



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**METİLSÜLFONİLMETANIN OVCAR-3, SKOV-3 VE A2780
OVER KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZ VE
OTOFAJİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Hatice Melis ÇOŞGUN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Arzu Zeynep KARABAY**

ANKARA

2024

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METİLSÜLFONİLMETANIN OVCAR-3, SKOV-3 VE A2780
OVER KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZ VE
OTOFAJİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Hatice Melis ÇOŞGUN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Arzu Zeynep KARABAY

**Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün
19L237008 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne, Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Metilsülfonilmetanın OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 Over Kanseri Hücrelerinde Apoptoz ve Otofaji Üzerindeki Etkileri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Hatice Melis ÇOŞGUN

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında Hatice Melis ÇOŞGUN tarafından hazırlanan “Metilsülfonilmetanın OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 Over Kanseri Hücrelerinde Apoptoz ve Otofaji Üzerindeki Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.07.2024

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Özge ÜLKER
Ankara Üniversitesi

İmza

Doç. Dr. Aynur KARADAĞ GÜREL
Uşak Üniversitesi

İmza

Doç. Dr. Arzu Zeynep KARABAY
Ankara Üniversitesi

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Yalda HEKMATSHOAR
Altınbaş Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

MSM'nin OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 Over Kanseri Hücrelerinde Apoptoz ve Otofaji Üzerindeki Etkileri

Dünya genelinde, over kanseri kadınlarda en yaygın yedinci kanser türüdür ve kanser kaynaklı ölümlerin en yaygın sekizinci nedeni olup beş yıllık hayatta kalma oranı %45'in altındadır. Bu hastalığın ortadan kaldırılmasında başlıca tedavi seçenekleri cerrahi ve kemoterapidir. Bunların yanında hedefli tedaviler ve hormonlar da kullanılmaktadır. Programlı hücre ölümü (PCD) olarak adlandırılan apoptoz çok hücreli organizmalar için hem fizyolojik hem de patolojik olarak önem taşıyan bir olgudur. Kanser ekseninde apoptoz süreçlerinin sağlıklı işletilememesi ve apoptoza direnç gelişimi gözlenmektedir. Hücre canlılığını etkileyen bir başka olgu olan otofaji ise hücrenin kendi kendini sindirmesi olarak bilinen, hücrenin organel ve içeriğinin otofagozom olarak adlandırılan çift zarlı veziküllerin içine alınarak lizozomal yıkımın gerçekleştiği homeostatik katabolik bir süreçtir. Otofaji, onkojenik aktivasyon sonrasında kanseri teşvik etmekte; ancak tümörün başlaması ve malign dönüşümde hasarlı ve bozuk hücrelerin ortadan kaldırılmasında inhibitör etkiler de sergilemektedir. Bu nedenle, otofajinin kanser gelişiminde ikili rolü olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda, daha az yan etki potansiyeline sahip olmaları nedeniyle doğal ürünler ve diyet destek preparatlarının kanser karşıtı etkilerinin araştırılması dikkat çekici bir araştırma alanı olmuştur. Genel olarak güvenli olarak tanınan (GRAS) bir madde olan ve yüksek dozlarda toksik etki sergilemeksizin kullanılabilen MSM, ağrı, iltihaplanma, alerji, artrit, parazit enfeksiyonlar ve saç, cilt ve tırnaklarda normal keratin seviyelerinin korunması gibi çok çeşitli durumlarda kullanılan popüler bir besin takviyesidir. Geçtiğimiz birkaç yıl içerisinde MSM'in çeşitli kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkiler sergileyebildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada MSM, OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanseri hücreleri üzerinde test edilmiştir. Hücreler farklı dozlardaki MSM ile inkübe edildikten sonra canlılık testi, kaspaz aktivite tayini, apoptoz tayini ve otofajik otofagozomların belirlenmesi spektrofotometrik ölçüm ve akım sitometri ile gerçekleştirilmiştir. MSM'nin her üç over kanseri hücresi üzerinde de belirli dozlarda hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı ve apoptozu anlamlı olarak indüklediği belirlenmiştir. MSM'nin etkin sitotoksik dozları arasında olan 300 mM dozda her üç over kanseri hücresinde de kaspaz-3 enzim aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Otofagozomların floresan boyanması ise MSM'nin 300 mM ve 400 mM'lık dozlarında farklı etkiler sergilediğini ortaya koymuştur. SKOV-3 hücrelerinde 300 mM ve 400 mM MSM kontrol grubuna göre otofagozomların floresan boyanmasını arttırmış, OVCAR-3 hücrelerinde sadece 300 mM MSM ile boyanmada artış, 400 mM MSM ile boyanmada azalma gözlenmiş, A2780 hücrelerinde ise 300 mM MSM dozuyla anlamlı bir değişiklik belirlenmemiş, 400 mM MSM ile boyanmada azalma belirlenmiştir. Özetle, bu çalışmanın sonuçları MSM'nin kaspaz-3 enzim aktivitesini arttırdığı, apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur. Gelecekte, MSM'nin otofaji üzerindeki etkileri ise doza bağımlı olarak farklılık göstermiştir. MSM'nin, apoptotik bir ajan olarak over kanseri tedavisi için klinikte kullanımına yönelik çalışmaların yapılması ve otofaji üzerindeki etkilerinin daha ayrıntılı analizi önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, otofaji, metilsülfonilmetan, Over kanseri, OVCAR-3, SKOV3, A2780

SUMMARY

Effects of MSM on Apoptosis and Autophagy in OVCAR-3, SKOV-3 and A2780

Ovarian Cancer Cells

Worldwide, ovarian cancer is the seventh most common type of cancer in women and the eighth most common cause of cancer death, with a five-year survival rate of less than 45%. The main treatment options for eliminating this disease are surgery and chemotherapy. In addition, targeted therapies and hormones are also used. Apoptosis, called programmed cell death (PCD), is a phenomenon of both physiological and pathological importance for multicellular organisms. In the cancer axis, the failure of apoptosis processes to operate properly and the development of resistance to apoptosis are observed. Autophagy, another phenomenon that affects cell viability, is a homeostatic catabolic process known as the self-digestion of the cell, in which the organelles and contents of the cell are enclosed in double-membrane vesicles called autophagosomes and lysosomal destruction occurs. Autophagy promotes cancer after oncogenic activation; However, it also exhibits inhibitory effects in the elimination of damaged and damaged cells during tumor initiation and malignant transformation. Therefore, autophagy has been reported to have a dual role in cancer development. In recent years, investigating the anti-cancer effects of natural products and dietary supplement preparations has become a remarkable research area because they have less potential for side effects. MSM, a generally recognized as safe (GRAS) substance that can be used in high doses without toxic effects, is a popular dietary supplement used for a wide variety of conditions, including pain, inflammation, allergies, arthritis, parasitic infections, and maintaining normal keratin levels in hair, skin and nails. Over the past few years, it has been reported that MSM can exert apoptotic effects on various cancer cells. In this study, MSM, OVCAR-3, SKOV-3 and A2780 were tested on ovarian cancer cells. After the cells were incubated with different doses of MSM, viability test, caspase activity determination, apoptosis determination and determination of autophagic autophagosomes were performed by spectrophotometric measurement and flow cytometry. It was determined that MSM significantly reduced cell viability and significantly induced apoptosis at certain doses on all three ovarian cancer cells. It was determined that MSM significantly increased caspase-3 enzyme activity in all three ovarian cancer cells at a dose of 300 mM, which is among the effective cytotoxic doses. Fluorescent staining of autophagosomes revealed that MSM exhibited different effects at doses of 300 mM and 400 mM. In SKOV-3 cells, 300 mM and 400 mM MSM increased the fluorescent staining of autophagosomes compared to the control group. In OVCAR-3 cells, an increase in staining was observed only with 300 mM MSM and a decrease in staining with 400 mM MSM. In A2780 cells, no significant change was detected with the 300 mM MSM dose. A decrease in staining was determined with 400 mM MSM. In summary, the results of this study revealed that MSM increased caspase-3 enzyme activity and induced apoptosis. In the future, the effects of MSM on autophagy differed depending on the dose. It is recommended to conduct clinical studies on the use of MSM as an apoptotic agent for the treatment of ovarian cancer and to analyze its effects on autophagy in more detail.

Keywords: Apoptosis, autophagy, methylsulfonylmethane, Ovarian cancer, OVCAR-3, SKOV3, A2780

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Over Kanseri	5
1.2. Over Kanseri Epidemiyolojisi ve İnsidansı	5
1.3. Over Kanseri Sınıflandırılması	6
1.4. Over Kanseri Risk Faktörleri	6
1.5. Apoptoz	7
1.5.1. Apoptozda Rol Oynayan Sinyal Yolakları	9
1.5.1.1. Apoptozun Dışsal Yolağı	9
1.5.1.2. Apoptozun İçsel Yolağı	10
1.5.1.3. Kaspazlar	10
1.5.1.4. Bcl-2 Ailesi	12
1.6. Otofaji	14
1.6.1. Otofaji Mekanizmasının Düzenlenmesi	14
1.7. Metilsülfonilmetan (MSM)	16
1.7.1. MSM'nin Etki Mekanizması	17
1.7.2. MSM'nin Klinik Kullanımı	21
1.7.3. MSM'nin Toksisitesi	25
1.8. Çalışmamızda Kullanılan Hücre Serilerinin Özellikleri	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	28
2.2. Kimyasallar	28
2.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Serisi	28
2.4. Yöntemler	28
2.4.1. Hücre Kültürü	28
2.4.2. Hücre Sayımı ve Canlı Hücrelerin Belirlenmesi	29
2.4.3. Hücre Canlılık Testi	29
2.4.4. Protein Kantitasyonu	30
2.4.5. Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini	30
2.4.6. PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I ile Apoptoz tayini	31
2.4.7. Otofagozomların CYTO-ID Autophagy Detection Kit ile Belirlenmesi	32
3. BULGULAR	33
3.1. MSM'nin OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 Over Kanseri Hücrelerinde Canlılık Üzerindeki Etkileri	33
3.2. MSM'nin OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 Over Kanseri Hücrelerinde Apoptoz Üzerindeki Etkileri	34
3.3. MSM'nin Kaspaz 3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri	38
3.4. Cyto-ID Boyaması İle MSM'nin Otofaji Üzerindeki Etkilerinin Saptanması	38

4. TARTIşMA	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİř	59



ÖNSÖZ

MSM'nin çeşitli kanserlerde apoptoz üzerine çalışmalarını bulunurken daha önce over kanseri üzerinde apoptoz ve otofajiye ile ilgili daha önce hiçbir çalışma yapılmamıştır. MSM'nin klinik olarak kanseri tedavilerinde destekleyici olarak kullanılması ve GRAS olarak tanımlanan MSM'nin kemoterapötik ilaçlara oranla çok yüksek dozlarda güvenle kullanılmasından dolayı bu tez çalışmasında over kanser hücre serisi olan OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 ile apoptotik ve otofajik yolların etkin olduğu bir sistem oluşturularak bu hücre modeli üzerinde otofaji ve apoptoz üzerine olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilen bu tez çalışmasında antikanser etkileri bulunan Metilsülfonilmetan'ın, OvcAR-3, Skov3, A2780 over kanser hücreleri üzerinde apoptoz ve otofaji üzerine etkileri ilk kez ortaya konulmuştur. Metilsülfonilmetan'ın OVCAR-3, SKOV-3, A2780 over kanser hücrelerinde apoptoz ve otofaji üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 19L0237008 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tezimin hazırlanması bana her zaman destek olan, sabır ve azimle tüm bilgi birikimini ve deneyimlerini paylaşan, yardımlarını asla esirgemeyen, bu yolda ne zaman umutsuzluğa düşsem tüm güzel enerjisiyle beni yeniden aşıla çalışmaya devam ettiren değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Arzu Zeynep KARABAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım sırasında yardımlarını her zaman yanımda hissettiğim Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı, Prof. Dr Fügen AKTAN'a, tüm bilgi ve deneyimleri ile çalışmalarına ışık tutan Dr.Öğretim üyesi Aslı KOÇ, Araştırma görevlisi Dr Ecem KAYA SEZGİNER ve Araştırma görevlisi Nuri ÖZMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu süreçte her zaman yanımda olan desteklerini hiç esirgemeyen annem eşim Levent, annem ve çocuklarım Göktürk Ömer ve Kürşat Yusuf'a teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIP	Apoptosis inducing protein
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor-1
Bad Bcl-2	Associated agonist of cell death
BAG Bcl-2	Associated athanogene protein
Bak Bcl-2	Antagonist killer
Bax Bcl-2	Associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
Bcl-B	B-cell lymphoma B
Bcl-w	B-cell lymphoma -2 like protein 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma extra large
Bcl-XS	B-cell lymphoma extra small
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
CAD	Caspase aktivated DNase
CLL	Kronik lenfatik lösemi
COX2	Siklooksijenaz 2
DD	Death domain
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pl
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DNA	Deoksribonükleik asit
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
Fas (APO-1, CD95)	Type-II transmembrane protein that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) family
IAP	Inhibitors of apoptosis proteins
ICAD	Inhibitor of CAD
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 reseptör
IKK	İnhibitör kappa B kinaz
IL-1 β	İnterlökin 1-beta IR İnsülin reseptörü
I-CAD	Caspase activated DNase
ICAM 1	Intercellular adhesion molecule 1 I
FN γ	İnterferon gama I κ B İnhibitör kappa B
IKK	İnhibitör kappa B kinaz
IL-1 β	İnterlökin 1 beta
IL-1R	İnterlökin 1 resptörü
IL-4	İnterlökin 4
IL-10	İnterlökin 10

IL-12	İnterlökin 12
IL-13	İnterlökin 13
I κ B	İnhibitör kappa B
JAK3	Janus kinaz 3
LPS	Lipopolisakkarit
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MOMP	Mitokondrial outer membran permeabilization
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]
NF κ B	Nükleer Faktör kappa B
NSCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri
p53/TP53	Tümör-protein 53
PARP	Poli- (ADP-riboz) polimeraz
PCD	Programlı hücre ölümü
PS	Fosfolipidlerin
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
ROS	Reaktif oksijen türleri
RTK	Reseptör tirozin kinaz
siRNA	Silencing interferans RNA'sı
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
STAT	Sinyal Transdüksiyon ve Transkripsiyon Aktivatörü
TNF	Tümör nekrosis faktör
TNFR	Tümör nekrosis faktör reseptör
TNF α	Tümör nekrosis faktör alfa
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein
TRAIL	Tümör nekrosis faktör ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Apoptozun memeli hücresindeki içsel ve dışsal yolları	9
Şekil 1.2. Kaspaz aktivasyonunun mekanizması ve hücre ölümünün yürütülmesi	11
Şekil 1.3. Mitokondride apoptozun Bcl-2 proteinleri tarafından düzenlenmesi	13
Şekil 1.4. Otofaji mekanizmasının düzenlenmesi	16
Şekil 3.1. MSM'nin OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanseri hücrelerinde % canlılık üzerindeki etkileri	33
Şekil 3.2. MSM (300mM ve 400mM) uygulanan ve uygulanmayan OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri	34
Şekil 3.3. Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan OVCAR-3 hücrelerinde Annexin V-7AAD ve PE boyanması sonucu	35
Şekil 3.4. Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan SKOV-3 hücrelerinde Annexin V-7AAD ve PE boyanması sonucu	36
Şekil 3.5. Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan A2780 hücrelerinde Annexin V-7AAD ve PE boyanması sonucu	37
Şekil 3.6. MSM'nin OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanseri hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkileri	38
Şekil 3.7. Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan OVCAR-3 hücrelerinde Cyto-ID boyanması sonucu	39
Şekil 3.8. Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan SKOV-3 hücrelerinde Cyto-ID boyanması sonucu	39
Şekil 3.9. Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan A2780 hücrelerinde Cyto-ID boyanması sonucu	40

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Metilsülfonilmetan (MSM) Toksisite Verileri

25



1. GİRİŞ

Dünya ortalamasına bakıldığında kadınlarda over kanseri en yaygın kanser türü olarak yedinci sıradadır ve kansere bağlı ölümle bakıldığında beş yıllık hayatta kalma oranı %45'in altındadır (Webb ve Jordan, 2017). Jinekolojik kanserlerin kıtalara göre coğrafi dağılımı değişim göstermektedir. Ekonomik açıdan gelişmişlikleri düşük olan Afrika ve Güney Amerika ülkelerinde jinekolojik kanserler daha sık görülmektedir (Sung vd., 2021). Türkiye istatistiklerine göre tüm yaş gruplarındaki kadınlarda görülen over kanseri yüzdesi %6.3'tür, kadınlarda görülen kanserler içinde 7. sıradadır (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017). Jinekolojik kanserler içinde en çok ölüm oranına sahip olan bir kanser olması, belirtilerin geç farkedilmesi, geç tanı alması ve son yıllarda oranlarında artış görülmesi sebebiyle over kanserinin tedavisinde yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalar hız kazanmıştır.

Apoptoz kontrolsüz hücre yayılmasını kontrol ederek doku homeostazını korur ve meydana gelen gereksiz veya zararlı hücreleri yok etmek için sıkı şekilde kontrol edilen programlı hücre ölümü (PCD) mekanizmasıdır (Goldar vd., 2015). Apoptoz bir çok hastalığın ortaya çıkmasında da önemli bir faktör olarak işlev görür. Nörodejeneratif hastalıklar söz konusu olduğunda artmış apoptoz; kanser gibi bazı hastalıklarda ise azalmış apoptoz hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Wong, 2011). Apoptoz, sağlıklı hücrenin döngüsü, immün sistemin düzgün şekilde çalışması gibi çeşitli hücresel olayların önemli bir parçasıdır. (Elmore, 2007). Bugüne kadar yapılan araştırmalar içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik) olmak üzere iki ana apoptotik sinyal yolağının olduğunu göstermiştir. (Elmore, 2007). İçsel yolda hem anti apoptotik hem de pro-apoptotik etkileri olan Bcl-2 protein ailesinin etkileşimi hücrenin apoptotik sürece girip girmeyeceğini belirler. Bcl-2 ailesine ait heterodimer olarak bulunan Bcl-2/Bax oranı bazı malignitelerde tanı konucu faktör olarak kullanılmaktadır (Celepli, 2020). Dışsal yolda ise apoptoz, hücre dışından gelen sinyallerle başlatılmaktadır.

Otofaji veya hücrenin kendi kendini sindirmesi olarak bilinen hücrenin organel ve içeriğinin çift zarlı vezikül olan autophagosome da saklandığı ve hücresel bileşenlerin bozulması nedeniyle yıkımın lizozomal olarak yapıldığı homeostatik katabolik bir süreçtir (Mizushima vd., 2008). Otofaji mekanizmalarında rol oynayan 30'dan fazla gen tanımlanmış ve bunlara ATG (Autophagy-related proteins) ailesi adı verilmiştir. ATG5, ATG12 ve ATG16L'den oluşan kompleks, LC3II ile birlikte fagoforun uzamasını uyarır ve otofagozomun oluşmasını için gereklidir. P60, bu proteinlere bağlanarak hücreyi yıkıma

götürür. P60 otofagozom oluşurken LC3II'ye bağlanır ve hedef protein ve organeller yeni oluşan otofagozomda yutulur. Otofagozom daha sonra lizozomla birleşir ve içindekiler sindirilir (Ndoye ve Weeraratna, 2016).

Otofajinin modülasyonu, birçok kanserde tümörün baskılanmasında ve desteklenmesinde aksi iki rol oynar. Aynı zamanda otofaji, germ hücre özelliklerinin korunmasına, tekrarlanmasına ve antikanser tedavi sistemlerine direnç geliştirilmesine sebep olarak kansere sebep olan hücrelerin özelliklerini düzenler. Her ne kadar rapamisin ve klorokin gibi bazı otofaji modülatörleri antikanser tedavisinde otofajiyi düzenlemek için kullanılsa da, bu süreç hem tümörün baskılanmasında hem de teşvikinde de rol oynadığından kanserdeki otofajinin kesin mekanizmasının anlaşılması için daha fazla araştırma gerekmektedir (Yun, 2018).

Kemoterapik ilaçların selektif olmaması, yüksek toksisiteleri ve yan etkileri nedeniyle doğal kaynaklı ya da kimyasal olarak sentezlenen gıda takviyesi olarak kullanılan preperatlar yan etkilerinin daha az olması sebebiyle kanser tedavilerinde kullanılan ilaçlara alternatif olarak kullanılmaya çalışılmakta ve bu alanda yapılan araştırmalara devam edilmektedir. Metisülfonilmetan (MSM), anti-enflamatuvar özelliği başta olmak üzere başka çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılan popüler bir gıda takviyesidir. MSM'nin anti-enflamatuvar etkisinin yanında antioksidan ve antiapoptotik etkisi de vardır. Genellikle güvenli kabul edilir (GRAS) bir madde olarak bildirilen MSM, bilinen ve hafif yan etkilerinin az olması sebebiyle günde dört grama kadar dozlarda çoğu kişi tarafından iyi tolere edilir (Butawan vd., 2017).

Son yıllarda bir orgonasülfür olan MSM'nin apoptotik etkisinin olması, oksidatif stresi azaltması ve GRAS olarak bilinen bir madde olması sebebiyle kanser üzerindeki etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

MSM çeşitli in vitro çalışmalarda farklı kanser hücre hatlarında tek başına veya kombine etkileri araştırılarak metabolik ve fenotipik etkileri değerlendirilmiştir. MSM ve tamoksifen kombinasyonu, Jak2/STAT5b yolağını inhibe edip ve ER-pozitif meme kanseri ksenograftlarında tümör büyümesini ve metastazını sinerjik olarak inhibe ettiği (Nipin vd., 2015); MSM'nin, Meme Kanseri Büyümesini STAT3 ve STAT5b Yollarının Down regülasyonu ile baskıladığı (Lim vd., 2012); MSM'nin metastatik Murine 4t1 (66CL-4) hücre serisi meme kanser hücrelerinde ve insan meme kanser hücrelerinde anti-kanser aktivite gösterdiği (Caron vd., 2013); meme kanseri hücrelerinde ve melanoma hücrelerinde birden fazla hipoksik ve hipoksik olmayan metastatif hedefi engellediği (Caron ve Caron,

2015); MSM'nin, meme kanseri hücrelerinde STAT5b aracılığıyla HER2 ifadesini engellediği (Kang vd., 2016); MSM'nin, apoptozun aktivasyonu ile hepatik tümör gelişimini baskıladığı (Kim vd., 2014); MSM'nin p53, Bax, Bcl-2, sitokrom c ve PARP proteinlerini hedefleyerek LPS/IFN- γ -aktive edilmiş RAW 264.7 makrofaj benzeri hücrelerin apoptosisini modüle ettiği (Karabay vd., 2016); AG490, MSM'nin Jak2 inhibitörü kombinasyonunun sinerjistik olarak mesane tümör gelişimini Jak2/STAT3 yolu aracılığıyla baskıladığı (Joung vd., 2014); MSM'nin C2C12 miyoblastlarında kobalt klorürün neden olduğu hipoksik toksisiteyi hafiflettiği (Kang vd., 2022); demir metabolizmasının embriyonik kanser kök hücrelerinde metilsülfonilmetan kullanarak trail aracılı ekstrinsik apoptozu indüklemek için potansiyel bir mekanizma olduğu (Kang vd., 2021); MSM'nin endometrial kanser hücrelerini doksorubisine duyarlı hale getirdiği (Kowalska vd., 2021); metilsülfonilmetanın hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği ve HT-29 hücrelerinin kök hücre potansiyelini baskıladığı (Kang vd., 2020); metilsülfonilmetanın A549 akciğer kanseri hücrelerinde G2/M hücre döngüsünü durdurduğu ve içsela ölüm yolağı aracılığıyla proliferasyon ve apoptoz üzerinde etkisinin olduğu (Kim vd., 2020); MSM'nin apoptozu indüklediği ve prostat kanseri hücrelerinin yayılımını azalttığı (Kowalska vd., 2018); MSM'nin Yd-38 dişeti kanseri hücrelerinde G1 fazını durdurduğu ve mitokondriyal apoptozu indüklediği (Nipin vd., 2017) görülmüştür. MSM'nin yapılan bazı çalışmalarda hücre döngüsü durdurduğu, nekroz veya apoptoz indüksiyonu yoluyla hücrenin hayatta kalımını önleyerek bağımsız olarak kanser hücrelerine sitotoksik etkisinin olduğu kanıtlanmıştır.

MSM tarafından hücrenin gelişiminin ve çoğalmasının engellenmesi, transkripsiyonel ve/veya post transkripsiyonel basamaklarındaki metabolik değişimlerden olabilir. MSM STAT3 ve STAT5b gibi faktörlerinin etkilerini ve DNA'ya bağlanmayı önlemiştir. Lim vd. (2012), Nipin vd. (2014) Lim vd. (2012), Nipin vd. (2014) ve Kang vd. (2016); ayrıca P53 transkripsiyon faktörünü MSM'nin koruduğu Lim ve ark. (2012) tarafından bulunmuştur. MSM Jak2 fosforilasyonunun indirek etkisi STAT3'ün DNA bağlanmasını inhibe etmesi olabilir (Joung vd., 2014). Bununla birlikte STAT3 ve STAT5b'nin promotörlere bağlanmasını inhibe ederek vasküler büyüme faktörü (VEGF) (Joung vd., 2014); (Lim vd., 2012); (Nipin vd., 2015); (Caron, 2015)), ısı şok proteini (HSP)90 α (Lim vd., 2012), ve insülin benzeri büyüme faktör reseptörü-1 (IGF-1R) (Joung vd., 2014); (Lim vd., 2012); (Nipin., 2015) gibi onkogenik proteinlerin ekspresyonlarını azalttığı gözlenmiştir. MSM IGF-1R ve VEGF'nin ekspresyonu azaltmış insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) aracılı, hücre canlılığını ve çoğalmasını azaltarak tümör kaynaklı büyümeyi önlemeye yardımcı olabileceği düşünülmüştür (Park vd., 2015; Werner ve Bruchim, 2012).

Kanser hücre hatlarında yapılan in vitro çalışmalarda, MSM kanser hücrelerinin normal fenotipine geri döndürmüştür (Butawan vd., 2017). MSM ile tedavi, temas inhibisyonu ve hücre yaşlanmasının indüklenmesi (Caron vd., 2010; Caron ve Bannon , 2013; Caron ve Caron 2015; Caron vd., 2013) ve normalleştirilmiş yara iyileşmesi (Caron vd., 2010; Caron vd., 2013) ile sonuçlanır. Bu kısmen, mikrotübüllerin ayrılması ve dolaylı olarak yeniden birleştirilmesi (Caron ve Caron, 2015) ve aktin lokalizasyonunun yeniden düzenlenmesi dahil olmak üzere hücresel filamentlerdeki güçlü değişikliklere yorumlanabilir (Caron vd., 2010; Lim vd., 2012). Anjiyogenezi önlemenin bir hipoksi durumuna yol açabilmesine rağmen, MSM'nin hipoksik koşullar altında HIF-la düzeylerini azalttığı (Caron ve Caron , 2015; Lim vd., 2012) ve hipoksiye yanıt olarak çeşitli metastatik biyobelirteçleri önlediği veya iyileştirdiği de gösterilmiştir (Caron ve Caron, 2015).

Kanser hücreleri, MSM ile tedavi edilen hayvan modellerine transplante edildiğinde, tümör büyümesinin baskılandığı gözlemlenmiştir (Joung vd., 2014; Lim vd., 2012; Nipin vd., 2015), ancak bu çalışmalarda MSM AG490 (Joung vd., 2014) veya Tamoxifen (Nipin vd., 2015) ile kombine olarak kullanılmıştır. Yalnızca MSM ile tedavi edilen farelerden alınan tümör dokusunda, IGF-1R'nin önemli ölçüde baskılanması olmaksızın IGF-1, STAT3, STAT5b ve VEGF'nin ekspresyonunda düşüş gözlemlenmiştir (Lim vd., 2012). Kombinasyon tedavileri ile tedavi edilen ksenografli farelerden izole edilen dokuların her ikisi de STAT5b ve IGF-1R sinyallemede down regülasyonu sergilemiştir (Joung vd., 2014; Nipin vd., 2015). Önceki çalışmalar ayrıca, sıçanlarda kanseri indüklemekten yaklaşık bir hafta önce MSM ile ön tedavinin, tümörün başlamasına kadar olan süreçte önemli bir azalma ile sonuçlandığını ileri sürülmüştür (McCabe vd., 1986; O'Dwyer vd., 1988). MSM ile insanda kanser tedavisi denemeleri bugüne kadar yapılmamış olmasına rağmen yapılan bir çalışmada MSM kullanımı akciğer ve kolorektal kanser riskinde azalma olabileceğini düşündürmüştür (Satia vd., 2009). Yapılan çalışmalarda elde edilen in vitro ve in vivo sonuçlara bakılarak MSM'nin kanser tedavisinde kullanımının daha fazla araştırılmasının gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Bütün bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında MSM'nin, daha önce etkilerinin araştırılmadığı over kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin apoptoz ve otofaji sinyalleri üzerinden incelenmesi hedeflenmiştir.

1.1. Over Kanseri

Kadın üreme organlarının herhangi birinden kaynaklanan kanserlere jinekolojik kanserler denilmektedir. Over, endometrium, vulva, serviks ve vajen olarak sıralanabilir (Bray vd., 2018). Over kanseri ortaya çıkış nedenleri, gelişimsel özellikleri ve çok sayıda başka özellik bakımından farklılık gösteren heterojen bir malignite grubunu kapsar (Torre vd., 2018).

Over kanserinin ortaya çıkışını çevresel faktörler, genetik faktörler, coğrafi durum, sosyoekonomik durum, genetik, endokrin ve diyet etkilemektedir. Over kanserinin ortalama yaşı 58 olmasına rağmen risk yaşla birlikte artmaktadır (Rooth, 2013). Over kanseri tanısı alan hastaların %90'ı 40 yaşın üzerindeyken tanı alır, 30 yaşın altındaki kadınlarda over kanseri nadirdir. En yüksek görüldüğü yaş aralığı 75-79'dur (Torre vd., 2018).

Jinekolojik kansere bağlı ölümlerin en önde gelen sebebi over kanseridir. Yumurtalık kanseri her yaşta kadını etkiler, ancak en sık menopoza sonra 50 yaş üstü hastalarda daha sık görülmektedir. Hastalık erken evrelerde genellikle belirti vermediğinden ve geç evrede semptomlar spesifik olmadığından, hastalığa yakalanan kadınların %75'inden fazlası ileri evrede teşhis alır (Doubeni vd., 2016). Hastaların sıklıkla doktora başvurma nedenleri sürekli olan pelvik ve karın ağrısı, sebebi belli olmayan karında sürekli olan şişlik, sık idrara gitme ve idrara sıkışma hissidir. Over kanseri için spesifik olmasa da ilk tanı için vajinanın ultason ile incelenmesi ve serum kanser antijeni CA-125 ölçümü yapılır. Tanı konulduktan sonra cerrahi olarak tümörlü bölgenin alınır ve ardından kemoterapiye başlanır. Tedavinin bundan sonraki kısmı kanserin evresine ve derecesine bağlı olmasına rağmen kanserin genetik biçimi de tedaviyi şekillendirir. (Roett ve Evans, 2009).

1.2. Over Kanseri Epidemiyolojisi ve İnsidansı

2020 itibarıyla yumurtalık kanseri, yaklaşık 313,959 yeni vaka ile dünya genelinde kadınlarda en sık görülen yedinci kanserdir (Sung vd., 2021). Global kanser istatistikleri 2018 yılı verilerine göre; 295,414 olan bu sayı 2020 yılında artış göstermiştir (Bray vd., 2018). Amerika Birleşik Devletleri ve Afrika ülkelerinde fazla görülme sıklığına sahip over kanseri Japonya'da en düşük sıklıkla görülmektedir. 2020 yılında dünya genelinde over kanseri teşhisi konmuş kadınların yaklaşık 207,252 tanesi bu hastalıktan hayatını kaybetmiştir (Sung vd., 2021). Over kanserinde beş yıllık sağ kalım oranları %45'in altında olduğundan kansere bağlı ölümlerin sekizinci sırasında yer alır (Webb ve Jordan, 2017).

Over kanseri asemptomatik seyrettiği için evre III veya IV'de tanı alınan hastaların oranı %70'dir. Geç tanı konulduğu için bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %29'dur. Erken teşhis konulan hastaların da %15'inin tanıdan sonraki 5 yılda sağ kalım oranı %92'dir (Mallen vd., 2018). Over kanseri insidansını ve genel olarak mortaliteyi azaltmada ilerleme kaydedilmiş olsa da, ırksal farklılıkların kaynağını belirlemek ve over kanserinin erken tespiti ve önlenmesi için etkili mekanizmaları belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Torre vd., 2018).

Türkiye istatistiklerinde bakıldığında ise tüm tüm yaş gruplarından kanser tanısı almış kadınların %6.3'ü over kanseri tanısı almış ve 7. en sık görülen kanser olmuştur. (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017).

1.3. Over Kanseri Sınıflandırılması

Yumurtalık tümörleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından histogenetik ilkelere dayanarak sınıflandırılmaktadır ve bu sınıflandırma, yumurtalık tümörlerini köken almalarına göre sölomik yüzey epitel hücreleri, germ hücreleri ve mezenşimden (stroma ve seks kordu) oalarak adlandırılır. İyi huylu yumurtalık tümörleri epitelyal yumurtalık tümörleri seröz, endometriyoid, müsinöz ve berrak hücreli olmak üzere 4 tipe ayrılır (McCluggage, 2011).

1.4. Over Kanseri Risk Faktörleri

Over kanserinde en sık görülen belirtilerin sebepsiz ve sürekli karın ağrısı, sebepsiz sürekli karın şişliği, idrar sıklığının artması gibi spesifik olmayan belirtiler olması ve hastalığın etiyolojisinin de hala tam olarak belirlenememiş olması sebebiyle risk faktörlerinin tanımlanmış olması son derece önemlidir. (Riman vd., 2004).

Over kanserinde risk faktörleri değiştirilebilir veya değiştirilemez olarak sınıflandırılmıştır. Değiştirilebilir faktörler sigara, hormon replasman tedavisi ve beslenme iken değiştirilemeyen faktörler ırk, ovulasyon döngüsü, BRCA1/BRCA2 mutasyonu, aile öyküsü, lynch sendromu ve endometriyozistir (Stewart vd., 2019).

Over kanseri oluşumunda aile öyküsünde meme ve over kanseri olması dikkat edilmesi gereken en önemli faktördür. Tümör baskılayıcı genler olarak adlandırılan BRCA1

ve BRCA2'nin mutasyonları meme ve over kanseriyle doğrudan bağlantılıdır (Slatnik ve Duff, 2015).

Diğer bir faktör ise hormonal dengedir. Jinekolojik kanser gelişme riskinin hormonal dengesi bozulan kadınlarda arttığı gözlemlenmiştir. Meme, endometriyal ve over kanseri gelişme riskini arttıran diğer bir hormonal bozukluk da uzun süre yüksek düzeyde östrojen hormonunun kullanılması progesteron ile dengelenemediğinden dolayı homeostazisin bozulmasıdır. (Beral vd., 2005).

Over kanseri oluşumu riskinin emzirme ve hamilelik döneminde ovulasyonun durmasına bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Over kanseri gelişimi 6 aydan daha az emzirenlerde %21, 6 ay ile 12 ay arasında emzirenlerde %28 ve 13 aydan daha uzun süre emzirenlerde %33 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Friebel vd., 2014).

Tüm bu sebeplere bakarak, ovulasyonun azaldığı oral kontraseptif kullanımı, emzirme, hamilelik, çoklu doğum, erken menopoz gibi faktörler over kanseri riskini azaltırken; düşük adet görme yaşı, azalmış doğurganlık, infertilite ve geç menapoz over kanseri riskinin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Hem genel popülasyonda hem de BRCA1 ile BRCA2 mutasyonuna sahip kadınlarda 10 yıl oral kontraseptif kullanımı %50 oranında over kanseri gelişme riskini azaltmaktadır (Ali, 2018).

Over kanseri gelişiminde risk faktörü olarak genetik mutasyon kadar önemsenmesede etnik sınıf yine de göz önüne alınmaktadır. Beyaz kadınlarda over kanseri insidansı %'de 0,0122, İspanyol kadınlarda %'de 0,0106, Asya ile Pasifik Adaları bölgesinde %'de 0.0095 siyahi kadınlarda %'de 0.0094' dür (Peres vd., 2018).

1.5. Apoptoz

Apoptoz fizyolojik ve patolojik rolleri olan ve yürütülmesi için protein sentezi gerektiren aktif bir süreçtir (Walker vd., 1988). Kerr ve arkadaşları ilk kez 1972 yılında apoptozu ölen hücrelerin çekirdeklerinde nükleer fragmentasyon olarak görmüş ve organellerin iyi korunduğunu farkederek bu olayı “büzüşme nekrozu” olarak adlandırılmışlardır (Soria vd., 2002).

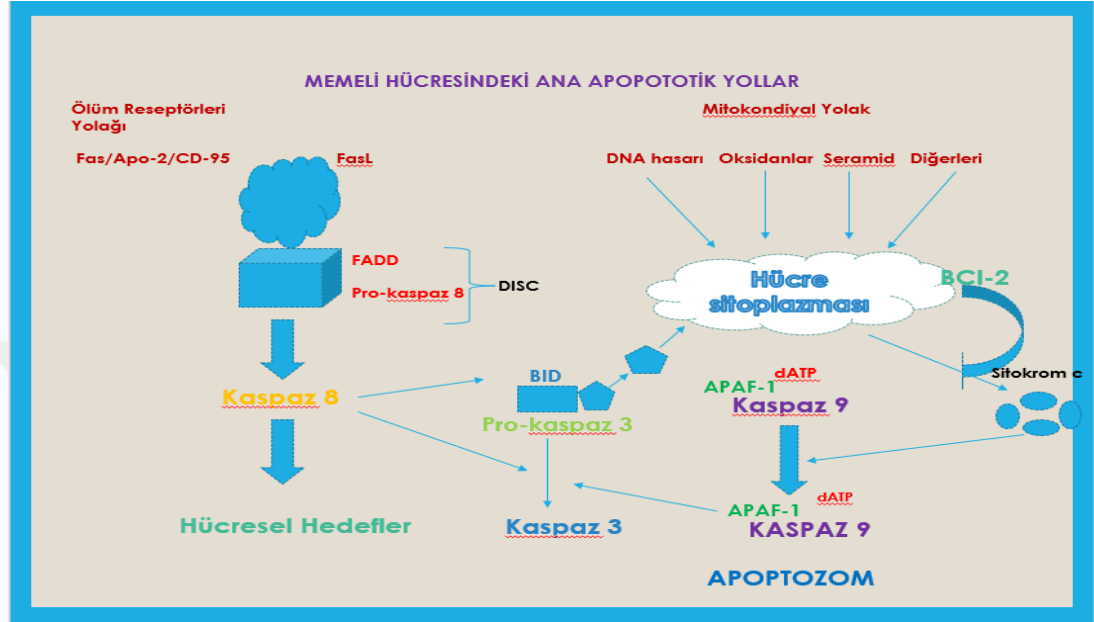
Apoptoz, evrim sırasında çok hücreli organizmaların çevresel saldırılara karşı geliştirdiği hücrenin aktif olarak kendi ölümünü indüklediği fizyolojik mekanizmalardan biridir. Nekroz genellikle şiddetli fiziksel veya kimyasal hücre dışı faktörlere ve dokunun

enflamatuvar reaksiyonlarının bir sonucu olarak meydana gelirken apoptoz ve genellikle hücrenin içinden inflamasyon belirti ve semptomları olmadan başlar (Elmore, 2007). Apoptoz, vücutta belirli organ ve dokularda işlevini kaybeden hücreler ile yenilerinin oluşumu arasındaki dengenin kurulması için önemlidir. Ek olarak, bir organizmanın bir dizi patolojik duruma özel bir cevabıdır. Apoptoz, bir organizmanın yaşamı boyunca meydana gelen fizyolojik ve patolojik süreçlerinde hayati bir rol oynar. Yoğun bir apoptotik süreç olmadan normal bir embriyo ve fetüs gelişimi mümkün değildir. Apoptotik süreçlerin düzgün çalışmaması insanlarda ve hayvanlarda bazı hastalıkların oluşumu ile ilişkilidir (Pistritto vd., 2016).

Morfolojik olarak apoptoz, nükleer kromatin ve sitoplazmanın yoğunlaşmasını, çekirdeğin parçalanmasını ve organellerin başlangıçta sağlam olduğu zara bağlı cisimler üretmek için tüm hücrenin tomurcuklanmasını içerir (Walker vd.,1988). Erken aşamada, çoğu hücre tipinde yoğun kromatin nükleer zarfın etrafında hilal şeklinde kenarlara ayrılma eğilimindedir, ancak timositler gibi bazı hücrelerde genellikle nükleer hacmin çoğunu kaplar (Hiramine, 1997). Apoptotik hücreler, zara bağlı apoptotik cisimlere bölünür ve o bölgedeki doku hücreleri tarafından fagosite edilir. Bu değişikliklere genellikle internükleozomal DNA parçalanması eşlik eder. Buna ek olarak apoptoz, fizyolojik uyarana yanıt olarak gelişen ve de novo gen ekspresyonu lazım olan programlanmış hücre ölümünün (PCD) temsili bir morfolojisidir (Elmore, 2007). Apoptozda görülen biyokimyasal değişiklikler, kromozomal DNA'nın internükleozomal parçalara bölünmesini, fosfatidilserin eksternalizasyonunu ve spesifik proteoliz yoluyla kaspazlar olarak bilinen protein ailesinin aktivasyonunu içerir (Ouyang vd.,2012).

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, gen seviyesinde hassas bir şekilde düzenlenir ve DNA hasarından sonra veya gelişim sırasında meydana gelen hasarlı hücrelerin düzenli ve verimli bir şekilde çıkarılmasıyla sonuçlanır (Fuchs ve Steller, 2011). Apoptoz mekanizması karmaşık bir çok sinyal yolağıyla meydana gelir. Apoptoz, bir hücrede kaspaz aracılı içsel veya dışsal yollar yoluyla tetiklenebilir. Şekil 1.1'de içsel ve dışsal yollar gösterilmiştir. Efektör, apoptotik kaspazları her iki yolu aktive etmek için birleşir ve sonuçta apoptozun özellikleri olan biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerle sonuçlanır (Wong, 2011). Bunların dışında granzim B veya granzim A yoluyla Perforin/granzim yolunun indüklendiği T-hücresi aracılı sitotoksositeye bağlı olarak hücrenin ortadan kaldırılmasını içeren bir yol daha vardır. Bu üç farklı yol aynı terminalde veya basamakların birinde birleşir. Kaspaz-3'ün parçalanmasıyla başlayan bu yol DNA'nın parçalanması, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin bozulması, proteinlerin çapraz

bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler tarafından alınması ile sonuçlanır. Granzim A yolu, kaspazdan bağımsız tek sarmallı DNA hasarı yoluyla hücre ölüm yolunu aktive eder (Lieberman, 2005).



Şekil 1.1. Apoptozun memeli hücresindeki içsel ve dışsal yolları

Sitokinler, TNF, DNA hasarıyla birlikte baskılayıcı gen olan p53'ün aktive olması, glukokortikoidler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, enfeksiyonlar, ve onkojenler (cmyc gibi) apoptozu başlatan bazı hücre içi uyaranolardır (Bossy-Wetzel vd.,1998). Organizmada apoptozu uyaranol ve baskılayan çok sayıda gen bulunmaktadır (Elmore, 2007).

1.5.1. Apoptozda Rol Oynayan Sinyal Yolakları

1.5.1.1. Apoptozun Dışsal Yolağı

Ekstrinsik apoptotik yol ölüm liganları olarak da bilinen tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesinin bir alt kümesi olan hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin ilgili aktive edici sitokin liganları ile birleşmesiyle başlar (Fulda, 2009; Guicciardi ve Gores, 2009; Khosravi-Far ve Espoti, 2004). Apoptotik sinyalin iletiminden sorumlu ölüm bölgeleri [Death domain (DED)] içeren bu ailenin tüm üyeleri yaklaşık 80 intrasellüler aminoasitten oluşan protein yapıdadırlar. Tanımlanan ölüm reseptörlerinden Tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) en iyi bilinenlerdir ve bunların liganları sırasıyla TNF ve Fas

ligandı (FasL) olarak adlandırılır (Hengartner, 2001). Prokaspaz 8 ve 10 ölümüne neden olan sinyal kompleksi (DISC) oluşturmak için adaptör proteinler olarak ölüm reseptörlerine alınan TNF reseptörü ile ilişkili death domain (TRADD) ve Fas ile ilişkili death domain (FADD) adaptör proteinlere bağlanır. Kaspaz 8 ve 10 bu kompleks yapı tarafından aktive edilir (Schneider ve Tschopp, 2000). Aktive olan kaspaz 8 ve 10, yürütücü kaspazlar olan cellat kaspazlar olarak da bilinen kaspaz 3, 6 ve 7'yi aktive eder, hücre ölümüne sebep proteinlerin ve hücre iskeletinin imhası başlar. Bundan farklı olarak kaspaz-8, Bcl-2 ailesine ait proapoptotik Bid'i parçalayarak mitokondriden sitokrom C salınımına neden olur ve intrinsik yolu aktive eder (O'Brien,2008, Karp,2008) Wang,2013).

1.5.1.2. Apoptozun İçsel Yolağı

İçsel apoptoz, , iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu genotoksik hasar, büyüme faktör eksikliği, oksidatif stres, mitokondriyel hasar, ER stresi gibi nedenler sonucu aktive olur. İç hasar durumunda Bcl-2 ailesine ait mitokondri dış membranında bulunan iki proapoptotik üye olan Bax, Bad ekspres olur ve Apaf-1 molekülüne bağlanarak Apaf-1'i serbestleştirir ve MOMP artar. (Koff, 2015; Wang, 2013). Artmış MOMP ile birlikte mitokondride bulunan sitokrom C sitozole salınarak serbest kalan Apaf-1 ile kaspaz-9 molekülüne bağlanır. Kaspaz-9, Sitokrom C, Apaf-1 ve ATP'den meydana gelen bu yapıya apoptozom denilir ve bununla birlikte kaspaz kaskadı başlatılmış olur (Kadam, 2015). Aktif hale gelen kaspaz-9 kaspaz 3 ve kaspaz 7'yi aktive eder. Kaspaz kenzimleri, DNA'yı parçalayan endonükleazları aktive ederler. Bu aşamadan sonra apoptotik hücreler, internükleozomal DNA kırılımını gerçekleştirirler (Seyrek, 2011).

BCL-2 protein ailesi ve kaspazlar apoptozun başlaması, ilerlemesi ve düzenlenmesinde önemi rol oynarlar.

1.5.1.3. Kaspazlar

Kaspazlar, yüksek oranda korunmuş aspartat spesifik sistein proteazları ailesine aittir ve çok hücreli organizmalarda bulunan interlökin-1 β -dönüştürücü enzim ailesinin üyeleridir (Black,1989).

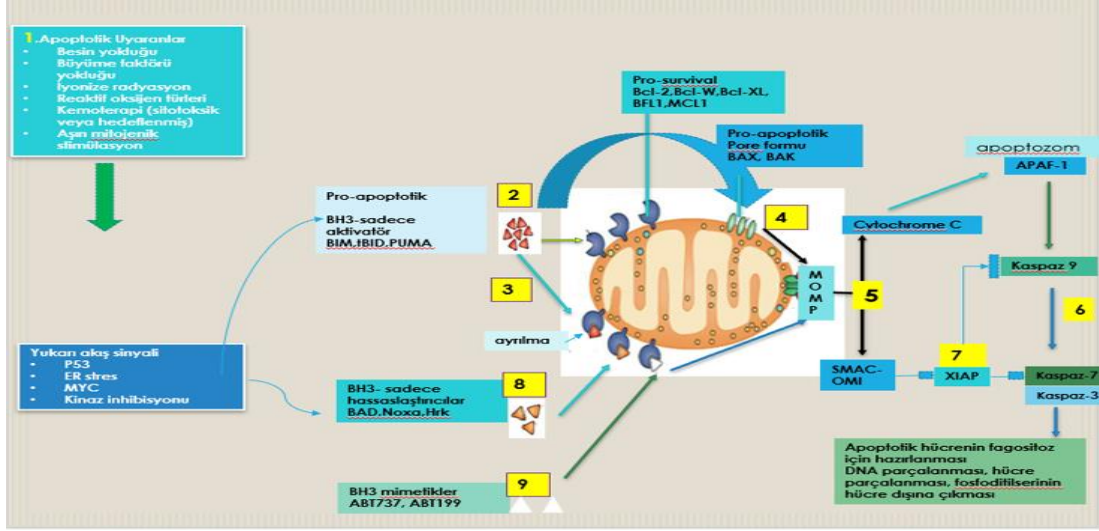
İnflamatuar kaspazlar ve apoptotik kaspazlar olmak üzere iki ana alt gruba ayrılan kaspaz ailesinin 15 üyesi bulunur (Cotter ve al-Rubeai, 1995). Başlatıcı kaspazlar ve uygulayıcı kaspazlar apoptotik kaspazlar grubuna dahildir. Kaspazlar, hücre kaderinin

1.5.1.4. Bcl-2 Ailesi

Birçok hücre sisteminde apoptozu inhibe eden ilk gen olarak tanımlanan Bcl-2 geni ilk kez foliküler lenfoma B hücrelerinde bulunmuştur (Arya,2016; Laban,2015). Bir hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceği Bcl-2 gen ailesine bağlıdır. Bcl-2 ailesi üyeleri kendi aralarında homodimer ve heterodimerler oluştururlar ve apoptoza gidip gitmeyeceği bu aile üyeleri arasındaki dengeye bağlıdır. (Coşkun, 2001). Bcl-2 gen ailesi, anti-apoptotik ve proapoptotik proteinler olmak üzere ikiye ayrılır ve hücrenin apoptozun içsel yolağının düzenlenmesinden sorumludurlar. Proapoptotik proteinlerin fazla olduğu hücreler apoptoza daha fazla eğilimliken; antiapoptotik proteinlerin fazla olduğu hücreler apoptoza daha az eğilimlidir (Iqbal,2004). Bcl-2 ailesi proteinlerinin Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-xL, A1 ve Bcl-B anti-apoptotik üyeleri ve iki proapoptotik kategorinin Bax ailesi (Bax, Bak, Bok) tüm BH domainlerine (BH1-BH3) sahipken, Bad, Bim, Noxa, Bid, , Hrk, Bik, Bcl-xs, Nip3, Bmf ve Puma sadece BH3 domaini içeren proapoptotik aileyi oluşturur ((Luna-Vargas ve Chipuk, 2016; Siddiqui vd., 2015).

Bu ailenin üyeleri mitokondriyal dış zarın [mitochondrial membrane (MOM)] bütünlüğünü düzenlerler ve bunun sonucunda hücrenin sağ kalımı veya ölüm kararı belirlenmektedir. Propapototik proteinler apoptozda indükleyici rol oynayan sitozoldeki Sitokrom C ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör)' ün salınımının düzenli artışını sağlayarak rol oynarlar. Mitokondrinin dış zarında, çekirdek zarında ve endoplazmik retikulumda bulunan antiapoptotik üyeler ise iyon transportunu gerçekleştirmek için por oluşumunu sağlayarak iyon taşınımını düzenleyici mekanizmada görev yaparlar. Özellikle hücrelerde bulunan Ca^{++} miktarını düzenlerler ve kaspazlar için öncül form olan AIF ve sitokrom C salınımını durdurarak apoptozun inhibisyonuna neden olurlar (Singh vd.,2019). Mitokondride apoptozun Bcl-2 proteinleri tarafından düzenlenmesinin şematik gösterimi Şekil 1.3'de sunulmaktadır.

BH3 bölgesinde, Bcl-2 ailesinin ana rolü, mitokondriyal membran geçirgenliğini düzenlemektedir ve bunun sonucunda apoptojenik faktörler intermembran boşluktan sitoplazmaya salınır. Bcl-2 üyeleri lipid peroksidasyonunu azaltır, çekirdeğe Ca alım inhibisyonu yapar ve kaspaz 6 inhibisyonuna sebep olurlar (Warren vd., 2019). Apoptoz inhibisyonu yapan Bcl-xL mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi korurken Bcl-2 ise pro-oksidan gibi davranarak reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini kontrol eder (Tsujimoto, 1998).



Şekil 1.3. Mitokondride apoptozun Bcl-2 proteinleri tarafından düzenlenmesi

Bid, Bad ve Bim mitokondride sitozolik lokasyona sahiptir. Ölüm sinyalinden sonra, BH3 bölgesi proteinleri, Bax/Bak benzeri proteinler gibi pro-apoptotik proteinlere izin veren anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini nötralize ederek ve ya azaltarak apoptozu indükleyebilir. Bu tür modifikasyonlar, proteinlerin aktivasyonları ve dış alandaki mitokondriyal membrana (OMM) translokasyonu ile sonuçlanır; bu da çok bölgeli pro-apoptotik elemanlar olan Bax/Bak benzeri proteinler ile etkileşime girmesine ve oligopolimerizasyonuna ve gözenek oluşumuna yol açar. Bu gözenek, apoptoz süreçlerini arttıran diğer apoptotik proteinlerin intermembran boşluğa salınmasına da yol açabilir (Warren vd., 2019).

Genel olarak, Bcl-2 entegre bir proteindir, anti-apoptotikler pro-apoptotiklerin aktivitesini nötralize ederse BH3 proteinlerine bağlanır ve MOMP'u önleyerek azaltır; nötralize edemezse Bax oligomerizasyonu gerçekleşir ve hücre apoptozu gider. Hücre sağ kalımının antiapoptotik (Bcl-2) ve pro-apoptotik (Bax ve sadece BH3 içeren proteinlerin) nispi oranı, apoptotik uyarılara karşı hücre duyarlılığını veya direncini belirlemektedir (Bcl-2/ Bax) (Tsujimoto, 1998).

Bcl-2 ailesinin üyelerinde meydana gelen dengesizliklerin bazı hastalıkların patolojisinde rol oynadığı ve hücrelerde apoptozun doğru olarak yürütülemediği gözlemlenmiştir. Bazı anti-apoptotik proteinlerin çok fazla baskılanması, bir ya da birden fazla proteinin down regüle olması ya da her ikisiyle de alakalı olarak ortaya çıkabildiği düşünülmektedir. Kolorektal kanserin Bcl-xL'in aşırı baskılanması sonucu ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Liu vd., 2021). Büyük hücreli B-cell lenfoma (DLBCL) Melanoma, prostat kanseri gibi birçok kanser türünde ise anti-apoptotik Bcl-2' nin aşırı artışı gözlemlenmiştir

(Nipin vd., 2021; Renner vd., 2017; Stanoszek vd., 2021). Anti-apoptotik bileşenlerde meydana gelen bu artışlar kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncine yol açabilir ve bu da apoptoza girmeyi zorlaştırır (Kontos vd., 2014).

1.6. Otofaji

İlk olarak 40 yıl önce Christian de Duv tarafından keşfedilen ve Yunanca 'kendini yemek' anlamına gelen 'otofaji' büyük ölçüde pankreas hormonu glukagon ile perfüze olmuş sıçan karaciğerinin lizozomlarında mitokondri ve diğer hücre içi bozulmasına dayandırılmıştır (Deter ve De Duve, 1967).

Lizozom bağımlı katabolik bir süreç olan otofaji, yüksek oranda korunmuştur. Hücrel homeostaziye aracılık eden otofajik aktivite ücreleri korumak için esastır. Besin açlığı, hipoksi, ER stresi patojen enfeksiyonu, gibi farklı stres biçimlerine fizyolojik bir yanıtır (Kuma, 2017). Temizlik rolü gören otofaji hücre içi patojenlerin ortadan kaldırılmasında, mitokondri, endoplazmik retikulum ve peroksizomlar gibi hasarlı organellerin temizlenmesinde, yanlış katlanmış veya kümelenmiş proteinlerin çıkarılmasında görev alır (Glick vd., 2010).

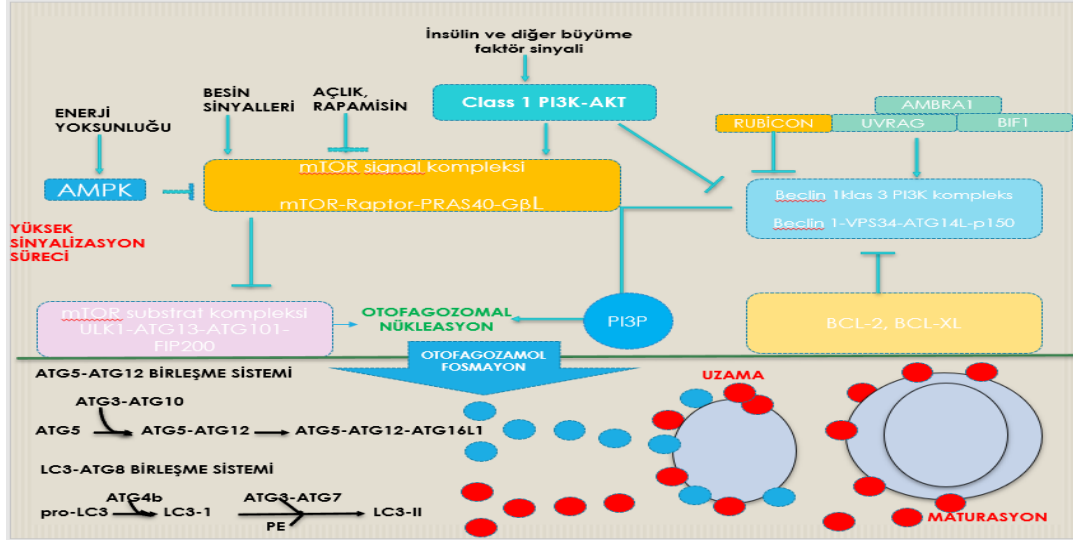
Otofaji makro-otofaji, mikro-otofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç tipte tanımlanmıştır. Makrotofajide lizozom sitoplazmada bulunan ve hücrel içerikte bulunan uzun ömürlü proteinler, toplanmış proteinler, hasarlı organeller ve hücre içi patojenler gibi büyük bölümler ile birleşerek bir otolizozom oluşturur ve otofagozom adı verilen çift membranlı bir vakuol içine alır. Otolizozomal içerikleri bozarak makromolekülleri yeniden kullanıma uygun hale getirir. Mikro-otofajide, aksine, sitozolik bileşenler, lizozomal zarın invajinasyonu yoluyla doğrudan lizozomun kendisi tarafından alınır. CMA yolu (şaperon aracılı otofaji), lizozomla ilişkili membran proteini tip 2A (LAMP-2A) ile etkileşime girerek hedef proteinleri lizozomal membranlar üzerinden lizozomal lümene iletir. Sonuç olarak şaperon aracılı otofaji, veziküler izleme gerektirmediği için diğer otofaji türlerinden farklıdır. (Saftig vd., 2008). Otofajik aktivitede meydana gelen anormallikler kanser dahil çeşitli metabolik ve nörodejeneratif hastalık patogenezlerine yol açabilir (Choi vd., 2013).

1.6.1. Otofaji Mekanizmasının Düzenlenmesi

Otofajik yol, çevresel uyarılara yanıt verir. Besin sinyalleri, rapamisinin (mTOR) memeli (mekanistik) hedefine bağlı bir sinyal yolunu modüle eder. mTOR Sınıf I

fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)–Akt, otofajinin negatif olarak düzenleyen insülin ve diğer büyüme faktörü sinyallerine cevap olarak aktive olur. Akt ayrıca Beclin 1'i fosforile ederek otofajiyi negatif olarak düzenleyebilir. AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), mTOR'u negatif yönlü olarak düzenler. Enerji tükenmesine yanıt olarak otofaji düzenleyicisi UNC-51 benzeri kinaz 1'i (ULK1) doğrudan fosforile eder, böylece pozitif olarak hareket eder.

MTOR proteinini, mTOR sinyal kompleksi 1'de bulunur (mTOR'un düzenleyicisiyle ilişkili proteinini [Raptor], G proteini beta alt birimi benzeri proteinini [GβL] ve prolin bakımından zengin Akt/PKB substratı 40 kDa [PRAS40] içeren mTORC1)) Bu da memeli koordine edilmemiş-51 benzeri protein kinaz ULK1, ATG13, ATG101 ve FIP200'den oluşan mTOR substrat kompleksini düzenler. Oratmdaki besin yeterli olduğunda, mTORC1, ULK1 aktivitesini baskılar, sonuç olarak otofajinin aktivasyonunu baskılanır. Ayrıca sınıf III fosfatidilinositol-3-kinaz (PIK3C3 veya VPS34), Beclin1, ve ATG14L'den oluşan Beclin1-etkileşimli kompleksin de otofajinin düzenlenmesinde rolü vardır. Bu kompleksin uyarılması, PI3P üretimini artırır ve ATG14L'nin yerini geçen UVRAG ve BIF1, otofaji/beklin-1 düzenleyici 1 (AMBRA1) ve varsayılan negatif düzenleyici Rubicon dahil olmak üzere, bu düzenlemeye etkileşim halinde olan birkaç faktör dahil olabilir. Otofagosomal uzamanın olabilmesi için iki ubikuitin benzeri proteinin konjugasyonu gereklidir. Ubikuitin benzeri protein ATG12, ATG7 (E1 benzeri) ve ATG10 (E2 benzeri) enzimleri tarafından ATG5'e bağlanır. ATG5-ATG12 kompleksi otofajik zarın uzamasında rol oynayan ATG16L1 ile bir kompleks olur. Ubikuitin benzeri protein mikrotübül ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3'ü (LC3, ATG8) ikinci bir konjugasyon sistemine ihtiyaç duyar. LC3 ve homologları, hücrel lipid fosfatidiletanolamin (PE) ile düzenlenir. LC3, LC3-I formunu oluşturmak için proteaz ATG4B tarafından bölünür. PE'nin LC3-I ile konjuge hali, ATG7 ve ATG3 oluşması sırasıyla oluşur. Memelilerde, LC3-I'in (serbest form) LC3-II'ye (PE- dönüşümü, otofagozom meydana gelmesi için önemli adımlardan biridir. (Mizushima ve Levine, 2020; Onorati vd., 2018; Ouyang vd., 2012). Otofaji mekanizmasının düzenlenmesi Şekil 1.4'de sunulmuştur.



Şekil 1.4. Otofaji mekanizmasının düzenlenmesi

1.7. Metilsülfonilmetan (MSM)

Dimetil sülfon, metil sülfon, sülfonilbismetan, organik kükürt veya kristalli dimetil sülfoksit gibi çeşitli isimlerle adlandırılan kan dolaşımında ve anne sütünde bulunan normal bir oksidatif metabolit olan; tamamlayıcı ve alternatif bir ilaç (CAM) olarak da kullanılan doğal olarak oluşan bir organosülfür bileşiği olan Metilsülfonilmetan (MSM), ağrı, iltihaplanma, alerji, artrit, parazit enfeksiyonları, saç, cilt ve tırnaklarda normal keratin seviyelerinin korunması gibi çeşitli durumlarda kullanılan popüler bir besin takviyesidir (Bertken, 1983; Horváth vd., 2002). MSM dozuna ilişkin kanıtlar mevcuttur ancak optimal faydaları sağlamak için gereken kesin dozu ve tedavi süresini belirlemek için ek çalışmalar devam etmektedir. Çoğu kişi tarafından günde dört grama kadar dozajlarda iyi tolere edilebilen MSM Genel Olarak Güvenli Tanınan (GRAS) onaylı bir maddedir ve bilinen çok fazla bir yan etkisi yoktur (Sousa-Lima vd., 2016).

Klinik bir uygulama olarak kullanılmadan önce, MSM, ana bileşiği dimetil sülfoksit (DMSO) gibi öncelikle yüksek sıcaklıkta, polar, aprotik, ticari bir çözücü olarak kullanılmıştır (Clark vd., 2008). 1950'lerin ortalarından 1970'lere kadar, DMSO, diğer ajanların birlikte taşınmasıyla ve tek başına membrana nüfuz edebilmesi, antioksidan yetenekleri, anti-inflamatuar etkileri, mast hücrelerinden histamin salınımını indüklemesi, antikolinesteraz aktivitesi ve yeteneği dahil olmak üzere benzersiz biyolojik özellikleri için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Clark vd., 2008). Williams ve meslektaşları (Williams, Burstein, Layne, 1966; Williams vd., 1965) tavşanlarda DMSO'nun metabolizmasını

inceledikten sonra, diğerleri DMSO'ya atfedilen bazı biyolojik etkilerin kısmen onun metabolitlerinden kaynaklanabileceğini öne sürdüler (Kocsis vd.,1975).

Eksojen MSM kaynakları meyveler (Kocsis vd., 1975; Pearson, Dawson, Lackey, 1981), sebzeler (Kocsis vd., 1975; Pearson vd., 1981; Winning vd., 2009), tahıllar (Moazzami vd., 2011; Pearson vd., 1981), bira (Pearson vd., 1981), porto şarabı (Silva vd.,2003), kahve (Pearson vd., 1981), çay (Pearson vd.,, 1981) ve inek sütüdür(Pearson vd., 1981; Williams vd., 1966). Diyetle indüklenen mikrobiyom değişikliklerinin, sıçanlarda (Palmnäs vd., 2014) ve gebe dişi domuzlarda (Palmnäs vd., 2014) serum MSM düzeylerini etkilediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, bağırsak florası diyet (Gerhards ve Gipian, 1967), egzersiz (Cerdá vd., 2016) veya diğer faktörler tarafından kolayca manipüle edilir (Pinto vd., 2015).

MSM, sıçanlarda yaklaşık 12.2 saatlik biyolojik bir yarı ömür sergilemiş ve dokularda homojen dağılımı göstermiştir (Magnuson vd., 2007). Beyin omurilik sıvısında tespit edildiğinden ve beynin gri ve beyaz maddesi arasında eşit olarak dağıldığından, insanlarda doku dağılımı da muhtemelen yaygındır (Cecil vd., 2002; Lin vd., 2001; Rogovin, 2002; Willemsen, Engelke vd., 2006). Ayrıca, beyindeki biyolojik yarı ömür tahmini 7,5 saattir (Rose vd., 2000), genel yarı ömrün ise 12 saatten fazla olduğu öne sürülmektedir.

1.7.1. MSM'nin Etki Mekanizması

MSM'nin tam mekanik işlevi, bazı değişik hücre tiplerini içerebildiğinden zarlara nüfuz etme ve tüm vücuda nüfuz etme kabiliyetinin artması nedeniyle açıklanması zordur. MSM'nin transkripsiyonel ve hücre altı düzeyde inflamasyon ve oksidatif stresin engellenmesinde rolü olduğu yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Bu organo sülfür bileşiğinin küçük boyutu nedeniyle, doğrudan ve dolaylı etkileri arasında ayırım yapmak güçtür ancak birden fazla etkiye sahip olduğu da görülmektedir (Butawan vd., 2017).

1980'li yılların başından beri aydınlatılmaya çalışılan MSM' nin etki mekanizması MSM'nin anti-inflamatuvar, antioksidan, serbest radikal süpürücü, bağışıklık modülatörü özellikleri ve kanseri önleme mekanizmaları üzerinden aydınlatılmaya çalışılmıştır.(Grimble, 2006).

In vitro çalışmalar, MSM'nin aktive edilmiş B hücrelerinin (NF-κB) nükleer faktör kappa-hafif zincir güçlendiricisinin transkripsiyonel aktivitesini (Joung vd., 2016; Kim vd.,

2009) çekirdeğe translokasyonu engelleyerek ve aynı zamanda NF- κ B'nin bozulmasını önleyerek inhibe ettiğini göstermektedir (Kim vd., 2009). MSM'nin, Serin-536'da p65 alt biriminin fosforilasyonunu bloke etme dahil olmak üzere modifikasyonlarını değiştirdiği gösterilmiştir (Kloesch vd., 2011), ancak bunun doğrudan mı yoksa dolaylı bir etki mi olduğu belirsizdir. Bunlar gibi alt birimlerde yapılan modifikasyonlar, NF- κ B'nin (Christian vd., 2016) transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesine büyük ölçüde katkıda bulunur ve bu nedenle, bu anti-inflamatuvar mekanizmayı daha fazla anlamak için daha fazla ayrıntı gereklidir. NF- κ B yolunun genel olarak sitokinleri, kemokinleri ve adezyon moleküllerini kodlayan genlerin yukarı yönlü düzenlenmesinden sorumlu proinflamatuvar bir sinyal yolu olduğu varsayılır (Lawrence, 2009). MSM NF- κ B üzerinde baskılayıcı etki yaparak, in vitro olarak interlökin (IL)-1, IL-6 ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) için mRNA'nın aktivitesinin azalması ile sonuçlanır (Lawrence, 2009). Bunun sonucunda bu sitokinlerin transkripsiyon ekspresyonunda azalması beklenir; ayrıca IL-1 ve TNF- α doza bağlı olarak inhibe edilir (Lawrence, 2009).

MSM, NF- κ B yolunu baskılar ve buna bağlı olarak indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunun azalır sonuç olarak da nitrik oksit (NO) ve prostanoidler gibi vazodilatör ajanların üretiminin azaldığı gözlemlenir (Kim vd., 2009). NO'nin vasküler tonusu düzenlemesinin yanında (Tousoulis vd., 2012), mast hücre aktivasyonunu da düzenleme etkisi de vardır (Coleman, 2002); bunlara bağlı olarak, MSM, inflamasyonun oluşumunda mast hücre aracılığıyla engelleyici bir role sahip olabilir. Sitokinlerin ve vazodilatör ajanlar oluşumunun azalması immün hücrelerin lokal inflamasyon bölgelerine akışı ve alımı engeller.

Hücre altı düzeyde, nükleotid bağlama alanı, 3 (NLRP3) inflamatuvar etkilere duyarlı lösin açısından zengin pürin alanı, hücrel stres sinyallerini algılar ve inflamatuvar belirteçlerin olgunlaşmasına yardımcı olarak yanıt verir (Nipin vd., 2015; He vd., 2016). MSM, NLRP3 inflamatuvar transkriptinin NF- κ B üretimini down regüle ederek ve/veya mitokondriyal üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) (Ahn vd., 2015) biçimindeki aktivasyon sinyalini bloke ederek NLRP3 inflamatuvarının ekspresyonunu olumsuz etkiler.

Normalden fazla miktarda ROS, hücreler üzerinde hasara yola açabilir ancak fenotipik olarak normal hücrelerde bazı yolları uyarmak için belirli miktarda olması gereklidir (Dan Dunn vd., 2015). MSM'nin antioksidan etkisi ilk olarak nötrofil ile uyarılan ROS üretiminin in vitro baskılandığında ancak hücresiz bir sistemde etkilenmediğinde fark

edildi (Beilke vd., 1987); bu nedenle antioksidan mekanizmanın kimyasal düzeyden çok mitokondriye etki ettiği öne sürülmüştür.

MSM, NF- κ B, sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT), p53 ve nükleer faktör (eritroidden türetilen 2) benzeri 2 (Nrf2) olmak üzere az dört tip transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu etkiler. MSM bu transkripsiyon faktörlerini etkileyerek , ROS ve antioksidan enzimlerin dengesinin düzenlenmesinde etkili olabilir. Bunların her biri de kısmen ROS tarafından etkinleştirilmektedir (Butawan vd.,2017).

MSM, NF- κ B transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek ROS üretiminde görev alan enzimlerin ve sitokinlerin üretimini azaltabilir. COX-2 ve iNOS'un negatif yönlü regülasyonu sırasıyla süperoksit radikali (O₂⁻) ve nitrik oksit (NO) miktarını azaltır (Kim vd., 2009). Ek olarak, MSM, uyarılmış herhangi bir mitokondriyal üretilen ROS'u azaltabilen TNF- α (Ahn vd., 2015; Kim vd., 2009) gibi sitokinlerin ekspresyonunu baskılar (Ahn vd., 2015). Sitokin üretimindeki azalmalar, parakrin sinyalleşmesinin azalmasına ve diğer transkripsiyon ajanlarının ve yollarının aktivasyonuna katılabilir (Butawan vd., 2017).

MSM in vitro olarak bir dizi kanser hücre hattında STAT transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu veya aktivitelerini baskılamıştır (Joung vd.,2014; Lim vd., 2012). Apoptoz, farklılaşma ve çoğalma ile ilgili genlerin düzenlenmesi Janus kinaz (Jak)/STAT yolu ile ilgilidir ve bunların tümü gerekli bir sinyal bileşimi olan ROS'u üretir (Höll vd., 2016; Redza-Dutordoir, 2016). Jak/STAT yolunu kullanarak sinyal verme, sitokin ekspresyonunun azalması sonucu engellenebilir. Jak/STAT yolunun aşağı regülasyonu, oksidaz (Manea vd., 2010) ve B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) (Gross, 2016) ekspresyonunu azaltarak ROS oluşumunu daha da azaltabilir.

MSM ile in vitro olarak yapılan ön tedavinin makrofaj benzeri hücrelerde redoks duyarlı p53 transkripsiyon faktörünün toplanmasının azaldığı bildirilmiştir. (Karabay vd., 2014). Bu p53, hücre içi ROS seviyelerine bağlı olarak iki yönlü oksidatif fonksiyon sergiler, burada genel anlamda p53, düşük hücre içi ROS seviyelerinde antioksidatif fonksiyonlar ve yüksek ROS seviyelerinde prooksidatif fonksiyonlar uygular, p53'ün antioksidan işlevi, Sestrin, glutatyon peroksidaz (GPx) ve aldehit dehidrojenaz (ALDH) gibi süpürücü enzimleri up regüle eder. Prooksidatif olarak işlev yapan P53 oksidazları düzenlerken aynı zamanda antioksidan genleri de baskılar (Liu ve Xu, 2011).

İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1 transaktif edici düzenleyici protein (HIV-1 Tat) ile kültürlenen murin nöroblastom hücreleri, Nrf2'nin azalmış nükleer translokasyonu

olduğunu göstermiştir; bunun yanında MSM ile birlikte yapılan kültürleme sonucunda, Nrf2 translokasyonunu çekirdeğe kontrol seviyelerine döndürmüştür (Kim vd., 2015). Nrf2, glutamat-sistein ligaz (GCL), süperoksit dismutazlar (SOD'ler), katalaz (CAT), peroksiredoksin (Prdx), GPx, glutatyon S-transferaz (GST) ve diğerleri dahil olmak üzere antioksidan enzimlerle ilişkisi açısından iyi belgelenmiştir (Zhang vd., 2015). MSM'nin Nrf2 üzerinde ne gibi bir etkisi olduğu açık olmasa da, Nrf2'nin ayrıca p21'in p53 ifadesi veya B hücreli lenfoma ekstra büyük (Bcl-XL) Jak/STAT ifadesi ile düzenlenebileceğini düşünülmektedir (Ma, 2013).

MSM dahil kükürt içeren bileşikler, bağışıklık tepkisini desteklemede kritik bir rol oynarlar (Grimble, 2006; Parcell, 2002; Ramoutar, 2010). Kronik stres, duyarsızlaşmaya yol açar ve normal bir bağışıklık tepkisi oluşmadığı için bağışıklık sistemi üzerinde zararlı etkilere sahiptir. IL-6'nın geniş etkileri, kronik enflamasyonun sürdürülmesine dahil edilmiştir (Gabay, 2006). İn vitro olarak MSM IL-6'yı azaltmıştır, bu da bu kronik zararlı etkileri azaltabilir (Ahn vd., 2015; Kim vd., 2009; Kloesch vd., 2011). Kapsamlı egzersizden önce MSM ile ön tedavi, lipopolisakkarit (LPS) ile tedavi edilen kan, ex vivo sitokinlerin salgılanması yoluyla bir yanıt oluşturabildiğinden, bağışıklık hücrelerinin aşırı stresini önlemiştir, bu etki plasebo grubunda gözlenmemiştir (Van der Merwe ve Bloomer, 2016).

Mast hücrelerinden histamin salınımı DMSO (Candussio vd., 1987) tarafından inhibe edilir; bununla birlikte, MSM'nin histamin salınımı üzerindeki etkileri henüz keşfedilmemiştir. Daha önce araştırmalar, MSM'nin vasküler fonksiyonu engellediğini göstermektedir (Alam, 1983; Layman, 1987). Başka in vitro çalışmalarda, MSM NO ve prostanooidler gibi vazodilatör ajanların ekspresyonunu azaltmıştır (Kim vd., 2009). NO miktarındaki azalma, makrofajları NO ile uyarılan apoptoza karşı korur (Karabay vd., 2014).

Bunlara ek olarak, MSM, hücre döngüsü ve hücre ölümü ile ilgili diğer immün modülatör etkilere yardımcı olabilir. MSM vitro çalışmalarda, gastrointestinal kanser hücrelerinde (Jafari vd., 2012), karaciğer kanseri hücrelerinde (Kim vd., 2014) ve kolon kanseri hücrelerinde (Karabay vd., 2016) apoptozu indüklemiştir. Bu bulguların aksine, MSM murin meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklememiştir (Caron vd., 2013) bunun yerine MSM'nin hem metastatik murin meme kanserine hem de murin melanom hücrelerine normal hücresel metabolizmayı geri kazandırdığı gösterilmiştir (Caron, 2015). MSM uygulanan gastrointestinal kanser hücrelerinde ise hücre döngüsünün durduğu gözlenmiştir (Jafari vd., 2012). Hücrenin hayatta kalmasına yönelik bu değişiklikler, p53 ve Jak/STAT yollarındaki siklin üretim modülasyonlarından kaynaklanabilir (Butawan vd., 2017).

İnsanlarda, plazma sülfat ve homosistein değişiklikleri için bireyler arasında MSM dozuna bağlı eğilimler gözlenmemiştir. Bir kükürt donörü olan MSM kükürt döngüsü boyunca kükürt kullanımından büyük ölçüde sorumlu olan mikroorganizmalar ile, memeli mikrobiyotasına bağımlı olabilir (Butawan vd., 2017).

MSM'nin uzun zamandır metiyonin, sistein, homosistein, taurin ve diğer kükürt içeren bileşikler için bir kükürt vericisi olduğu düşünülmese de alkolleyici bir ajan olmadığı ve DNA'yı metillemediği bildirilmiştir (Butawan vd., 2017). Kawai ve arkadaşlarının (2010) yaptığı araştırmada ise MSM'nin ana bileşiği olan DMSO, hidroksil radikali (OH) varlığında DNA'yı metilleyebilir (Kawai vd, 2010), bu da DMSO'nun MSM'ye oksidasyonuna yardımcı olma potansiyeline sahip olduğunu gösterir (Jørgensen, 2010; Ramírez-Anguita vd., 2009).

1.7.2. MSM'nin Klinik Kullanımı

MSM, hücrel ve doku seviyelerinde fizyolojik etkileri değiştirmek için çok iyi nüfuz eden terapötik ajandır. Bunun yanı sıra MSM, diğer terapötik ajanlar ile birlikte taşıyıcı veya ortak taşıyıcı olarak hareket etme yeteneğine sahiptir, hatta potansiyel uygulamalarını arttırmak için kullanılır (Butawan vd.,2017).

MSM' nin klinik olarak kullanılabilirliği yapılmış insan ve hayvan çalışmalarından elde edilen bulgulara dayanmaktadır. Bu çalışmalarda, MSM' nin artrit ve enflamasyonda, kırıldak dokuyu korumada, hareket aralığını ve fiziksel işlevi iyileştirmede, egzersizle ilişkili kas ağrısını azaltmada, mevsimsel alerjileri iyileştirmede, cilt kalitesini ve dokusunu iyileştirmede ve kanserde klinik olarak yarar sağlayacağı bildirilmiştir (Kim vd., 2006).

Gelişmiş penetrasyon özelliklerine sahip bir mikro besin olarak MSM, genellikle glukozamin, kondroitin sülfat ve boswellik asit dahil olmak üzere diğer anti-artritik ajanlarla kombine olarak artrit ve diğer inflamatuvar durumlar için kombinasyon halinde klinikte kullanılmaktadır (Brien vd.,2008).

MSM'nin yapılan in vitro çalışmalarda, sitokin ekspresyonunun azaltarak anti-inflamatuvar etki göstermiş olabileceği ileri sürülmüştür (Ahn vd., 2015; Kim vd., 2009; Kloesch vd., 2011). Deney hayvanlarında (Ahn vd.,2015; Kim vd., 2009; Kloesch vd., 2011) sitokin azalmaları kanıtlanmış ve deneysel olarak arttırılan artritik hayvan modellerinde de MSM ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Aynı zamanda MSM, glukozamin ve kondroitin sülfat içeren bir kombinasyonda, deneysel olarak indüklenen akut ve kronik romatoid artritli sıçanlarda C-reaktif proteini (CRP) etkili bir şekilde düşmüştür (Arafa vd., 2013).

MSM'ye genel olarak bakıldığında, Dr. Stanley Jacob, MSM ile takviyeyi takiben semptomları düzelen osteoartrit hastalarıyla ilgili on bir vaka çalışmasına atıfta bulunmuştur (Jacob,2003). Klinik araştırmalar, VAS ağrı ölçeği (Debbi vd., 2011; Usha, 2004), WOMAC ağrı alt ölçeği (Debbi vd., 2011; Kim vd., 2006), SF36 ağrı alt ölçeği (Debbi vd., 2011) ve Lequesne İndeksi (Usha, 2004) tarafından belirtildiği gibi MSM'nin ağrıyı azaltmada etkili olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda inflamatuvar sertlikte (Debbi vd., 2007; Patagonis, 2014) ve şişmede (Usha ve Naidu, 2004) de iyileşmeler kaydedilmiştir. Ayrıca, Usha ve Naidu (Usha ve Naidu, 2004) tarafından yapılan bir çalışmada, glukozamin ile kombine MSM, ağrı, ağrı yoğunluğu ve şişlikteki iyileşmelerin süresini kısaltmıştır.

Kombine tedavi içeren ilaçları kullanan diğer insan çalışmalarında da benzer sonuçlar çıkmıştır. Örneğin, artrit ile ilişkili ağrı ve sertlik, Glukozamin, Kondroitin sülfat ve MSM (GCM) (Nakasone vd., 2011; Vidgasavar vd., 2004) kullanılarak önemli ölçüde iyileştirmiştir. Osteoartrit (OA) tanısı konmuş sedanter obez kadınlarda diyet ve egzersiz değişikliklerinin üzerine bir GCM kombinasyonu eklendiğinde ağrı ve sertlikte marjinal iyileşmeler gözlenmiştir (Magrans-Courtney vd., 2011). MSM'nin boswellik asit (Notarnicola vd., 2016) ve tip II kollajen (Xie vd., 2008) ile birlikte kullanıldığında artrit ağrısını azaltmada da etkili olduğu gösterilmiştir.

Artrite ek olarak, MSM, indüklenmiş kolit (Amirshahrokhi vd., 2011), akciğer hasarı (Amirshahrokhi vd., 2011) ve karaciğer hasarı (Amirshahrokhi vd., 2011; Kamel, 2013) için in vivo sitokin ekspresyonunu zayıflatmıştır. Hasegawa ve meslektaşları (Hasegawa vd., 2004), MSM'nin topikal olarak uygulandığında UV kaynaklı inflamasyona ve %2.5'lik bir sulu içme solüsyonu ile ön tedaviden sonra akut alerjik inflamasyona karşı korumada yararlı olduğunu bildirmiştir.

MSM, insanlarda da diğer inflamatuvar prosesleri azaltmıştır. MSM bir klinik vaka çalışmasında interstisyel sistitten muzdarip altı hastadan dördü için etkili bir tedavi olarak farkedilmiş ve bildirilmiştir (Childs, 1994). Ek olarak, MSM'nin mevsimsel alerjik rinit semptomlarını hafiflettiği de gösterilmiştir(Barrager, 2003; Barrager vd., 2002). MSM tarafından sistemik egzersize bağlı inflamasyonda azalma gözlemlenmiş olsa da (Van der Merwe ve Bloomer, 2016), insan çalışmalarında, MSM verilen farelerde azalmış sinovit inflamasyonunda görüldüğü gibi, doğrudan kıkırdak veya sinovyumdaki inflamatuvar etkileri araştırılmamıştır (Moore, 1985).

Cerrahi olarak indüklenen osteoartrit tavşanlarında MSM, kıkırdak ve sinovyal dokuda (Amiel, 2008), TNF-a'da ve OA ilerlemesi sırasında korunan eklem kıkırdağı yüzeyinde

azalma ile de gözlenmiştir. GCM kombinasyonu ile desteklenmiş bir romatoid artrit (RA) sıçan modelinin histopatolojisi, sinovyum proliferasyonunun azaldığını ve eklemden düzensiz bir kenarın geliştiğini göstermiştir (Arafa vd., 2013). Ayrıca, MSM takviyesi verilen OA farelerinde kırıldak yüzey dejenerasyonunun önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Ezaki vd., 2013). MSM'nin koruyucu etkileri, Murav'ev ve meslektaşlarının artrit farelerinin diz eklemi dejenerasyonunun MSM ile azaldığını bildirdikleri çalışmada da görülmüştür (Murav'ev İu vd., 1991).

Yukarıda bahsedilen gelişmelerle birlikte enflamasyon ve kırıldak korunmasında subjektif ölçümlerin kullanımı yoluyla genel fiziksel işlevde faydalı değişiklikler de kaydedilmiştir (Debbi vd., 2011; L. S. Kim vd., 2006). Günlük olarak MSM verilen osteoartrit popülasyonlarla yapılan çalışmalarda, WOMAC (Debbi vd., 2011; L. S. Kim vd., 2006), SF36 (Debbi vd., 2011; L. S. Kim vd., 2006) ve Agrege Lokomotor Fonksiyon (ALF) (Debbi vd., 2011) ile değerlendirildiği gibi, fiziksel fonksiyonda önemli gelişmeler gözlenmiştir. Ekstra egzersizin neden olduğu kas hasarını takiben objektif kinetik diz ölçümleri kesin değildir, ancak MSM'nin maksimum izometrik diz ekstansör iyileşmesine yardımcı olabileceğini düşündürmektedir (Melcher vd., 2016).

MSM, sonuçları olumlu sonuçlanan bir dizi kombine tedavide de kullanılmıştır. Glukozamin, kondroitin sülfat, MSM, guava yaprağı ekstresi ve D Vitamini içeren takviye kullanımı sonucu, Japon Diz OA Ölçümüne göre diz osteoartriti olan hastaların fiziksel olarak şikayetleri azalmıştır (Nakasone vd., 2011). Başka bir takviye olan GCM sonucunda fonksiyonel yetenekte ve eklem hareketliliğinde artış olmuştur (Vidyasagar vd., 2004). MSM ve boswellik asit kombine kullanıldığında, Lequesne İndeksi (Notarnicola vd., 2016) ile değerlendirilmiş ve diz eklemi fonksiyonunu iyileştirdiği de gösterilmiştir. Arginin l- α -ketoglutarat, hidrolize Tip I kollajen, bromelain ve MSM içeren kombinasyon rotator manşet onarımından sonra üç ay kullanılmış ve objektif fonksiyonel sonuçları etkilemeden onarım bütünlüğünü iyileştirdiği görülmüştür (Gumina vd., 2012).

Kombine kullanımı araştıran diğer çalışmalar, önemli gelişmeler gösterememiştir. Geriatrik atlara üç ay boyunca ağızdan verilen bir GCM kombinasyonu, yürüyüş özelliklerinde önemli değişiklikler göstermemiştir (Higler vd., 2014). İnsanlarda, MSM ve boswellik asit, anti-inflamatuar ilaçlara olan ihtiyacı azaltmasına rağmen gonartroz tedavisi olarak plasebo gibi etki göstermiştir (Notarnicola vd., 2011). Bununla birlikte, diyet ve egzersiz rejimine ek olarak bir GCM kombinasyon takviyesi uygulanan grupla

uygulanmayan grup karşılaştırıldığında da önemli bir gelişme kaydedilmemiştir (Magrans-Courtney vd., 2011).

MSM ve glukozamin takviyesi kullanan ve fizik tedavi gören bel ağrısı olan hastalar, yaşam kalitelerinde iyileşmenin olduğunu bildirmiştir (Tant vd., 2005). GCM takviyeleri spinal eklem hastalığı ve dejeneratif disk hastalığı için bir tedavi olarak düşünülmüş ancak kalite literatürünün azlığı nedeniyle etkinlik konusunda bir sonuca ulaşılamamıştır (Stuber vd., 2011).

Bağ dokusuna olan kükürt katkısı nedeniyle MSM, anti-inflamatuvar etkilerinin yanı sıra kas ağrılarında da etkili olabileceği düşünülmektedir. Dayanıklılık egzersizinin neden olduğu kas hasarı, kreatin kinaz ile ölçüldüğü üzere MSM takviyesi ile azalmıştır (Barmaki vd., 2012). MSM ile ön tedavi, yorucu direnç egzersizlerini (Melcher vd., 2016; Kalman vd., 2013) ve dayanıklılık egzersizini (Kalman vd., 2012) takiben kas ağrısını azaltmıştır.

MSM in vitro çalışmalarda uyarılmış nötrofillerde ROS'u kimyasal olarak nötralize etmemiş bunun yerine mitokondriyal süperoksit, hidrojen peroksit ve hipokloröz asit oluşumunu baskılamıştır (Beilke et al., 1987). Ek olarak, MSM, HIV-1 Tat maruziyetinin ardından indirgenmiş glutatyon (GSH)/oksidlenmiş glutatyon (GSSG) oranını normal seviyelere geri yükseltebilir, NO üretimini azaltabilir ve nöronal ROS üretimini azaltabilir (Kim vd., 2015).

İnsanlarda, dayanıklılık egzersizinden önce MSM ön tedavisi, indüklenmiş protein oksidasyonu (Nakhostin-Roohi vd., 2011; Nakhostin-Roohi vd., 2013), bilirubin üretimi (Barmaki vd., 2012; Nakhostin-Roohi vd., 2013), lipid peroksidasyonu (Nakhostin-Roohi vd., 2011), kreatin kinaz (Barmaki vd., 2012), oksitlenmiş glutatyon (Nakhostin-Roohi vd., 2011) ve ürik asidin (Nakhostin-Roohi vd., 2011; Nakhostin-Roohi vd., 2013) akut zayıflamasına neden olurken toplam antioksidan kapasitede bir artış görülmüştür (Barmaki vd., 2012; Kim vd., 2009). Dayanıklılık egzersizini takiben, 10 günlük tedavi öncesi (Nakhostin-Roohi vd., 2011) redükte glutatyon yükselmiştir, ancak egzersizden hemen önce tek bir oral dozdan önemli ölçüde etkilenmemiştir (Nakhostin-Roohi vd., 2013).

MSM'in mevsimsel alerjiler üzerine etkisi incelendiğinde 30 gün boyunca 2.6 g/gün MSM, 3. haftaya kadar üst ve toplam solunum semptomlarında ve ayrıca alt solunum semptomlarında azalma gözlemlenmiştir (Barrager vd., 2002) ve tüm bu iyileştirmeler, 30 günlük takviye alımın boyunca değişmemiştir. Bu çalışmanın bir dezavantajı, polen sayımları ve bir semptom anketinin bildirilmemesi olmuştur (Gaby, 2002) ancak bu durum

sonra düzeltilmiş olmakla birlikte Barrager ve ark.(2002) histamin salınımını ölçmek için bu örnek popülasyonun bir alt bölümünü kullanmış ancak plazma IgE veya histamin düzeylerinde önemli bir değişiklik bulamamışlardır (Barrager vd., 2002).

1981'de Herschler'e verilen ilk patentten bu yana, MSM'nin keratine kükürt vericisi olarak hareket ederek cilt kalitesini ve dokusunu iyileştirmek için terapötik kullanımları olduğu öne sürülmüştür. Son bir çalışma raporuna göre, MSM, tıkaçıcı bir yama yoluyla tavşanların derisini tahriş etmediği ancak başka bir çalışma raporuna göre, MSM'nin kobayların derisini biraz tahriş edebileceği gösterilmiştir. EDTA ve MSM içeren bir losyon kullanıldığında, her 8 saatte bir üç günlük topikal uygulamanın ardından sıçanlarda yanık bölgelerinde hafif iyileşme olduğu da rapor edilmiştir (Wang vd., 2015).

1.7.3. MSM' nin Toksisitesi

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) GRAS bildirimi altında, MSM'nin 4845.6 mg/gün'ün altındaki dozlarda güvenli olduğunu kabul etmektedir, aynı zamanda MSM iyi tolere edilmekte ve güvenli görünmektedir (Borzelleca, 2007). Sıçanlar (Horváth vd., 2002; Magnuson vd., 2007; McCabe vd., 1986; Morton, 1986; O'Dwyer vd., 1988), fareler (Takiyama vd., 2010) ve köpekler (Brim vd.,2010; Khan vd., 2010) dahil olmak üzere bir dizi hayvan üzerinde bir dizi toksisite çalışması yapılmıştır. Bir ön toksisite çalışma raporunda, büyük patolojik bir değişiklik göstermemesine rağmen iki gün sonra 15,4 g/kg'lık bir oral sulu doz verilen dişi bir sıçanda tek bir ölüm bildirmiştir. Diğer teknik raporlar, MSM topikal olarak uygulandığında hafif cilt ve göz tahrişinin gözlemlendiğini göstermektedir (Borzelleca, 2007). Toksisite çalışmalarının bir özeti Çizelge 1.1'de listelenmiştir.

Çizelge 1.1. Metilsülfonilmetan (MSM) Toksisite Verileri (Butawan vd., 2017).

Tür	Uygulama Yolu	Süre Akut≤15gün	NOAEL (Gözlenen OlumsuzEtki Düzeyi)	Referans
Fareler	Oral	Belirtilmemiş(akut)	5g/kg	Kocsis vd.,(1975)
Fareler	İntraperitonal	Belirtilmemiş(akut)	5g/kg	Kocsis vd.,(1975)
Fareler	Oralgavaj	15 gün	5g/kg	Takiyama vd.,(2010)
Sıçan	İntraperitonal	Belirtilmemiş(akut)	5g/kg	Kocsis vd.,(1975)
Sıçan	Oralgavaj	15 gün	2g/kg	Takiyama vd., (2010)
Gebelik Sıçan	Oralgavaj (14gün)	21 gün	1g/kg	Magnuson vd. (2007)
Fareler	Oral	91 gün	1.5g/kg	Takiyama vd., (2010)

1.8. Çalışmamızda Kullanılan Hücre Serilerinin Özellikleri

Çalışmamızda farklı özelliklere sahip üç çeşit over kanseri hücre serisi kullanılmıştır. Farklı hücre serisi kullanmaktaki amacımız MSM'nin farklı özelliklere sahip kanser hücrelerindeki etkisinin araştırılması olmuştur.

Çalışmamızda kullandığımız OVCAR-3 hücre serisi insan epitel hücre kökenli adenokarsinomdan elde edilmiş bir over kanser hücre hattıdır. Bu hücre hattı uygun bir transfeksiyon konağı olarak kullanılabilir. OVCAR-3, over kanserinde ilaç direncinin araştırılmasında uygun bir model sistemidir ve hormon reseptörlerinin varlığında hormonal tedavinin değerlendirilmesinde kullanılabilir. Expression markerlarına bakıldığında androjen reseptörü pozitif, östrojen reseptörü pozitif, progesteron reseptörü pozitif olarak görev yapar. Yumuşak agarda koloniler oluşturabilir ve anormal bir karyotipe sahiptir. Klinik olarak bakıldığında adriamisin, melfalan ve sisplatin konsantrasyonlarına dirençlidir. Hem kültürlenmiş hücreler hem de ksenograftlar androjen ve östrojen reseptörler özellikleri gösterir. Ksenograft modelleri, 17-beta estradiol ile tedavinin bu over karsinomunda progesteron reseptörlerini indükleyebileceğini göstermek için kullanılmıştır (ATCC, 2024).

Çalışmamızda kullandığımız diğer bir hücre hattı olan SKOV-3, over adenokarsinomu olan bir hastanın asit sıvısından türetilen epitel benzeri morfolojiye sahip bir insan hücre hattıdır. Uygun bir transfeksiyon hattı olarak kullanılabilen SKOV-3'ün bir özelliği de disfonksiyonel apoptozom aktivasyonu, yumurtalık karsinomu ve kemoterapi direncinin patogenezi ile bağlantılıdır. Bu hücre hattı hipodiploiddir ve çıplak farelere enjekte edildiğinde yüksek tümör oluşumu gösterir. Ayrıca tümör nekroz faktörlerine ve bazı sitotoksik ilaçlara karşı dirençlidir. SKOV-3, östrojen ve antiöstrojene dirençli yumurtalık kanseri üzerine araştırma için ideal bir modeldir. OVCAR-3'den farklı olarak östrojen ve progesteron reseptörünü exprese etmez (BJRC,2024).

Çalışmamızda kullandığımız son hücre hattı ise A2780 olup tedavi edilmemiş bir hastanın yumurtalık endometroid adenokarsinom tümör dokusundan elde edilmiştir. Tedavi sisteminde terapötik hedeflerin belirlenmesi ve toksisitenin etkilerini gözlemlemek için yaygın olarak kullanılır. Bu epitel hücre hattı, spinner kültürlerinde süspansiyon halinde tek tabaka halinde büyür ve bağışıklık yetersizliği olan farelerde tümör oluşturur. A2780, sisplatin duyarlılığı gösterir. Over tümörü neovaskülarizasyonunun rolünün araştırılmasında ve kemoterapi ilaçlarında direncin belirlenmesinde model olarak kullanılmıştır. (Abdulkhalek vd., 2014; Pfankuchen vd., 2015)

MSM'nin çeşitli kanserlerde apoptoz yolağı üzerine çalışmalar bulunmaktadır ancak daha önce over kanserinde apoptoz ve otofaji üzerindeki etkilerine literatürde rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında over kanser hücre serileri olan OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 ile apoptotik ve otofajik yolların etkin olduğu bir sistem oluşturularak bu hücre modeli üzerinde over kanseri durumlarında tedaviyi destekleyici olarak yaygın klinik kullanımı bulunan ve GRAS olarak tanımlanan MSM'nin otofaji ve apoptoz üzerine olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Beckman Coulter marka santirifüj, Holten Lamin Air marka steril kabin Spectramax marka spektrofotometre, Sanyo CO2 İnkübatörü, Gilson otomatik pipetler, Mettler marka su banyosu, Velp Scientifica marka magnetik karıştırıcı, Sesa 1400 marka pH metre, Heto, Sanyo, Bosch marka -20 °C ve - 80 °C derin dondurucular, Arçelik buzdolabı, Heidolph vorteks, Mettler Toledo elektronik terazi, Labnet International çalkalayıcı, Olympus floresan mikroskop, Thermo marka spektrofotometre, jel elektroforezi, Bio-Rad immunblotlama tetra cell, western blot cihazı, Accuri C6 akım sitometri, Enzo CYTO-ID® Autophagy detection kit, Bd Pharmingen PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I kullanıldı.

2.2. Kimyasallar

Fetal bovine serum, RPMI 1640 medium, L-glutamin, PAA firmasından penisilin/streptomisin, sülfanilamid, naftiletlen diamine, thiazol blue tetrazolium bromide (MTT), BSA, glisin, PBS, DMSO, aminoguanidine hydrochloride, Sigma firmasından rhodamine 123, annexin V, propidium iodide, BD Biosciences' firmasından, kaspaz-3 substratları Alexis Biochemicals, Thermo firmasından Bradford ajanı, Aldrich firmasından MSM, Enzo firmasından CYTO-ID® Autophagy detection kit, Bd Pharmingen firmasından PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I temin edildi.

2.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Serisi

Çalışmamızda OV KAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanser hücre serileri kullanılmıştır.

2.4. Yöntemler

2.4.1. Hücre Kültürü

OV KAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanser hücreleri, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve inaktif fetal sıgır serumu (%10) içeren RPMI 1640 besiyerinde 75 cm²'lik

flasklarda, 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde çoğaltıldı. %80 yoğunluğa ulaşan hücreler PBS ile yıkanarak tripsinize edilerek pasajlandı.

2.4.2. Hücre Sayımı ve Canlı Hücrelerin Belirlenmesi

Bir hücre süspansiyonundaki canlı hücrelerin sayısını tespit etmek için tripan mavisi kullanılmıştır. Canlı hücreler sağlam hücre zarına sahip oldukları için tripan mavisi, eozin veya propidyum gibi belirli boyaları hücre içine almazlar ancak ölü hücrelerin sağlam bir hücre zarı bulunmadığı için bu hücreler bu boyalarla boyanır. Bu işlem sırasında boya ile karıştırılan hücre süspansiyonundaki hücrelerin daha sonra boyayı alıp almadığını belirlemek için hücre canlılığı ışık mikroskobunda sayılmıştır. Her kuyuya eşit sayıda canlı hücre ekilmesi önemli olduğu için trypan mavisi kullanılarak Neubauer lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra hücreler 6’lı, 24’lü ya da 96’lı plaklara ekim yapılmıştır. İki özdeş bölmeye sahip Neubauer lamında sayma bölgesinin derinliği 0,1mm, alanı 1mm², hacmi 0,1mm³’dür. Tripan mavisi içeren PBS içinde süspansiyon edilen hücrelerden ölü hücreler maviye boyanırken, boyanmayan canlı hücrelerin mikroskopta sayımı yapılır (Strober, 2015).

Elimizde bulunan 20 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan mavisi çözeltisi ile karıştırıldı ve çalışmamızda canlı hücre sayısı bulmak için 1ml (1cm³)’teki hücre sayısı = 0,1mm³’teki hücre sayısı x 2 (dilüsyon faktörü) x 10000 formülü kullanıldı.

2.4.3. Hücre Canlılık Testi

MTT; canlı hücreler tarafından substratın kromojenik ürüne dönüştürülmesine bağlı olan canlılık deneyleri arasında, hala çok yönlü ve popüler testlerden biridir. MTT testinin temelinde, etkisiyle suda çözünür sarı boya olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]’ün mitokondriyal redüktazın çözünmeyen mor bir formazana dönüşmesidir. Elde edilen formazon kristalleri çözündürülür ve konsantrasyonu 570 nm spektrofotometrede optik yoğunluğu belirlenir. Canlı hücre sayısı analiz sonucundan elde edilen boya yoğunluğu ile korelasyon gösterir. Sonuç, kuyu başına ~10⁶ hücreye kadar mükemmel doğrusallığa sahip hassas bir testtir. Test, birden fazla kuyuda büyütülen yapışık veya yapışmayan hücreler için standardize edilmiştir. Protokolde, standart bir 96 oyuklu plaka kullanılır. Ancak bu, farklı bir plaka formatına uyacak şekilde büyütülebilir. 96 oyuklu bir plaka içinde oyuk başına plaka 500-10.000 hücre içerir. Test, 10⁶ hücreye kadar iyi doğrusallığa sahiptir (Kumar vd., 2018).

Final konsantrasyonu 5mg/ml olan MTT boyası, RPMI 1640 besiyerinde çözüldü. Üzerindeki besiyeri atılan hücreler her kuyuya 20µl MTT çözeltisi ve 100µl besiyeri eklenerek 96'lık plakta 37°C'de, etüvde 4 saat süre ile bekletildi sonrasında medium aspire edilerek çözücü ajan DMSO eklendi ve kristaller çözüldü. Birkaç dakika içinde 595 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü yapıldı. Uygulanan denemeye göre, kontrol (tedavisiz) grupta veya MSM'nin farklı dozları uygulanan gruplarda absorbanslar ölçülerek tedavisiz grubun canlılığı %100 kabul edilerek diğer gruplardaki canlılık değeri relatif olarak hesaplandı.

2.4.4. Protein Kantitasyonu

Bradford testi, protein konsantrasyonlarını ölçmek için hızlı ve oldukça hassas bir yöntemdir. Çözeltideki denatüre proteinlere bağlanmayı takiben Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının maksimum absorbanstaki 465 nm'den 595 nm'ye kaymasına dayanır (Kielkopf vd., 2020). Çalışmamızda protein miktar tayini amacıyla kullanılan Bradford testi ile kaspaz aktivite tayini için kullanılacak örneklerin mg protein başına hesaplanmaları yapıldı.

Protein tayini yapabilmek amacıyla 2 µl örnek ve 150 µl Bradford ayırıcı 96 kuyulu plaklarda her kuyuya konularak karanlıkta, 5 dakika, oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans ölçüldü. Standart BSA grafiğinden ve eşitliğinden hareketle örneklerin protein miktar tayini yapıldı.

2.4.5. Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini

Trypan blue ile Neubauer lamında mikroskopla sayılan hücreler 6'lık plaklara ekim yapılarak bir gece etüvde inkübasyona bırakıldılar. Ekimden 24 saat sonra hücreler, MSM'nin 300mM ve 400mM dozları ile muamele edildi ve bu şekilde 24 saat etüvde inkübasyona bırakıldılar. Kuyulardaki hücreler bu süre sonunda kazınarak toplandı. Kazınarak elde edilen hücreler 160 µL PBS ve 4 µL deterjan ile muamele edilerek sitozolik ekstreleri hazırlandı. Ependorflara alınan lizat buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 10 saniye vortekslenen lizat sonra 14.000 rpm'de 4°C'de 2 dk santrifüj yapıldı. İki kere tekrarlanan bu işlem sonunda elde edilen süpernatant sitozolik ekstre olarak kullanıldı ve daha önce de belirtildiği şekilde Bradford yöntemine göre protein tayini yapıldı. 50 µL lizat kaspaz-3'ün substratı ile 96'lık plakta 1 saatlik inkübasyona bırakıldıktan sonra oluşan kolorimetrik ürünün floresan şiddeti 402nm dalgaboyunda ölçüldü. Ölçülen floresan şiddeti her örneğin 50 µL'sinin içerdiği mg protein miktarına oranlandı.

2.4.6. PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I ile Apoptoz tayini

Plazma zarının iç ve dış yaprakçıklarına asimetrik olarak dağılmış lipitler sağlıklı bir hücrenin yüzeyini oluşturur. Hücre sitoplazmasına doğru yönelim gösteren fosfatidilserin (PS), normalde plazma zarının iç zarı ile sınırlı olan lipitlerden biridir. Apoptoz esnasında bozulan lipid asimetrisi sebebiyle PS plazma zarının dış yaprağına çıkar ve kalsiyum bağlayıcı bir protein olan Annexin V, PS'ye bağlanarak floresan olarak görüntülenebilir. Bu nedenle Annexin V, apoptoz esnasında hücre dışına yönelen PS'yi tespit etmek için kullanılabilir (Crowley vd., 2016).

Canlı hücreleri canlı olmayan hücrelerden ayırt etmek için kullanılan Amino-Actinomycin (7-AAD) standart bir akış sitometrik canlılık belirteçidir. Zarları sağlam olan canlı hücreler 7-AAD'yi geçirmezken ölü ve hasarlı hücrelerin zarları 7-AAD için geçirgindir. PE Annexin V ile boyanan ve 7-AAD için boyanmayan hücrelerin apoptotik süreçte olduğu düşünülür. Hem PE Annexin V hem de 7-AAD için pozitif boyanan hücrelerin ise ya apoptozun son aşamasında ya nekroz geçirmekte ya da zaten ölü olduğu düşünülür. Her ikisi için de negatif boyanan hücreler canlıdır ve ölçülebilir apoptozdan geçmemektedir (Zembruski vd., 2012).

Çalışmamızda 6'lık plaklara ekim yapılan hücreler etüvde 24 saat inkübe edildiler. Bu süre sonunda etkilerinin gözlemleneceği 300 mM MSM ve 400 mM MSM ile 24 saat inkübe edildiler. 24 saat sonunda soğuk PBS ile iki kez yıkanan kuyulardaki hücreler 1x bağlama tamponunda ml'de 10^6 hücre olacak şekilde tekrar süspande edildi. Bu solüsyondan 100 μ l (1×10^5) hücre alınarak üzerine 5 μ l Annexin V-PE ve 5 μ l 7-AAD eklenen hücreler çok hafifçe vortexlenerek 15 dakika oda ısısında (25°C) karanlıkta inkübasyona bırakıldılar. Tüplere 400 μ l 1xbağlama tamponu eklendikten sonra 1 saat içinde akış sitometrisi ile analiz edildi.

Akım sitometri sonuçlarına göre canlı hücrelerde Annexin V-PE negatif ve 7-AAD negatif, erken apoptotik hücrelerde Annexin V-PE pozitif ve 7-AAD negatif, nekrotik hücrelerde ise Annexin V-PE pozitif ve 7-AAD pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bunun sonunda MSM'nin farklı dozlarını uyguladığımız ve uygulamadığımız hücrelerdeki canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler belirlenerek analiz edildi.

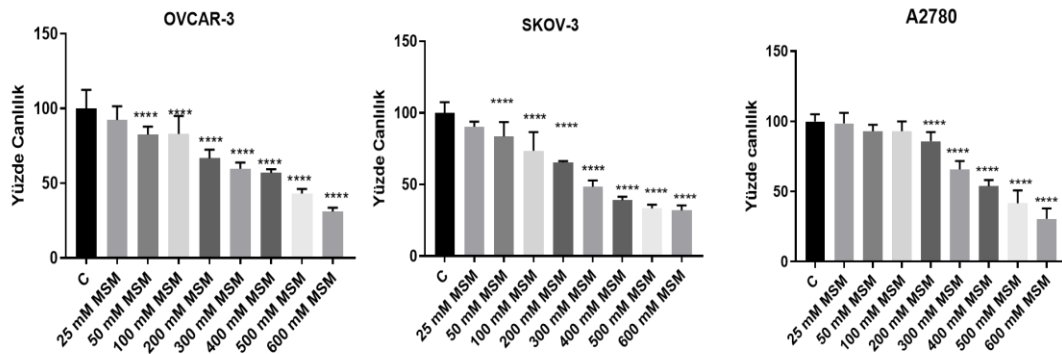
2.4.7. Otofagozomların CYTO-ID Autophagy Detection Kit ile Belirlenmesi

6'lık plaklara ekim yapılan hücreler 24 saatlik etüvde inkübe edildiler. 24 saat sonunda etkilerinin gözlemleneceği 300 mM MSM ve 400 mM MSM ile 24 saatlik inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyondan sonra hücrelere rapamycin uygulandı, daha sonra hücreler tripsinize edilerek toplandı. Örnekler 1×10^5 - 1×10^6 hücre/mL'ye kadar içermektedir. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek pelet elde edildi. Hücrelere 1X assay buffer eklenerek hücre kültür ortamında yıkandı ve santrifüjden sonra hücreler toplandı. 250 µL 1X assay buffer eklenerek canlı hücre örnekleri yeniden süspanse edildi. 250 µL seyreltilmiş CYTO-ID® green stain solüsyonu her numuneye eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı. Bu bir mono-dispers hücre süspansiyonu elde etmek önemli olduğu için yavaş yavaş aşağı ve yukarı pipetleme yapıldı. Bu uygulamadan sonra hücreler santrifüj edildi ve 1X assay buffer ile yıkandıktan sonra 500 µL assay buffer ile yeniden süspanse edildi. 1X assay buffer ile 3 kez yıkandıktan sonra örnekler akış sitometresinde yeşil (FL1) veya turuncu (FL2) kanalda analiz edildi.

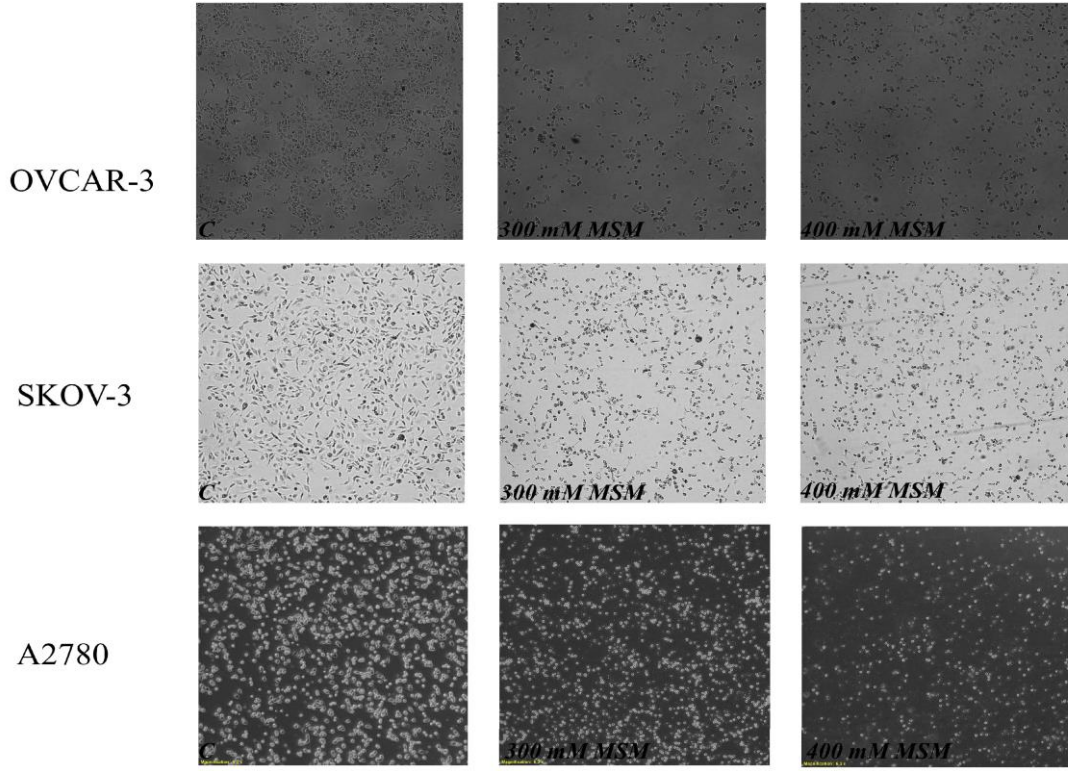
3. BULGULAR

3.1. MSM'nin OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 Over Kanseri Hücrelerinde Canlılık Üzerindeki Etkileri

MSM'nin over kanseri hücre serilerinde canlılık üzerindeki etkilerini belirlemek üzere MTT testi yapılmıştır. MSM her üç over kanseri hücre serisinde de canlılığı doza bağımlı ve anlamlı olarak azaltmıştır. 50mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda MSM'nin , OVCAR-3 hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlenmiş, 300mM MSM dozunda canlılık % 59,66 iken 400mM konsantrasyonda % 56,94' e, 500mM konsantrasyonda ise %44,06'ya gerilemiştir (Şekil 3.1A). MSM'nin SKOV-3 hücre canlılığını da doz bağımlı olarak azalttığı belirlenmiştir. MSM, SKOV-3 hücre canlılığını 300mM konsantrasyonda 48,43'e, 400 mM konsantrasyonda ise 39,08'e düşürmüştür (Şekil 3.1B). MSM'nin A2780 hücre canlılığını ise 200mM ve üzerindeki dozlarda anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir (Şekil 3.1C). Her üç over kanseri hücre serisinde de MSM'nin canlılığı anlamlı ve doz bağımlı olarak azalttığı belirlenmiş, literatür bilgisinden de hareketle, MSM'nin etki mekanizmasını belirlemek üzere ileri analizler için 300mM ve 400mM konsantrasyonları belirlenmiştir. MSM uygulanan hücrelerdeki morfolojik değişiklikler ışık mikroskopunda da takip edilmiştir. Hücrelerin mikroskobik değişimleri Şekil 3.2'de görülmektedir. Buna göre, MSM uygulanan OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 hücrelerinde kontrol hücrelere göre temas ve tutunmanın azaldığı ve sitoplazmanın büzülerek küçüldüğü gözlenmektedir (Şekil 3.1).



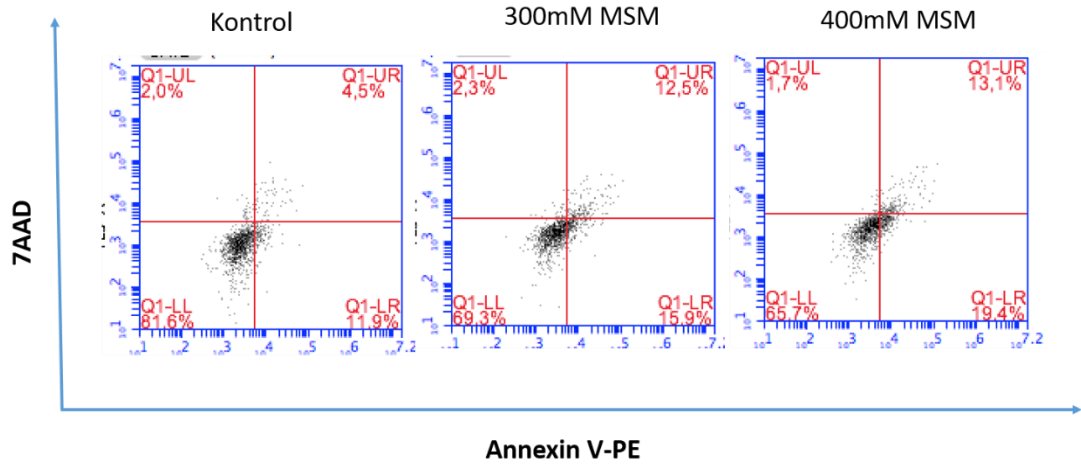
Şekil 3.1. MSM'nin OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanseri hücrelerinde % canlılık üzerindeki etkileri. **A:** MSM OVCAR-3 hücrelerinde canlılığı 50mM ve üzerindeki dozlarda ($p < 0,0001$); **B:** SKOV-3 hücrelerinde 50 uM ($p = 0,0001$) ve üzerindeki dozlarda ($p < 0,0001$) ve A2780 hücrelerinde ise 200mM ($p = 0,0017$) ve üzerindeki dozlarda anlamlı olarak azaltmıştır. (** $p = 0,0001$, *** $p < 0,0001$)



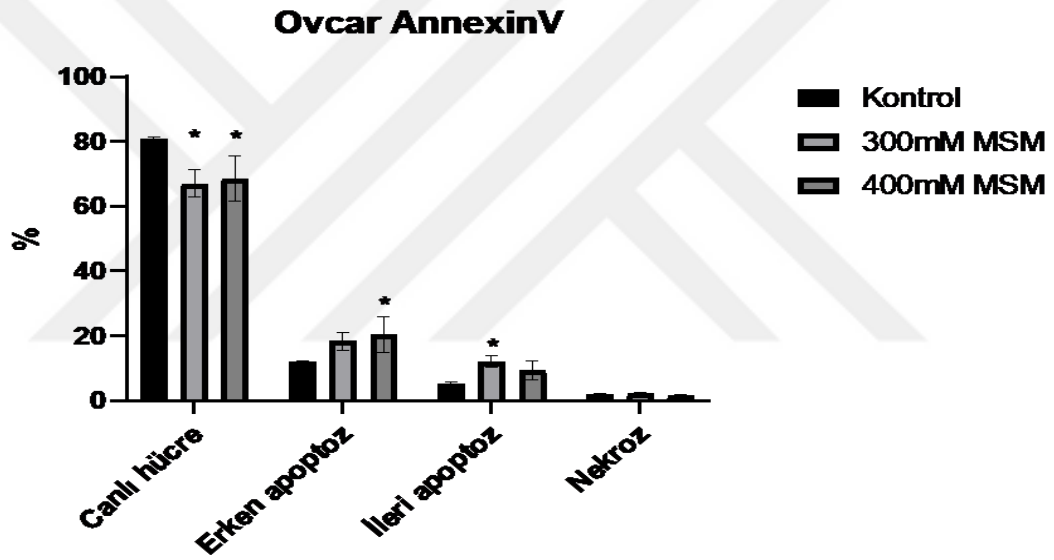
Şekil 3.2. MSM (300mM ve 400mM) uygulanan ve uygulanmayan OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanseri hücrelerinin ışık mikroskopi görüntüleri. Şeklin en üstündeki üç görüntü soldan sağa sırasıyla MSM uygulanmayan, 300mM MSM uygulanan ve 400mM MSM uygulanan OVCAR-3 hücrelerini, şeklin ortasındaki üç görüntü soldan sağa sırasıyla MSM uygulanmayan, 300mM MSM uygulanan ve 400mM MSM uygulanan SKOV-3 hücrelerini ve şeklin en altındaki üç görüntü soldan sağa sırasıyla MSM uygulanmayan, 300mM MSM uygulanan ve 400mM MSM uygulanan A2780 hücrelerini göstermektedir.

3.2. MSM'nin OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 Over Kanseri Hücrelerinde Apoptoz Üzerindeki Etkileri

MSM'nin over kanseri hücre serilerinde apoptoz üzerindeki etkilerini belirlemek üzere akım sitometri ile Annexin V-PE ve 7AAD ile ikili boyama yapılmıştır. MSM 300mM ve 400mM dozlarda OVCAR-3 hücrelerde apoptozu indüklemiştir (Şekil 3.3).



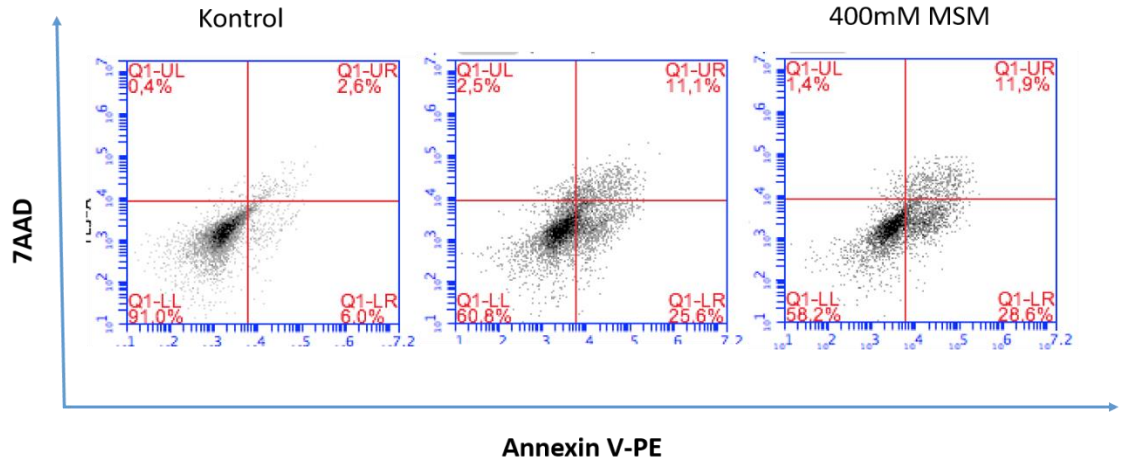
A



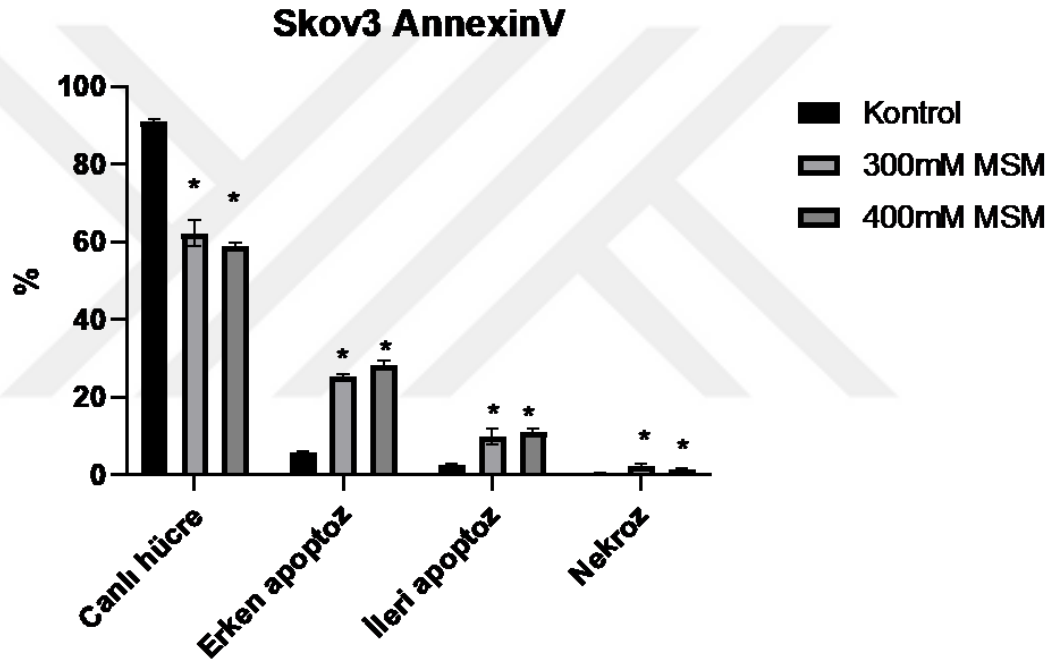
B

Şekil 3.3. A ve B. A: Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan OVCAR-3 hücrelerinde Annexin V-7AAD ve PE boyanması sonucunda elde edilen plotların temsili gösterimi. B: Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan OVCAR-3 hücrelerinde bar grafik olarak canlı, erken, ileri apoptotik ve nekrotik hücre sayılarının yüzde bar grafiği (*p<0.05)

MSM'nin SKOV-3 ve A2780 hücrelerinde de 300mM ve 400mM dozlarda erken apoptozu arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.4 ve 3.5).

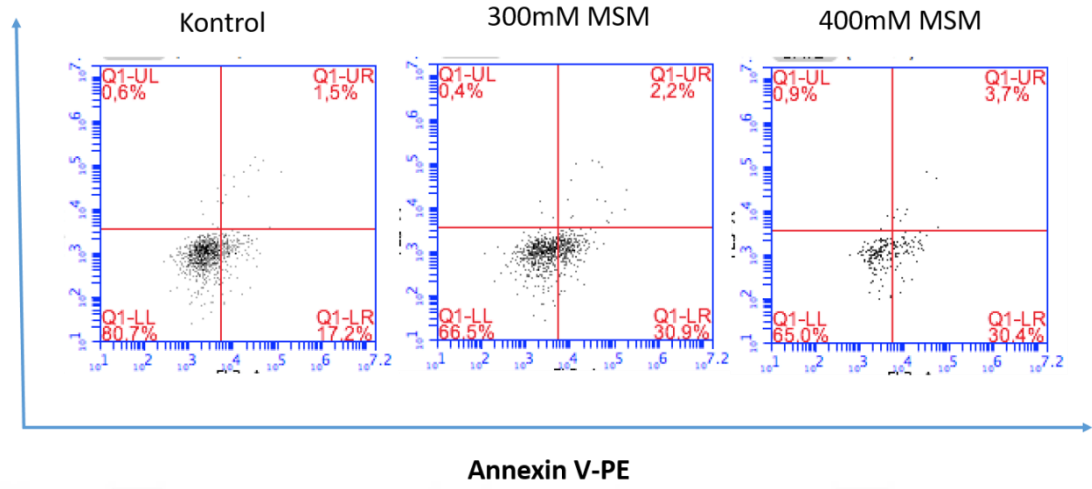


A

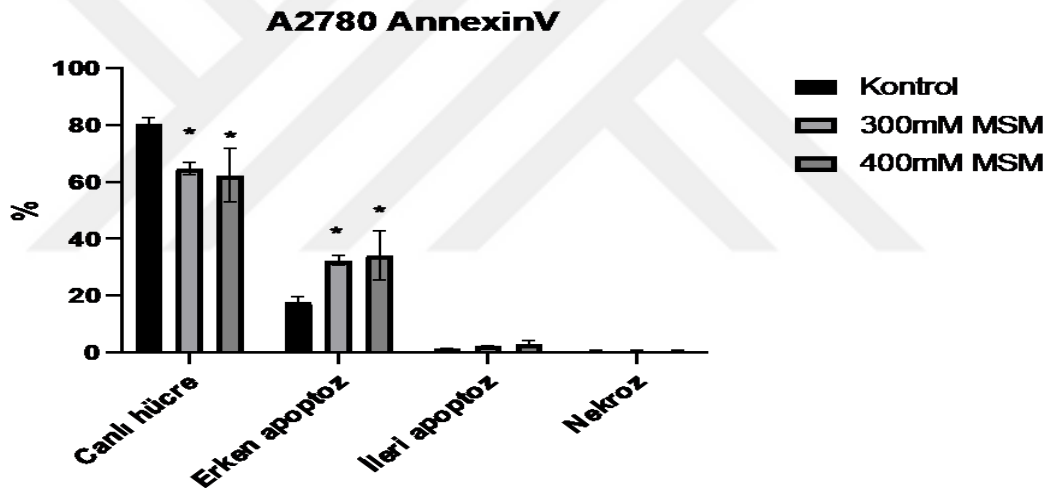


B

Şekil 3.4. A ve B A: Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan SKOV- 3 hücrelerinde Annexin V-7AAD ve PE boyanması sonucunda elde edilen plotların temsili gösterimi. **B:** Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan SKOV- 3 hücrelerinde bar grafik olarak canlı, erken, ileri apoptotik ve nekrotik hücre sayılarının yüzde bar grafiği (*p<0.05)



A

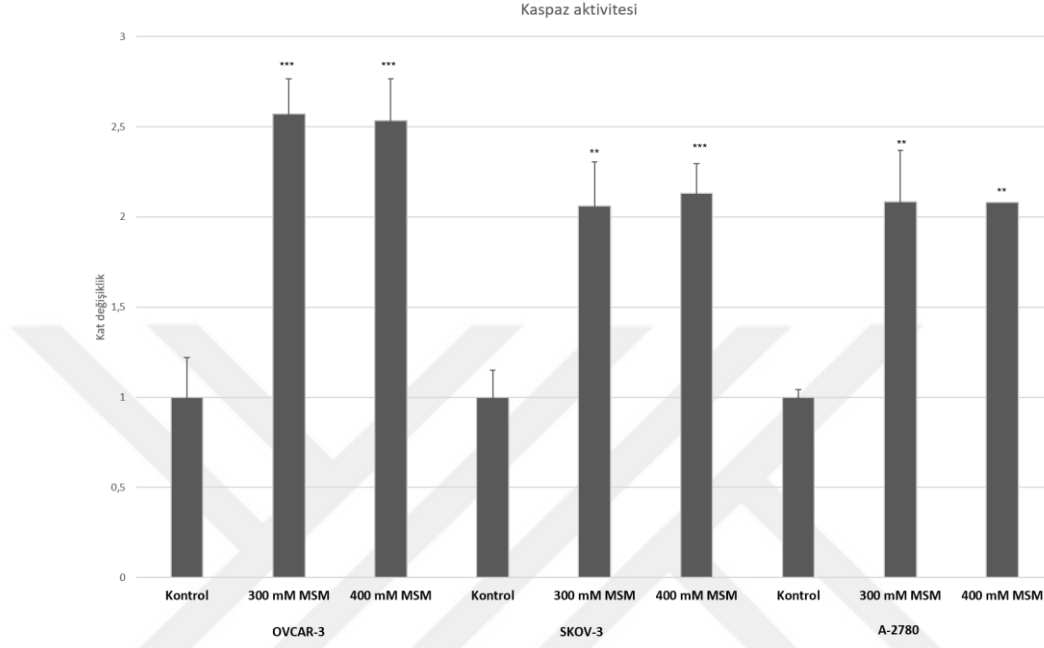


B

Şekil 3.5. A ve B A: Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan A2780 hücrelerinde Annexin V-7AAD ve PE boyanması sonucunda elde edilen plotların temsili gösterimi. B: Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan A2780 hücrelerinde bar grafik olarak canlı, erken, ileri apoptotik ve nekrotik hücre sayılarının yüzde bar grafiği (*p<0.05)

3.3. MSM'nin Kaspaz 3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

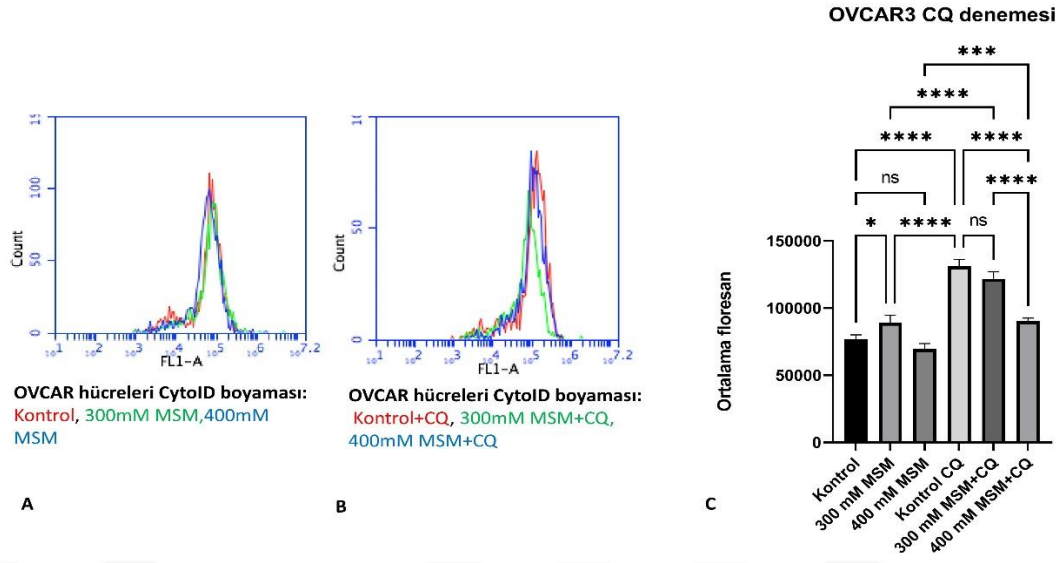
MSM, her üç hücre serisinde de kaspaz 3 enzim aktivitesini 300mM dozda anlamlı ($p<0,005$) olarak arttırmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. MSM'nin OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanseri hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkileri

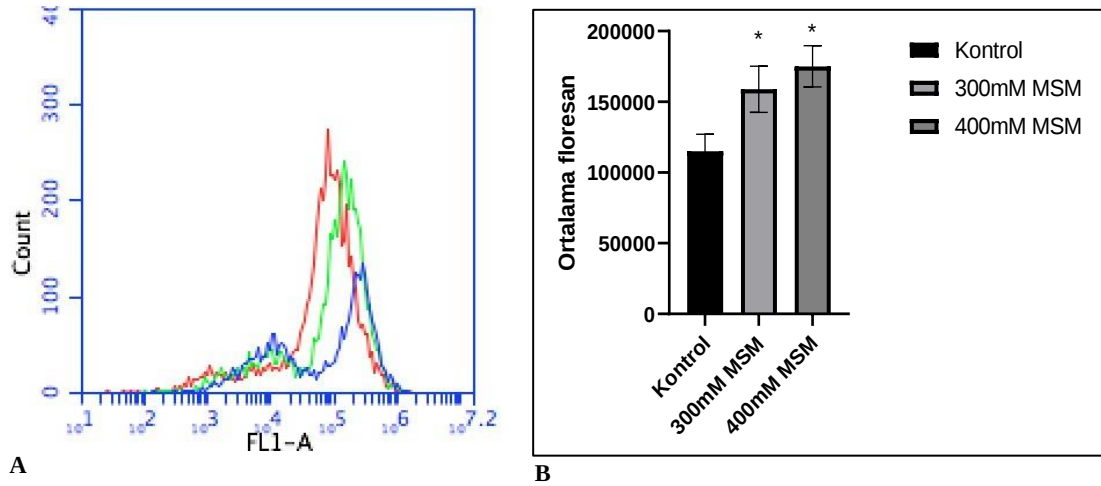
3.4. Cyto-ID Boyaması İle MSM'nin Otofaji Üzerindeki Etkilerinin Saptanması

Otofajik boyama olarak kullanılan Cyto-ID Boyaması sonucunda OVCAR-3 hücrelerinde 300mM MSM tedavisi ile boyanma artmış, 400mM MSM ile ise boyanma azalmıştır. Klorokin eklenen OVCAR-3 kontrol hücrelerinde floresan ışıma artmış buda bize pozitif kontrol grubumuzun ve kitin amacımız doğrultusunda çalıştığını göstermiştir. Aynı şekilde klorokin ve 300mM MSM kombine uygulanan tedavide floresan ışımayı anlamsız olarak azaltırken 400mM ve klorokin kombinasyon tedavisinde ışıma anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 3.7 A, B, C,).



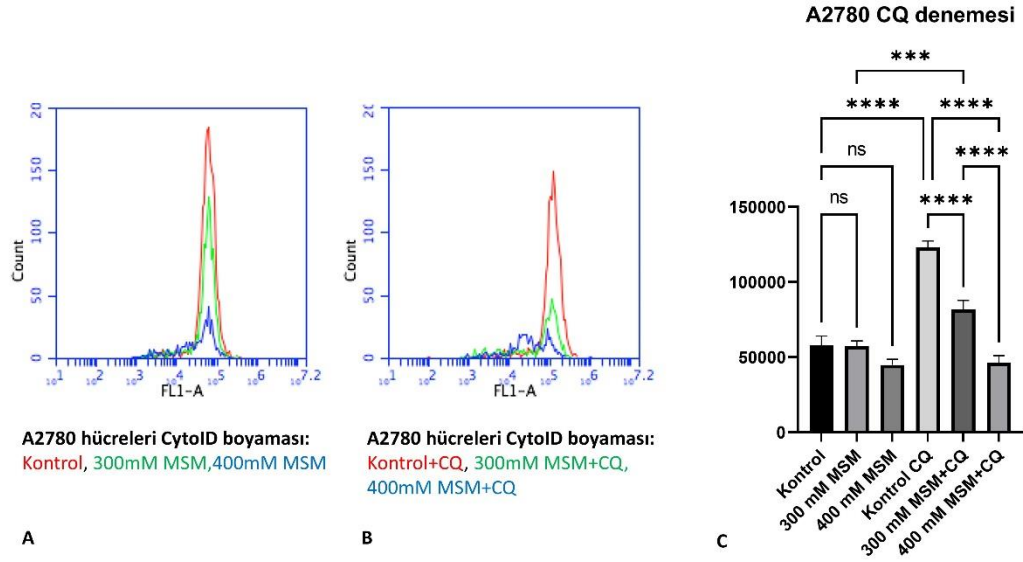
Şekil 3.7. A B C. **A:** Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan OVCAR-3 hücrelerinde Cyto-ID boyanması sonucunda elde edilen plotun temsili gösterimi. Renklerin simgelediği gruplar: **Kontrol**, **300mM MSM**, **400mM MSM**. **B:** Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM ve klorokin uygulanan OVCAR-3 hücrelerinde Cyto-ID boyanması sonucunda elde edilen plotun temsili gösterimi **C:** Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan ve kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM ve klorokin uygulanan Cyto-ID boyanmasına ilişkin ortalama floresanın bar grafik olarak verilmiş şekli

Otofajik boyama olarak kullanılan sonucunda SKOV-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre 300mM ve 400 mMMSM tedavili hücrelerde boyanma artış göstermiştir.



Şekil 3.8. A ve B **A:** Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan SKOV-3 hücrelerinde Cyto-ID boyanması sonucunda elde edilen plotun temsili gösterimi. Renklerin simgelediği gruplar: **Kontrol**, **300mM MSM**, **400mM MSM**. **B:** Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan SKOV-3 hücrelerinde Cyto-ID boyanmasına ilişkin ortalama floresanın bar grafik olarak verilmiş şekli.

A2780 hücrelerinde ise 400mM MSM tedavi dozunda azalma görülmüştür. Klorokin uygulanan A2780 kontrol hücrelerine göre 300mM ve klorokin kombine tedavi ve 400mM MSM ve klorokin tedavili hücrelerde anlamlı bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.9. A ve B. A: Kontrol, 300mM MSM ve 400mM MSM uygulanan A2780 hücrelerinde Cyto-ID boyanması sonucunda elde edilen plotun temsili gösterimi. Renklerin simgelediği gruplar: **Kontrol**, **300mM MSM**, **400mM MSM**. B: Kontrol, 300mM MSM, 400mM MSM ve klorokin uygulanan A2780 hücrelerinde Cyto-ID boyanması sonucunda elde edilen plotun temsili gösterimi. C: Kontrol, 300 mM MSM ve 400mM MSM ve kontrol, 300mM MSM, 400mM MSM ve klorokin uygulanan A2780 hücrelerinde Cyto-ID boyanmasına ilişkin ortalama floresanın bar grafik olarak verilmiş şekli.

Elde edilen verilerle MSM'nin otofajik kofulların boyanmasının bir ölçümü olan Cyto-ID boyanmasında hücre ve doza bağımlı farklı etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur.

4. TARTIŞMA

Literatürde MSM'nin farklı kanser hücre serilerinde proliferasyon üzerindeki etkileri incelendiğinde, Melanoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada 200mM MSM varlığında melanoma hücre proliferasyonu önemli ölçüde inhibe edildiği bildirilmiştir (Caron vd, 2010). Bir başka çalışmada ise meme kanseri hücrelerinde büyümenin logaritmik fazı sırasında MSM ile tedavi edilen hücrelerin sayısı kontrol hücrelerinininkiyile karşılaştırılmış ve MDA-MB 231 hücre büyümesinin, 300mM MSM ile yaklaşık %55 ve 500mM MSM ile yaklaşık %70 oranında inhibe olduğu bildirilmiştir. 300mM MSM ile ~%38 ve 500mM MSM ile ~%70 SK-BR3 hücre büyümesi inhibe olmuştur. Bunlara ek olarak MSM ile tedavi doza bağlı olarak MDA-MB 231 ve SK-BR3 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır (Lim vd., 2012). MCF-7 meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada MSM'nin Tamoksifen ile kombinasyonu incelenmiş ve 200mM-20 µM kombinasyonunda yaklaşık ~%60 ve 300mM-25µM tamoksifen kombinasyonunda ~%40 hücre büyümesinin azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada farklı bir hücre serisi olan T47D hücreleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (SD vd., 2015).Yine meme kanseri hücrelerinin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise MSM ile tedavinin, doza bağlı bir şekilde SK-BR3 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı; 100mM MSM'nin SK-BR3 hücre büyümesini %32, 200 mM dozunun %45 ve 300 mM dozunun ise %51 inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, 300mM MSM konsantrasyonu, IC50 dozu olarak kabul edilerek ileri deneylerde kullanılmıştır (Kang vd., 2016). MSM'nin etkileri gastrointestinal hücrelerde araştırılmış ve hepatoselüler karsinoma (HepG2), insan gastrik karsinoma (AGS), insan özofagus squamöz hücre karsinoma (KYSE-30) hücrelerindeki IC50 değerleri sırasıyla 28.04 mg/ml, 21.87mg/ml and 27.98 mg/ml olarak bildirilmiştir. Bu değerler de 300mM' a yakın konsantrasyonları işaret etmektedir (Jafari vd., 2012).

Literatürde MSM'nin over kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız MSM konsantrasyonlarına karşılık elde ettiğimiz canlılık değerleri literatürle paralellik göstermektedir. 300mM ve sonrası dozlarda canlılık önemli ölçüde azalmaktadır.

Literatürde 600mM MSM dozunda melanoma hücrelerinde %63 apoptoz bildirilmiştir (Caron vd., 2010). MSM'nin, MDA-MB-231 hücrelerinde 300mM dozda apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Lim vd., 2012). Bir başka çalışmada ise MSM'nin karaciğer kanseri hücrelerinde kaspaz 8, kaspaz 3, PARP fragmentasyonu artışı aracılığıyla apoptotik etkilerini gösterdiği ortaya konulmuştur (Kim vd., 2014). 200mM metil sülfonun

murin 4T1 (66cl-4) kanserli hücrelerde apoptozu tetiklediği, hücre proliferasyonunu ve DNA sentezini azalttığını, hücrelerin hücre dışı bir matris yoluyla göçünü inhibe ettiğini ve temas inhibisyonunu ve ankoraj bağımlı büyümeyi indüklediğini bulmuşlardır (Caron vd., 2013). Aynı çalışmada 200mM konsantrasyonda benzer şekilde apoptozun tetiklendiği görülmüştür. Bizim çalışmamızda bu çalışmalara paralel olarak MSM'nin hücre canlılığını azaltıcı etkilerini apoptoz aracılığıyla gerçekleştirdiği belirlenmiştir.

Literatürde MSM'nin 150 ve 200mM konsantrasyonlarda gingival kanser hücrelerinde (Nipin vd., 2017), 200mM konsantrasyonda HT-29 hücrelerinde (Kim vd., 2020), 500mM konsantrasyonda hepatik kanser hücrelerinde (Kim vd., 2014), 300mM konsantrasyonda kolon kanseri hücrelerinde (Karabay vd., 2016) kaspaz enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmamızda literatürle paralel olarak MSM'nin kaspaz 3 enzim aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir.

Elde edilen verilerle MSM'nin otofajik kofulların boyanmasının bir ölçümü olan Cyto-ID boyanmasında hücre ve doza bağımlı farklı etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Klorokin eklenen hücrelerdeki floresan ışımadaki azalma MSM'nin klorokinle indüklenen otofagazom lizozom birleşmesinin baskılanmasını azaltarak otofajik akışı uyarıyor olabilir ancak mekanizmanın ileri çalışmalarla aydınlatılması gerekir (Han vd., 2020). Literatürde ise MSM'nin otofaji üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 over kanser hücreleri MSM'nin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiş ve bunun sonucunda hücre canlılıkları anlamlı ölçüde azalmıştır. Ayrıntılı olarak bakıldığında OVCAR-3 hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlenmiş, 300mM MSM dozunda canlılık % 59,66 iken 400mM konsantrasyonda % 56,94' e, 500mM konsantrasyonda ise %44,06'ya gerilemiştir. MSM'nin SKOV-3 hücre canlılığını da doz bağımlı olarak azalttığı belirlenmiştir. MSM, SKOV-3 hücre canlılığını 300mM konsantrasyonda 48,43'e, 400mM konsantrasyonda ise 39,08'e düşürmüştür. MSM'nin A2780 hücre canlılığını ise 200mM ve üzerindeki dozlarda anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir. Her üç over kanseri hücre serisinde de MSM'nin canlılığı anlamlı ve doz bağımlı olarak azalttığı belirlenmiş, literatür bilgisinden de hareketle, MSM'nin etki mekanizmasını belirlemek üzere en etkin azalmayı gösteren 300mM ve 400mM konsantrasyonları belirlenmiştir.

MSM uygulanan hücrelerdeki morfolojik değişiklikler ışık mikroskopunda da takip edilmiştir. Buna göre, MSM uygulanan OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 hücrelerinde kontrol hücrelere göre temas ve tutunmanın azaldığı ve sitoplazmanın büzüşerek küçüldüğü gözlenmiştir.

MSM'nin over kanseri hücre serilerinde apoptoz üzerindeki etkilerini belirlemek için akım sitometri ile Annexin V-PE ve 7AAD ile yapılan ikili boyamada MSM 300 mM ve 400 mM dozlarında OVCAR-3 hücrelerde apoptozu indüklemiştir. MSM'nin SKOV-3 ve A2780 hücrelerinde ise 300mM ve 400mM dozlarında erken apoptozu arttırdığı belirlenmiştir.

MSM, her üç hücre serisinde de kaspaz 3 enzim aktivitesini 300mM dozda anlamlı olarak arttırmış ve hücrelerin apoptoza girdiğini doğrulamıştır.

Otofajik boyama olarak kullanılan Cyto-ID boyaması sonucunda SKOV-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre 300mM ve 400mM MSM tedavili hücrelerde boyanma artış göstermiş, OVCAR-3 hücrelerinde 300mM MSM tedavisi ile boyanma artmış, 400mM MSM ile ise boyanma azalmıştır. A2780 hücrelerinde ise 400mM MSM tedavi dozunda azalma görülmüştür. Klorokin eklenen OVCAR-3 hücrelerinde 300mM MSM' da anlamlı olmamasına rağmen bir azalma gözlenmiş; 400 mM MSM hücrelerinde ise anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Klorokin eklenen A2780 hücrelerine hücrelerine baktığımızda ise

hem 300mM MSM hemde 400mM MSM uygulanan hücrelerde anlamlı bir azalma olmuştur.

Elde edilen verilerle MSM'nin otofajik kofulların boyanmasının bir ölçümü olan Cyto-ID boyanmasında hücre ve doza bağımlı farklı etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. MSM'nin otofaji üzerindeki etkilerinin daha ileri olarak analiz edilmesi, etkilerini net olarak ortaya koyacaktır.



KAYNAKLAR

- Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., El Hadri, K., Friguet, B., Simmet, T., Rouis, M. (2015). NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*, 4, 296-307. doi:10.1016/j.redox.2015.01.0vc08
- Ahn, H., Kim, J., Lee, M. J., Kim, Y. J., Cho, Y. W., Lee, G. S. (2015). Methylsulfonylmethane inhibits NLRP3 inflammasome activation. *Cytokine*, 71(2), 223-231. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.001
- Alam, S. S., Layman, D. L. (1983). Dimethyl sulfoxide inhibition of prostacyclin production in cultured aortic endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci*, 411, 318-320. doi:10.1111/j.1749-6632.1983.tb47314.x
- Ali, A. T. (2018). Fertility Drugs and Ovarian Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 18(6), 567-576. doi:10.2174/1568009617666170620102049
- Amirshahrokhi, K., Bohlooli, S., Chinifroush, M. M. (2011). The effect of methylsulfonylmethane on the experimental colitis in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 253(3), 197-202. doi:10.1016/j.taap.2011.03.017
- Arafa, N. M., Hamuda, H. M., Melek, S. T., Darwish, S. K. (2013). The effectiveness of Echinacea extract or composite glucosamine, chondroitin and methyl sulfonyl methane supplements on acute and chronic rheumatoid arthritis rat model. *Toxicol Ind Health*, 29(2), 187-201. doi:10.1177/0748233711428643
- Barmaki, S., Bohlooli, S., Khoshkhashesh, F., Nakhostin-Roohi, B. (2012). Effect of methylsulfonylmethane supplementation on exercise - Induced muscle damage and total antioxidant capacity. *J Sports Med Phys Fitness*, 52(2), 170-174.
- Barrager, E., Schauss, A. G. (2003). Methylsulfonylmethane as a treatment for seasonal allergic rhinitis: additional data on pollen counts and symptom questionnaire. *J Altern Complement Med*, 9(1), 15-16. doi:10.1089/107555303321222874
- Barrager, E., Veltmann, J. R., Jr., Schauss, A. G., Schiller, R. N. (2002). A multicentered, open-label trial on the safety and efficacy of methylsulfonylmethane in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Altern Complement Med*, 8(2), 167-173. doi:10.1089/107555302317371451
- Beilke, M. A., Collins-Lech, C., Sohnle, P. G. (1987). Effects of dimethyl sulfoxide on the oxidative function of human neutrophils. *J Lab Clin Med*, 110(1), 91-96.
- Beral, V., Bull, D., Reeves, G. (2005). Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 365(9470), 1543-1551. doi:10.1016/s0140-6736(05)66455-0
- Bertken, R. (1983). "Crystalline DMSO": DMSO2. *Arthritis Rheum*, 26(5), 693-694. doi:10.1002/art.1780260525

- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D., Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo j*, 17(1), 37-49. doi:10.1093/emboj/17.1.37
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brien, S., Prescott, P., Bashir, N., Lewith, H., Lewith, G. (2008). Systematic review of the nutritional supplements dimethyl sulfoxide (DMSO) and methylsulfonylmethane (MSM) in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 16(11), 1277-1288. doi:10.1016/j.joca.2008.03.002
- Brim, T. A., Center, V., Wynn, S. G., Springs, S., Gray, L. F., Brown, L. P. (2010). More on accidental overdosage of joint supplements. *J Am Vet Med Assoc*, 236(10), 1061-1062.
- Butawan, M., Benjamin, R. L., Bloomer, R. J. (2017). Methylsulfonylmethane: Applications and Safety of a Novel Dietary Supplement. *Nutrients*, 9(3). doi:10.3390/nu9030290
- Candussio, L., Klugmann, F. B., Decorti, G., Bevilacqua, S., Baldini, L. (1987). Dimethyl sulfoxide inhibits histamine release induced by various chemicals. *Agents Actions*, 20(1-2), 17-21. doi:10.1007/bf01965621
- Caron, J. M., Bannon, M., Rosshirt, L., Luis, J., Monteagudo, L., Caron, J. M., Sternstein, G. M. (2010). Methyl sulfone induces loss of metastatic properties and reemergence of normal phenotypes in a metastatic cloudman S-91 (M3) murine melanoma cell line. *PLoS One*, 5(8), e11788. doi:10.1371/journal.pone.0011788
- Caron, J. M., Bannon, M., Rosshirt, L., O'Donovan, L. (2013). Methyl sulfone manifests anticancer activity in a metastatic murine breast cancer cell line and in human breast cancer tissue--part I: murine 4T1 (66cl-4) cell line. *Chemotherapy*, 59(1), 14-23. doi:10.1159/000351100
- Caron, J. M., Caron, J. M. (2015). Methyl Sulfone Blocked Multiple Hypoxia- and Non-Hypoxia-Induced Metastatic Targets in Breast Cancer Cells and Melanoma Cells. *PLoS One*, 10(11), e0141565. doi:10.1371/journal.pone.0141565
- Caron, J. M., Monteagudo, L., Sanders, M., Bannon, M., Deckers, P. J. (2013). Methyl sulfone manifests anticancer activity in a metastatic murine breast cancer cell line and in human breast cancer tissue--part 2: human breast cancer tissue. *Chemotherapy*, 59(1), 24-34. doi:10.1159/000351099
- Cecil, K. M., Lin, A., Ross, B. D., Egelhoff, J. C. (2002). Methylsulfonylmethane observed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in a 5-year-old child with developmental disorder: effects of dietary supplementation. *J Comput Assist Tomogr*, 26(5), 818-820. doi:10.1097/00004728-200209000-00026
- Celepli, S. B., İrem; Celepli, Pınar; Karagin, Peren Hatice (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *güncel gastroenteroloji dergisi* 24/3.

- Cerdá, B., Pérez, M., Pérez-Santiago, J. D., Tornero-Aguilera, J. F., González-Soltero, R., Larrosa, M. (2016). Gut Microbiota Modification: Another Piece in the Puzzle of the Benefits of Physical Exercise in Health? *Front Physiol*, 7, 51. doi:10.3389/fphys.2016.00051
- Childs, S. J. (1994). Dimethyl sulfone (DMSO₂) in the treatment of interstitial cystitis. *Urol Clin North Am*, 21(1), 85-88.
- Choi, A. M., Ryter, S. W., Levine, B. (2013). Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*, 368(7), 651-662. doi:10.1056/NEJMra1205406
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G. K. (2008). Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151(1), 10-27. doi:10.1016/j.cbpb.2008.05.010
- Christian, F., Smith, E. L., Carmody, R. J. (2016). The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells*, 5(1). doi:10.3390/cells5010012
- Clark, T., Murray, J. S., Lane, P., Politzer, P. (2008). Why are dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone such good solvents? *J Mol Model*, 14(8), 689-697. doi:10.1007/s00894-008-0279-y
- Coleman, J. W. (2002). Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol*, 129(1), 4-10. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01918.x
- Cotter, T. G., al-Rubeai, M. (1995). Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *Trends Biotechnol*, 13(4), 150-155. doi:10.1016/s0167-7799(00)88926-x
- Creagh, E. M., Conroy, H., Martin, S. J. (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*, 193, 10-21. doi:10.1034/j.1600-065x.2003.00048.x
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(11). doi:10.1101/pdb.prot087288
- Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*, 6, 472-485. doi:10.1016/j.redox.2015.09.005
- Debbi, E. M., Agar, G., Fichman, G., Ziv, Y. B., Kardosh, R., Halperin, N., . . . Debi, R. (2011). Efficacy of methylsulfonylmethane supplementation on osteoarthritis of the knee: a randomized controlled study. *BMC Complement Altern Med*, 11, 50. doi:10.1186/1472-6882-11-50
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53), 8543-8567. doi:10.1038/sj.onc.1207107
- Deter, R. L., De Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol*, 33(2), 437-449. doi:10.1083/jcb.33.2.437

- Doubeni, C. A., Doubeni, A. R., Myers, A. E. (2016). Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician*, 93(11), 937-944.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Ezaki, J., Hashimoto, M., Hosokawa, Y., Ishimi, Y. (2013). Assessment of safety and efficacy of methylsulfonylmethane on bone and knee joints in osteoarthritis animal model. *J Bone Miner Metab*, 31(1), 16-25. doi:10.1007/s00774-012-0378-9
- Friebel, T. M., Domchek, S. M., Rebbeck, T. R. (2014). Modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 106(6), dju091. doi:10.1093/jnci/dju091
- Fuchs, Y., Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), 742-758. doi:10.1016/j.cell.2011.10.033
- Fulda, S. (2009). Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett*, 281(2), 128-133. doi:10.1016/j.canlet.2008.11.023
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 8 Suppl 2(Suppl 2), S3. doi:10.1186/ar1917
- Gaby, A. R. (2002). Methylsulfonylmethane as a treatment for seasonal allergic rhinitis: more data needed on pollen counts and questionnaire. *J Altern Complement Med*, 8(3), 229. doi:10.1089/10755530260127925
- Gerhards, E., Gibian, H. (1967). The metabolism of dimethyl sulfoxide and its metabolic effects in man and animals. *Ann N Y Acad Sci*, 141(1), 65-76. doi:10.1111/j.1749-6632.1967.tb34867.x
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221(1), 3-12. doi:10.1002/path.2697
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(6), 2129-2144. doi:10.7314/apjcp.2015.16.6.2129
- Grimble, R. F. (2006). The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *J Nutr*, 136(6 Suppl), 1660s-1665s. doi:10.1093/jn/136.6.1660S
- Gross, A. (2016). BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1857(8), 1243-1246. doi:10.1016/j.bbabbio.2016.01.017
- Guicciardi, M. E., Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *Faseb j*, 23(6), 1625-1637. doi:10.1096/fj.08-111005

- Gumina, S., Passaretti, D., Gurzi, M. D., Candela, V. (2012). Arginine L-alpha-ketoglutarate, methylsulfonylmethane, hydrolyzed type I collagen and bromelain in rotator cuff tear repair: a prospective randomized study. *Curr Med Res Opin*, 28(11), 1767-1774. doi:10.1185/03007995.2012.737772
- He, S., Zimmerman, M. W., Layden, H. M., Berezovskaya, A., Etchin, J., Martel, M. W., . . . Look, A. T. (2021). Synergistic melanoma cell death mediated by inhibition of both MCL1 and BCL2 in high-risk tumors driven by NF1/PTEN loss. *Oncogene*, 40(38), 5718-5729. doi:10.1038/s41388-021-01926-y
- He, X., Slupsky, C. M. (2014). Metabolic fingerprint of dimethyl sulfone (DMSO₂) in microbial-mammalian co-metabolism. *J Proteome Res*, 13(12), 5281-5292. doi:10.1021/pr500629t
- He, Y., Hara, H., Núñez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*, 41(12), 1012-1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002
- Hengartner, M. O. (2001). Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, 104(3), 325-328. doi:10.1016/s0092-8674(01)00219-7
- Higler, M. H., Brommer, H., L'Ami, J. J., de Grauw, J. C., Nielen, M., van Weeren, P. R., . . . Back, W. (2014). The effects of three-month oral supplementation with a nutraceutical and exercise on the locomotor pattern of aged horses. *Equine Vet J*, 46(5), 611-617. doi:10.1111/evj.12182
- Hiramine, C. (1997). [Definition and morphological features of apoptosis]. *Rinsho Byori*, 45(5), 459-469.
- Horváth, K., Noker, P. E., Somfai-Relle, S., Glávits, R., Financsek, I., Schauss, A. G. (2002). Toxicity of methylsulfonylmethane in rats. *Food Chem Toxicol*, 40(10), 1459-1462. doi:10.1016/s0278-6915(02)00086-80.1.1
- Höll, M., Koziel, R., Schäfer, G., Pircher, H., Pauck, A., Hermann, M., . . . Sampson, N. (2016). ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells. *Mol Carcinog*, 55(1), 27-39. doi:10.1002/mc.22255
- Jafari, N., Bohlooli, S., Mohammadi, S., Mazani, M. (2012). Cytotoxicity of methylsulfonylmethane on gastrointestinal (AGS, HepG2, and KEYSE-30) cancer cell lines. *J Gastrointest Cancer*, 43(3), 420-425. doi:10.1007/s12029-011-9291-z
- Jørgensen, S., Kjaergaard, H. G. (2010). Effect of hydration on the hydrogen abstraction reaction by HO in DMS and its oxidation products. *J Phys Chem A*, 114(14), 4857-4863. doi:10.1021/jp910202n
- Joung, Y. H., Darvin, P., Kang, D. Y., Sp, N., Byun, H. J., Lee, C. H., . . . Yang, Y. M. (2016). Methylsulfonylmethane Inhibits RANKL-Induced Osteoclastogenesis in BMMs by Suppressing NF-κB and STAT3 Activities. *PLoS One*, 11(7), e0159891. doi:10.1371/journal.pone.0159891

- Joung, Y. H., Na, Y. M., Yoo, Y. B., Darvin, P., Sp, N., Kang, D. Y., . . . Yang, Y. M. (2014). Combination of AG490, a Jak2 inhibitor, and methylsulfonylmethane synergistically suppresses bladder tumor growth via the Jak2/STAT3 pathway. *Int J Oncol*, 44(3), 883-895. doi:10.3892/ijo.2014.2250
- Kalman, D. S., Feldman, S., Scheinberg, A. R., Krieger, D. R., Bloomer, R. J. (2012). Influence of methylsulfonylmethane on markers of exercise recovery and performance in healthy men: a pilot study. *J Int Soc Sports Nutr*, 9(1), 46. doi:10.1186/1550-2783-9-46
- Kamel, R., El Morsy, E. M. (2013). Hepatoprotective effect of methylsulfonylmethane against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Arch Pharm Res*, 36(9), 1140-1148. doi:10.1007/s12272-013-0110-x
- Kang, D. Y., Darvin, P., Yoo, Y. B., Joung, Y. H., Sp, N., Byun, H. J., Yang, Y. M. (2016). Methylsulfonylmethane inhibits HER2 expression through STAT5b in breast cancer cells. *Int J Oncol*, 48(2), 836-842. doi:10.3892/ijo.2015.3277
- Kang, D. Y., Sp, N., Bae, S. W., Jang, K. J. (2022). Methylsulfonylmethane relieves cobalt chloride-induced hypoxic toxicity in C2C12 myoblasts. *Life Sci*, 301, 120619. doi:10.1016/j.lfs.2022.120619
- Karabay, A. Z., Aktan, F., Sunguroğlu, A., Buyukbingol, Z. (2014). Methylsulfonylmethane modulates apoptosis of LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophage-like cells by targeting p53, Bax, Bcl-2, cytochrome c and PARP proteins. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 36(6), 379-389. doi:10.3109/08923973.2014.956752
- Karabay, A. Z., Koc, A., Ozkan, T., Hekmatshoar, Y., Sunguroglu, A., Aktan, F., Buyukbingol, Z. (2016). Methylsulfonylmethane Induces p53 Independent Apoptosis in HCT-116 Colon Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 17(7). doi:10.3390/ijms17071123
- Kawai, K., Li, Y. S., Song, M. F., Kasai, H. (2010). DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications. *Bioorg Med Chem Lett*, 20(1), 260-265. doi:10.1016/j.bmcl.2009.10.124
- Kesavardhana, S., Malireddi, R. K. S., Kanneganti, T. D. (2020). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annu Rev Immunol*, 38, 567-595. doi:10.1146/annurev-immunol-073119-095439
- Khan, S. A., McLean, M. K., Gwaltney-Brant, S. (2010). Accidental overdosage of joint supplements in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 236(5), 509-510.
- Khosravi-Far, R., Esposti, M. D. (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*, 3(11), 1051-1057. doi:10.4161/cbt.3.11.1173
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020(4), 102269. doi:10.1101/pdb.prot102269
- Kim, D. H., Kang, D. Y., Sp, N., Jo, E. S., Rugamba, A., Jang, K. J., Yang, Y. M. (2020). Methylsulfonylmethane Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis, and Suppresses the

Stemness Potential of HT-29 Cells. *Anticancer Res*, 40(9), 5191-5200. doi:10.21873/anticancer.14522

- Kim, D. H., Sp, N., Kang, D. Y., Jo, E. S., Rugamba, A., Jang, K. J., Yang, Y. M. (2020). Effect of Methylsulfonylmethane on Proliferation and Apoptosis of A549 Lung Cancer Cells Through G(2)/M Cell-cycle Arrest and Intrinsic Cell Death Pathway. *Anticancer Res*, 40(4), 1905-1913. doi:10.21873/anticancer.14145
- Kim, J. H., Shin, H. J., Ha, H. L., Park, Y. H., Kwon, T. H., Jung, M. R., . . . Yu, D. Y. (2014). Methylsulfonylmethane suppresses hepatic tumor development through activation of apoptosis. *World J Hepatol*, 6(2), 98-106. doi:10.4254/wjh.v6.i2.98
- Kim, L. S., Axelrod, L. J., Howard, P., Buratovich, N., Waters, R. F. (2006). Efficacy of methylsulfonylmethane (MSM) in osteoarthritis pain of the knee: a pilot clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(3), 286-294. doi:10.1016/j.joca.2005.10.003
- Kim, S. H., Smith, A. J., Tan, J., Shytle, R. D., Giunta, B. (2015). MSM ameliorates HIV-1 Tat induced neuronal oxidative stress via rebalance of the glutathione cycle. *Am J Transl Res*, 7(2), 328-338.
- Kim, Y. H., Kim, D. H., Lim, H., Baek, D. Y., Shin, H. K., Kim, J. K. (2009). The anti-inflammatory effects of methylsulfonylmethane on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. *Biol Pharm Bull*, 32(4), 651-656. doi:10.1248/bpb.32.651
- Kloesch, B., Liszt, M., Broell, J., Steiner, G. (2011). Dimethyl sulphoxide and dimethyl sulphone are potent inhibitors of IL-6 and IL-8 expression in the human chondrocyte cell line C-28/I2. *Life Sci*, 89(13-14), 473-478. doi:10.1016/j.lfs.2011.07.015
- Kocsis, J. J., Harkaway, S., Snyder, R. (1975). Biological effects of the metabolites of dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci*, 243, 104-109. doi:10.1111/j.1749-6632.1975.tb25349.x
- Kontos, C. K., Christodoulou, M. I., Scorilas, A. (2014). Apoptosis-related BCL2-family members: Key players in chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 14(3), 353-374. doi:10.2174/18715206113139990091
- Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., Domińska, K., Urbanek, K. A., Piastowska-Ciesielska, A. W. (2018). Methylsulfonylmethane (organic sulfur) induces apoptosis and decreases invasiveness of prostate cancer cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 64, 101-111. doi:10.1016/j.etap.2018.10.001
- Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., Kurczewska, D., Domińska, K., Urbanek, K. A., Piastowska-Ciesielska, A. W. (2021). Methylsulfonylmethane sensitizes endometrial cancer cells to doxorubicin. *Cell Biol Toxicol*, 37(2), 261-275. doi:10.1007/s10565-020-09542-4
- Kuma, A., Komatsu, M., Mizushima, N. (2017). Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy*, 13(10), 1619-1628. doi:10.1080/15548627.2017.1343770
- Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018(6). doi:10.1101/pdb.prot095505

- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651
- Layman, D. L. (1987). Growth inhibitory effects of dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone on vascular smooth muscle and endothelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol*, 23(6), 422-428. doi:10.1007/bf02623858
- Lim, E. J., Hong, D. Y., Park, J. H., Joung, Y. H., Darvin, P., Kim, S. Y., . . . Yang, Y. M. (2012). Methylsulfonylmethane suppresses breast cancer growth by down-regulating STAT3 and STAT5b pathways. *PLoS One*, 7(4), e33361. doi:10.1371/journal.pone.0033361
- Lin, A., Nguy, C. H., Shic, F., Ross, B. D. (2001). Accumulation of methylsulfonylmethane in the human brain: identification by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Toxicol Lett*, 123(2-3), 169-177. doi:10.1016/s0378-4274(01)00396-4
- Liu, D., Chen, C., Cui, M., Zhang, H. (2021). miR-140-3p inhibits colorectal cancer progression and its liver metastasis by targeting BCL9 and BCL2. *Cancer Med*, 10(10), 3358-3372. doi:10.1002/cam4.3840
- Liu, D., Xu, Y. (2011). p53, oxidative stress, and aging. *Antioxid Redox Signal*, 15(6), 1669-1678. doi:10.1089/ars.2010.3644
- Luna-Vargas, M. P., Chipuk, J. E. (2016). The deadly landscape of pro-apoptotic BCL-2 proteins in the outer mitochondrial membrane. *Febs j*, 283(14), 2676-2689. doi:10.1111/febs.13624
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 401-426. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320
- Magnuson, B. A., Appleton, J., Ames, G. B. (2007). Pharmacokinetics and distribution of [35S]methylsulfonylmethane following oral administration to rats. *J Agric Food Chem*, 55(3), 1033-1038. doi:10.1021/jf0621469
- Magnuson, B. A., Appleton, J., Ryan, B., Matulka, R. A. (2007). Oral developmental toxicity study of methylsulfonylmethane in rats. *Food Chem Toxicol*, 45(6), 977-984. doi:10.1016/j.fct.2006.12.003
- Magrans-Courtney, T., Wilborn, C., Rasmussen, C., Ferreira, M., Greenwood, L., Campbell, B., . . . Kreider, R. B. (2011). Effects of diet type and supplementation of glucosamine, chondroitin, and MSM on body composition, functional status, and markers of health in women with knee osteoarthritis initiating a resistance-based exercise and weight loss program. *J Int Soc Sports Nutr*, 8(1), 8. doi:10.1186/1550-2783-8-8
- Mallen, A. R., Townsend, M. K., TwoRoger, S. S. (2018). Risk Factors for Ovarian Carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 32(6), 891-902. doi:10.1016/j.hoc.2018.07.002
- Manea, A., Tanase, L. I., Raicu, M., Simionescu, M. (2010). Jak/STAT signaling pathway regulates nox1 and nox4-based NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(1), 105-112. doi:10.1161/atvbaha.109.193896

- Martinvalet, D., Zhu, P., Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 22(3), 355-370. doi:10.1016/j.immuni.2005.02.004
- McCabe, D., O'Dwyer, P., Sickie-Santanello, B., Woltering, E., Abou-Issa, H., James, A. (1986). Polar solvents in the chemoprevention of dimethylbenzanthracene-induced rat mammary cancer. *Arch Surg*, 121(12), 1455-1459. doi:10.1001/archsurg.1986.01400120105017
- McCluggage, W. G. (2011). Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology*, 43(5), 420-432. doi:10.1097/PAT.0b013e328348a6e7
- Miller, D. K. (1997). The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol*, 9(1), 35-49. doi:10.1006/smim.1996.0058
- Mizushima, N., Levine, B. (2020). Autophagy in Human Diseases. *N Engl J Med*, 383(16), 1564-1576. doi:10.1056/NEJMra2022774
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075. doi:10.1038/nature06639
- Moazzami, A. A., Zhang, J. X., Kamal-Eldin, A., Aman, P., Hallmans, G., Johansson, J. E., Andersson, S. O. (2011). Nuclear magnetic resonance-based metabolomics enable detection of the effects of a whole grain rye and rye bran diet on the metabolic profile of plasma in prostate cancer patients. *J Nutr*, 141(12), 2126-2132. doi:10.3945/jn.111.148239
- Morton, J. I., Siegel, B. V. (1986). Effects of oral dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone on murine autoimmune lymphoproliferative disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 183(2), 227-230. doi:10.3181/00379727-183-42409
- Murav'ev Iu, V., Venikova, M. S., Pleskovskaia, G. N., Riazantseva, T. A., Sigidin Ia, A. (1991). [Effect of dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone on a destructive process in the joints of mice with spontaneous arthritis]. *Patol Fiziol Eksp Ter*(2), 37-39.
- Nakasone, Y., Watabe, K., Watanabe, K., Tomonaga, A., Nagaoka, I., Yamamoto, T., Yamaguchi, H. (2011). Effect of a glucosamine-based combination supplement containing chondroitin sulfate and antioxidant micronutrients in subjects with symptomatic knee osteoarthritis: A pilot study. *Exp Ther Med*, 2(5), 893-899. doi:10.3892/etm.2011.298
- Nakhostin-Roohi, B., Barmaki, S., Khoshkharesh, F., Bohlooli, S. (2011). Effect of chronic supplementation with methylsulfonylmethane on oxidative stress following acute exercise in untrained healthy men. *J Pharm Pharmacol*, 63(10), 1290-1294. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01314.x
- Nakhostin-Roohi, B., Niknam, Z., Vaezi, N., Mohammadi, S., Bohlooli, S. (2013). Effect of single dose administration of methylsulfonylmethane on oxidative stress following acute exhaustive exercise. *Iran J Pharm Res*, 12(4), 845-853.

- Notarnicola, A., Maccagnano, G., Moretti, L., Pesce, V., Tafuri, S., Fiore, A., Moretti, B. (2016). Methylsulfonylmethane and boswellic acids versus glucosamine sulfate in the treatment of knee arthritis: Randomized trial. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 29(1), 140-146. doi:10.1177/0394632015622215
- Notarnicola, A., Tafuri, S., Fusaro, L., Moretti, L., Pesce, V., Moretti, B. (2011). The "MESACA" study: methylsulfonylmethane and boswellic acids in the treatment of gonarthrosis. *Adv Ther*, 28(10), 894-906. doi:10.1007/s12325-011-0068-3
- O'Dwyer, P. J., McCabe, D. P., Sickle-Santanello, B. J., Woltering, E. A., Clausen, K., Martin, E. W., Jr. (1988). Use of polar solvents in chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Cancer*, 62(5), 944-948. doi:10.1002/1097-0142(19880901)62:5<944::aid-cncr2820620516>3.0.co;2-a
- Onorati, A. V., Dyczynski, M., Ojha, R., Amaravadi, R. K. (2018). Targeting autophagy in cancer. *Cancer*, 124(16), 3307-3318. doi:10.1002/cncr.31335
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, 45(6), 487-498. doi:10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x
- P, N. S., Kang, D. Y., Kim, B. J., Joung, Y. H., Darvin, P., Byun, H. J., . . . Yang, Y. M. (2017). Methylsulfonylmethane Induces G(1) Arrest and Mitochondrial Apoptosis in YD-38 Gingival Cancer Cells. *Anticancer Res*, 37(4), 1637-1646. doi:10.21873/anticancer.11494
- Palmnäs, M. S., Cowan, T. E., Bomhof, M. R., Su, J., Reimer, R. A., Vogel, H. J., . . . Shearer, J. (2014). Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLoS One*, 9(10), e109841. doi:10.1371/journal.pone.0109841
- Parcell, S. (2002). Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev*, 7(1), 22-44.
- Park, D. J., Thomas, N. J., Yoon, C., Yoon, S. S. (2015). Vascular endothelial growth factor a inhibition in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 18(1), 33-42. doi:10.1007/s10120-014-0397-4
- Pearson, T. W., Dawson, H. J., Lackey, H. B. (1981). Natural occurring levels of dimethyl sulfoxide in selected fruits, vegetables, grains, and beverages. *J Agric Food Chem*, 29(5), 1089-1091. doi:10.1021/jf00107a049
- Peres, L. C., Risch, H., Terry, K. L., Webb, P. M., Goodman, M. T., Wu, A. H., . . . Schildkraut, J. M. (2018). Racial/ethnic differences in the epidemiology of ovarian cancer: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Int J Epidemiol*, 47(2), 460-472. doi:10.1093/ije/dyx252
- Pinto, J., Barros, A. S., Domingues, M. R., Goodfellow, B. J., Galhano, E., Pita, C., . . . Gil, A. M. (2015). Following healthy pregnancy by NMR metabolomics of plasma and correlation to urine. *J Proteome Res*, 14(2), 1263-1274. doi:10.1021/pr5011982

- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603-619. doi:10.18632/aging.100934
- Ramírez-Anguita, J. M., González-Lafont, A., Lluch, J. M. (2009). Formation pathways of DMSO(2) in the addition channel of the OH-initiated DMS oxidation: A theoretical study. *J Comput Chem*, 30(9), 1477-1489. doi:10.1002/jcc.21168
- Ramoutar, R. R., Brumaghim, J. L. (2010). Antioxidant and anticancer properties and mechanisms of inorganic selenium, oxo-sulfur, and oxo-selenium compounds. *Cell Biochem Biophys*, 58(1), 1-23. doi:10.1007/s12013-010-9088-x
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1863(12), 2977-2992. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012
- Renner, W., Langsenlehner, U., Krenn-Pilko, S., Eder, P., Langsenlehner, T. (2017). BCL2 genotypes and prostate cancer survival. *Strahlenther Onkol*, 193(6), 466-471. doi:10.1007/s00066-017-1126-9
- Riman, T., Nilsson, S., Persson, I. R. (2004). Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 83(9), 783-795. doi:10.1111/j.0001-6349.2004.00550.x
- Roett, M. A., Evans, P. (2009). Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician*, 80(6), 609-616.
- Rogovin, J. L. (2002). Accumulation of methylsulfonylmethane in the human brain: identification by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Toxicol Lett*, 129(3), 263; author reply 265. doi:10.1016/s0378-4274(02)00022-x
- Rooth, C. (2013). Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. *Br J Nurs*, 22(17), S23-30. doi:10.12968/bjon.2013.22.Sup17.S23
- Rose, S. E., Chalk, J. B., Galloway, G. J., Doddrell, D. M. (2000). Detection of dimethyl sulfone in the human brain by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging*, 18(1), 95-98. doi:10.1016/s0730-725x(99)00110-1
- S, P. N., Darvin, P., Yoo, Y. B., Joung, Y. H., Kang, D. Y., Kim, D. N., . . . Yang, Y. M. (2015). The combination of methylsulfonylmethane and tamoxifen inhibits the Jak2/STAT5b pathway and synergistically inhibits tumor growth and metastasis in ER-positive breast cancer xenografts. *BMC Cancer*, 15, 474. doi:10.1186/s12885-015-1445-0
- Saftig, P., Beertsen, W., Eskelinen, E. L. (2008). LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*, 4(4), 510-512. doi:10.4161/auto.5724
- Satia, J. A., Littman, A., Slatore, C. G., Galanko, J. A., White, E. (2009). Associations of herbal and specialty supplements with lung and colorectal cancer risk in the VITamins and Lifestyle study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(5), 1419-1428. doi:10.1158/1055-9965.Epi-09-0038

- Schneider, P., Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv*, 74(2-3), 281-286. doi:10.1016/s0031-6865(99)00038-2
- Siddiqui, W. A., Ahad, A., Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol*, 89(3), 289-317. doi:10.1007/s00204-014-1448-7
- Silva Ferreira, A. C., Rodrigues, P., Hogg, T., Guedes De Pinho, P. (2003). Influence of some technological parameters on the formation of dimethyl sulfide, 2-mercaptoethanol, methionol, and dimethyl sulfone in port wines. *J Agric Food Chem*, 51(3), 727-732. doi:10.1021/jf025934g
- Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(3), 175-193. doi:10.1038/s41580-018-0089-8
- Slatnik, C. L., Duff, E. (2015). Ovarian cancer: Ensuring early diagnosis. *Nurse Pract*, 40(9), 47-54. doi:10.1097/01.NPR.0000450742.00077.a2
- Soria González, J. E., Orea Solano, M. (2002). [Apoptosis]. *Rev Alerg Mex*, 49(4), 121-128.
- Sousa-Lima, I., Park, S. Y., Chung, M., Jung, H. J., Kang, M. C., Gaspar, J. M., . . . Kim, Y. B. (2016). Methylsulfonylmethane (MSM), an organosulfur compound, is effective against obesity-induced metabolic disorders in mice. *Metabolism*, 65(10), 1508-1521. doi:10.1016/j.metabol.2016.07.007
- Sp, N., Kang, D. Y., Jo, E. S., Lee, J. M., Jang, K. J. (2021). Iron Metabolism as a Potential Mechanism for Inducing TRAIL-Mediated Extrinsic Apoptosis Using Methylsulfonylmethane in Embryonic Cancer Stem Cells. *Cells*, 10(11). doi:10.3390/cells10112847
- Stanoszek, L. M., Smith, L. B., Grajewski, K., Reneau, J. C., Wilcox, R., Perry, A. M. (2021). Spontaneous Regression of High-Grade B-Cell Lymphoma With MYC and BCL2 Rearrangements: Case Report and Literature Review. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 21(2), e120-e125. doi:10.1016/j.clml.2020.09.006
- Stewart, C., Ralyea, C., Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs*, 35(2), 151-156. doi:10.1016/j.soncn.2019.02.001
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3.B.1-a3.B.3. doi:10.1002/0471142735.ima03bs111
- Stuber, K., Sajko, S., Kristmanson, K. (2011). Efficacy of glucosamine, chondroitin, and methylsulfonylmethane for spinal degenerative joint disease and degenerative disc disease: a systematic review. *J Can Chiropr Assoc*, 55(1), 47-55.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. doi:10.3322/caac.21660

- Tant, L., Gillard, B., Appelboom, T. (2005). Open-label, randomized, controlled pilot study of the effects of a glucosamine complex on Low back pain. *Curr Ther Res Clin Exp*, 66(6), 511-521. doi:10.1016/j.curtheres.2005.12.009
- Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., . . . Siegel, R. L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, 68(4), 284-296. doi:10.3322/caac.21456
- Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., Stefanadis, C. (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*, 10(1), 4-18. doi:10.2174/157016112798829760
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, 3(11), 697-707. doi:10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x
- Usha, P. R., Naidu, M. U. (2004). Randomised, Double-Blind, Parallel, Placebo-Controlled Study of Oral Glucosamine, Methylsulfonylmethane and their Combination in Osteoarthritis. *Clin Drug Investig*, 24(6), 353-363. doi:10.2165/00044011-200424060-00005
- van der Merwe, M., Bloomer, R. J. (2016). The Influence of Methylsulfonylmethane on Inflammation-Associated Cytokine Release before and following Strenuous Exercise. *J Sports Med (Hindawi Publ Corp)*, 2016, 7498359. doi:10.1155/2016/7498359
- Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobé, G. C., Kerr, J. F. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*, 13, 18-54.
- Wang, C. Z., Ayadi, A. E., Goswamy, J., Finnerty, C. C., Mifflin, R., Sousse, L., . . . Ansari, N. H. (2015). Topically applied metal chelator reduces thermal injury progression in a rat model of brass comb burn. *Burns*, 41(8), 1775-1787. doi:10.1016/j.burns.2015.08.012
- Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis*, 10(3), 177. doi:10.1038/s41419-019-1407-6
- Webb, P. M., Jordan, S. J. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 41, 3-14. doi:10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006
- Werner, H., Bruchim, I. (2012). IGF-1 and BRCA1 signalling pathways in familial cancer. *Lancet Oncol*, 13(12), e537-544. doi:10.1016/s1470-2045(12)70362-5
- Willemsen, M. A., Engelke, U. F., van der Graaf, M., Wevers, R. A. (2006). Methylsulfonylmethane (MSM) ingestion causes a significant resonance in proton magnetic resonance spectra of brain and cerebrospinal fluid. *Neuropediatrics*, 37(5), 312-314. doi:10.1055/s-2006-955968
- Williams, K.I., K S Whittemore, K. S., Mellin, T. N., Layne, D. S. (1965) Oxidation of Dimethyl Sulfoxide to Dimethyl Sulfone in the Rabbit Science 1965 Jul 9;149(3680):203-4. doi: 10.1126/science.149.3680.2

- Williams, K. I., Burstein, S. H., Layne, D. S. (1966a). Dimethyl sulfone: isolation from cows' milk. *Proc Soc Exp Biol Med*, 122(3), 865-866. doi:10.3181/00379727-122-31272
- Williams, K. I., Burstein, S. H., Layne, D. S. (1966b). Metabolism of dimethyl sulfide, dimethyl sulfoxide, and dimethyl sulfone in the rabbit. *Arch Biochem Biophys*, 117(1), 84-87. doi:10.1016/0003-9861(66)90128-7
- Winning, H., Roldán-Marín, E., Dragsted, L. O., Viereck, N., Poulsen, M., Sánchez-Moreno, C., . . . Engelsen, S. B. (2009). An exploratory NMR nutri-metabonomic investigation reveals dimethyl sulfone as a dietary biomarker for onion intake. *Analyst*, 134(11), 2344-2351. doi:10.1039/b918259d
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30(1), 87. doi:10.1186/1756-9966-30-87
- Xie, Q., Shi, R., Xu, G., Cheng, L., Shao, L., Rao, J. (2008). Effects of AR7 Joint Complex on arthralgia for patients with osteoarthritis: results of a three-month study in Shanghai, China. *Nutr J*, 7, 31. doi:10.1186/1475-2891-7-31
- Zembruski, N. C., Stache, V., Haefeli, W. E., Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem*, 429(1), 79-81. doi:10.1016/j.ab.2012.07.005
- Zhang, H., Davies, K. J. A., Forman, H. J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 314-336. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036