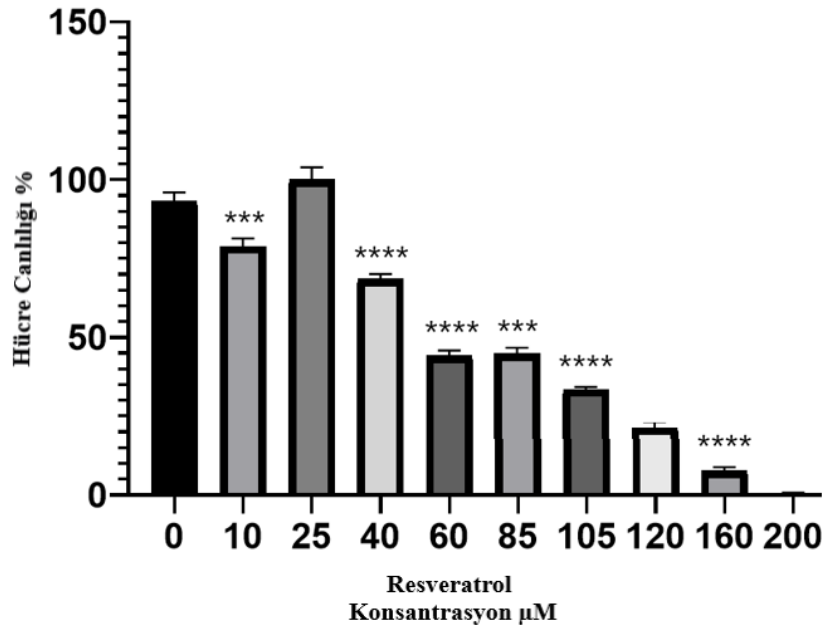


**Şekil 4.1.** Cisplatin konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda HeLa hücre canlılığına etkisi (kontrolle göre; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ).

MTT deneyi sonucunda, cisplatinin HeLa hücreleri üzerine uygulanmasından sonra IC<sub>50</sub> değeri 30 µM olup canlılık oranı %50,12 'dir.

MTT deneyi sonrasında ölçülen absorbans değerleri Graphpad Prism 9 programında ONE ANOVA yöntemi ile tekrarlı karşılaştırma ile analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri;  $p > 0,05$  fark yok,  $p < 0,05$ \* fark var,  $p < 0,01$ \*\* önemli derecede fark var,  $p < 0,001$ \*\*\*,  $p < 0,001$ \*\*\*\*olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.1'de istatistiksel değerlendirme sonuçları verilmiştir.

Cisplatinin, 20  $\mu\text{M}$  dozu haricinde uygulanan tüm dozları 24 saat inkübasyon sonrasında HeLa hücre canlılığında istatistiksel olarak önemli bir azalışa neden olmuştur (Şekil 4.1.). 10, 25, 30, 40, 50, 60, 70  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında HeLa hücre canlılığı sırasıyla %47,63, %66,14, %60,89, %50,12, %41,7, %36,14, %17,18, %22,09 olarak bulunmuştur. Bu % canlılık oranlarındaki konsantrasyona bağlı azalış maddesiz kontrol hücre canlılık oranına göre 25  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,01$ , 30  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,001$ , 40  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,001$ , 50  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,01$ , istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.1).



**Şekil 4.2.** Resveratrol konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda HeLa hücre canlılığına etkisi (kontrolle göre; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ )

MTT deneyi sonucunda, resveratrolün HeLa hücreleri üzerine uygulanmasından sonra  $\text{IC}_{50}$  değeri 60  $\mu\text{M}$  olup canlılık oranı %49,92'dir.

Resveratrolün HeLa hücreleri üzerinde yaptığımız çalışmada, 25  $\mu\text{M}$  dozu haricinde uygulanan tüm dozları 24 saat inkübasyon sonrasında HeLa hücre canlılığında istatistiksel olarak önemli bir azalışa neden olmuştur. (Şekil 4.2.). 10, 25, 40, 60, 85, 105, 120, 160, 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında HeLa hücre canlılığı sırasıyla %72,84, %98,02, %63,74, %49,92, %51,09, %32,16, %23,58, %12,02, %2,19 olarak bulunmuştur. Bu % canlılık oranlarındaki konsantrasyona bağlı azalış maddesiz kontrol hücre canlılık oranına 10  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,001$ , 40  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,0001$ , 60  $\mu\text{M}$   $p < 0,001$  85  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,001$ , 105  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,0001$  160;  $p < 0,0001$ , istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

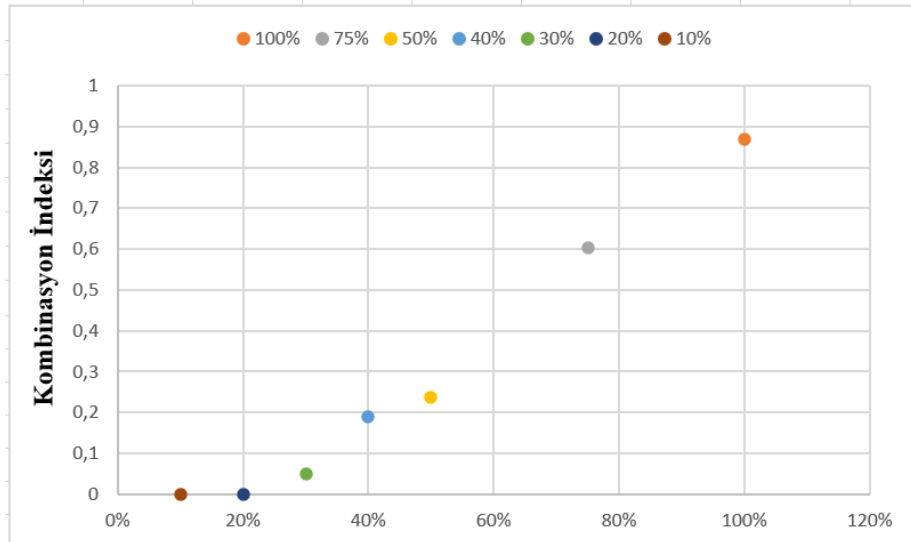
#### 4.1.2. Kombinasyon indeksi bulguları

CDDP, RSV ve bu iki maddenin kombinasyonlarının sitotoksosite verilerine dayanarak, kombinasyon indeksi hesaplanmıştır ve bunun için CompuSyn programı kullanılmıştır.

HeLa hücre hattındaki kombinasyonların apoptoz üzerine etkilerinin belirlenmesi için %40 (KM40), %50'lik (KM50) ve %100 canlılık gösteren (30  $\mu$ M CDDP + 60  $\mu$ M RSV) kombinasyonları deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir (Tablo 4.4; Şekil 4.3)

**Tablo 4.1.** Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri.

IC <sub>50</sub> Yüzdesi	CDDP	RSV	CI
%100	30	60	0,86892
%75	22,5	45,0	0,60316
%50	15,0	30,0	0,23682
%40	12,0	24,0	0,18945
%30	9,0	18,0	0,05026
%20	6,0	12,0	0,03351
%10	3,0	6,0	0,00973

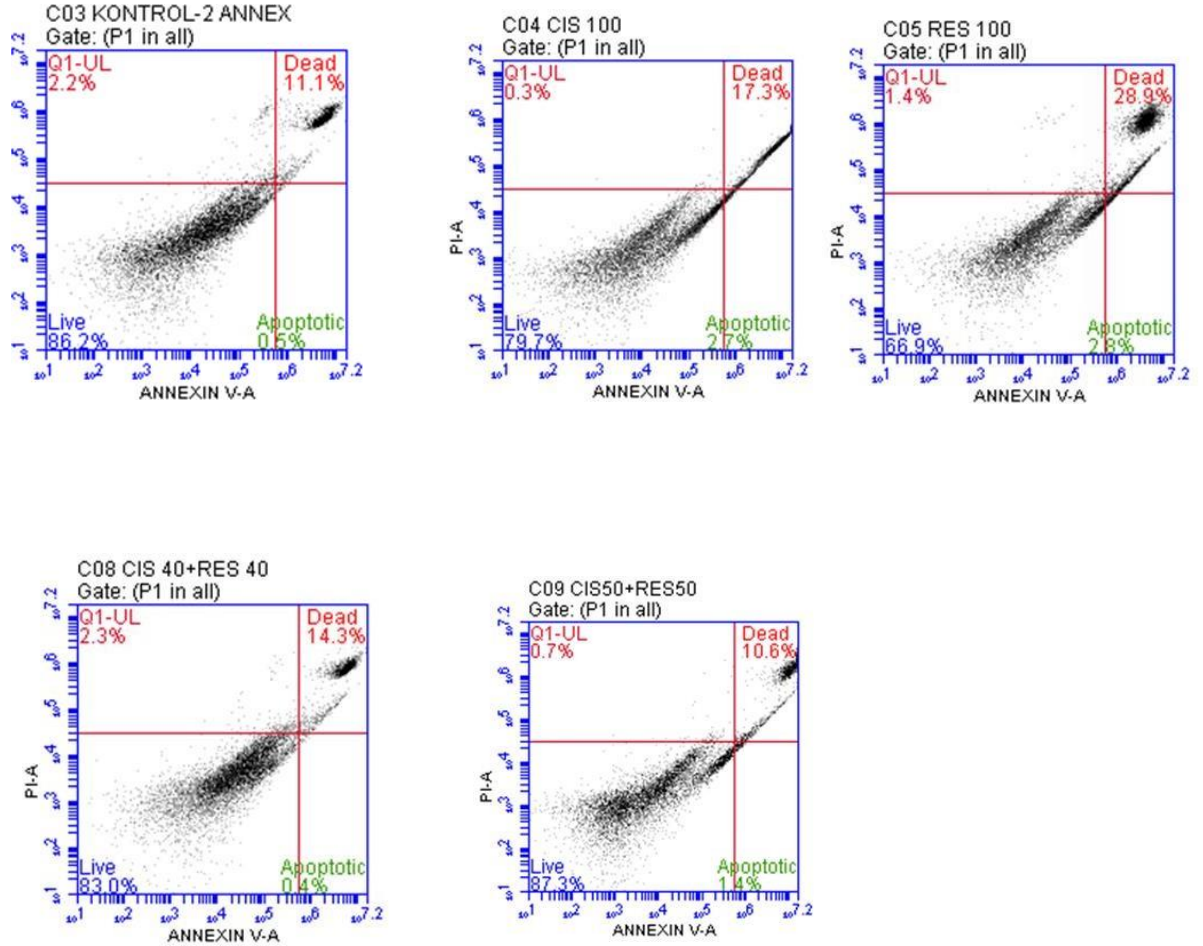


**Şekil 4.3.** Cisplatin, Resveratrol ve kombinasyonların HeLa hücre hattında sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri (CI<1 (Sinerjist), CI=1 (Aditif), CI>1 (Antagonist))

#### 4.2. Apoptoz Bulguları

#### 4.2.1. Annexin V-FITC/PI

Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri, akış sitometri cihazı ile belirlenmiştir.



**Şekil 4.4.** Cisplatin ve resveratrolün IC<sub>50</sub> dozunun ve [CDDP+RSV] kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri (Kontrol grubu, CDDP IC<sub>50</sub> dozu [30 µM], RSV IC<sub>50</sub> dozu [60 µM], KM50 kombinasyon dozu [15 µM CDDP + 30 µM RSV], KM40 kombinasyon dozu [12 µM CDDP + 24 µM RSV])

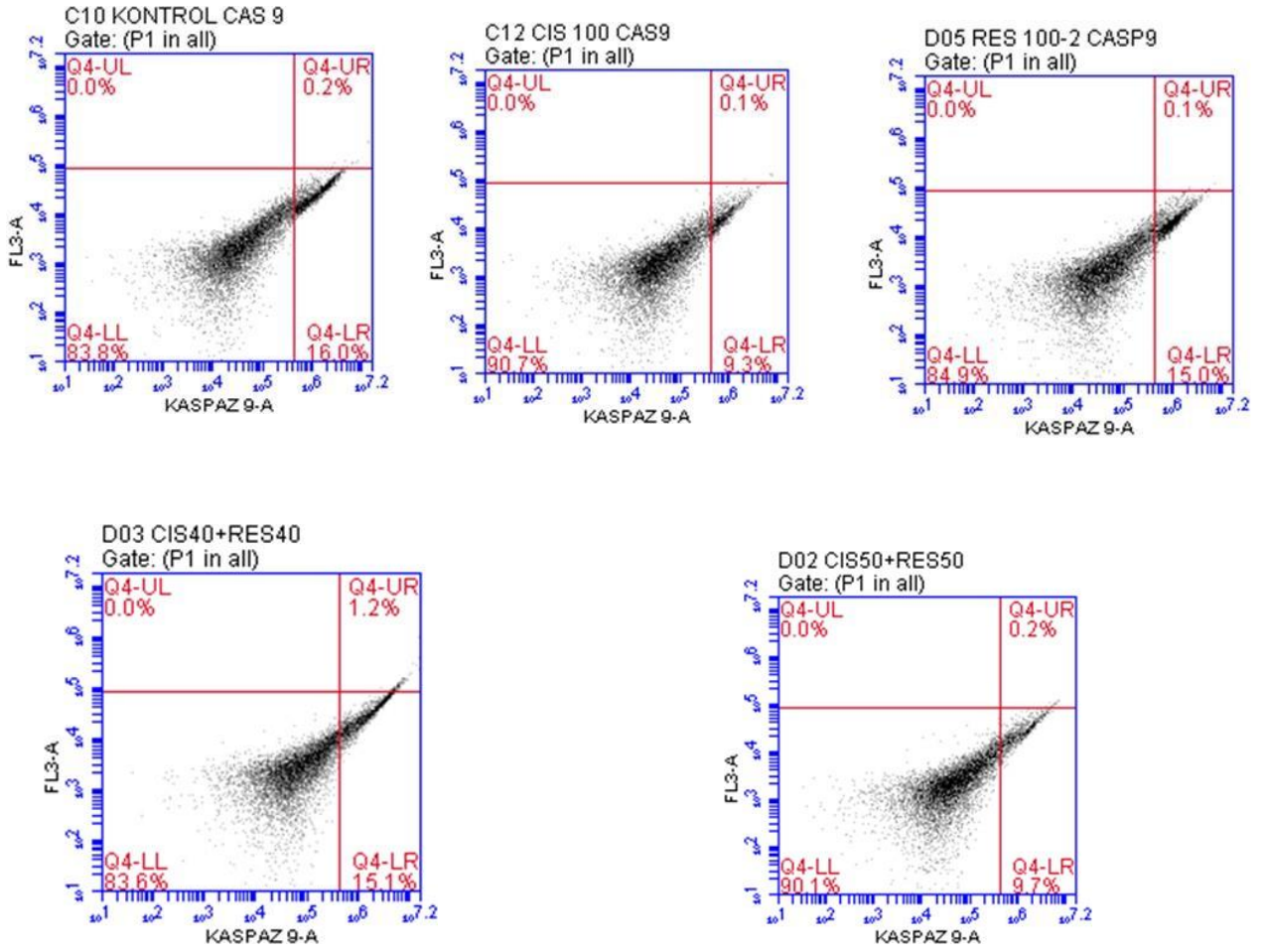
**Tablo 4.2.** Akım sitometri cihazından alınan grafiklerde, hücrelerin alanlara göre dağılımı (canlı (Annexin-V  $\pi$ PI, Q3), erken apoptoz (Annexin-V + /PI, Q4), geç apoptoz (Annexin-V + /PI+, Q4) ve nekrotik (Annexin-V  $\pi$ PI+, Q1)).

Gruplar	Q1	Q2	Q3	Q4
KONTROL	% 2,2	% 11,1	%86,2	%0,5
CİSPLATİN (30 $\mu$ M)	%0,3	% 17,3	%79,7	%2,7
RESVERATROL (60 $\mu$ M)	%1,4	%28,9	%66,9	%2,8
CİS-RSV (12 $\mu$ M- 24 $\mu$ M)	%2,3	% 14,3	%83,0	%0,4
CİS-RSV (15 $\mu$ M-30 $\mu$ M)	%0,7	% 10,6	%87,3	%1,4

HeLa hücre hattı üzerinde tek başına ve CDDP ve RSV kombinasyonlarının apoptotik etkilerinin kantitatif tespiti için analizler akış sitometrisi kullanılarak yapıldı. Analizde canlı apoptotik ve nekrotik hücreleri tanımlamak için PI ve Annexin V-FITC kullanıldı. Kontrol grubu olarak hiçbir muamele görmemiş HeLa hücreleri kullanıldı. 24 saat sonra 30  $\mu$ M CDDP, 60  $\mu$ M RSV ve Kombinasyon 50 (15  $\mu$ M CDDP+30  $\mu$ M RSV), Kombinasyon 40 (12  $\mu$ M CDDP+ 24  $\mu$ M RSV) kombine grupları analiz edildi. Erken apoptoz kontrol grubunda %0,5, 30  $\mu$ M CDDP grubunda %2,7, 60  $\mu$ M RSV grubunda %2,8, Kombinasyon 40 (12  $\mu$ M CDDP+ 24  $\mu$ M RSV) %0,4, Kombinasyon 50 (15  $\mu$ M CDDP + 30  $\mu$ M RSV) %1,4. Bu dozlarda geç apoptoz sırasıyla; %11,1, %17,3, %28,9, %14,3 ve %10,6'dır (Bkz. Şekil 4.3).ve Kombinasyon 50 (15  $\mu$ M CDDP + 30  $\mu$ M RSV), grubunda erken apoptoz oranı, tek başına uygulanan 30  $\mu$ M CDDP ve 60  $\mu$ M RSV göre 24 saatlik sürede daha yüksek gözlemlendi. Geç apoptoz oranı 30  $\mu$ M CDDP'de %79,7 iken Kombinasyon 40 (12  $\mu$ M CDDP + 24  $\mu$ M RSV) %83,0, Kombinasyon 50 (15  $\mu$ M CDDP + 30  $\mu$ M RSV) %87,3 olarak bulundu (Bkz. Şekil 4.3).

## 4.2.2. Kaspaz-9

Cisplatin, resveratrol ve kombinasyonların, 24 saat sonucunda HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri, akış sitometri cihazı ile belirlenmiştir.



**Şekil 4.5.** Cisplatin ve resveratrolün IC<sub>50</sub> dozunun ve [CDDP+RSV] kombinasyonlarının, 24 saat sonucunda, HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri (Kontrol grubu, CDDP IC<sub>50</sub> dozu [30 µM], RSV IC<sub>50</sub> dozu [60 µM], KM50 kombinasyon dozu [15 µM CDDP + 30 µM RSV], KM40 kombinasyon dozu [12 µM CDDP + 24 µM RSV])

**Tablo 4.3** Akım sitometri cihazından alınan grafiklerde, hücrelerin alanlara göre dağılımı Negatif (kaspaz-9, Q3), Pozitif (kaspaz-9, Q4), apoptotik yüzdeleri

Gruplar	Q3	Q4
KONTROL	% 83,8	% 16,0
CİPLATİN (30µM)	%90,7	%9,3
RESVERATROL (60M)	%84,9	% 15,0
CİS-RSV (12 µM- 24 µM)	%83,6	% 15,1
CİS-RSV (15 µM- 30 µM)	%90,1	%9,7

Kaspazlar apoptoz sırasında kanser hücrelerinin yok edilmesinde önemli bir rol oynayan sistein-proteaz grubunun enzimleridir. Bu çalışmada 60µM RSV, 30 µM CDDP ve her ikisinin kombinasyonu ile 24 saat inkübasyondan sonra kaspaz-9 aktiviteleri ölçülmüştür. Kontrol grubundaki HeLa hücrelerinde %83,8 canlılıkla negatif kaspaz-9 ve %16,0 pozitif kaspaz-9 aktivitesi gözlemlenmiştir. 60 µM RSV (%84,9) negatif kaspaz-9 ve (%15,0) pozitif kaspaz-9, 30 µM CDDP (90,7) negatif kaspaz-9 ve (%9,3) pozitif kaspaz-9 gözlemlenirken kombinasyon 40 (CDDP 12 µM, RSV 24 µM) (%83,6) negatif kaspaz-9 ve (%15,1) pozitif kaspaz-9; kombinasyon 50 (CDDP 15 µM, RSV 30 µM) (%90,1) negatif kaspaz-9 (%9,1) pozitif kaspaz-9 gözlemlenmiştir (bkz. Şekil 4.4).

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Rahim ağız kanseri, dünya çapında kadınlarda görülen ikinci en yaygın kanser türüdür. Kayıtlara göre her yıl yaklaşık olarak 500.000 yeni vaka tespit edildiği bildirilmiştir. Rahim ağız kanseri, yüksek riskli insan papilloma virüs (HPV) tipleri ile kalıcı enfeksiyon, enflamatuvar tepkiler ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Oksidatif stres ise oksidan türlerin oluşumu ve ortadan kaldırılması arasındaki dengesizlikten kaynaklanır (Qin vd., 2018). Bu durum DNA ve proteinlerin hasarına yol açarak genetik değişikliklerin birikmesine yol açtığı görülmüştür. Sağlıklı hücreler redoks homeostazını sürdürmek için, "antioksidan savunması" olarak adlandırılan koruyucu moleküller aracılığı ile ROS oluşumu ve uzaklaştırılması arasındaki dengeyi korumaya çalışır. Hücrede meydana gelen dengesizlik durumu hasar tespit yollarının bozulmasına ve apoptoza sebep olabilir. Hasarlı hücrede apoptozun gerçekleşmemesi de kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olabilir. Apoptoz ve oksidatif stres kanserin tedavisi için en çok araştırılan konuların başında gelmektedir (Villamil, 2020). Apoptoz süresince, hücrelerde, hücre ve membran büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, nükleer ve sitoplazmik ağın dağılımı, DNA'nın parçalara ayrılması ve membran tomurcuklanması gibi sitoplazmik ve nükleer değişimler görülür. Apoptozun neden olduğu bahsedilen anormallikler kanser gelişiminde ve devam eden süreçte önemli rol oynar. Son zamanlarda, kanser gibi birçok insan hastalığında tedavi edici özelliklere sahip antioksidan gibi yeni bileşiklerin kemopreventif ve kemoterapötik özelliklere sahip olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Dong vd., 2022; Xin vd., 2022). Ökalyptüs, dut, yer fıstığı, ladin ve üzümde bol miktarda bulunan Resveratrol kardiovasküler hastalıklarda, nörodejeneratif hastalıklarda ve kanser de geniş bir kullanım spektrumuna sahip bir stilbenoiddir. Bunun yanı sıra antioksidan, antiinflamatuvar, büyüme inhibisyonu ve pro-apoptotik aktiviteleri de bulunmaktadır. Resveratrol tüm bunların yanı sıra malign hücre büyümesini baskıladığı, hücreleri apoptoza sürüklediği ve kansere spesifik genleri down regüle ettiği bildirilmiştir (Sinha vd., 2016). Bu özelliklere sahip ajanlar, kanser tedavisi için tamamlayıcı bir yaklaşım olarak kullanılabilir. Antioksidan molekülleri kullanan terapötik yaklaşımlar araştırılmıştır ve gelecekte kanser tedavisi için uygun alternatifler oluşturabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu doğal bitkilerin sentetik olarak kullanılan anti-kanser ilaçları ile verildiğinde onların kullanılan dozunu azalttığı da çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Zhang vd., 2004).

Bu tez kapsamında, antineoplastik bir ilaç olan cisplatin, antioksidan olarak kullanılan Resveratrol birbirinden ayrı ve kombine uygulama sonrasında servikal kanser hücre dizisi olan HeLa hücrelerinde hücre canlılıkları 24 saatlik zaman aralığında sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi ve mevcut tedavide kullanılan cisplatin ile kombine etkileri ortaya konmuştur.

Resveratrol ve cisplatin kombinasyonlarının HeLa hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerini değerlendirmek için MTT metodu kullanılarak büyümeye olan etkileri incelenmiştir. Resveratrol ve cisplatin kombinasyonu dahilinde HeLa hücreleri üzerindeki sinerjizimi araştırmak için farklı konsantrasyonlarda, Resveratrol (10, 25, 40, 60, 85, 105, 120, 160, 200  $\mu$ M), Cisplatin (10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70,  $\mu$ M) ayrı ayrı ve kombinasyonlar halinde uygulama yapılmıştır. 24 saatlik sürecin sonunda cisplatin 30  $\mu$ M konsantrasyonda ve resveratrol 60  $\mu$ M konsantrasyonda sitotoksik etkileri bulunmuştur. Resveratrol ve cisplatinin kombinasyon halindeki uygulamamızda Cisplatin + Resveratrol (100, 75, 50, 40, 30, 20, 10  $\mu$ M) konsantrasyonlar uygulanmıştır. Bahsettiğimiz MTT sonuçlarını değerlendirdiğimizde tek başına resveratrol ve cisplatinin doza bağlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı saptanmıştır. Resveratrol ve cisplatinin birleşmesi HeLa hücrelerinde artmış sitotoksikite ile sonuçlanmıştır. Cisplatin sağlıklı hücreler üzerinde de belirli bir sitotoksikite yaratan ve bu sebepten dolayı kemoterapötik uygulamada yan etkileri oldukça fazla olan bir ilaçtır (Zhu, vd., 2016). Cisplatinin bunun gibi yan etkileri olması sebebi ile resveratrol ile kombinasyonunda etki dozunun düşmesi önem arz etmektedir. Literatürdeki pek çok çalışma resveratrolün aynı zamanda sağlıklı hücreleri sitotoksikiteden koruduğu göstermektedir. RSV ve CDDP'nin IC<sub>50</sub> sonuçları ve gösterdikleri doza bağlı etkilerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Anlar, 2016; Li vd., 2018; Sezgin vd., 2019).

Yapılan bir başka çalışmada, 12,5-100  $\mu$ M resveratrol ile muamele edilen HeLa hücrelerinde inhibisyonlar gözlemlenmiş ve resveratrol tedavisinin doza bağlı olarak HeLa hücrelerinde LC3-II geninin transkripsiyonlarını uyardığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2022).

Yakın zamanda Shaito ve ark., RSV' ün "düşük konsantrasyon da antioksidan, yüksek konsantrasyon da pro-oksidan" etkisi olduğunu öne sürerek doz seçiminin önemini vurgulamıştır (Shaito vd., 2020).

Cisplatin, sağlıklı hücreler üzerinde de sitotoksik etki yaratan ve bu sebep ile kemoterapötik uygulamada yan etkileri oldukça fazla olan bir ilaçtır. Bu neden ile resveratrolün tek başına kullanılan cisplatinin etki dozunu düşürmüş olması ilerde yapılacak olan çalışmalar neticesinde oldukça önem arz ettiği vurgulanmıştır (Ma, 2015). Literatürdeki pek çok çalışma, resveratrolün aynı zamanda sağlıklı hücreleri cisplatin sitotoksitesinden de koruduğunu göstermektedir. Resveratrolün, cisplatine bağlı oluşan nefrotoksositeye karşı korucu etkisini gösteren pek çok çalışma mevcuttur ve günümüzde resveratrol üzerine birçok çalışma yapılmaya devam etmektedir (Amaral vd., 2008; Darwish vd., 2018).

Bu tez kapsamında CDDP, RSV ve kombinasyonların HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkinin belirlenmesi Annexin V- FITCH/PI ile boyanan hücreler akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) cihazında incelenmiştir. HeLa hücrelerine farklı dozlarda resveratrol, cisplatin ve kombinasyonları verilerek apoptoz üzerine etkilerinin doza bağlı olarak oluşturulduğu etkiler araştırılmıştır.

MTT sonuçlarına göre; HeLa rahim ağzı kanseri hücrelerinde 30 µM CDDP, 60 µM RSV, Kombinasyon 50 (15 µM CDDP, 30 µM RSV), Kombinasyon 40 (12 µM CDDP, 24 µM RSV) 24 saat inkübe edildi. Sonuçlar kontrol grubuna göre karşılaştırıldı.

Çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; HeLa hücrelerine verilen 30 µM CDDP, 60 µM RSV ve Kombinasyon 50 (15 µM CDDP, 30 µM RSV) kontrol grubuna göre erken apoptozu arttırdığı gözlemlendi.

Canlı hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde; HeLa hücrelerine uygulanan hücrelerinde 30 µM CDDP (%79,7), 60 µM RSV (%66,9), Kombinasyon 40 (12 µM CDDP, 24 µM RSV) (%83,0) kontrol grubuna göre canlı hücrelerin yüzde oranlarında düşüş görülürken, Kombinasyon 50 (15 µM CDDP, 30 µM RSV) (%87,3) canlı hücrelerin yüzde oranında düşük bir artış gözlemlenmiştir.

Geç apoptotik hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre (%11,1), 30  $\mu$ M CDDP (%17,3), 60  $\mu$ M RSV (%28,9), Kombinasyon 40 (12  $\mu$ M CDDP, 24  $\mu$ M

RSV) (%14,3) geç apoptozun arttığı gözlemlenirken Kombinasyon 50 (15  $\mu$ M CDDP, 30  $\mu$ M RSV) (%10,6) geç apoptoz yüzdesinde düşüş gözlemlenmiştir.

30  $\mu$ M CDDP, 60  $\mu$ M RSV, Kombinasyon 40 (12  $\mu$ M CDDP, 24  $\mu$ M RSV) uygulanan HeLa hücrelerinde erken ve geç apoptozun artması, resveratrolün ayrı ve cisplatin ile kombine halinde kullanılmasında HeLa hücrelerinde apoptozu tetiklediğini açıklayabilir.

Kontrol grubuna göre, 60  $\mu$ M RSV'ün HeLa hücrelerine uygulanması apoptozu, 30  $\mu$ M CDDP uygulanan HeLa hücrelerine göre daha çok tetiklediği gözlemlenmiştir.

AITC'nin (Alil izotiyosiyanat) HeLa hücrelerinin apoptoz üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada; HeLa hücrelerinin 0,5, 15 ve 45  $\mu$ M AITC ile 24 saat işleme tabi tutulmuş ve akış sitometrisi kullanılarak HeLa hücrelerinin apoptotik etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada gözlemlenen kontrol grubundaki apoptoz oranı (%5,08), tedavi gruplarında yapılan çalışmada ise sırasıyla 0,5, 15 ve 45  $\mu$ M AITC tedavi grubunda %10,65, %17,49, %24,26 olarak gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışma neticesinde apoptoz oranları, ilaç konsantrasyonları kontrol grubundaki apoptoz oranından yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Qin vd., 2018).

MCF-7 hücrelerinde resveratrolün apoptoz mekanizması üzerinde etkisinin araştırılmasının yapıldığı çalışmada, adenomatöz polipozis koli (APC) ile işaretli Annexin V antikorumun apoptoz sürecinde MCF-7 hücreleri üzerinde resveratrolün etkisi incelenmiştir. Yapılan bu araştırma neticesinde 100  $\mu$ M ve 250  $\mu$ M RSV verilen MCF-7 hücrelerinde erken ve geç apoptozun zamana bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir (Karabekir, 2017).

Yuming Zhang yaptığı çalışmada RSV'in 24 saat boyunca HeLa hücreleri üzerindeki biyolojik etkileri incelenmiş ve 12,5- 100  $\mu$ M RSV ile muamele edilen HeLa hücrelerinde inhibisyonlar gözlemlenmiştir. Aynı zamanda HeLa hücrelerindeki RSV tedavisinin ROS patlamasını tetiklediği ve dolayısıyla oksidatif stres oluşturduğu yönünde gözlemler yapılmıştır. (Zhang vd., 2022).

Yaptığımız çalışmada HeLa hücreleri üzerinde ayrı ve kombinasyon halinde CDDP ve RSV etkisini hangi metabolik yol üzerinden gösterdiğini anlayabilmek amacıyla, intrinsik apoptozis yolunda önemli rol oynayan Kaspaz-9 enziminin aktivasyonu 24 saat inkübasyon süresine tabi tutularak akım sitometri cihazı (BD Accuri C6) ile incelenmiştir. Kaspaz-9, başlatıcı kaspazlar grubu içerisinde bulunan ve mitokondri aracılı apoptoziste rol alan aspartik asit spesifik proteazdır (Kısmalı, 2012).

Bu çalışmada 30 µM CDDP, 60 µM RSV, Kombinasyon 50 (15 µM CDDP, 30 µM RSV),

Kombinasyon 40 (12 µM CDDP, 24 µM RSV) 24 saat inkübasyonundan sonra kaspaz-9 aktiviteleri ölçülmüştür. Kontrol grubundaki HeLa hücrelerinde (%83,8) canlılıkla negatif kaspaz-9 ve (%16;0) pozitif kaspaz-9 aktivitesi gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada kontrol grubuna göre; CDDP ve RSV ayrı ve kombine uygulamalarında pozitif kaspaz-9 yüzdelerinde düşme meydana geldiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla HeLa hücrelerine uygulanan CDDP, RSV ve kombine uygulamaları doğrultusunda “kaspaz-9 aktiftir” diyemeyiz.

Bizim çalışmamızda kontrol grubuna göre; 30 µM CDDP, 60 µM RSV, Kombinasyon 50 (15 µM CDDP + 30 µM RSV), Kombinasyon 40 (12 µM CDDP + 24 µM RSV) yüzdelik oranlarında düşme meydana geldiğinden dolayı HeLa hücrelerinde kaspaz-9 bağımlı ölüm gerçekleşmemiştir.

Dhandayuthapani yapmış oldukları çalışma da, hem resveratrol hem de genistein maddelerinin HeLa hücre dizisi üzerine ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulamaları sonucunda, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivitelerini artırarak apoptozu indükleyebildiğini gözlemlemişlerdir. Resveratrol ve genisteine ayrı ayrı veya kombinasyon halinde 24 saat maruz kaldıktan sonra, HeLa hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinde azalma görüldüğünü bildirmişlerdir (Dhandayuthapani vd., 2013).

Yapılan bir başka çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinin kaspaz-9 aktivasyonu 24 saatlik inkübasyondan sonra kontrol grubu (23 µM CDDP + 72 µM RSV) ile mukayese edildiğinden de kombinasyon grubunda %30,5 kaspaz-9 aktif olarak gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada CDDP ile RSV kombinasyonunun kaspaz-9 aktivasyonu arttırmada etkili olduğu gösterilmiştir (Özdemir vd., 2021).

Sonuç olarak; yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz veriler dahilinde CDDP, RSV ayrı ve kombinasyon halinde HeLa hücrelerinde sinerjik bir etkisi olduğu belirlenmiştir. RSV 60  $\mu\text{M}$ 'ın, CDDP 30  $\mu\text{M}$ , Kombinasyon 40 (12  $\mu\text{M}$  CDDP+24  $\mu\text{M}$  RSV) ve Kombinasyon 50 (15  $\mu\text{M}$  CDDP+ 30  $\mu\text{M}$  RSV) dozlarına göre daha yüksek oranda apoptotik etki oluşturduğu belirlenmiştir. RSV 60  $\mu\text{M}$  bu etkisi; Annexin V FITC/PI deneyi ile belirlenmiştir. HeLa hücrelerinde CDDP ve RSV varlığında, mitokondriyal yolak üzerinde kaspaz-9 bağımlı ölüm gerçekleşmemiştir. O nedenle; CDDP ve RSV ayrı ve kombinasyonlarının uygulandığı HeLa hücre hattındaki gösterdikleri bu etkilerin, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarındaki aktiviteleri ve apoptotik etkilerinin hangi spesifik yolaklar üzerinde nasıl gerçekleştiği *in vitro* ve *in vivo* ortamda etkili olup olmadıkları gibi soruların cevabını bulabilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKÇA

- Akçalı A. (2010) Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi*.25(3):119-23.
- Akşit H., Bildik A., (2008) Apoptozis. *YYÜ Vet. Fak.Derg.*19(1): 55-63
- Almatroodi S., Mohammed A., Abdullah S. M., Alhumaydhi F., Babiker A., Khan A., Rahmani A. (2020) Potential Therapeutic Targets of Resveratrol, a Plant Polyphenol, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer. *Molecules*.
- Amaral C., Francescato H., Coimbra T., Darin J., Antunes L., Bianchi M., (2008) Resveratrol, sıçanlarda sisplatin kaynaklı nefrotoksisteyi hafifletir. *Toksikoloji Arşivleri*. Syf.363–370
- Anlar H., Bacanlı M., Kutluk B., vd (2016) Cytotoxic Activity of Resveratrol in Different Cell Lines Evaluated by MTT and NRU Assays. *Turk J Pharm Sci* 13(1), 27-34.
- Altan, N., Dinçel A.S. ve Koca C., (2006) Diabetes mellitus and oksidatif stress. *Turk J. Biochem.*, 31(2), 51-56.
- Balkan, B. M., Kısmalı, G., Turan, D., Balkan, A. B. & Sel, T. (2017). IL-6 İlavesi HEPG2 Hücrelerinde Kaspaz Aktivitelerini Nasıl Etkiler?. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* , 5 (2) , 85-92 .
- Baykara O. (2016) Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*.Cilt;5(3):154-65.
- Bosquesi P., Melchior A., Pavan A., Souza C., Rusinova R., Barbieri K., Fernandes G., Andersen O., Costa F.,(2020) Synthesis and evaluation of resveratrol derivatives as fetal hemoglobin inducers. *Bioorganic Chemistry*.
- Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., & Irimie, A. (2009) Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncologica*, 48 (6), 811– 821.

- Bylund, J., Brown, K.L., Movitz, C., Dahlgren, C., & Karlsson, A. (2010) Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? *Free Radical Biology and Medicine*, 49 (12), 1834–1845.
- Carocho, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51 (1), 15– 25.
- Chatterjee S, Burns TF. (2017) Targeting heat shock proteins in cancer: A promising therapeutic approach. *Int J Mol Sci.*;18(9).
- Chu E., Sartorelli A., (2014) Kanser Kemoterapisi. *In book: Temel ve Klinik Farmakoloji*.Syf; 949-975.
- Chou, T.C. (2010) Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*, 70 (2), 440–446.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. (2008) Caspases An update. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol.* ;151(1):10–27.
- Coşkun G., Özgür H., (2011) Apoptoz ve nekroz mekanizmaları, *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı*; 20: 145
- Creagh EM, Martin SJ. (2001) Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans*; 29:696–702.
- Çetintaş V.B., Eroğlu Z., (2013) Cisplatin direncinde etkili moleküler mekanizmalar. *Dergi Park*; 20, (2), 72 – 79.
- Çiftçi N., (2017) The Role of Oxidative Stress in Cancer: Could Antioxidants Fuel the Progression of Cancer?. *Ahi Evran Tıp Dergisi*; 1: 8-13
- Çilingir A., Mis L., (2014) Apoptosis, *BEU Journal of Science* 3(1), 102-112.
- Darwish, M.A., Abo-Youssef, A.M., Khalaf, M.M., Abo-Saif, A.A., Saleh, I.G., & Abdelghany, (2018) T.M.Resveratrol influences platinum pharmacokinetics: A novel mechanism in protection against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology Letters*, 290, 73–82.

- Dasari S., Tchounwou P., (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.*05; 740: 364–378.
- Dhandayuthapani S., Marimuthu P., Hörmann V., Kumi-Diaka J., Rathinavelu A. (2013) Resveratrol ve Genistein tarafından Kaspaz Aktivasyonu yoluyla HeLa Hücrelerinde Apoptozun İndüklenmesi. *Tıbbi Gıda Dergisi: (16-2).*139-146.
- Dinçel G.,Kul O., Patolojik Apoptozis Ve Tanı Yöntemleri.,*Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.*(5), Sayı 1, 86 – 108.
- Dong Z., Wang Y., Wan W., Wu J.,Wang B., Zhu H., Xie M., Liu L.(2022) Resveratrol ameliorates oxaliplatin-induced neuropathic pain via anti-inflammatory effects in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine; 24(3): 586.*
- Dybkowska E, Sadowska A, Świdorski F, Rakowska R, Wysocka K. (2018) The occurrence of resveratrol in foodstuffs and its potential for supporting cancer prevention and treatment. *A review. Rocznik Panstw Zakl Hig;69(1):5–14.*
- Elmore S. (2007) Apoptosis: A Review Of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology; 35: 495-516.*
- Ergin, K., Yaylalı, A. (2013). Resveratrol ve etkileri üzerine bir gözden geçirme. *Medical Journal of Suleyman Demirel University, 20(3), 115-120.*
- Ersöz E, Can OB, Uzunoglu S. (2016) Eksozomların Kanserdeki Rolü. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi;3(1):144-52.*
- Ezer M., (2019) Akciğer kanserinde karboplatin ve kurkumin kombinasyonlarının oksidatif stres üzerindeki etkisi. Yüksek lisans tezi. Biyokimya Anabilim Dalı Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Fulda, S., & Debatin, K.M. (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene, 25 (34), 4798–4811.*
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., Kroemer, G. (2012) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene, 31 (15), 1869–1883.*

Gilgenkrantz S. (2014) Sixty years of HeLa cell cultures. *Histoire des sciences medicales*;48(1):139-44.

Gökçe Ö, Yılmaz A, Gürbüz V, Konaç E, Ekmekçi A. (2011) İnsan servikal kanser Hela hücrelerinde Vinorelbin'in apoptotik etkisi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*;25(1):5-14.

Gökhan A., Kılıç K., Gülle K., Uyanıkgil Y., Çavuşoğlu T., Apoptotik yollar ve hedefe yönelik tedaviler. Süleyman Demirel Üniversitesi. *Tıp Dergisi*. 27(4):565-573

Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Chaudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C., Gupta, P.K., Pakuwal, U. (2014) Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (11), 4405–4409.

Guangyi Qin, Ping Li, Zhuowei Xue. (2018) Effect of allyl isothiocyanate on the viability and apoptosis of the human cervical cancer HeLa cell line *in vitro*. *Oncol Lett.*; 15(6): 8756–8760.

Güleş Ö.,Eren Ü., (2008) Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2) 73-78.

Gündoğdu S., Uçar Ü., Kuruüzüm Uz A., Resveratrolün bulunduğu kaynaklar ve tıbbi önemi. *Ankara ecz.fak.derg.* 43(3):652-673

Grell, M., Krammer, P.H., Scheurich, P., (1994) Segregation of APO-1/Fas antigen and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis, *Eur. J. Immunol.*, 24 (10): 2563-6.

Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*;144(5):646-74.

**http-1:**

[https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=23&single\\_unit=50000](https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=23&single_unit=50000) (Erişim tarihi: 21.04.2022)

İrgit A., (2021) Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Bezelye derg.*

- Jiang B., Tian Q., Shu C., Zhao J., Xue M., Zhu S., (2022) Resveratrol Enhances the Anti-Cancer Effects of Cis-Platinum on Human Cervical Cancer Cell Lines by Activating the SIRT3 Relative Anti-Oxidative Pathway. *Front. Pharmacol.* 13:916876.
- Johnson A, Morgan L., (2015) Walter RR. Molecular Biology of The Cell. 6th ed. *Garland Science*; p:1021-1034.
- Kaya C., Çalışkan Y., Yönden Z., (2012) Apoptozis. Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, *Biyokimya Anabilim Dalı*. Cilt 3-11.
- Karabekir G., Demircan G., Özdaş Ş., (2017) Resveratrolün MCF-7 hücre soyunda apoptotik etkinin araştırılması. *FNG & Bilim Tıp Dergisi* ;3(1):27-34
- Karabekir G., (2017) MCF-7 hücre soyunda resveratrolün apoptoz mekanizması üzerine etkisinin araştırılması. Yüksek lisans tezi. İstanbul Bilim Üniversitesi. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı. Syf.48.
- Kamzol W, (2013) Jaglarz K, Tomaszewski KA, Puskulluoglu M, Krzemieniecki K. Assessment of knowledge about cervical cancer and its prevention among female students aged 17–26 years. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*;166(2):196-203.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.*; 26: 239-57
- Kısmalı G., Sel T. (2012) Paraquat İle Oluşturulmuş Oksidatif Stresin HepG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması. *Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg;* 26 (2): 79 – 85
- Kim YA, Rhee SH, Park KY, Choi YH. (2003) Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J Med Food.*, 6:273-280.
- Koç F, Akşit S, Kurugöl Z, Koturoğlu G, Halicioğlu O, Aslan A. (2010) Serviks Kanseri Hakkında Hekimlerin Bilgi Düzeyleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Gynecology and Obstetrics*;20(5):281-6.

- Komorowska D., Gajewska A., Hikiş P., Bartosz G., Rodacka A., Comparison of the effects of resveratrol and its derivatives on the radiation response of MCF-7 breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(17),9511
- Koopman G., Reutelingsperger GP., Kuijten GA., Keehnen RM., Oers van MH., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *ScienceDirect*. 84(5),1415-1420
- Kumar D, Basu S, Parija L, Rout D, Manna S, Dandapat J, (2016) Curcumin and Ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*.;81:31-7.
- Li P., Zhou L., Zhao T., Liu X., Zhang P., Liu Y., Zheng X., Li Q. (2017) Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, Vol. 8, (No. 14).
- Li L., Qiu R., Lin Y., Cai Y., vd. (2018) Resveratrol suppresses human cervical carcinoma cell proliferation and elevates apoptosis via the mitochondrial and p53 signaling pathways. *Oncol Lett.*; 15(6): 9845–9851
- Ma, L., Li, W., Wang, R., Nan, Y., Wang, Q., Liu, W., & Jin, F. (2015). Resveratrol enhanced anticancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by inducing mitochondrial dysfunction and cell apoptosis. *International Journal of Oncology*, 47 (4), 1460–1468.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*;22(3):355– 70.
- Martel C., Plummer M., Vignat J., Franceschi S., (2017) Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International Journal of Cancer*. 141, 664–670
- Moga M., Dimienescu O., Arvatescu C., Mironescu A., Dracea L, Ples L., (2016) The Role of Natural Polyphenols in the Prevention and Treatment of Cervical Cancer. *Molecules*. 21, 1055.

- Murray TV, McMahon JM, Howley BA, Stanley A, Ritter T, Mohr A, Zwacka R, Fearnhead HO. (2008) A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation. *Journal of Cell Science*; 121: 3786-93.
- Özcan O., Erdal H., Çakırca G., Yönden Z., (2015) Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 6 (3): 331-336.
- Özdemir F., Sever A., Ögünç Keçeci Y., Seller Z. (2021) Resveratrol increases the sensitivity of breast cancer MDA-MB-231 cell line to cisplatin by regulating intrinsic apoptosis. *Iran J Basic Med Sci. Cilt: 24 Sayı: 24 Syf: 66 – 72*.
- Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Alessia Garufi, D’Orazi G. (2016) Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*;8(4):603–19.
- Qin G, Li P, Xue Z. (2018) Effect of allyl isothiocyanate on the viability and apoptosis of the human cervical cancer HeLa cell line in vitro. *Oncology letters*;15(6):8756-60.
- Rahmanian N, Hosseinimehr SJ, Khalaj A. (2016) The paradox role of caspase cascade in ionizing radiation therapy. *J Biomed Sci.*;23(1):1–13.
- Sever A., (2018) MCF-7 hücrelerinde oksidatif hasara karşı cisplatin ile kombinasyonda resveratrolün sinerjik etkisi ve oksidatif stres indeksi. [Yüksek Lisans Tezi]. Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi.
- Sezgin Y.,Çetin M.,İşeri Ö., vd. (2019) Farklı Resveratrol Konsantrasyonlarının Gingival Fibroblastlardaki Hücre Canlılığına Etkisi. *EÜ Dişhek Fak Derg*; 40\_3: 147-152
- Shaito A., AM Posadino, N. Younes , H. Hasan , S. Halabi , D. Alhababi , A. Al-Mohannadi , WM Abdel-Rahman , AH Eid , GK Nasrallah , G. Pintus.(2020) Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 2084;
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.*;22(4):526–39.

- Sinha, D., Sarkar, N., Biswas, J., & Bishayee, A. (2016). Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology*, 40–41, 209–232.
- Silke, J., & Meier, P. (2013) Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins – Modulators of Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5,
- Şenol D., (2019) How Much I Am Aware of Human Papilloma Virus (HPV)?. *TJFMPC* ;13 (4): 462-471.
- Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. (2009) Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 19: 137-143.
- 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.
- Villamil J., Bautista-Niño P., Serrano N., Rincon M., Garg N., (2020) Potential Role of Antioxidants as Adjunctive Therapy in Chagas Disease. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* , Article ID 9081813, (13).
- Xin R., Shen B., Huang Z., Liu J.B., Li S., Jiang G.X., Zhang J., Cao Y.H., Zou D., Li W., Li C.G., Ma Y., Fu D. (2022) Research progress in elucidating the mechanisms underlying resveratrol action on lung cancer. *National center for biotechnology information*; (23)-15
- Yeung AW, Aggarwal BB, Orhan IE, Horbanczuk OK, Barreca D, Battino M, Belwal T, Bishayee A, Daglia M, Devkota HP, Echeverría J. (2019) Resveratrol, a popular dietary supplement for human and animal health: Quantitative research literature analysis-a review. *Animal Science Papers and Reports*; 37 :2, 103-118
- Yıldırım İ., Koçak N., (2012) Yıldırım S., Programlı Hücre Ölümü; Literatür Bilgilerinin Türkçe Derlemesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*: 2(3):58-66.
- Yokuş B., Çakır D.Ü., (2012) Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*: 1(2): 7-18.

- Zhang Y., Yuan F., Li P., Gu J., Han J., Ni Z, Liu F.. (2022) Resveratrol inhibits HeLa cell proliferation by regulating mitochondrial function. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 241, 113788.
- Zhang A, WU Y, Lai HW, Yew T. (2004) Apoptosis-A Brief Review. *Neuroembryology*; 05: 47–59.
- Zhu H., Hui L., Zhang W., Shen Z., Hu X., Zhu X., (2016) Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Design, Development and Therapy*. (10)