



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**CISPLATIN DİRENÇLİ VE NORMAL A2780 HÜCRE SERİSİNDE
RESVERATROL'ÜN HÜCRE DÖNGÜLERİNE VE NF-KB
AKTİVASYONUNA ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Buse FINDIKLI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**CİSPLATİN DİRENÇLİ VE NORMAL A2780 HÜCRE SERİSİNDE
RESVERATROL'ÜN HÜCRE DÖNGÜLERİNE VE NF-KB
AKTİVASYONUNA ETKİLERİ**

Buse FINDIKLI

Danışman
Doç.Dr Zuhale EROĞLU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç.Dr. Zuhale EROĞLU

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Üye : Prof.Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Biyoloji ve genel olarak bilime merakım sonucunda kendi isteğimle bu bölüme başvurduğum. Evrende canlı olarak nitelendirilen her şeyin araştırılması ve aydınlatılması gerektiğine inancım beni sürekli araştırmaya ve okumaya yönlendirdi. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü ile başlayan biyoloji serüvenim Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim ile devam etti. Bu süreçte pek çok konuda danışmanım, bölüm hocalarım ve arkadaşlarım bana destek oldular.

Bu tez kapsamında doğal bir bileşik olan Resveratrol'un, NF-κB sinyal yolunun inhibisyonu ve hücre döngülerinde meydana gelebilecek değişikliklere bağlı olarak Cisplatin dirençli A2780 hücre hattındaki hücrelerin Cisplatine duyarlı hale gelmesindeki rolü normal hücre serisi ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Çalışmamızın sonraki çalışmalara referans olması umulmaktadır.

Bu tez çalışması Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. BAP birimine tüm desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 12.09.2022

Buse FINDIKLI

Özet

Cisplatin Dirençli ve Normal A2780 Hücre Serisinde Resveratrol'ün Hücre Döngülerine ve NF-κB Aktivasyonuna Etkileri

Yumurtalık kanseri öldürücü bir jinekolojik kanserdir ve genellikle ilerlemiş evrelerde ortaya çıktığından kadınlar arasında en yaygın kanser ölüm nedenidir. Hastalığın derecesine ve ilerleyişine bağlı olarak cerrahi tedavi, radyoterapi veya kemoterapi tedavileri uygulanmaktadır. Cisplatin, kemoterapi tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir ancak uzun Cisplatin tedavi sonrasında kemoterapi direnci gelişebilmektedir.

NF-κB, hücrede pek çok süreci yöneten önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir. Büyük bir hücre sağkalım sinyali olarak, NF-κB kanser hücresinin kemoterapi ve radyoterapiye karşı direncinde birden fazla adımda rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinde NF-κB aktivasyonunun çeşitli antikanser ajanlar ile inhibe edilmesiyle gelişmiş ilaç direncinin tersine çevirebildiği varsayılmaktadır.

Doğal bir polifenol bileşiği olan Resveratrol'ün, çeşitli kanser hücrelerinde antikanser aktivite gösterdiği bildirilmektedir. Üzüm, çilek ve yer fıstığı dahil olmak üzere çeşitli gıdalarda bol miktarda bulunmaktadır. Resveratrol'ün hücrede çeşitli yollar aracılığı ile anti-tümör, anti-inflamatuar ve anti-aterosklerotik etkiler gösterdiği pek çok çalışmada gösterilmiştir. Ek olarak hücre döngüsünü durdurduğu, apoptozu ve otofajiyi indüklediği, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca özellikle hücrede birçok genin ekspresyonundan sorumlu NF-κB sinyal yolağını inhibe ederek ilaca dirençli kanser hücrelerinin ilaca duyarlılığını artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak Cisplatin direnci gelişmiş A2780 hücre hattında Resveratrol'ün hücre döngüleri ve NF-κB aktivitesini inhibe ederek hücreleri Cisplatine duyarlı hale getirip getirmediğini belirten bir literatüre rastlanmadığından araştırmamızın özgün bir değere sahip olacağını düşünmekteyiz.

Bu araştırmada Cisplatin direnci olan ve olmayan yumurtalık kanseri hücre hattı A2780 kullanılarak Resveratrol'ün NF-κB sinyal yolağı üzerindeki aktivasyon değişimlerine bağlı olarak hücre döngüsü, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi hücre içi moleküler mekanizmalara etkisini karşılaştırmalı olarak inceledik. Elde ettiğimiz bulgulara göre Resveratrol'ün A2780 ve A2780cis hücre hatlarında proliferasyonu

inhibe ettiği ve sitotoksik etki gosterdiği bulunmuştur. Sonrasında gerçekleştirdiğimiz huce dongusu analizi, apoptoz analizi ve RT-PCR analizine gore Resveratrol'un literatürle uyumlu şekilde bir etkisinin olmadığını gorduk. Elde ettiğimiz bulgular anlamlı bir sonuç ifade etmediği için sonraki çalışmalarımızda Resveratrol'un Cisplatin ile kombine dozlarda hucelere uygulanmasının ve NF-κB ekspresyonu üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için protein miktar tayinlerinin ve fosforilasyon seviyelerinin llmesinin yararlı olabileceğini dşunmekteyiz.

Anahtar Kelimeler; Resveratrol, cisplatin, Nüklear faktor- κB(NF-κB), yumurtalık kanseri, A2780



Abstract

Effects of Resveratrol on Cell Cycles and NF- κ B Activation in Cisplatin-Resistant and Normal A2780 Cell Lines

Ovarian cancer is a lethal gynecological cancer and is the most common cause of cancer death among women, as it usually occurs in advanced stages. Depending on the degree and progression of the disease, surgical treatment, radiotherapy, or chemotherapy treatments are applied. Cisplatin is one of the chemotherapeutic agents commonly used in chemotherapy treatment, but chemotherapy resistance may develop after long Cisplatin treatment.

NF- κ B is one of the important transcription factors that govern many processes in the cell. As a major cell survival signal, NF- κ B plays a role in multiple steps in cancer cell resistance to chemotherapy and radiotherapy. It is hypothesized that enhanced drug resistance can be reversed by inhibiting NF- κ B activation in cancer cells with various anticancer agents.

Resveratrol, a natural polyphenol compound, is reported to have anticancer activity in various cancer cells. It is abundant in a variety of foods, including grapes, strawberries, and peanuts. Many studies have shown that resveratrol has anti-tumor, anti-inflammatory, and anti-atherosclerotic effects through various pathways in the cell. In addition, it has been reported to stop the cell cycle, induce apoptosis and autophagy, and inhibit cell proliferation. In addition, studies are showing that it increases the sensitivity of drug-resistant cancer cells to drugs by inhibiting the NF- κ B signaling pathway responsible for the expression of many genes in the cell. However, since there is no literature indicating whether Resveratrol sensitizes cells to Cisplatin by inhibiting cell cycles and NF- κ B activity in the A2780 cell line with cisplatin resistance, we think that our research will have a unique value.

In this study, we comparatively examined the effects of Resveratrol on intracellular molecular mechanisms such as cell cycle, cell proliferation, and apoptosis, depending on the activation changes on the NF- κ B signaling pathway, using the ovarian cancer cell line A2780 with and without Cisplatin resistance. According to our findings, it was found that Resveratrol inhibited proliferation and showed a cytotoxic effect in A2780 and A2780cis cell lines. According to the cell cycle analysis, apoptosis

analysis, and RT-PCR analysis we performed afterward, we found that Resveratrol had no effect in line with the literature. Since the findings we obtained did not reveal a significant result, we think that in our future studies, it may be useful to apply Resveratrol to cells in combined doses with Cisplatin and to measure protein assays and phosphorylation levels to determine its effect on NF- κ B expression.

Keywords; Resveratrol, cisplatin, Nuclear factor- κ B(NF- κ B), ovarian cancer, A2780



İçindekiler

Önsöz	II
Özet	III
Abstract	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini	X
Şekiller Dizini	XI
Grafikler Dizini	XII
Kısaltma Listesi	XIII
1. Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları	4
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	4
1.6. Araştırmanın Amacı	4
2. Genel Bilgiler	5
2.1. Yumurtalığın Yapısı ve Fonksiyonları	5
2.2. Yumurtalık Kanseri	6
2.2.1. Yumurtalık Kanserinin Sınıflandırılması	6
2.2.2. Yumurtalık Kanseri Evreleme, Tanı ve Tedavi Yöntemleri	7
2.3. Cisplatin Tedavisi ve Direnç Mekanizması	7
2.3.1. Hücre Döngüsünün Cisplatin Tedavisi ile Düzenlenmesi	8
2.4. NF-κB (Nükleer Faktör Kabba B)	8
2.4.1. Yumurtalık Kanserinde NF-κB'nin Rolü	9
2.4.2. NF-κB İnhibisyonu ve Kemoterapötik İlaç Direnci	10
2.5. Doğal Bileşiklerin Kemoterapötik İlaç Dirençliliğinde Önemi	10
2.5.1. Yumurtalık Kanserinde Resveratrol'ün Kemoterapötik Özellikleri	11
3. Gereç ve Yöntem	12
3.1. Araştırma Evreni ve Örneklem	12
3.2. Araştırmanın Değişkenleri	12
3.3. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	12
3.4. Veri Toplama Araçları ve Uygulaması	12

3.5. Veri Analizi	13
3.6. Araştırma Etiği	14
3.7. Reaktifler	14
3.7.1. Cisplatin	14
3.7.2. Resveratrol	15
3.8. Hücre Kültürü	15
3.9. Hücrelerin Pasajlanması	17
3.10. Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyon)	18
3.11. Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi	19
3.12. Hücrelere Cisplatin Uygulamasının Yapılması	19
3.13. A2780 ve A2780cis Hücre Hatlarında Proliferasyon Deneyi	20
3.14. Hücre Sitotoksite Deneyi (XTT)	21
3.15. Hücre Döngüsü Deneyi	22
3.16. Apoptoz Deneyi	24
3.17. Gen Ekspresyonu	26
3.17.1. Total RNA İzolasyonu	26
3.17.2. RNA Miktar ve Safılık Ölçümü	27
3.17.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	28
3.17.4. RT-PCR Analizi	29
3.18. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	32
4. Bulgular	33
4.1. Proliferasyon Deneyleri	33
4.2. Cisplatin Direncinin Belirlenmesi	34
4.3. Resveratrol'ün Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	36
4.4. Resveratrol'ün Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	37
4.5. Resveratrol'ün Hücreler Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	39
4.6. Resveratrol'ün NF-κB Genindeki mRNA Ekspresyon Düzeyine Etkisinin Analizi	42
5. Tartışma	43
6. Sonuç ve Öneriler	52
7. Kaynaklar	53
8. Ekler	63
9. Teşekkür	64

10. Özgeçmiş.....66



Tablolar Dizini

Tablo 1. Cisplatin ana stok dilüsyonu	14
Tablo 2. Resveratrol ana stok dilüsyonu	15
Tablo 3. cDNA reaksiyon miks karışımı	28
Tablo 4. Kullanılan gen primerlerinin dizilimleri ve baz sayıları	29
Tablo 5. GAPDH Forward ve Reverse Primerlerinin Kullanım Bilgisi	30
Tablo 6. NF- κ B Forward ve Reverse Primerlerinin Kullanım Bilgisi	30
Tablo 7. PCR Reaksiyon karışımı	31
Tablo 8. PCR reaksiyon programı	31



Şekiller Dizini

Şekil 1. Resveratrol ve yumurtalık kanseri tedavisinde etkili mekanizmalar.	3
Şekil 2. Kadın üreme sistemi	5
Şekil 3. Cisplatin'in moleküler yapısı	15
Şekil 4. Resveratrol'ün moleküler yapısı	15
Şekil 5. A2780 hücre hattının 24 ve 48.saatlerdeki mikroskopik görüntüsü	16
Şekil 6. A2780cis hücre hattının 24 ve 48.saatlerdeki mikroskopik görüntüsü	16
Şekil 7. Neubauer hemositometrisi	17
Şekil 8. Hücrelerde PI etkileşimi sonucu hücre döngüsünün belirlenmesi	23
Şekil 9. Hücrelerde Annexin V ve PI etkileşimleri	25
Şekil 10. A2780 hücre hattında Resveratrol'ün 48.saatteki hücre döngüsü grafikleri	38
Şekil 11. A2780cis hücre hattında Resveratrol'ün 48.saatteki hücre döngüsü grafikleri	39
Şekil 12. Resveratrol'ün (IC ₅₀) A2780 hücre hattında 48.saatteki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları	40
Şekil 13. Resveratrol'ün (IC ₅₀) A2780cis hücre hattında 48.saatteki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları	41

Grafikler Dizini

Grafik 1. A2780 Hücre Hattı Proliferasyon Deneyi Bulguları	33
Grafik 2. A2780cis Hücre Hattı Proliferasyon Deneyi Bulguları	34
Grafik 3. A2780cis Hücre Hattında Cisplatin Sitotoksosite Bulguları	35
Grafik 4. A2780cis Hücre Hattında Cisplatin Uygulaması Sonrasında Sitotoksosite Bulguları	35
Grafik 5. A2780 Hücre Hattında Resveratrol Sitotoksosite Bulguları	36
Grafik 6. A2780cis Hücre Hattında Resveratrol Sitotoksosite Bulguları	37
Grafik 7. Resveratrol'ün 48.saat sonunda A2780 hücre hattındaki G ₀ /G ₁ , S ve G ₂ /M evrelerinin yüzdeleri	38
Grafik 8. Resveratrol'ün 48.saat sonunda A2780cis hücre hattındaki G ₀ /G ₁ , S ve G ₂ /M evrelerinin yüzdeleri	39
Grafik 9. Resveratrol'ün (IC ₅₀) A2780 hücre hattında 48.saatteki apoptotik etkisinin kat değişim grafiği	40
Grafik 10. Resveratrol'ün (IC ₅₀) A2780cis hücre hattında 48.saatteki apoptotik etkisinin kat değişim grafiği	41
Grafik 11. A2780 hücre hattında NF-κB mRNA ekspresyon kat değişimi	42
Grafik 12. A2780cis hücre hattında NF-κB mRNA ekspresyon kat değişimi	42

Kısaltma Listesi

- ABD : Transvajinal Ultrason
Akt : Protein Kinaz B
AO/EB : Akridin Turuncusu/Etidyum Bromür
Bcl-2 : B Hücreli Lenfoma 2
Bcl-X1 : B-Hücreli Lenfoma-Ekstra Büyük
BRCA1 : Meme Kanseri Geni 1
BRCA2 : Meme Kanseri Geni 2
BT : Bilgisayarlı Tomografi
CA-125 : Kanser Antijeni 125
CCNE1 : Siklin Bağımlı Kinaz E1 Kodlayan Kinaz
CDK : Sikline Bağımlı Kinaz
Cisplatin : Cis-Diammi-Neplatinum-Diklorür
CTNNB1 : Catenin Beta 1
DMSO : Dimetil Sülfoksit
EGFR : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT : Epiteyal-Mezenkimal Geçiş
FAS-L : FAS Ligandı
FBS : Fetal Bovine Serum
FIGO : Uluslararası Jinekoloji Ve Obstetrik Fedarasyonu
FSH : Folikül Uyarıcı Hormon
Ghdx : Global Sağlık Veri Değişimi
GSK3 β : Glikojen Sentaz Kinaz-3 β
IKK : I κ B Kinaz
Ikb : İnhibitör Kabba B
KRAS : Kirsten Sıçan Sarkom Virüsü
LC3-I : Protein 1-Hafif Zincir 3
LC3-II : Protein 2 Hafif Zincir 3
LH : Lutenize Edici Hormon
MAPK : Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MRI : Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF- κ b : Nükleer Faktör Kabba B

PET : Pozitron Emisyon Tomografisi

PI : Propidium İyodür

PI3K : Fosfoinositid 3-Kinaz

PS : Fosfotidilserin

PTEN : Fosfataz Ve Tensin Homologu

RB1 : Tümör Baskılayıcı Proteinlerden Retinoblastoma Protein 1

RHD : Rel Homoloji Alanı

RPMI-1640 : Roswell Park Memorial Institute Medium

VEGFR : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

XTT : Sodyum 3'-[1-(Fenilaminokarbonil)-3,4-Tetrazolyum]-Bis (4 Metoksi-6-Nitro)

Benzen Sülfonik Asit Hidrat

1. Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Dünya çapında her yıl milyonlarca insana kanser teşhisi konmaktadır. Bu kanserler içinden yumurtalık kanseri, gelişmiş ülkelerdeki kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenlerinden biridir. Aynı zamanda genel olarak kadınlarda en sık görülen yedinci ölüm nedenidir ve kadınlarla ilişkili tüm kanserlerin yaklaşık %4'ünü oluşturur (Khazaei vd., 2021) . Global Sağlık Veri Değişimi (GHDx) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) havuzlarından elde edilen dünya çapındaki yumurtalık malignitelerine göre, 2020 yılında 313 959 yeni yumurtalık kanseri vakası ve 207 252 ölüm kaydedilmiştir (Sung vd., 2021).

Yumurtalık kanseri, seröz, endometrioid, berrak hücreli ve müsinöz olmak üzere dört farklı epitelyal tümörden oluşan heterojen bir neoplazmadır (McCluggage, 2011). En yaygın tip olan epitelyal tümörler için tanı anındaki evre epitel alt türüne göre büyük ölçüde değişmektedir. Cisplatin, yumurtalık kanseri dahil pek çok katı tümöre karşı klinik aktivite sergileyen, bilinen en güçlü platin bazlı antitümör ajanlardan biridir (Siddik, 2003). Cisplatin, DNA üzerindeki pürin bazlarıyla etkileşime girerek DNA hasarına ve sonrasında bazı sinyal yollarının aktivasyonu ile apoptozun indüklenmesine yol açmaktadır. Bununla birlikte, DNA hasarının aracılık ettiği apoptotik sinyaller zayıflatılabilir ve bu yolla ortaya çıkan direnç yumurtalık kanserinde Cisplatin bazlı kemoterapinin önemli bir sınırlaması haline gelir (Tapia & Diaz-Padilla, 2013).

1.2. Araştırmanın Sorusu

Yumurtalık kanseri, en yüksek ölüm oranına sahip en yaygın jinekolojik kanserlerden biridir. Yumurtalık kanserinde hastalığın seyrine göre cerrahi tedavi, radyoterapi veya kemoterapi tedavileri uygulanır. Mevcut tedavi seçeneklerinde genelde platin/taksan bazlı kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Yumurtalık kanserinin tedavi edilmesinde en önemli engellerden biri kemoterapi direncinin gelişmesidir (Luvero, Milani, & Ledermann, 2014). Kemoterapötik ajanların çoğu kanser hücrelerinde NF- κ B ve NF- κ B tarafından düzenlenen gen ürünlerini aktive eder ve ilaç direncini indükler. Özellikle, kurkumin, tokotrienol, resveratrol, garcinol gibi doğal bileşiklerden elde edilen inhibitörlerin NF- κ B aktivasyonunu ilaç direncini yenebilmek için bloke edebildiği ve hücreleri kemoterapötik ajanlara duyarlı hale getirebildiği pek çok çalışmada ortaya konmuştur (Monisha vd., 2016). Doğal bir

bileşik olan Resveratrol, anti-inflamatuar, anti-viral ve anti-tümör aktiviteler dahil olmak üzere birçok biyolojik etkiye sahiptir (Hu vd., 2016). Resveratrol, sağlıklı hücreleri etkilemeden Akt, MAPK, Wnt ve NF- κ B dahil olmak üzere çeşitli sinyal yollarını kontrol ederek kanser hücrelerinde apoptozu indüklemekte ve hücre döngüsünün durmasını desteklemektedir (Hazafa vd., 2022).

Çalışmamızın konusu, yumurtalık kanserinde Resveratrol'un, Cisplatin dirençli A2780 hücre hattında NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu ve hücre döngülerinin değişimi ve hücrelerin Cisplatin'e duyarlı hale getirilmesinde etkili olup olmayacağı normal A2780 hücre serisi ile karşılaştırılarak incelenmesidir.

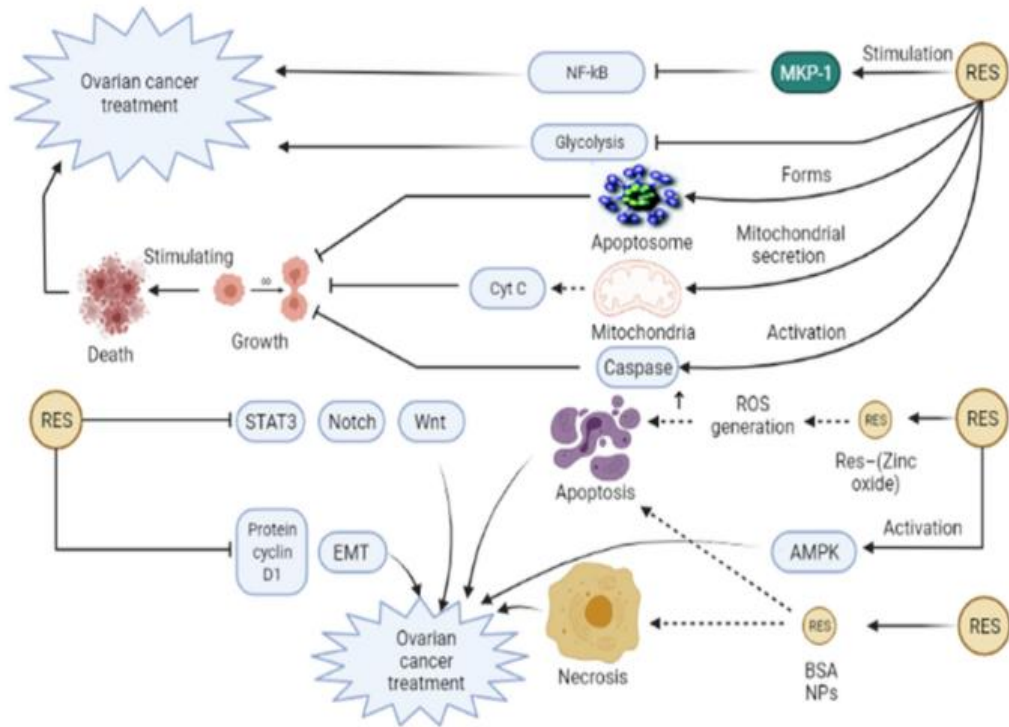
1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Cisplatin; mesane, meme, servikal, baş-boyun skuamöz karsinomu ve yumurtalık dahil olmak üzere katı tümörlerin tedavisinde kullanılan iyi bilinen bir antikanser ilacıdır (Loren vd., 2022). Cisplatin, kanser hücresi tarafından emildikten sonra hücrel makromoleküllerle etkileşime girmekte ve bir dizi biyokimyasal mekanizma yoluyla DNA'ya bağlanarak DNA sentezi ve hücre büyümesinin inhibisyonuna yol açmaktadır. Cisplatin'in birincil moleküler etki mekanizması; lipid peroksidasyonu yoluyla reaktif oksijen türlerinin üretilmesinden kaynaklanan hücre içi-dışı apoptoz yollarının indüklenmesi, çeşitli sinyal yollarının aktivasyonu, p53 sinyallemesinin indüklenmesi ve hücre döngüsünün durması ile ilişkilendirilmiştir (Tchounwou vd., 2021). Cisplatin direnci; gelişmiş ilaç detoksifikasyonu, azalan ilaç birikimi gibi ilaç taşınımındaki değişiklikleri, DNA tamiri ve DNA hasarının baypas edilmesindeki düzenlemeleri ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT)/nükleer faktör- κ B (NF- κ B) gibi hücre içi sinyal yollarındaki ve apoptotik hücre ölüm yollarındaki değişiklikleri içeren çok faktörlü bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır (Chen, Liu, Yuan, & Qiao, 2018).

NF- κ B, hücrede 200'den fazla genin ifadesini indükleyen; hücrenin hayatta kalması, hücre adhezyonu, inflamasyon, farklılaşma ve büyüme gibi çeşitli süreçleri yöneten en önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir (Zinatizadeh vd., 2020). Pek çok çalışmada NF- κ B'nin meme, servikal, prostat, pankreas ve akciğer kanseri gibi tümörlerde aktive olduğu gösterilmiştir (Shen & Tergaonkar, 2009). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, yumurtalık kanserinin yayılmasında ve ilaç direnci oluşumunda

NF-κB sinyal yolunun aşırı aktive olduğu bulunmuştur (White vd., 2011; Yang vd., 2011).

Resveratrol (3,5,40-trihidroksistilben), üzüm, çilek, yer fıstığı ve diğer bitki kaynaklarında ve ayrıca kırmızı şarapta bulunan bir polifenolik bileşiktir (Rauf vd., 2018). Resveratrol'un anti-kanser etkisi, artan reaktif oksijen türleri (ROS), apoptoz, yumurtalık kanserine karşı savaşabilen protein siklin D1'in aşağı regülasyonuna yol açan mitokondriyal fonksiyonun hasarı ile ilişkilidir (Rezaei-Tazangi vd., 2021). Ayrıca Resveratrol'un kanserli hücre proliferasyonunu inhibe etmek için NF-κB aktivitesini inhibe ederek apoptozu indüklediği ve ilaca dirençli kanser hücre dizilerinin ilaca duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir. Resveratrol'un kanser hücrelerindeki etkileri üzerine yapılan çalışmalar yumurtalık kanserinin tedavisi için umut verici bir terapötik olduğunu doğrulamaktadır (Karthikeyan, Hoti, & Prasad, 2015). Yumurtalık kanserinin tedavisinde Resveratrol'un tetiklediği mekanizmalar Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Resveratrol ve yumurtalık kanseri tedavisinde etkili mekanizmalar (Rezaei-Tazangi vd., 2021).

Tez kapsamındaki çalışmamızda; günümüzde pek çok hastalıkta etkinliği araştırılmakta olan Resveratrol'un normal ve Cisplatin'e dirençli yumurtalık kanseri hücre hattı A2780 üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla; hücre döngü değişimleri ve NF-κB genlerinin ekspresyon düzey farklılıklarına bakılarak, Resveratrol'un NF-κB yolağı üzerinden ilaç duyarlılığını etkileyip etkilemeyeceği irdelenecektir.

HİPOTEZ 0: Resveratrol'un normal ve Cisplatin'e dirençli yumurtalık kanseri hücre hattı A2780 üzerinde etkileri bulunmamaktadır.

HİPOTEZ 1: Resveratrol yumurtalık kanseri hücre hattı A2780'de hücre döngüsü değişimlerine neden olmaktadır ve hücre döngüsünü durdurmaktadır.

HİPOTEZ 2: Resveratrol NF-κB sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe ederek Cisplatin dirençli hücreleri Cisplatin'e duyarlı hale getirmektedir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Yumurtalık kanseri jinekolojik maligniteler arasında ölüm oranı oldukça yüksek olan kanser çeşididir. Çalışmamızda; Resveratrol'un yumurtalık kanseri hücre hattı ve cisplatine dirençli hücre hattı A2780 üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla sırasıyla, sitotoksisite, hücre döngü değişimlerinin analizi, apoptoz analizi ve NF-κB genlerinin ekspresyon düzey farklılıkları RT-PCR yöntemiyle karşılaştırmalı olarak değerlendirilecektir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Proje bütçesinin düşük olması nedeniyle araştırmanın *in vitro* hücre kültüründe yürütülmüş olması araştırmamızı sınırlayan sebeplerdir. Yapılan deneyler ön çalışma olarak kabul edilip ilerleyen süreçlerde *in vivo* deneylerle doğrulanması planlanabilir.

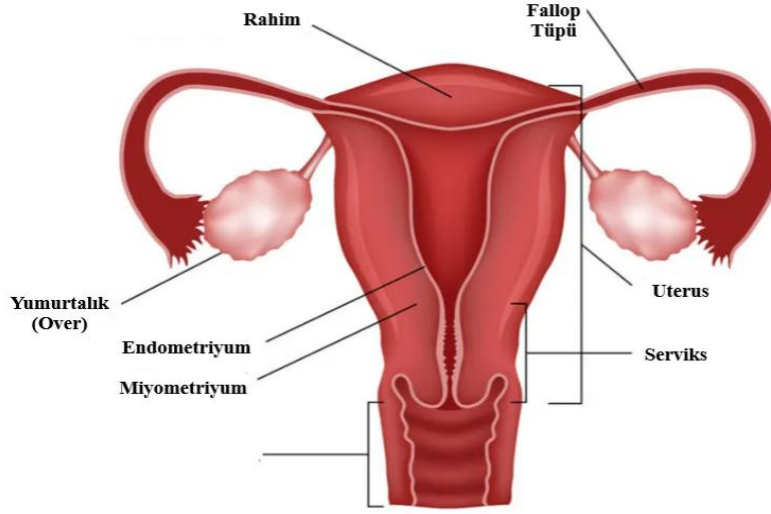
1.6. Araştırmanın Amacı

Bu tez kapsamında Cisplatin dirençli yumurtalık kanseri hücre hattı A2780cis'de doğal bir bileşik olan Resveratrol'un, NF-κB sinyal yolunun inhibisyonu ve hücre döngülerinde meydana gelebilecek değişikliklere bağlı olarak Cisplatin dirençli hücrelerin cisplatine duyarlı hale gelmesindeki rolünün normal A2780 hücre serisi ile karşılaştırılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Yumurtalığın Yapısı ve Fonksiyonları

Genital organlar; gonadlar, üreme kanalları ve dış genital organlardan meydana gelmektedir. Genital organlarda cinsiyetin ortaya çıkması transkripsiyonel düzenleyiciler, salgılanan hormonlar ve reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (Biaison-Lauber, 2010). Kadın üreme anatomisi hem dış hem de iç yapıları içermektedir. İç genital organlar vajina, uterus, serviks, fallop tüpleri ve yumurtalıklardan oluşmaktadır (Graziottin & Gambini, 2015). (Şekil 3)



Şekil 2. Kadın üreme sistemi (Sargis, 2015)

Yumurtalıklar, her biri 2,5 ile 5 cm uzunluğunda, 1,5 ile 3 cm genişliğinde ve 0,6 ile 1,5 cm kalınlığında olan oval şekilli yapılardır (Erickson & Chang, 2007). İnsanlarda yumurtalıklar rahmin iki tarafında pelvis duvarına karşı uzanan yumurtalık fossa adı verilen bir bölgede bulunmaktadır. Yumurtalıklar pelvik duvara infundibulopelvik bağ ve uterusu utero-ovaryan bağ ile bağlıdır. Bu bağlar sayesinde yumurtalıklar fallop tüplerine yakın hale gelmektedir (Hobeika, Armouti, Kala, & Stocco, 2019). İnsan yumurtalığı, oositlerin (yumurtaların) olgunlaşması ve depolanması görevini üstlenirken aynı zamanda üreme hormonlarının (östrojen ve progesteron) üretimini sağlayarak endokrin bir bez olarak çalışmaktadır. Yumurtalık fonksiyonu hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon tarafından kontrol edilmekte ve bu hormon, her ikisi de bu düzenlemede gerekli olan lutenize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) üretmek için hipofiz bezini harekete geçirmektedir (Altchek, Deligdisch, & Kase, 2003).

2.2. Yumurtalık Kanseri

Dünya çapında, kadınlarda en sık görülen yedinci kanser tipi ve kansere bağlı ölümlerin sekizinci en yaygın nedeni yumurtalık kanseridir. Beş yıllık sağ kalım oranı %45'in altındadır (Webb, Leader, Cancers Group, & Jordan, 2017). 2021 yılında yaklaşık 21 410 kadına yumurtalık kanseri teşhisi konulmuş ve bu vakalarla ilişkili tahmini ölüm sayısının 13 770 olduğu belirtilmiştir (Siegel, Miller, Fuchs, & Jemal, 2021).

2.2.1. Yumurtalık Kanserin Sınıflandırılması

Yumurtalık; epitel, stromal ve germinal hücreler olmak üzere üç ana bileşenden köken almaktadır. Buna bağlı olarak yumurtalıktan kaynaklanan başlıca kötü huylu tümörler epitelyal karsinom, germ hücreli tümör, seks kord-stromal tümörler ve Krukenberg tümörleri şeklinde adlandırılmaktadır. En yaygın olan yumurtalık kanseri tipi epitelyal karsinomlardır (Gaona-Luviano, Adriana, Medina-Gaona, & Magaña-Pérez, 2020). Epitelyal yumurtalık kanserinin moleküler genetik çalışmalarına ve histopatolojik sınıflandırılmalarına dayanan ve bu tümörleri tip I ve tip II şeklinde gruplandıran dualistik bir model önerilmiştir. Tip I karsinomlar düşük dereceli seröz, düşük dereceli endometrioid, berrak hücreli ve müsinöz karsinomlardan ve nadir de olsa malign Brenner tümörlerinden oluşurlar. Tip II tümörler büyük ölçüde ileri dereceli seröz karsinomlardan, karsinosarkomlardan ve farklılaşmamış karsinomlardan oluşmaktadır (Kurman & Shih, 2016).

Epitelyal yumurtalık kanserinin histolojik alt sınıfları olan tip I ve tip II karsinomlar farklı patogenezi, davranışları, moleküler belirteçleri ve tedaviye yanıt şekilleri ile belirgin şekilde birbirlerinden ayrılmaktadırlar (Vang, Shih, & Kurman, 2009). Genetik olarak kararlı, ilerlemeleri yavaş ve adım adım olan düşük dereceli tip I tümörler BRAF, KRAS, PTEN, CTNNB1 ve ERBB2 ve nadiren p53 gibi spesifik genlerdeki mutasyonlarla karakterize edilirler. Buna karşılık hızla büyüyen, agresif klinik özellikler gösteren ve genetik olarak kararsız yapıda olan tip II tümörler sıklıkla p53, BRCA1 ve BRCA2'de genlerindeki mutasyonları içeren yüksek dereceli seröz karsinomlardır (Shih & Kurman, 2004; Vang vd., 2009).

2.2.2. Yumurtalık Kanseri Evreleme, Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Yumurtalık kanserinin patolojik değerlendirmesinde kabul edilen evreleme sistemi, 2014 yılında Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Fedarasyonu (FIGO) tarafından revize edilerek oluşturulmuştur (Prat, 2014). En iyi sağ kalım oranı ile ilişkili evre I yumurtalık kanseri hastalarda en nadir görülen evredir. Hastalara genellikle ileri evrelerde (evre III ve IV) teşhis konmaktadır (Javadi, Ganeshan, Qayyum, Iyer, & Bhosale, 2016).

Yumurtalık kanserine bağlı lezyonların tespiti, teşhisi, yönetimi ve tedavi seçeneklerinin belirlenebilmesi için birtakım görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar; transvajinal ultrason (ABD), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve pozitron emisyon tomografisi (PET)'dir (Bristow & Armstrong, 2010).

2.3. Cisplatin Tedavisi ve Direnç Mekanizması

Cisplatin (cis-diammi-neplatinum-diklorür), kanser tedavisinde uygulanan platin bazlı kemoterapi ajanlarından biridir ve yumurtalık, baş-boyun, kolorektal, mesane ve akciğer kanseri dahil olmak üzere pek çok katı malignitenin tedavisinde kullanılmaktadır (Galluzzi vd., 2011). Cisplatin hücreye girdiğinde sitoplazmada bulunan su molekülleri ile Cisplatin üzerinde bulunan klor atomları yer değiştirmektedir. Bu hidrolize ürün, proteinler üzerindeki sülfhidril grupları ve nükleik asitler üzerindeki herhangi bir nükleofil ile reaksiyona girebilen güçlü bir elektrofildir. Cisplatin, pürin kalıntıları üzerindeki N7 reaktif merkezine bağlanarak kanser hücrelerinde DNA hasarına yol açmakta, hücre bölünmesini bloke etmekte ve programlanmış hücre ölümünü indüklemektedir.

Malign hastalıkların klinik yönetiminde karşılaşılan en önemli engellerden bir tanesi kemoterapi direncidir. Cisplatin de dahil olmak üzere platin antikanser ajanları, toksisitelerine ve direnç başlangıcı nedeniyle sıklıkla tedavi başarısızlıklarına rağmen yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçlar arasında yer almaktadırlar (Cocetta, Ragazzi, & Montopoli, 2020). Bu ilaçların kemoterapide kullanımı, hücrelerin içsel ve dışsal dirençleri nedeniyle kısıtlanmaktadır. Birçok kanser hücresi başlangıçta platin ilaçlarla kemoterapiye duyarlı olsa da zamanla DNA hasar onarımı, glutatyon ve metalotiyoninler ile ilaç inaktivasyonu ve hücre zarında bulunan çeşitli taşıma sistemleri ile ilaç akışı yoluyla direnç geliştirebilmektedirler (Makovec., 2019).

Direnç, bir direnç faktörünün fazlalığına, tümör hücresinin öldürülmesi için gerekli faktörlerin doygunluğuna veya bu faktörlerin mutasyona uğramasına bağlı olabilmektedir (Stewart, 2007). Yumurtalık kanseri hücrelerinin kemoterapötik mekanizmalara direnci oldukça karmaşıktır ve çoklu ilaç direnci, DNA hasar onarımı, hücre metabolizması, oksidatif stres, hücre döngüsünün düzenlenmesi, kanser kök hücreleri, bağışıklık sistemi, apoptotik yollar, otofaji ve anormal sinyal yolları bu direncin gelişiminde rol oynamaktadır (Mai vd., 2022).

2.3.1. Hücre Döngüsünün Cisplatin Tedavisi ile Düzenlenmesi

Yumurtalık kanserinde platin tedavisi ile hücre döngüsü düzenlenebilmektedir. Sikline bağımlı kinaz (CDK'ler), hücre döngüsünün uygun ilerlemesi için gerekli proteinlerdir ve ayrıca DNA hasar onarımının düzenlenmesinde de önemlidirler (Campbell, Hands, & Pette, 2020). Siklin bağımlı kinaz E1 kodlayan kinaz (CCNE1) ve tümör baskılayıcı proteinlerden retinoblastoma protein 1 (RB1), G1-S fazındaki hücre döngüsü geçişiyle ilişkili proteinlerdir. CCNE1, CDK2 aktivasyonu için gereklidir ve aşırı ekspresyonu, S fazına erken giriş, G1 fazı sırasında DNA onarımının ortadan kaldırılmasına ve artan replikasyon stresine yol açmaktadır. CCNE1 kopya sayısı artmış tümörler platin tedavisine daha dirençliken, RB1 kaybı platin tedavisine duyarlılıkla ilişkilidir (Da Costa vd., 2019; Kim vd., 2020). Ayrıca hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerden CDK6'nın inhibisyonu, apoptozu arttırarak epitelial yumurtalık kanseri hücrelerinin platine duyarlılığını arttırmaktadır (Dall'acqua vd., 2017) .

2.4. NF-κB (Nükleer Faktör Kabba B)

Nükleer faktör kabba B (NF-κB), immün ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde yer alan dimerik transkripsiyon faktörü ailesidir. NF-κB, DNA hasarına veya sitokin tedavisine yanıt olarak hücrelerin apoptoza uğramasını önlemede rol oynamaktadır (Yamamoto Y. & Gaynor R., 2001). NF-κB proteinleri, proteinin N terminaline doğru yer alan ve dimerizasyondan, inhibitör kabba B (IκB)'lerle etkileşimlerden ve DNA'ya bağlanmadan sorumlu olan korunmuş 300 aminoasitlik Rel homoloji alanının (RHD) varlığı ile karakterize edilmektedirler. Memelilerde homodimer veya heterodimer oluşturabilen beş NF-κB üyesi, p65(RelA), RelB, c-Rel, p50 ve p52 monomerleri tanımlanmıştır (Hayden & Ghosh, 2004). Stres sinyallerini entegre eden

ve bağışıklık tepkilerini düzenleyerek inflamasyonun şekillenmesine aracılık eden NF- κ B proteinleri son yıllarda onkogenез ile ilişkilendirilmiştir. NF- κ B sinyali, kanser gelişiminin ayırt edici özellikleri arasında olan büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme inhibitörlerine karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçınma, sınırsız replikasyon potansiyeli, doku istilası ve metastaz, anjiyogenez tepkilerinin hepsinde yer almaktadır (Naugler & Karin, 2008).

2.4.1. Yumurtalık Kanserinde NF- κ B'nin Rolü

NF- κ B hedef genleri, tümör hücresi çoğalmasını, hayatta kalmasını, göçünü, iltihaplanmasını ve anjiyogenezini teşvik etmektedir (Van Waes, 2007). NF- κ B'nin aktivasyonu iki ana yola ayrılmaktadır; kanonik veya klasik yol, katalitik IKK α , IKK β ve IKK γ düzenleyici alt birimleri tarafından oluşturulan I κ B kinaz kompleksini oluşturmaktadır. Bu kompleks, p50/RelA dimerinin translokasyonuna ve nükleer aktivasyonuna izin veren 32/36 serin rezidülerindeki I κ B α inhibitörünü fosforile etmektedir. Kanonik olmayan yol, NF- κ B indükleyici kinaz stabil hale geldiğinde ve IKK α homodimeri fosforile edildiğinde başlatılmakta, bu da p52'nin C-terminalinin degradasyonunu indüklemekte ve p52/RelB heterodimerini serbest bırakmaktadır (Gonzalez-Torres vd., 2017).

NF- κ B sinyal yolu, yumurtalık kanserinde kemorezistans, kanser kök hücre yönetimi, metastaz ve bağışıklıkla ilgili faktörlerin düzenlenmesinde öncü bir yoldur. Yumurtalık kanserinde birçok sinyal yolağı düzensizdir ve tümör ilerlemesinde kanonik ve kanonik olmayan yollar aracılığı ile NF- κ B sinyali aktive edilebilmektedir. Kanonik NF- κ B sinyalinin aktivasyonu, yanıt olarak anti-apoptotik genler ve immünomodülatör fonksiyonlar ile ilişkiliyken kanonik olmayan sinyal aktivasyonu tümör mikroçevresi, kanser kök hücre ilerlemesi ve yeniden tümör oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (Harrington & Annunziata, 2019). NF- κ B ailesi proteinlerinin agresif yumurtalık kanseri tümörlerinde aşırı eksprese edildiği ve NF- κ B alt birimi p50'nin aşırı ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Annunziata vd., 2010).

2.4.2. NF-κB İnhibisyonu ve Kemoterapötik İlaç Direnci

Yumurtalık kanseri olan hastalar, Cisplatin gibi ilk platin bazlı kemoterapiye yanıt verir. Bununla birlikte, bu ajanların, NF-κB aktivitesini indükleyerek tümör hücresinin hayatta kalmasına aracılık ettiği bilinmektedir. Cisplatin, IκB kinaz (IKK) aktivitesinde bir artış yoluyla NF-κB aktivasyonunu teşvik ediyor gibi gözükmemektedir ve bu da IκB'nin fosforilasyonuna yol açarak proteozom aracılı bozunma için hedef haline gelmesine ve NF-κB'den ayrılmasına neden olmaktadır (Aghajanian, 2004). Yumurtalık dokusunda NF-κB sinyalinin aktivasyonu, tümör çoğalma hızının artması ve yumurtalık tümörlerinin gelişimi ile sonuçlanmaktadır (G. H. Liu, Wang, Wang, & Kong, 2006). Başlangıçta taksan bazlı ilaçların NF-κB aktivasyonunu inhibe ettiği ve dolayısıyla metastaz oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Ho, Dickson, & Barker, 2005). Cisplatine dirençli hale gelmiş epitelyal yumurtalık kanseri hücre hatlarında NF-κB aktivasyonunun inhibisyonunun hücreleri Cisplatin duyarlı hale getirdiği bulunmuştur (Gaikwad, Thakur, Sakpal, Singh, & Ray, 2015). NF-κB, kemoterapi ve radyasyon tedavisinin etkisi altında DNA hasarına yanıt olarak aktive olmaktadır bu yolla tedaviye direnç gelişimi ve hastalık prognozu için umut verici bir belirteçtir. NF-κB inhibisyonu, kemoterapötik ajanlara karşı tümör direncini önler, bu nedenle NF-κB inhibitörlerinin geliştirilmesi birçok antikanser ajanın etkinliğini arttırabilmektedir (Nakanishi & Toi, 2005).

2.5. Doğal Bileşiklerin Kemoterapötik İlaç Dirençliliğinde Önemi

Son yıllarda belirli sebze ve meyvelerin düzenli tüketiminin kansere yakalanma riskini azaltabileceği ortaya konulmuştur. Sarımsak, zencefil, soya, kurkumin, soğan, patates, üzüm, çilek ve yeşil çay gibi doğal ürünlerin kanserlerden korunmada rol aldığı düşünülmektedir. Bu tür meyve ve sebzelerden üretilen ve kimyasal önleyici ajanlar olarak adlandırılan fitokimyasalardan genistein, ellagik asit, katekinler, 6-gingerol, ürsolik asit, krisin, silymarin, likopen, kapsaisin ve resveratrol kemoterapötiklerin toksik etkilerini azaltmak ya da ortadan kaldırmak için klinik çalışmalarda kullanılmaktadırlar (Dorai & Aggarwal, 2004).

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroksi-stilben), üzüm, yer fıstığı, çilek gibi bitkilerin yanı sıra kırmızı şarapta bulunan; anti-inflamatuar, anti-trombosit, antioksidan ve anti-tümör olmak üzere çeşitli farmakolojik etkileri olan doğal bir polifenolik fitoaleksindir (Bhat, Li, & Pezzuto, 2001).

Polifenolik bileşiklerin ve Resveratrol'ün kanserdeki rolünü gösteren pek çok çalışma vardır ve özellikle farklı kanser türleri üzerinde kemopreventif ve kemoterapötik etkileri olduğu gösterilmiştir (Mohan Shankar, Swetha, Keerthana, Rayginia, & Anto, 2021). Resveratrol, kanserojen aktivasyonunu bloke edebilmekte ve faz I inhibisyonu ve faz II enzimlerinin indüksiyonu yoluyla detoksifikasyonu artırabilmektedir. Hücre döngüsünü modüle edebilmekte ve apoptozu indükleyebilmektedir. Resveratrol'ün bir diğer önemli yönü, anti-anjiyogenik etkiler sayesinde invazyon ve metastazı baskılayabilmesidir. Öte yandan, tümör hücrelerini diğer ajanlarla kemoterapi için duyarlı hale getirebilmektedir (Kundu & Surh, 2008).

2.5.1. Yumurtalık Kanserinde Resveratrol'ün Kemoterapötik Özellikleri

Resveratrol, yumurtalık kanserinde heksozamin biyosentezini inhibe etmekte ve glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK3 β)'yi aktive ederek protein glikozilasyonunu kesintiye uğratmaktadır ve böylelikle endoplazmik retikulum stresi aracılı apoptozu tetiklemektedir (Gwak, Kim, Dhanasekaran, & Song, 2016). Apoptozun indüklenmesine ek olarak Resveratrol, otofagozom zarının uzaması için anahtar bir molekül olan Atg5'in ekspresyonunu arttırarak ve mikrotübül ilişkili protein 1-hafif zincir 3 (LC3-I)'den LC3-II'ye bölünmeyi teşvik ederek otofajiyi indüklemektedir (Lang vd., 2015). NF- κ B 'nin anormal aktivasyonu, kanser hücrelerini farmakolojik ilaçların neden olduğu apoptoza karşı koruyabilmekte ve ilaç direncine katkıda bulunabilmektedir. Resveratrol, yumurtalık kanseri hücrelerini NF- κ B'yi aşağı regüle ederek platin ilaçları tarafından indüklenen apoptoza karşı duyarlı hale getirebilmektedir. Ayrıca Resveratrol'ün, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) dahil olmak üzere moleküler hedefleri modüle ederek yumurtalık kanseri hücrelerinin cisplatin direncini tersine çevirebildiği bildirilmiştir (Yan, Tian, Zhang, & Xiang, 2020).

3. Gereç ve Yöntem

3.1.Araştırma Evreni ve Örneklem

Jinekolojik maligniteler arasında ölüm oranı oldukça yüksek olan kanser çeşididi yumurtalık kanseridir. Kemoterapi, yumurtalık kanseri tedavisinde ilk tercihtir ancak tümör hücreleri ilaca karşı dirençsizdir. Özellikle platin bazlı ilaçlara karşı gelişen direnç yumurtalık kanserinin tedavisinde önemli bir engel oluşturur. Tez kapsamındaki çalışmamızda; günümüzde pek çok hastalıkta etkinliği araştırılmakta olan Resveratrol'ün Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan elde edilen yumurtalık kanseri hücre hattı olan A2780 ve cisplatine dirençli A2780 hücre hattı üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla, sitotoksisite, BD Cycletest™ Plus DNA Kit ile hücre döngü değişimleri, Annexin V yöntemi ile apoptoz analizi ve LightCycler 480 cihazı ile yapılan gerçek zamanlı PCR ile de NF-κB genlerinin ekspresyon düzey farklılıkları değerlendirildi ve Resveratrol'ün NF-κB yolağı üzerinden hücrelerin ilaç duyarlılığını etkileyip etkilemeyeceği araştırıldı.

3.2.Araştırmanın Değişkenleri

Belirlenen dozlarda hücrelere cisplatin uygulamasının yapılması ve daha sonrasında 24,48 ve 72. saatlerde uygulanacak Resveratrol konsantrasyonları çalışmanın bağımsız değişkenlerini oluşturmaktadır; Resveratrol'ün normal ve cisplatin dirençli A2780 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, hücre döngülerindeki değişimler ve NF-κB ekspresyon değişimleri ise bağımlı değişkenlerdir.

3.3.Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamız Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı- Hücre Kültür Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.4.

Veri Toplama

Araçları ve Uygulaması

Çalışmada yumurtalık kanseri cisplatin dirençli ve dirençsiz A2780 hücre serileri kullanıldı ve etken madde olarak çeşitli konsantrasyonlarda Resveratrol uygulandı.

İn vitro ortamda çoğaltılan bu hücre hatlarında IC₅₀ dozunu belirlemek ve Resveratrol'ün hücreler üzerindeki etkinliğini ortaya koymak adına sitotoksisite,

hücre döngüsü ve apoptoz deneyleri ile RT-PCR ile NF-kB mRNA ekspresyon düzeyinin belirlenmesi deneyleri yapıldı.

Hücrelerde Resveratrol'ün belirlenmiş olan IC₅₀ dozu uygulaması ardından, hücrelerden "Total RNA Isolation Kit" kit manueline göre total RNA izole edildi ve örneklerin konsantrasyonu ve saflıkları Nanodrop cihazında ölçüldü.

GENECOPOEIA QP057 SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit ile cDNA oluşturulup, Resveratrol uygulanmış hücrelerde, NF-KB 'nin mRNA ekspresyon değişimlerinin incelenmesi (SYBR Green qPCR Kits) qRT-PCR ile Roche LightCycler 480 cihazında belirlendi.

3.5.Veri Analizi

Yumurtalık kanseri normal ve cisplatin dirençli A2780 hücreleri in vitro ortamda çoğaltıldı, hücrelerin canlılığı tripan boyası ile belirlendi. Bunun için hücrelerden ve boyadan 50 uL alınıp, hemositometriye aktarıldı ve pipetasyon işlemi uygulanarak hücrelerin ışık mikroskobu altında sayımı gerçekleştirildi. Canlı hücreler membran bütünlüklerini korudukları için boyayı almadı ve mikroskop altında parlak renkte gözüktü. Ölü hücreler ise membran yapılarının bozulması nedeniyle boyayı aldı ve koyu renkte görüldü. Canlı ve ölü hücre sayısından yola çıkarak hücrelerin canlılık yüzdesi hesaplandı. Bu hesaplama; '(canlı hücre sayısı/total hücre sayısı)*100' ile sağlandı.

Hücreler in vitro ortamda yeterli çoğalma oranına eriştikten sonra cisplatin dirençli ve dirençsiz hücrelerin ilaç dirençliliğini belirlemek ve hücrelere ilaç uygulaması yapılmak üzere belirlenen farklı dozlarda hücrelere cisplatin uygulandı ve sitotoksik etkinin belirlenmesi için XTT kiti kullanıldı. Doz aralığı hücrelerin canlılık ve çoğalma durumlarına göre belirlendi.

İlaç uygulaması ve sitotoksisite deneyi sonrasında hücrelere Resveratrol farklı dozlarda uygulandı ve XTT kiti ile sitotoksik analiz gerçekleştirildi. 3'lü tekrarlar şeklinde hücreler 96'lık well platlere yüklendi ve etken maddenin eklenmesinin ardından 24 saat inkübe edildi. Daha sonra, 48. ve 72. saatlerde her kuyuya belli miktar XTT eklendi ve sonrasında mikropalak okuyucuda (Multiskan Fc, Thermo) 450-620 nm referans aralığında absorbans değerleri ölçüldü, kolometrik olarak değerlendirildi. İşlem sonrası IC₅₀ değeri belirlendi ve sitotoksisite grafiği çizildi.

Resveratrol uygulaması sonrasında belirlenen IC₅₀ dozuna göre hücre döngüsündeki değişimlerin analizi için BD Cycletest™ Plus DNA Kit protokolü uygulandı, bu yöntem de BD-Acuri C6 akım sitometrisi cihazı kullanıldı. Ölçümlere göre Resveratrol uygulamasının hücre döngüsünün hangi aşamalarında etkili olduğu tespit edildi.

Resveratrol uygulaması sonrasında belirlenen IC₅₀ dozuna göre apoptoz değişimlerin analizi için Annexin V Kit protokolü uygulandı, bu yöntem de BD-Acuri C6 akım sitometrisi cihazı kullanıldı. Ölçümlere göre Resveratrol uygulamasının apoptozu indükleyip indüklediği tespit edildi.

NF-κB ekspresyonunun belirlenebilmesi IC₅₀ dozu uygulanan hücrelerden “Total RNA Isolation Kit” kit maneline göre total RNA izole edildi, elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları Nanodrop cihazında ölçüldü. Daha sonra Roche LightCycler 480 cihazında “GENECOPOEIA QP057 SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit” ile cDNA çevrimi ve RT-PCR ile genlerin mRNA ekspresyon değerleri belirlendi.

3.6.Araştırma Etiği

Çalışmamız yumurtalık kanseri hücre hattı ile *in vitro* ortamda gerçekleştirilecek olduğundan etik kurul onayı gerekmemektedir.

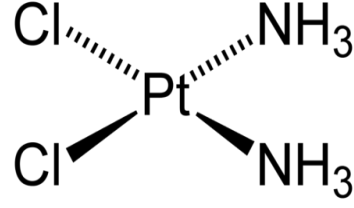
3.7. Reaktifler

3.7.1. Cisplatin

Hücrelere direnç kazandırmak için kullanılan Cisplatin’in moleküler yapısı Şekil 3’te verilmiştir. Cisplatin ana stok solüsyonları Tablo 1’de gösterildiği gibi, son konsantrasyonlar elde edilecek şekilde dilüe ederek hazırlandı.

Tablo 1. Cisplatin ana stok dilüsyonu

Molekül	Molekül ağırlığı (g/mol)	Miktarı (mg)	Stok Konsantrasyon (mili-molar)	Hacim (μl)
Cisplatin	301,1	50	1,67	99435,8



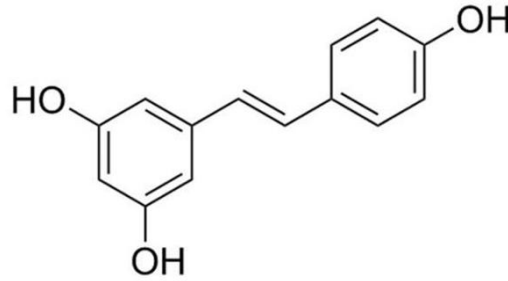
Şekil 3. Cisplatin'in moleküler yapısı

3.7.2. Resveratrol

Etken madde olarak kullanılan Resveratrol'ün moleküler yapısı Şekil 4'te verilmiştir. Resveratrol ana stok solüsyonları Tablo 2'de gösterildiği gibi, son konsantrasyonlar elde edilecek şekilde dilüe ederek hazırlandı.

Tablo 2. Resveratrol ana stok dilüsyonu

Molekül	Molekül ağırlığı (g/mol)	Miktarı (mg)	Stok Konsantrasyon (mili-molar)	Hacim (µl)
Resveratrol	228,4	22,4	60	1635,7



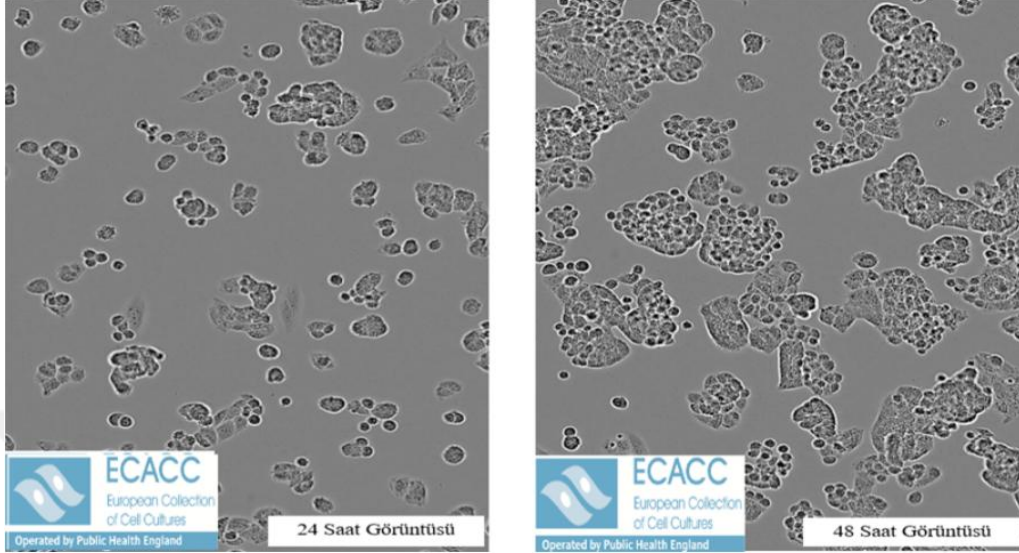
Şekil 4. Resveratrol'ün moleküler yapısı

3.8. Hücre Kültürü

Projede kullanılan insan yumurtalık kanseri hücre hattı olan A2780 ve Cisplatin dirençli A2780cis Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. A2780 hücre dizisi, tedavi edilmemiş bir hastadan alınan endometrioid adenokarsinom tümöründen oluşan epitel bir morfolojiye sahiptir ve adherent hücre özelliği göstermektedir. Hücrelerin sayılarını ikiye katlama süresi 48 saattir. A2780

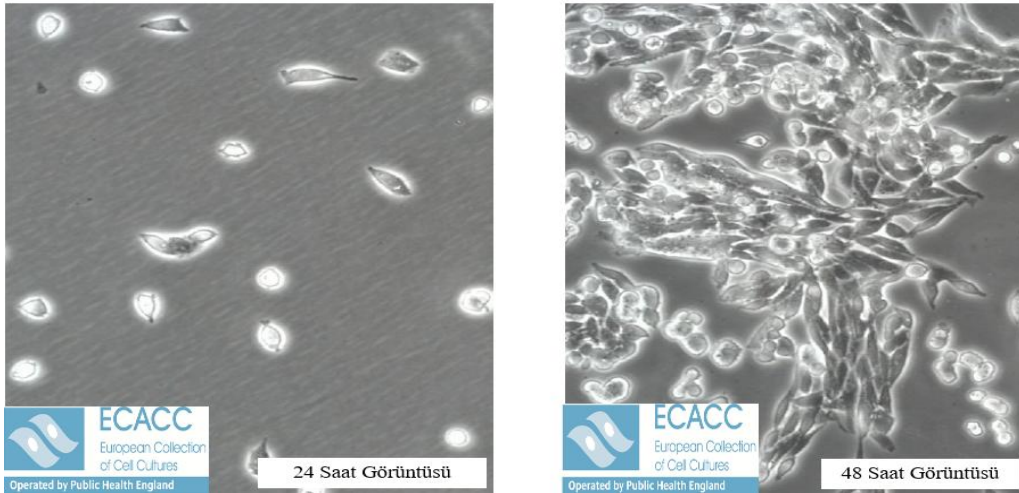
ve A2780cis hücre hatlarının mikroskop altındaki görüntüleri sırasıyla Şekil 5 ve Şekil 6’da gösterildiği şekildedir.

ECACC Number: **93112519**
Designation: **A2780**



Şekil 5. A2780 hücre hattının 24 ve 48.saatlerdeki mikroskopik görüntüsü

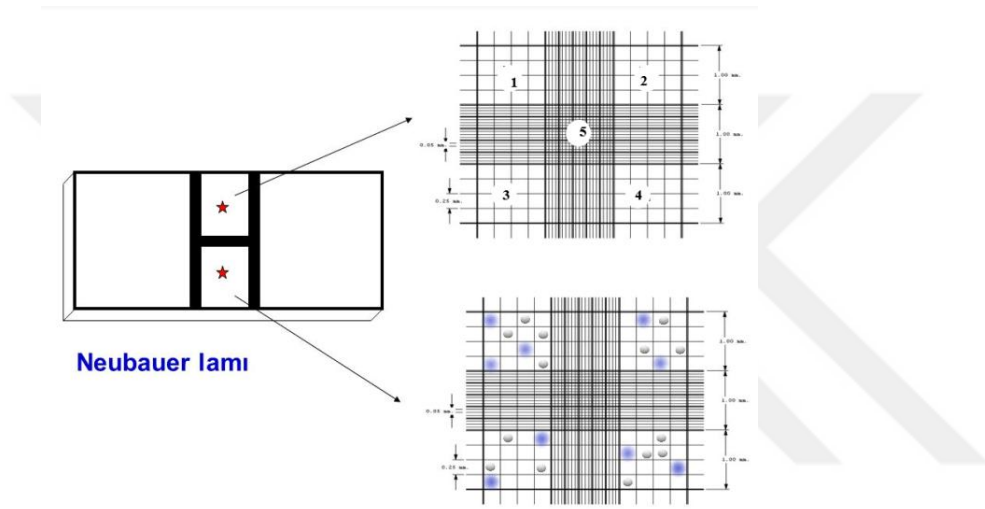
ECACC Number: **93112517**
Designation: **A2780cis**



Şekil 6. A2780cis hücre hattının 24 ve 48.saatlerdeki mikroskopik görüntüsü

A2780 ve A2780cis hücrelerinin uygun koşullarda çoğalabilmeleri için; %10 FBS (Fetal Bovine Serum), 2 mM L-glutamin, 100U/mL penisilin, 0,1 mg/mL streptomisin içeren Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) kullanılarak uygun flasklarda (25 cm²lik/ 75 cm²lik) ve 37⁰C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan etüvde inkübasyonu yapıldı.

İnverted Mikroskop kullanılarak hücrelerin proliferasyonu, pasajları ve takip işlemleri düzenli olarak kontrol edildi. Hücrelerin pasaj ve dondurulma işlemlerinden önce hücre canlılık oranlarının belirlenebilmesi için Tripan Mavisi kullanıldı. Işık mikroskobu altında Neubauer lamı kullanılarak 50 µl Tripan Mavisi ile 50 µl hücre solüsyonu karışımı içindeki hücrelerin sayımı yapıldı ve canlılık oranları belirlendi. Membranı hasar gören hücreler boyayı absorbe ettikleri için mavi renkte görünürlerken, sağlıklı olan canlı hücreler boyanmadıkları için mikroskop altında parlak bir şekilde gözlemlendi. Neubauer hemositometrisinin görüntüsü Şekil 7’de verilmiştir.



Şekil 7. Neubauer hemositometrisi

3.9.Hücrelerin Pasajlanması

5-6x10⁶ hücre sayısına yaklaşmış ve flask yüzeyini tamamen kaplamış olan hücreler 75 cm²'lik flaslara pasajlandı. Adherent hücre özelliği gösteren A2780 ve A2780cis hücrelerini flask yüzeyinden ayırabilmek için aşağıdaki süreç takip edildi.

1. Flaskların içerisindeki besiyeri dökülerek flask yüzeyi serum içermeyen RPMI-1640 ortamı ile yıkandı ve serum (FBS) yüzeyden uzaklaştırıldı.
2. Flaslara 1 ml tripsin-EDTA (%0,25) solüsyonu eklendi ve flask yüzeyindeki hücrelerin tripsin ile etkileşime girebilmeleri için flaslara 37°C'de 5 dk inkübatörde bekletildi.

3. İverted mikroskop aracılığıyla hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildikten sonra tripsin-EDTA'yı inhibe etmek için kullanılan miktarın 2 katına denk gelecek şekilde serum içeren RPMI-1640 ortamı flaslara eklendi.
4. Elde edilen hücreler 15 ml'lik falcon tüplerine alındıktan sonra 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi
5. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek kalan hücre peleti üzerine serumlu RPMI-1640 eklenerek pipetaj yapıldı. Hücrelerin eşit bir şekilde dağıldığına emin olunduktan sonra iki ayrı 75 cm²'lik flaska bölünerek pasajlama işlemi tamamlandı. Hücreler çoğalmak üzere inkübatöre kaldırıldı.

Deneylede hemen kullanılmayacak olan fazla hücreler dondurularak -80°C'de saklanmak üzere kaldırıldı.

3.10. Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyon)

Çoğalan ve pasajlanan hücrelerden kalan hücreler daha sonra kullanılmak ve stok oluşturmak adına dondurularak -80°C'de saklandı. Dondurma işlemi için aşağıdaki adımlar izlendi.

1. Flasklardaki ortamlar dökülerek flask yüzeyi serumsuz RPMI-1640 ile yıkandı ve serumdan uzaklaştırıldı.
2. Flaslara 1ml tripsin-EDTA (%0.25) uygulanarak hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler 15 ml'lik falkonlara toplanarak 1200 rpm'de 5 sk santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, pelet üzerine 1 ml serumlu ortam eklenerek hücreler Neubauer lamı yardımıyla sayıldı. Her kriyotüpte yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde kriyotüpler ayarlandı.
4. 9:1 oranında FBS-DMSO karışımı buz üzerinde hazırlandı ve hücre peleti bu karışım içerisinde pipetlenerek kriyotüplere 1 mL olacak şekilde dağıtıldı.
5. Kriyotüpler -80°C'de saklanmak üzere kaldırıldı.

3.11. Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi

-80°C’de kriyotüpler içinde dondurulmuş halde saklanan hücreler çözdürmek üzere öncelikle oda ısısına alındı ve Dimetil sülfoksit (DMSO)’in hücrelere zarar vermemesi için işlemler oldukça hızlı gerçekleştirildi. Dondurulmuş hücrelerin çözdürülmesi aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapıldı.

1. Kriyotüpler oda ısısına alındıktan sonra 1 ml RPMI-1640 besiyeri ile pipetaj uygulanarak çözdürme işlemi gerçekleştirildi.
2. İçerisinde 5 ml RPMI-1640 besiyeri bulunan 15 ml’lik falcon içerisine çözdürülen hücreler aktarıldı ve 1200 rpm’de 5 dk santrifüj yapıldı.
3. Hücrelerin DMSO’dan arındırılabilmesi için santrifüj işlemi tekrarlandı ve yeniden süpernatantı dökülen tüp üzerine 5 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı ve 1200 rpm’de 5 dk santrifüj uygulandı.
4. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Besiyeri-hücre karışımından 50 µl ve Tripan Mavisi’nden 50 µl alınarak Neubauer Lamı üzerine konuldu ve ışık mikroskobu altında hücre canlılığına bakıldı.
5. Hücre sayımı ve hücre canlılığı oranı belirlendikten sonra hücre-besiyeri karışımı üzerine 10 ml serum içeren RPMI-1640 besiyeri eklenerek 75 cm²’lik flasklara hücre ekimi gerçekleştirildi..
6. Flasklar, 37°C, %95 nem ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan etüv içerisine alınarak inkübasyona bırakıldı ve çoğalmaları takip edildi.

Hücre ekimi sonrasında hücreler inverted mikroskop altında takip edilerek çoğalma ve besiyeri kullanma durumlarına bağlı olarak pasajlanma ya da dondurma işlemleri yapıldı.

3.12. Hücrelere Cisplatin Uygulamasının Yapılması

Cisplatine dirençli hücre hattı A2780cis (EACC katalog no: 93112517) , Cisplatin’e duyarlı A2780 hücre hattına (EACC katalog no: 93112519) artan Cisplatin konsantrasyonlarının uygulanması ile geliştirilerek ilaç direnci oluşturulmuş olan hücre serisi satın alınmıştır. İlaç direncinde azalmaların olma ihtimali göz önüne

alınarak hatırlatma yapılması amacıyla -80°C’de saklanan A2780cis hücre hattına belirli aralıklar ve belirli dozlarla Cisplatin uygulaması aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır.

1. -80°C’de saklanan A2780cis hücre hattı “**Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi**” protokülüne uygun bir şekilde çözdürüldükten sonra 75 cm²’lik flaslara hücrelerin ekimi yapıldı.
2. Hücrelerin inverted mikroskop altında çoğalmaları ve flask yüzeyine tutunmaları takip edildi.
3. 5-6×10⁶ hücre sayısına yaklaşmış ve flask yüzeyini tamamen kaplamış olan hücrelerin bulunduğu flask içerisindeki serumlu ortam dökülerek flask yüzeyi serum içermeyen RPMI-1640 ortamı ile yıkandı.
4. Aşağıdaki seyreltme denklemine göre 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 22,5 µM Cisplatin belirli aralıkla hücre ortamına eklendi ve hücreler inkübatöre kaldırıldı.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

- M1: Stok çözeltinin molaritesi
 - M2: İstenen çözelti molaritesi
 - V1: Stok çözelti hacmi
 - V2: İstenen çözelti hacmi
5. 24 saat sonrasında Cisplatin içeren serumlu RPMI-1640 döküldü ve flask yüzeyinde Cisplatin kalmaması için flask serumsuz ortam ile yıkandıktan sonra flaska taze serumlu ortam eklenerek hücreler inkübatöre kaldırıldı. Her pasaj öncesinde bu işlem tekrarlanarak hücrelerin direnç durumlarını korumaları sağlandı.

3.13. A2780 ve A2780cis Hücre Hatlarında Proliferasyon Deneyi

Proliferasyon deneyi, metabolik olarak aktif hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyum (WST: kırmızı, XTT: sarı) tuzlarını kullanarak formazan (mor veya turuncu) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayanır.

Sitotoksosite deneyinde kullanılacak olan hücre konsantrasyonunun belirlenebilmesi için A2780 ve A2780cis hücre hatlarında proliferasyon deneyi yapıldı. Deney öncesinde aşağıdaki basamaklar takip edildi.

1. “Hücrelerin Pasajlanması” protokolü son basamaktan öncesine kadar tekrarlandı.
2. Hücre sayısı Neubauer lamı aracılığıyla belirlendikten sonra 3 tekrarlı olacak şekilde 96’lık well plate’lere her kuyuda 100 µl ortam içerisinde seri dilüsyon yapılarak 2×10^5 - $1,8 \times 10^3$ hücre/mililitre yoğunluğunda hücre ekimi yapıldı.
3. Deney 96.saatte durdurularak kuyucuklara 50 µl XTT reaktifi eklenerek birer saat aralıklarla 4 kere ölçüm gerçekleştirildi ve uygun absorbansa verilen hücre yoğunluğu belirlendi.

3.14. Hücre Sitotoksosite Deneyi (XTT)

XTT (sodyum 3’-[1-(fenilaminokarbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis (4 metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat) reaktifi kullanılarak, A2780 ve A2780cis hücre hatlarına 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 µM Cisplatin uygulandıktan sonra 24, 48 ve 72. Saatlerdeki sitotoksik etkisi değerlendirilip IC_{50} değeri belirlendi. Aynı işlem sonrasında 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 µM Resveratrol uygulanan hücreler için de tekrarlandı.

Bu deneyin çalışma prensibi tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri, formozan denilen yapıya dönüşmeleri sonucu renk değişikliğine uğramalarına dayanır. Tetrazolyum halkaları ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk reaksiyonu yalnızca canlı hücrelerde görülür. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybederek renk değişimi göstermezler. Canlı hücrelerde görülen bu renk değişimi mikropalak okuyucularda absorbans olarak optik dansitometri ile ölçülür.

Cisplatin ve Resveratrol için sitotoksik etkinin belirlenebilmesi için sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulandı.

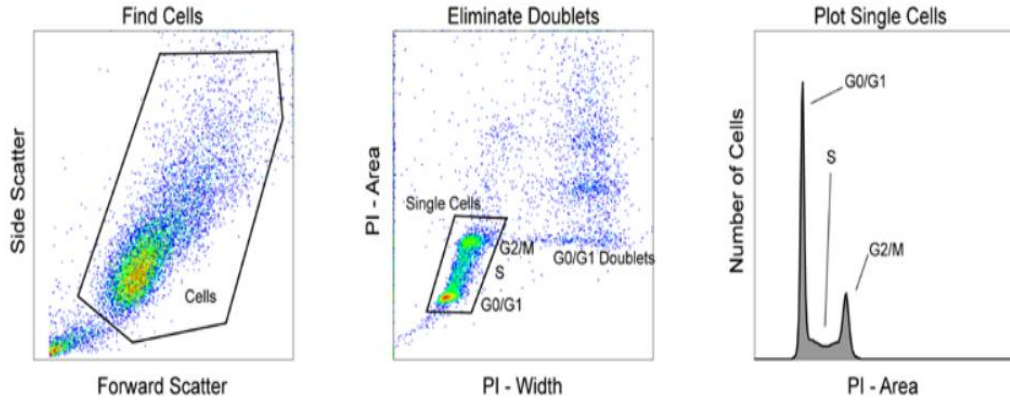
1. 96’lık well planelere, 3’lü tekrarlar şeklinde her kuyuda 100 µl %10 FBS içeren RPMI-1640 içerisinde ayrı ayrı A2780 ve A2780cis hücrelerinden sırasıyla 1×10^4 ve 1.5×10^4 olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.

2. Hücrelerin yüzeye tutunup çoğalabilmeleri açısından 24 saat boyunca plateler inkübatörde tutuldu.
3. İverted mikroskop altında hücrelerin yüzeye yapışma durumları kontrol edildikten sonra kuyucuklardaki ortamlar çekilerek 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 μM Cisplatin içeren ortamlar eklendi.
4. 24, 48 ve 72. Saatlere denk gelen zaman aralıklarında kuyucuklara 50 μl XTT reaktifi eklenerek, mikroplak okuyucuda (Multiscan Fc, Thermo) 450 nm absorbans 620 nm referans aralığında değerler ölçüldü ve kolorimetrik olarak değerlendirildi.
5. Canlılığın %50'sini inhibe edici doz olan IC_{50} dozu değeri belirlendi.
6. Bu işlem hücrelere belirli zamanlarda 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 22,5 μM Cisplatin uygulaması yapıldıktan sonra tekrarlandı.
7. Farklı zamanlarda Resveratrol'ün sitotoksik etkisinin belirlenebilmesi için basamaklar tekrarlandı ve literatür bilgisi dahilinde kuyucuklara 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 μM Resveratrol içeren ortamlar eklendi ve Resveratrol için IC_{50} değeri belirlendi.

3.15. Hücre Döngüsü Deneyi

Resveratrol'ün A2780 ve A2780cis hücre hatlarının hücre döngüsü üzerindeki etkilerini belirleyebilmek için BD CellCycle Test kiti (Katalog no: 340242) kullanıldı. Resveratrol verilmeyen hücreler A2780 ve A2780cis hücre hatları için kontrol hücreleri olarak ayarlandı.

Genel olarak hücre döngüsünü belirleyen bu yöntem, hücre zarı lipidlerinin iyonik olmayan bir deterjanla çözülmesini, hücre iskeletini ve nükleer proteinlerin tripsin ile elimine edilmesini, hücresel RNA'nın bir enzim ile sindirilmesini ve nükleer kromatinin spermin ile stabilize edilmesini içerir. Propidium iyodür (PI), daha sonra bir akış sitometresinde izole çekirdeklere stokiyometrik olarak bağlanır. PI lekeli çekirdekler, esas olarak 580 nm ile 650 nm arasındaki dalga boylarında floresan ışık yayar. Akış sitometresinin floresan 2 (FL2) dedektörü, boyanmış hücreler tarafından 564 nm ile 606 nm arasında yayılan ışığı analiz etmek için kullanılır. Ortaya çıkan floresan histogramları, anormal bir DNA kök çizgisinin (DNA anöploidi) varlığını saptamak için analiz edilir. Bu testin şematik gösterimi Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 8. Hücrelerde PI etkileşimi sonucu hücre döngüsünün belirlenmesi

A2780 ve A2780cis hücre hatlarına Resveratrol'ün hücre döngüsüne etkisini görmek için, çalışma gruplarına belirlenen IC₅₀ dozları ve dozların 50 µM altı ve üstü değerler uygulandı. Doz verilmeyen gruplar kontrol grubu olarak belirlendi. 48.saatte deney durdurularak aşağıdaki protokol uygulandı.

Protokol;

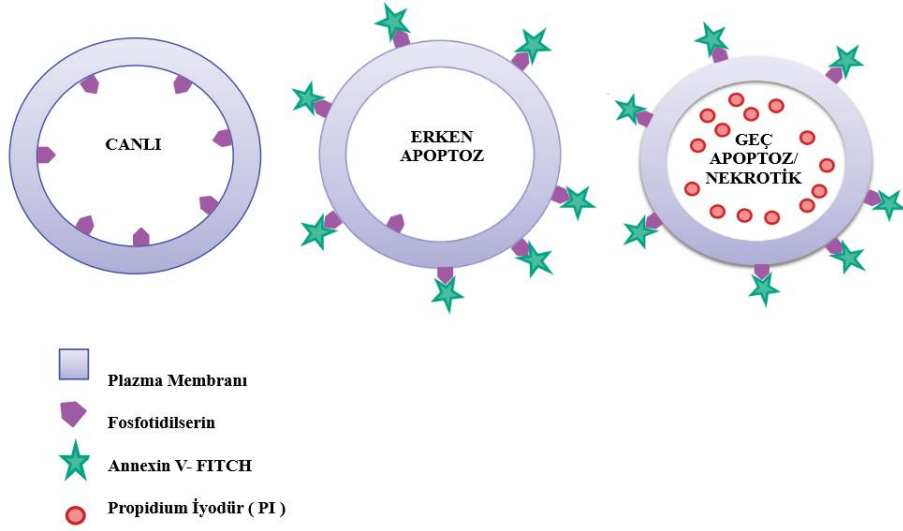
1. 6'lık well platelere A2780 ve A2780cis hücreleri için sırasıyla 4x10⁵ ve 6x10⁵ hücre ekimi yapıldı.
2. Hücrelerin yüzeye tutunup çoğalabilmeleri açısından 24 saat boyunca plateler inkübatörde tutuldu ve 24 saat sonunda belirlenen IC₅₀ dozları hücrelere uygulandı.
3. Kurulan deney 48.saatin sonunda sonlandırıldı.
4. 6'lık well platelerdeki ortamlar çekildi ve 1 ml PBS (Phosphate buffered salin) eklenerek yıkama yapıldı.
5. Kuyulardaki PBS çekilerek 500 µl %0.25 tripsin eklenerek 5 dakika inkübatörde bekletildi.
6. Hücrelerin plate yüzeyinden ayrıldığından emin olunduktan sonra, 1 ml %10 FBS içeren RPMI-1640 tripsini inhibe etmek için kuyulara eklendi.
7. Kuyulardaki hücreler 1.5'luk ependorflara toplanarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatant döküldü ve kalan pelet üzerine 1 ml Buffer Solution eklenerek elle yavaşça vortex yapıldı ve süspansen hücreler 300g'de 5 dakika santrifüj edildi.

9. Süpernatant döküldükten sonra aynı işlem tekrarlandı ve 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
10. Süpernatant döküldükten sonra hem kontrol gruplarına hem de çalışma gruplarına 250 µl Solüsyon A (tripsin buffer) eklendi ve yavaşça karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
11. Her gruba 200 µl Solüsyon B (tripsin inhibitörü ve RNase buffer) eklendi ve yavaşça karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
12. Buz üzerinde ve karanlık ortamda gruplara Solüsyon C (PI boya solüsyonu) eklendi ve karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildikten sonra Flow sitometri cihazında ölçümler gerçekleştirildi.

3.16. Apoptoz Deneyi

A2780 ve A2780cis hücre hatlarında Resveratrol'ün apoptotik etkisini araştırmak için BD Annexin V FITC Assay (Katalog no: 556547) kiti kullanıldı. Resveratrol verilmeyen hücreler kontrol hücreleri olarak ayarlandı.

Testin çalışma mekanizması, hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunan membran lipitlerinden biri olan fosfatidilserinin (PS) translokasyonuna dayanmaktadır. Ca^{+2} ye bağlı bir fosfolipid bağlayıcı protein olan Annexin V, PS için yüksek afiniteye sahiptir ve florokrom etiketli Annexin V, akış sitometrisi kullanılarak maruz kalan PS'nin saptanması için kullanılabilir. PS translokasyonu, apoptotik veya nekrotik süreçlerden kaynaklanan hücre ölümünün sonraki aşamalarında meydana gelir. Bu nedenle, Annexin V ile boyama, erken ve geç apoptotik hücrelerin tanımlanması için propidium iyodür (PI) boyası ile birlikte kullanılır. Sağlam zarlara sahip canlı hücreler PI'ı hariç tutarken, ölü ve hasarlı hücrelerin zarları PI'a geçirgendir. Bu nedenle, canlı kabul edilen hücreler hem Annexin V hem de PI negatif iken, erken apoptozda olan hücreler Annexin V pozitif ve PI negatiftir ve geç apoptozda olan veya zaten ölü olan hücreler hem Annexin V hem de PI pozitiftir. Bu şekilde apoptotik hücrelerin ayrımı gerçekleştirilmektedir. Annexin V ve PI maddelerinin hücreler üzerindeki etkileşimleri Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Hücrelerde Annexin V ve PI etkileşimleri

A2780 ve A2780cis hücre hatlarında Resveratrol'ün apoptotik etkisini belirlemek için çalışma gruplarına IC_{50} değerleri uygulandı. Doz verilmeyen gruplar kontrol grupları olarak ayarlandı. 48. Saatte deney durdurularak kit protokolü aşağıdaki sırayla uygulandı ve Flow sitometri cihazı ile ölçüm yapılarak hücrelerde kontrole kıyasla apoptotik etki belirlendi.

Protokol;

1. 6'lık well platelere A2780 ve A2780cis hücreleri için sırasıyla 4×10^5 ve 6×10^5 hücre ekimi yapıldı.
2. Hücrelerin yüzeye tutunup çoğalabilmeleri açısından 24 saat boyunca plateler inkübatörde tutuldu ve 24 saat sonunda belirlenen IC_{50} dozları hücelere uygulandı.
3. Kurulan deney 48.saatin sonunda sonlandırıldı.
4. 6'lık well platelerdeki ortamlar çekildi ve 1 ml PBS (Phosphate buffered salin) eklenerek yıkama yapıldı.
5. Kuyulardaki PBS çekilerek 500 μ l %0.25 tripsin eklenerek 5 dakika inkübatörde bekletildi.
6. Hücrelerin plate yüzeyinden ayrıldığından emin olunduktan sonra, 1 ml %10 FBS içeren RPMI-1640 tripsini inhibe etmek için kuyulara eklendi.

13. Kuyulardaki hücreler 1.5'luk ependorflara toplanarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra 1 ml PBS ile yıkama yapıldı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
14. Santrifüjden alınan ependorflara 10X Binding Buffer'dan 100 µl eklendi.
15. Doz ile muamale edilmiş olan hücrelerin bulunduğu ependorflara 2,5 µl PI ve 2,5 µl Annexin V eklendi.
16. Kontrol ependorflarına 2,5 µl Annexin V eklendi ve bütün ependorflar 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
17. Kontrol ependorfları hariç diğer ependorflara 150 µl Binding Buffer eklendi ve Flow sitometri cihazında ölçümler gerçekleştirildi.

3.17. Gen Ekspresyonu

Resveratrol'ün belirlenen IC₅₀ dozları A2780 ve A2780cis hücre hatlarında NF-κB mRNA ekspresyon düzeylerine olan etkileri LightCycler 480 cihazında RT-PCR yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

3.17.1. Total RNA İzolasyonu

Resveratrol'ün belirlenen dozları verilen hücreler çalışma grubu olarak belirlenirken doz verilmeyen gruplar kontrol grubu olarak belirlendi. 48. Saatte hücreler toplanıp, santrifüj edildikten sonra elde edilen pelletlerden total RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon "MagNA Pure Compact RNA İzolasyon Kiti" protokolüne göre uygulandı.

Protokol;

1. 6'lık well platelere A2780 ve A2780cis hücreleri için sırasıyla 4x10⁵ ve 6x10⁵ hücre ekimi yapıldı.
2. Hücrelerin yüzeye tutunup çoğalabilmeleri açısından 24 saat boyunca plateler inkübatörde tutuldu ve 24 saat sonunda belirlenen IC₅₀ dozları hücrelere uygulandı. Doz uygulanmayan gruplar kontrol olarak belirlendi.
3. Kurulan deney 48.saatin sonunda sonlandırıldı.
4. Platelere ortam uzaklaştırılarak, serumsuz RPMI-1640 ile hücreler yıkandı.

5. Eklenen serumsuz ortam çekildikten sonra kuyulara % 0.25 tripsin eklendi ve tripsinizasyon için plateler 5 dk boyunca inkübatörde tutuldu.
6. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığından emin olunduktan sonra kuyulara FBS içeren RPMI-1640 eklenerek hücreler santrifüj tüpüne toplandı ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı.
7. Süpernatant kısmı döküldü ve elde edilen hücre peleti üzerine 100 µl PBS eklenerek süspanse hale getirildi.
8. Süspanse haldeki hücrelerin üzerine 100 µl 'Lysis-binding Buffer'eklendi ve pipetaj uygulandı.
9. Örnekler oda sıcaklığında 10-15 dakika inkübe edildi.
10. Magnapure Compact LC cihazına örnekler yüklendi. Protokol olarak ; 'RNA cell' seçildi ve 200 µl örnek, 50 ul elution volüm seçeneği işaretlendi.
11. İnkubasyon işleminden sonra elde edilen 200 µl hücre lizati barkodsuz tüplere aktarıldı ve cihazın S sırasına yerleştirildi.
12. Boş elution tüpleri cihazın E sırasına yerleştirildi.
13. Cihazın C sırasına ise her bir örnek için barkodsuz sample tüplerine 20 µl DNAaz enzimi konularak yerleştirildi.
14. Tüm basamaklar tamamlandıktan sonra cihaz başlatıldı ve 32 dakika sonra total RNA izolasyon tamamlandı.

3.17.2. RNA Miktar ve Saflık Ölçümü

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları 260/280nm ve 230/260nm dalga boylarındaki absorbands değerleri Nanodrop cihazında okunarak belirlendi.

3.17.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Total RNA izolasyonu sonucu elde edilen uygun RNA'lerden cDNA sentezi yapmak için "GENECOPOEIA QP057 SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit" i kullanıldı.

Aşağıdaki protokol adımları izlenildi.

Protokol;

1. Total RNA izolasyonu sonucu elde edilen örnekler kit manueline göre 200 ng/μl şeklinde ayarlandı.
2. Kit protokolünde belirtildiği gibi reaksiyon miksi buz üzerinde 8 μl olacak şekilde hazırlandı. cDNA oluşturulması aşamasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3'te gösterildi.

Tablo 3. cDNA reaksiyon miks karışımı

Reaktifler	Hacim
Random Primer (50 μM)	1 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
5X first-strand Buffer	4 μl
M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1 μl
Rnase Inhibitor (40 U/μl)	1 μl

3. Miks cDNA tüplerine dağıtıldıktan sonra total RNA'lar eklenerek total hacim Rnase free dH₂O ile 20 μl'ye tamamlandı. İşlemlere buz üzerinde devam edildi.
4. Hazırlanan tüpler PCR thermo-cycler cihazına alınarak, aşağıdaki protokole göre çalıştırıldı.
 - 1) 55°C'da 60 dk
 - 2) 70°C'da 10 dk
5. Cihaz tamamlandıktan sonra cDNA örnekleri buz üzerinde bekletilerek PCR aşamasına geçildi.

3.17.4. RT-PCR Analizi

cDNA örnekleri kullanılarak NF- κ B ekspresyon seviyesini belirlemek için “BlazeTaq™ SYBR Green qPCR Mix 2” kullanılarak qPCR Array çalışması yapıldı. Hedef gen NF- κ B ve housekeeping gen primeri (GAPDH) ile birlikte aşağıdaki tabloda belirtilen prosedüre uygun mix hazırlandı. qPCR analizinde kullanılacak genlerin primerlerinin baz dizimleri ve baz sayıları Tablo 4’te verilmiştir. GAPDH Forward ve Reverse primerinin kullanım bilgileri Tablo 5’de ve NF- κ B Forward ve Reverse gen primerlerinin kullanım bilgileri Tablo 6’da verilmiştir. PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 7’de, PCR protokolü ise Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan gen primerlerinin dizimleri ve baz sayıları

Gen Adı	Gen Dizilimi	BP
GAPDH-Forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	20 bp
GAPDH-Reverse	5'-TCCACCCTGTTGCTGTA-3'	17 bp
NF- κ B-Forward	5'GCAGATGGCCCATACTTCA-3'	20 bp
NF- κ B-Reverse	5'CACCATGTCCTTGGGTCCAG-3'	20 bp

Tablo 5. GAPDH Forward ve Reverse Primerlerinin Kullanım Bilgisi

GAPDH-F							
Oligo No	191023-1-16	GC	42,30%	Tm (Basic)	58.83°C	Total nmol	43,69
Skala	50 nmol	MW	5990,9	Conc.	934,73 ng/µl	Total ng	261724,6
Saflaştırma	DSLIT	A260	29,4	OD	8,2	100 µM stok-µl TE	436,9

GAPDH-R							
Oligo No	191023-1-17	GC	40,90%	Tm (Basic)	47,05°C	Total nmol	38,05
Skala	50 nmol	MW	5112,4	Conc.	694,75 ng/µl	Total ng	194529,4
Saflaştırma	DSLIT	A260	20,5	OD	5,7	100 µM stok-µl TE	380,5

Tablo 6. NF-κB Forward ve Reverse Primerlerinin Kullanım Bilgisi

NF-κB-F							
Oligo No	191023-1-20	GC	42,30%	Tm (Basic)	58.83°C	Total nmol	37,55
Skala	50 nmol	MW	6062	Conc.	812,88 ng/µl	Total ng	227605,1
Saflaştırma	DSLIT	A260	25,5	OD	7,1	100 µM stok-µl TE	375,5

NF-κB-R							
Oligo No	191023-1-21	GC	46,20%	Tm (Basic)	55.88oC	Total nmol	35,73
Skala	50 nmol	MW	6069	Conc.	774,53 ng/µl	Total ng	216868,4
Saflaştırma	DSLIT	A260	23,2	OD	6,5	100 µM stok-µl TE	357,3

Tablo 7. PCR Reaksiyon karışımı

Reaktifler	Hacim
cDNA örneği	1 µl
2X Plus SYBR	10 µl
Upstream Primer	0,5 µl
Downstream Primer	0,5 µl
ddH ₂ O	8 µl
Son Hacim	20 µl

- Kullanılan primerler kullanım protokollerine uygun olarak hazırlandı. Üç tekrar olacak şekilde hesaplamalar yapıldı.
- PCR reaksiyon karışımı iyice karıştırılıp PCR reaksiyon tüplerine aktarıldı.
- Çok kısa santrifüj yapıldıktan sonra örnekler 96 kuyucuklu PCR plakasına alındı. PCR plakası Roche Light Cycler 480 cihazına yerleştirilerek reaksiyon başlatıldı.
- Cihaz Tablo 8'deki gibi programlandı. Program bitişi sonrası elde edilen Ct değerleri değerlendirildi.

Tablo 8. PCR reaksiyon programı

Programlar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı	Ramp Rate (°C/s)
Pre-İnkübasyon	95 °C	10 dakika	1	4.40
Pre-Amplifikasyon	95 °C	10 saniye	10	4.40
	60 °C	20 saniye		2.20
	72 °C	10 saniye		4.40
Amplifikasyon	95 °C	10 saniye	45	4.40
	60 °C	20 saniye		2.20
	72 °C	10 saniye		4.40
Melting Curve	95 °C	15 saniye	1	4.40
	60 °C	1 dakika		2.20
	95 °C	-		-
	60 °C	15 saniye		2.20
Soğutma	40 °C	1 saniye		2.20

3.18. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

IC₅₀ dozunun hesaplanması, hücre döngüsü ve apoptoz sonuçları Graphpad Prism 8 programında hesaplandı. Real-time PCR verileri relative ekspresyon analizi $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplandı.

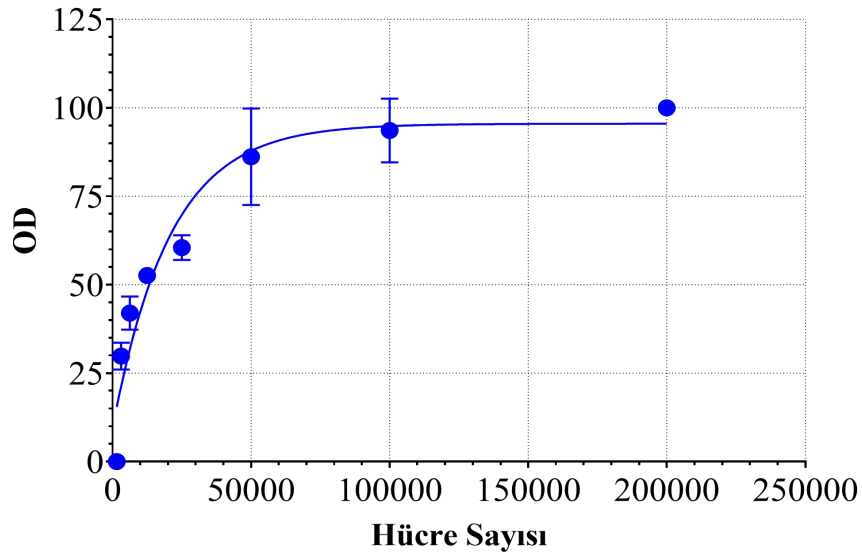


4. Bulgular

4.1.Proliferasyon Deneyleri

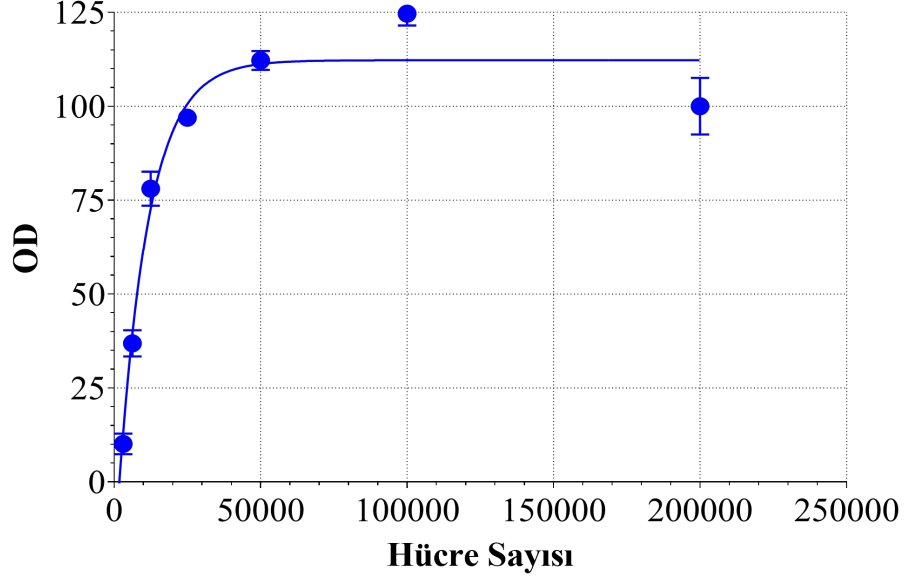
Yumurtalık kanseri hücre hattı A2780 ve Cisplatin dirençli yumurtalık kanseri hücre hattı A2780cis hücrelerinin sitotoksosite analizlerinde kullanılacak olan hücre sayısının belirlenmesi için proliferasyon deneyi kuruldu. Deneylerde ilk kuyucuklara 200 µl serumlu RPMI-1640 içerisinde 2×10^5 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 96'lık plate'e 3 tekrarlı kurulan proliferasyon deneyinde her kuyuda 100 µl içerisinde seri dilüsyon yapılarak hücreler dağıtıldı. 96. saatte deney sonlandırılarak kuyucuklara 50 µl XTT reaktifi eklendi ve bir saatte bir Multiscan FC (Thermo) mikropalak okuyucusunda ölçümler gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre hücre konsantrasyonu A2780 hücre hattı için 5×10^4 hücre/ml; A2780cis hücre hattı için 10×10^4 hücre/ml olarak belirlendi. A270 ve A2780cis hücreleri arasında 5×10^4 'lük bir fark olduğu görüldü. Proliferasyon sonuçları Grafik 1 ve Grafik 2'de gösterildi.

A2780 Proliferasyon Deneyi



Grafik 1. A2780 Hücre Hattı Proliferasyon Deneyi Bulguları

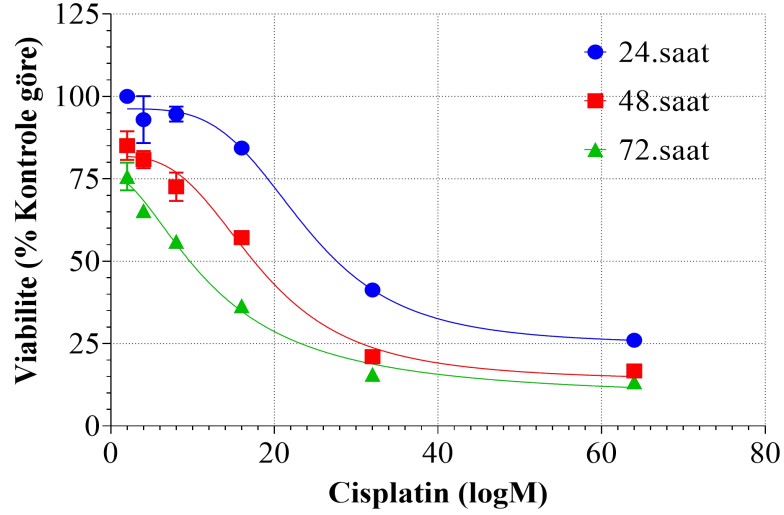
A2780cis Proliferasyon Deneyi



Grafik 2. A2780cis Hücre Hattı Proliferasyon Deneyi Bulguları

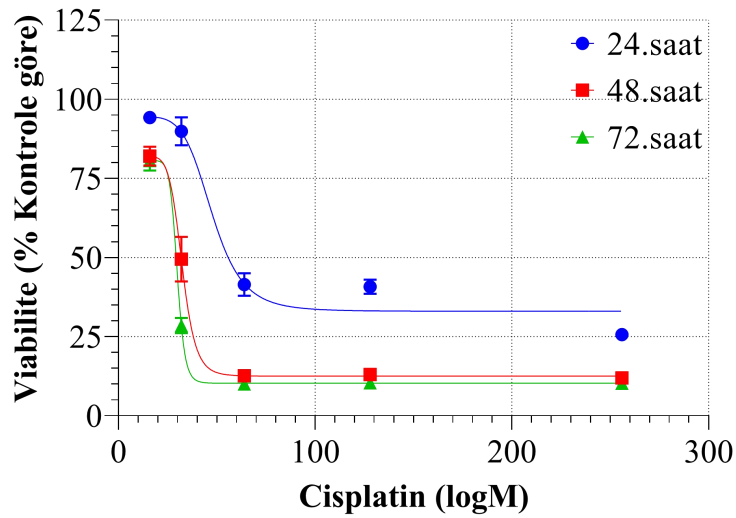
4.2. Cisplatin Direncinin Belirlenmesi

Ticari olarak Cisplatin dirençli halde satın alınan hücre hattı A2780cis'te direnç miktarının belirlenebilmesi için 96'lık well platede 3 tekrarlı olacak şekilde kurulan deneyde kuyucuklara, Cisplatin konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 μM şeklinde uygulandı. Cisplatin verilmeyen kuyucuklar kontrol grubu olarak ayarlandı. Proliferasyon deneyi sonucunda saptanan değere göre, her kuyuda 100 μl serumlu RPMI-1640 ortam içerisinde 10×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24, 48 ve 72. saatlerde her kuyucuğa 50 μl XTT reaktifi eklenerek bir saatte bir absorbans değerleri ölçüldü. Çıkan sonuçlar Graphpad Prism 8 yazılımı ile değerlendirildi. Cisplatin'in hücre proliferasyonunu %50 azalttığı doz miktarı olan IC_{50} değeri 48.saatte 18.26 μM olarak hesaplandı. Analiz grafiği, Grafik 3'te belirtildi.



Grafik 3. A2780cis Hücre Hattında Cisplatin Sitotoksosite Bulguları

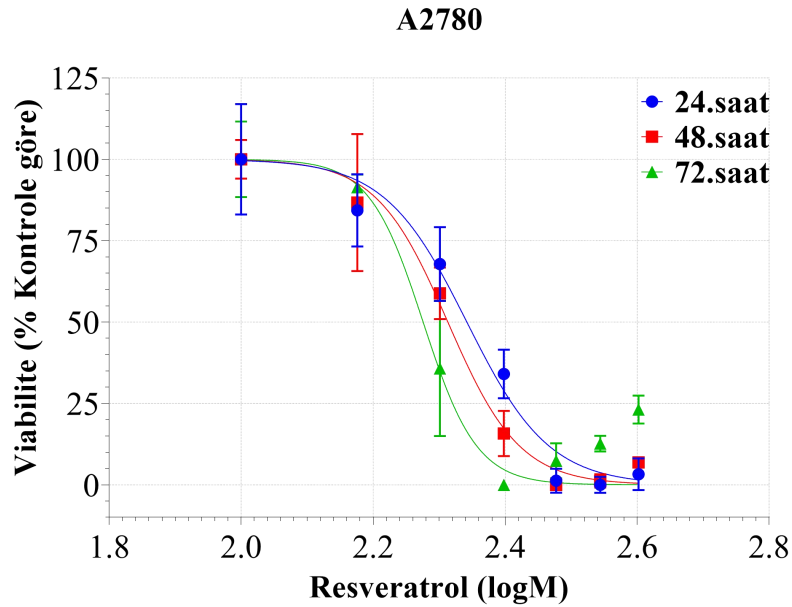
18.26 μM Cisplatin'e dirençli olduğu bulunan A2780cis hücrelerine Cisplatin uygulamasının yapılabilmesi için yeterli hücre yoğunluğuna erişilen flasklara farklı zamanlarda 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 ve 22,5 μM Cisplatin uygulaması yapıldı. Hücreler 24 saat boyunca Cisplatin içeren serumlu ortam içerisinde inkübatörde bekletildikten sonra direncin belirlenebilmesi için sitotoksosite testi tekrarlandı ve çıkan sonuçlar değerlendirildi. IC_{50} değeri 48.saatte 32.42 μM olarak hesaplandı. Cisplatin uygulaması öncesi ve sonrası sonuçlarına göre A2780cis hücrelerinin ~2 kat direnç kazandığı görüldü. Analiz grafiği, Grafik 4'te belirtildi.



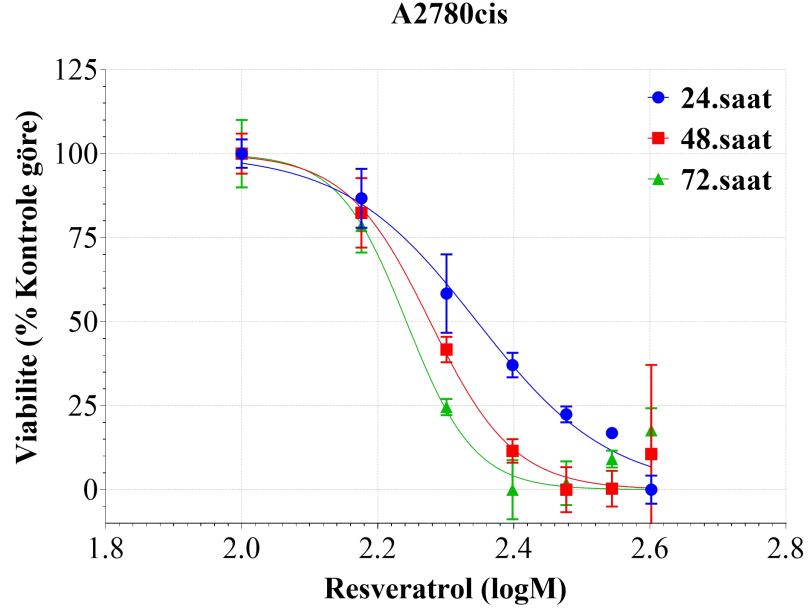
Grafik 4. A2780cis Hücre Hattında Cisplatin Uygulaması Sonrasında Sitotoksosite Bulguları

4.3. Resveratrol'ün Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

A2780 ve A2780cis hücreleri ile 96'lık well platede 3 tekrarlı olacak şekilde kurulan deneylerde kuyucuklara, Resveratrol konsantrasyonları 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 μM şeklinde uygulandı. İki hücre hattında da Resveratrol uygulanmayan kuyucuklar kontrol grubu olarak ayarlandı. Her kuyuda 100 μl serumlu RPMI-1640 ortamı içerisinde sırasıyla A2780 ve A2780cis hücrelerinden 5×10^4 ve 10×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24, 48 ve 72. Saatlerde her kuyucuğa 50 μl XTT reaktifi eklenerek absorbans değerleri ölçüldü ve GraphPad Prism 8 yazılımı ile değerlendirildi. Hücre proliferasyonunun %50'sini azaltan IC_{50} dozu A2780 için 48.saatte 215,2 μM ve A2780cis hücre hattı için 48.saatte 265,5 μM olarak hesaplandı. A2780 ve A2780cis hücreleri arasında Resveratrol'ün IC_{50} dozunun 50 μM farklı olduğu belirlendi. Sitotoksosite bulgularının grafikleri, Grafik 5 ve Grafik 6'da gösterildi.



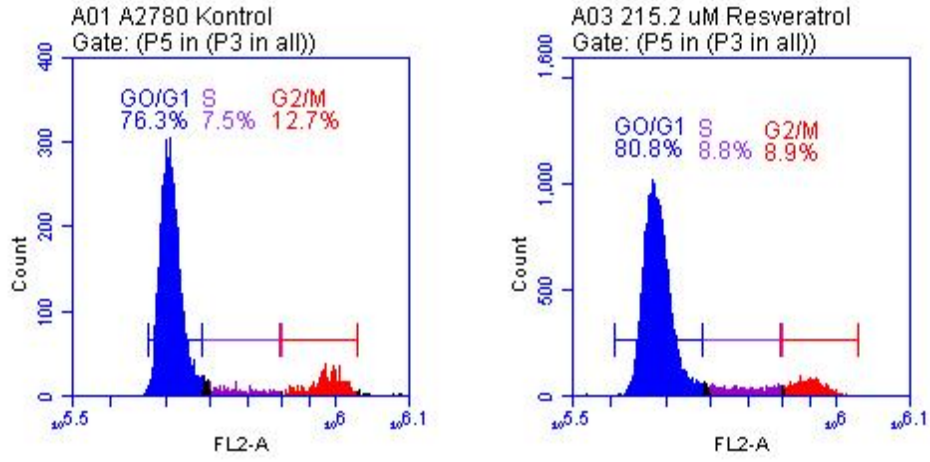
Grafik 5. A2780 Hücre Hattında Resveratrol Sitotoksosite Bulguları



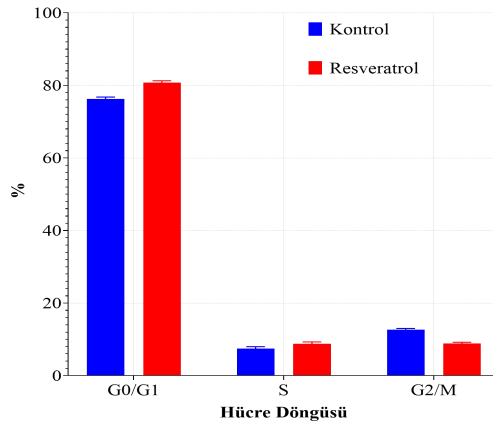
Grafik 6. A2780cis Hücre Hattında Resveratrol Sitotoksosite Bulguları

4.4. Resveratrol'ün Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Resveratrol'ün 48.saat için belirlenen IC_{50} dozları A2780 ve A2780cis hücre hatlarına uygulanarak, etken maddenin hücre döngüsü üzerine etkileri PI analizi ile değerlendirildi. Etken madde uygulanan hücreler, etken madde uygulanmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılarak, G_0/G_1 , S ve G_2/M evrelerindeki hücre sayıları ve yüzdeleri değerlendirilerek analiz edildi. A2780 hücre hattında 48.saatte hücrelerin G_0/G_1 fazındaki oranının %76,3 olduğu belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla, 215,2 μM Resveratrol'ün A2780 hücre hattına uygulanmasına bağlı olarak, 48.saatte G_0/G_1 fazındaki oran %80,8 olarak belirlendi. A2780 hücre hattı kontrol grubu ve etken madde uygulanan hücreler arasında G_0/G_1 fazında ~1,05 katlık bir artış görüldü. Sonuçlar Şekil 10 ve Grafik 7'de gösterildi.



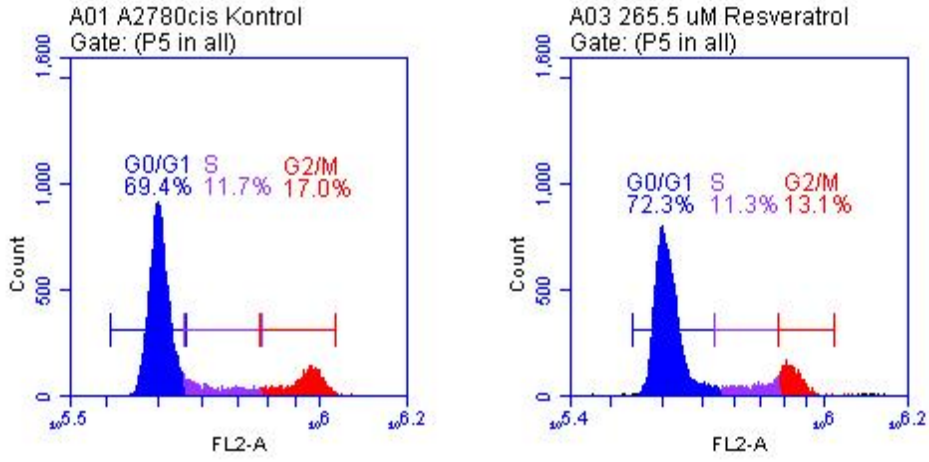
Şekil 10. A2780 hücre hattında Resveratrol'ün 48.saatteki hücre döngüsü grafikleri



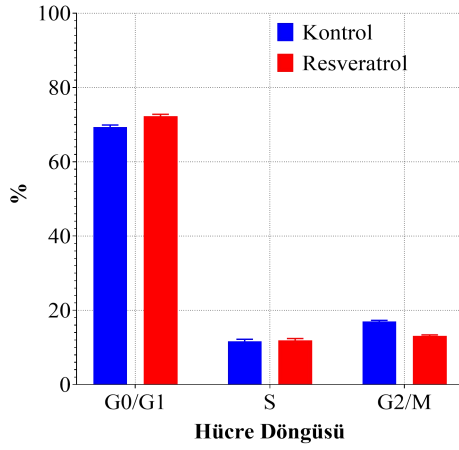
Hücre Döngüsü	Kontrol	Resveratrol
G0/G1	76,3%	80,8%
S	7,5%	8,8%
G2/M	12,7%	8,9%

Grafik 7. Resveratrol'ün 48.saat sonunda A2780 hücre hattındaki G₀/G₁, S ve G₂/M evrelerinin yüzdeleri

A2780cis hücre hattında, kontrol grubundaki hücrelerin G₀/G₁ fazındaki oranı 48.saatte %69,4 olarak belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla, 265,5 μM Resveratrol'ün A2780cis hücre hattına uygulanmasına bağlı olarak, 48.saatte G₀/G₁ fazındaki oran %72,3 olarak belirlendi. A2780cis hücre hattında, kontrol grubu ve etken madde uygulanan hücreler arasında G₀/G₁ fazında ~1,04 katlık bir artış görüldü. Sonuçlar Şekil 11 ve Grafik 8'de gösterildi.



Şekil 11. A2780cis hücre hattında Resveratrol'ün 48.saatteki hücre döngüsü grafikleri



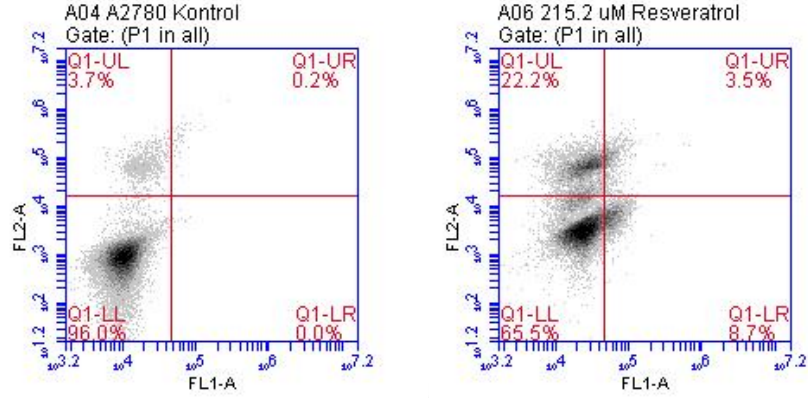
Hücre Döngüsü	Kontrol	Resveratrol
G0/G1	69,4%	72,3%
S	11,7%	11,9%
G2/M	17,0%	13,1%

Grafik 8. Resveratrol'ün 48.saat sonunda A2780cis hücre hattındaki G₀/G₁, S ve G₂/M evrelerinin yüzdeleri

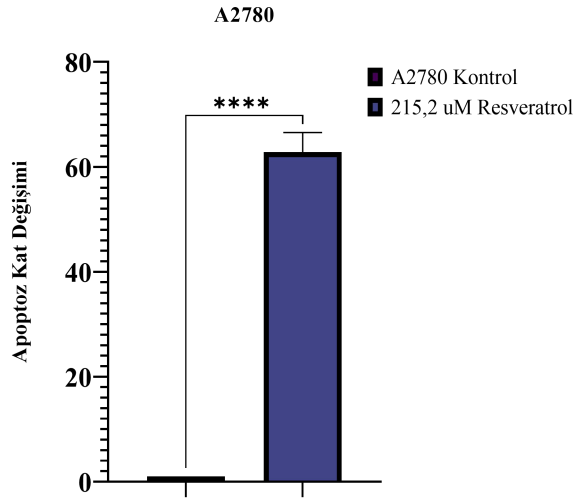
4.5. Resveratrol'ün Hücreler Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

A2780 ve A2780cis hücre hatlarına, Resveratrol etken maddesinin 48.saat IC₅₀ doz uygulaması ile bu dozların hücreler üzerindeki apoptotik etkinliği Annexin V yöntemi ile değerlendirildi. 6'lık well plateler içerisinde sırasıyla A2780 ve A2780cis hücrelerinden 3x10⁵ ve 4x10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Resveratrol uygulanmayan kuyucuklar kontrol grubu olarak kabul edildi. Sonuç olarak A2780 hücre hattında kontrole kıyasla %62,83 oranında apoptotik etki gözlemlendi. A2780cis hücre hattında ise kontrole kıyasla %7,96 oranında apoptotik etki gözlemlendi. A2780 hücre hattı için Annexin V görüntüleri Şekil 12'de ve A2780cis için Şekil 13'te

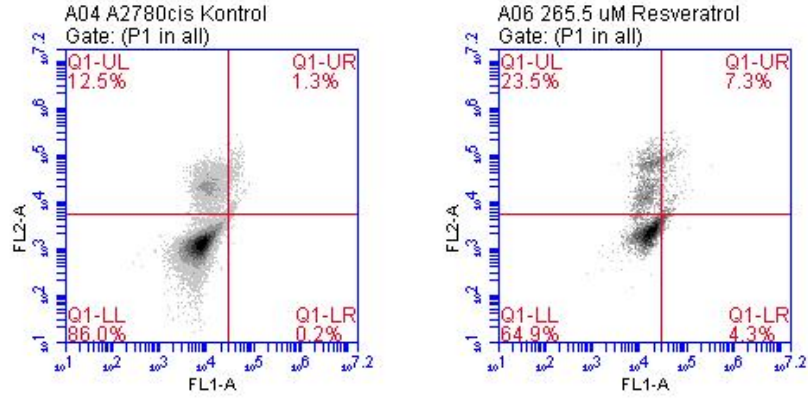
gösterildi. Apoptoz etkisinin kontrole göre kat değişiminin değerlendirilmesi A2780 için Grafik 9’da ve A2780cis için Grafik 10’da belirtildi.



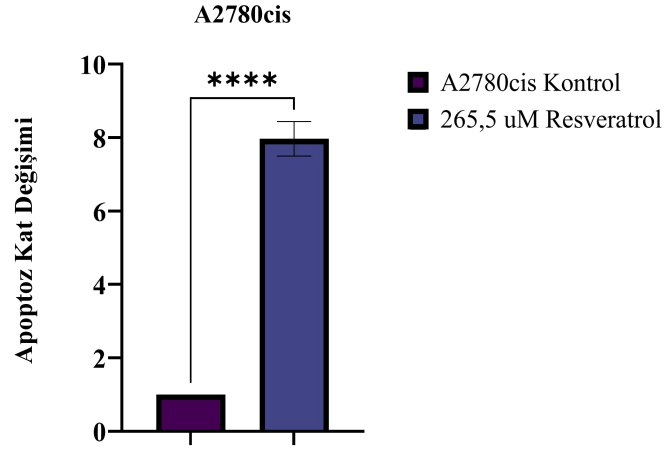
Şekil 12. Resveratrol’ün (IC₅₀) A2780 hücre hattında 48.saatteki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları



Grafik 9. Resveratrol’ün (IC₅₀) A2780 hücre hattında 48.saatteki apoptotik etkisinin kat değişim grafiği



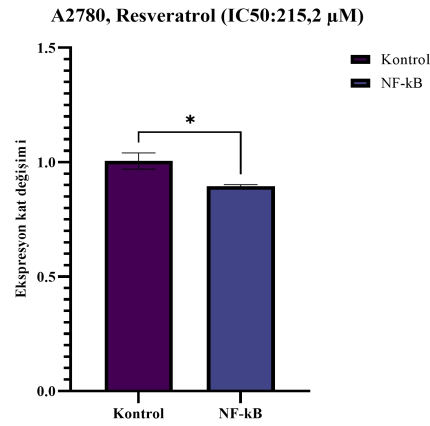
Şekil 13. Resveratrol'ün (IC_{50}) A2780cis hücre hattında 48.saatteki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları



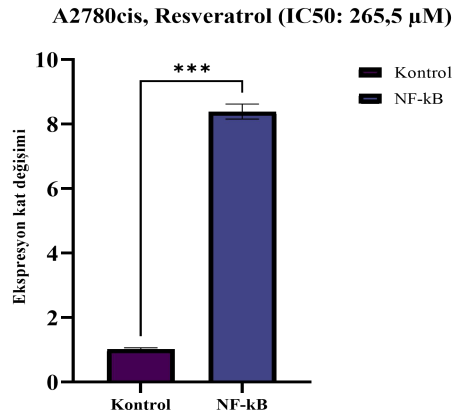
Grafik 10. Resveratrol'ün (IC_{50}) A2780cis hücre hattında 48.saatteki apoptotik etkisinin kat değişim grafiği

4.6. Resveratrol'ün NF-κB Genindeki mRNA Ekspresyon Düzeyine Etkisinin Analizi

Resveratrol etken maddesinin 48.saat IC₅₀ dozu uygulanan A2780 ve A2780cis hücre hatlarında , NF-κB geninin mRNA ekspresyon düzeyini belirlemek adına LightCycler 480 cihazında RT-PCR analizi yapıldı. Etken madde verilmeyen gruplar kontrol grubu olarak ayarlandı. Referans gen olarak GAPDH housekeeping geni kullanıldı. Resveratrol'ün hesaplanan IC₅₀ dozlarının uygulanması sonucunda A2780 hücre hattında NF-κB geninde 0,91 katlık bir azalma olduğu ve A2780cis hücrelerindeki NF-κB ekspresyonunda 8,30 katlık bir artış olduğu belirlendi. Gen ekspresyon değişiklikleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ile hesaplandı. RT-PCR sonucuna göre belirlenen kat değişimleri A2780 için Grafik 11'de ve A2780cis için Grafik 12'de verildi. Resveratrol'ün etkisinin literatür bilgileri doğrultusunda A2780cis hücre hattında 8,30 katlık ekspresyon artışı göstermesi sonucu bir inhibisyona neden olmadığı şeklinde yorumlandı.



Grafik 11. A2780 hücre hattında NF-κB mRNA ekspresyon kat değişimi



Grafik 12. A2780cis hücre hattında NF-κB mRNA ekspresyon kat değişimi

5. Tartışma

Gelişmiş toplumlarda kadınlar arasındaki kanserle ilişkili ölümlerin ana nedenlerinden biri yumurtalık kanseridir ve en ölümcül jinekolojik kanserlerden biri olduğu kabul edilmektedir. Yumurtalık kanserinin ortalama 5 yıllık sağ kalım oranı %40 düzeyindedir ve ileri evre hastalarda (evre III veya IV) bu oran yarıya düşmektedir (Kurman, Hedrick, Brigitte, & Ronnett, 2011).

Son zamanlarda, histopatolojik, moleküler ve genetik çalışmalardan elde edilen bulgularla yumurtalık kanserinin birkaç alt tipinin özellikleri aydınlatılmıştır. Yumurtalık kanseri iki geniş kategoriye ayrılmaktadır: Yumurtalıklardaki öncü lezyonların açıkça tanımlandığı Tip I tümörler ve bu tür lezyonların net olarak tanımlanmadığı ve tümörlerin tubal ve/veya over yüzey epitelinde de novo gelişebildiği Tip II tümörler şeklindedir. Bu özellikleri anlamak, yumurtalık kanseri mortalitesini azaltma çabasında önemlidir (Koshiyama, Matsumura, & Konishi, 2017).

Tip I karsinomlar, genel olarak, endometriyal karsinomlar gibi yavaş büyüyen düşük dereceli neoplazmalardır. Buna karşılık, tip II karsinomlar ileri dereceli ve klinik olarak agresif neoplazmalardır. Tip II karsinomların çoğu, ileri dereceli seröz karsinomu temsil etmektedir. İleri dereceli seröz karsinomun varyantları olan karsinosarkom ve farklılaşmamış karsinom da bu kategoriye dahildir. Tip II karsinom gelişimi sıklıkla p53 mutasyonları ile ilişkilendirilmektedir (Koshiyama, Matsumura, & Konishi, 2014).

Farklı histolojik ve moleküler özellikleri bulunan yumurtalık kanseri alt tiplerini temsil eden modeller, güvenilir prelinik testler sağlamak için kritik öneme sahiptir. Araştırmalarda kullanılmak üzere geliştirilmiş yaklaşık 100 yumurtalık kanseri hücre dizisi vardır, ancak bunların hüresel ve moleküler özellikleri büyük ölçüde tanımlanmamıştır. Beaufort ve arkadaşları, yumurtalık karsinomlarının klinik patolojik ve moleküler özellikleri ve prognozu ile ilişkili olan histolojik ve morfolojik alt tipleri belirlemişlerdir. 39 yumurtalık kanseri hücre hattı 14 ileri dereceli seröz, 4 seröz tip, 1 düşük dereceli seröz ve 20 seröz olmayan tip şeklinde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre A2780, SKOV3 ve IGROV1 gibi yaygın olarak kullanılan yumurtalık kanseri hücre hatlarının ileri dereceli seröz alt tipini temsil etmediği, ancak büyük olasılıkla endometrioid histolojik alt tipini temsil ettiği bildirilmektedir (Beaufort vd., 2014).

Çalışmamızda kullandığımız hücre hattı A2780, herhangi bir antikanser ilaç veya kimyasalla tedavi edilmemiş bir hastadan alınmış olup yumurtalık endometroid adenokarsinom tümöründen oluşturulmuş bir yumurtalık kanseri hücre hattıdır.

Yumurtalık kanseri, moleküler biyoloji ve klinik davranış açısından önemli ölçüde değişen, farklı kökenlerden farklı alt tipler içeren heterojen bir hastalıktır. Son on yılda tedavisinde bazı sınırlı ilerlemelere rağmen, şu anda çok az terapötik seçenek vardır ve genel sağkalım kötü olmaya devam etmektedir (Schmid & Oehler, 2014). Kemoterapi, yumurtalık kanseri tedavisinin en hayati parçasıdır. Platin içeren ilaçlar (cisplatin ve karboplatin) ve taksan ailesi (paklitaksel ve dosetaksel) yumurtalık kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ajanlardır (Chandra vd., 2019). Cisplatin, ciddi yan etkilerine ve direnç geliştirmesine rağmen yumurtalık kanserinin ana tedavisi olarak kullanılmaktadır. (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014).

İleri yumurtalık kanseri için kemoterapi yetersiz kalmaktadır. Cisplatin bazlı kombinasyon kemoterapötik tedavilerle gerçekleştirilen gelişmelere rağmen, çoğu hasta hala dirençli kanserden ölmektedir. İlaç direnci, tedavi sonucunun en önemli belirleyicisi olarak ortaya çıkmaktadır. Laboratuvar çalışmaları, yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlara karşı hücrel direnç mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Azalan ilaç birikimi, metabolik ilaç inaktivasyonu ve ilaca bağlı hücrel hasara karşı onarım veya tolerans, tümü hücrel düzeyde dirence katkıda bulunmaktadır (Perez, Hamilton, Ozols, & Young, 1993).

Helleman ve arkadaşları, *in vitro* şartlar altında bozulmuş Cisplatin taşınımını gösterebilmek için Cisplatin duyarlı A2780 hücre hattını Cisplatin dirençli hale getirmişlerdir. Duyarlı A2780 hücre hattını dirençli hale getirebilmek için ard arda 10 gün boyunca hücreleri 3.3 μM Cisplatin (1 $\mu\text{g/ml}$) ile muamele etmişlerdir. Sonrasında A2780cis hücre hattının Cisplatin direnci seviyesini belirlemek için MTT ve klonojenik hayatta kalma deneyleri yapmışlardır. Bunların sonucunda A2780 hücre hattı için Cisplatin IC_{50} değerini 1.2 μM ve A2780cis hücre hattı için IC_{50} değerini 4.5 μM olarak hesaplamışlardır. Bu sonuçlara göre duyarlı ve dirençli A2780 hücre hatlarında 3.8 katlık bir fark olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, A2780cis hücre hattının Cisplatin'e A2780 hücre hattından daha az duyarlı olduğunu göstermektedir (Helleman vd., 2006).

Alghamian ve arkadaşlarının yaptığı, kemorezistans derecesi bakımından farklılık gösteren ticari olarak temin edilebilen iki yumurtalık kanseri hücre dizisi A2780 ve

A2780cis arasında epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) gen düzenleyicilerinin ifadesinde herhangi bir önemli farklılık olup olmadığını belirlemeyi amaçlayan çalışmalarında, hücreleri 24 saat boyunca artan konsantrasyonlarda (0,5, 2, 5, 10, 15, 20 ve 30 $\mu\text{g/ml}$) Cisplatin ile muamele etmişlerdir. Bunun sonucunda yaptıkları MTT analizine göre A2780 hücre hattı için IC_{50} değerini 5 $\mu\text{g/ml}$ ve A2780cis hücre hattı için IC_{50} değerini 30 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplamışlardır. A2780cis hücrelerindeki IC_{50} değerinin, ana hücre hattının IC_{50} 'sinden altı kat daha yüksek olduğunu, bunun da A2780cis hücrelerinin, A2780 hücrelerine kıyasla Cisplatin kaynaklı sitotoksositeye karşı daha dirençli olduğunu ortaya koymuşlardır (Alghamian, Soukkaiech, Abbady, & Murad, 2022).

Bizde ticari olarak satın alınmış olan A2780cis hücre hattındaki Cisplatin direncinin dozunu belirleyebilmek için 24, 48 ve 72. saatlerde 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 μM Cisplatin uygulayarak XTT reaktifi ile sitotoksosite deneyi gerçekleştirdik ve doz-zamana bağlı olarak değişkenlik gösteren IC_{50} değerini hesapladık. XTT analizine göre 48.saatte A2780cis hücreleri için IC_{50} değerini 18.26 μM olarak hesapladık. Sonrasında belirli zaman aralıklarında A2780cis hücre hattına 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 ve 22,5 μM Cisplatin uyguladık ve bunun sonucunda tekrarladığımız XTT deneyi ile A2780cis hücreleri için 48.saatte IC_{50} değerini 32.42 μM olarak hesapladık. Bu sonuçlara göre analizlerimizin literatürle uyumlu olduğunu gördük ve diğer deneylerimize devam ettik.

Kemoterapötik ajanlara karşı direnç gelişimi söz konusu olduğunda, kemorezistansın üstesinden gelmek için kemoterapiye duyarlılık (kemosensitizasyon) stratejilerinin belirlenmesi önemlidir. Kemosensitizasyon, bir veya daha fazla direnç mekanizmasını modüle ederek bir ilacın diğerinin aktivitesini arttırmak için kullanılmasına dayanmaktadır. Potansiyel kemosensitizrler arasında Resveratrol gibi doğal ajanlar bulunmaktadır. (Gupta, Kim, Prasad, & Aggarwal, 2010).

Resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilben) ilk olarak 1940 yılında beyaz karaca otunun (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) köklerinin bir bileşeni olarak izole edilmiştir ve o zamandan beri 70'den fazla başka bitkiden elde edilen ekstraktlarda tanımlanmıştır. Resveratrol, anti-enfektif, antioksidan, anti-kanser ve kardiyoprotektif fonksiyonlar dahil olmak üzere geniş spektrumlu faydalı sağlık etkilerine sahip bir fitoaleksindir (Aggarwal vd., 2004). Resveratrol'un anti-kanser aktivitelerine, hücre döngüsü ilerlemesini durdurması, inflamasyonu, proliferasyonu,

apoptozu indüklemesi, invazyon, metastaz ve tümör hücrelerinin anjiyogenezini düzenleyen birkaç hücre sinyal molekülünün modülasyonu aracılık etmektedir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen araştırmalar, Resveratrol'ün apoptotik yolları modüle ederek, ilaç taşıyıcılarını ve tümör hücresi proliferasyonunda yer alan proteinleri aşağı modüle ederek tümör hücrelerinde kemo-direncin üstesinden gelebileceğini göstermektedir. Ek olarak, Resveratrol'ün NF- κ B ve STAT3 yolunu inhibe ederek hücreleri ilaca duyarlı hale getirebildiği gösterilmiştir.(Jiang vd., 2017). Nessa ve arkadaşlarının, ilaç direncinin üstesinden gelmek amacıyla insan yumurtalık A2780, A2780cis ve A2780ZD0473R hücre hatlarına Resveratrol ile platin ilaçları Cisplatin ve Oksaliplatin kombinasyonlarını uyguladıkları çalışmada, Cisplatin konsantrasyonunu 0.32 - 40 μ M aralığında ve Resveratrol konsantrasyonunu 1.6 - 200 μ M aralığında olacak şekilde hücrelere uygulamışlardır. 72 saatlik inkübasyon sonrasında A2780 için Cisplatin IC₅₀ dozunu $0.67 \pm 0.06 \mu$ M ve A2780cis için IC₅₀ dozunu $4.14 \pm 0.90 \mu$ M olarak hesaplamışlardır. Resveratrol için hesapladıkları IC₅₀ değerleri ise A2780 için $24.78 \pm 5.87 \mu$ M ve A2780cis için $24.65 \pm 7.82 \mu$ M'dır. Kombine dozlarla elde ettikleri sonuçlara göre Resveratrol ve platin ilaçların 2 saatlik bir zaman aralığıyla uygulanmasının, tek başına uygulamasından çok daha fazla hücre ölümüne neden olduğunu ve birleşik ilaç etkisinin, Resveratrol eklendiğinde daha büyük olduğunu göstermişlerdir. Resveratrol ile Cisplatin kombinasyonu için sinerjizm derecesinin, Oksaliplatin ile kombinasyonundan daha fazla olduğunu bulmuşlardır (Nessa, Beale, Chan, Yu, & Huq, 2012).

Baribeau ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada, A2780 ve A2780cis hücrelerinin çoğalmasını, MTT analizi ile değerlendirmişlerdir. 100 μ l kültür ortamında 24 saat boyunca 10 μ M Cisplatin'li veya Cisplatin uygulamadıkları 0 - 60 μ M doz aralığında hücreleri Resveratrol ile muamele etmişlerdir. Test edilen en yüksek dozda (60 μ M) Resveratrol'ün, A2780 hücrelerinin proliferasyonunda hafif bir azalmaya neden olduğu ve A2780cis hücrelerinde hiçbir farklılık olmadığını göstermişlerdir. Cisplatine duyarlı A2780 hücrelerinde Resveratrol'ün, tedavi olarak Cisplatin kullanıldığında gözlenen hücre proliferasyonundaki azalmayı güçlendirdiği ve bu iki bileşik arasında sinerjistik bir etki olabileceğini düşünmüşlerdir. Bu durum, Cisplatin'e dirençli A2780cis hücrelerinde gözlenmeyip, en yüksek Resveratrol dozu,

Cisplatin ile kombinasyon halinde kullanıldığında proliferasyonu arttırmadığını vurgulamışlardır (Baribeau, Chaudhry, Parent, & Asselin, 2014).

Liu ve arkadaşları, 72 saat boyunca 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 μM Resveratrol ile tedavi edilen A2780 ve SKOV3 hücrelerinin canlılığını MTT analizi ile belirlemişlerdir. Resveratrol'ün, yumurtalık kanseri hücresi büyümesini konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe etmesi ile tipik apoptotik morfolojiler, küçülmüş hücresel membran, nükleusta yoğun kromatin ve apoptotik cisimlerin oluşumunu hem A2780 hem de SKOV3 hücrelerinde gözlemlemişlerdir. A2780 ve SKOV3 hücrelerinde Resveratrol'ün IC_{50} değerlerini sırasıyla $196.01 \pm 33.09 \mu\text{M}$ ve $56.99 \pm 26.91 \mu\text{M}$ olarak bulmuşlardır (Y. Liu vd., 2018).

Bizde Resveratrol'ün A2780 ve A2780cis hücre hatlarında sitotoksik ve proliferatif etkilerini belirleyebilmek için XTT analizi yaptık. A2780 ve A2780 cis için 24, 48 ve 72. saatlerde 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 μM Resveratrol uygulayarak IC_{50} dozlarını hesapladık. Resveratrol'ün IC_{50} dozlarını sırasıyla A2780 ve A2780cis hücreleri için 215,2 μM ve 265,5 μM bulduk. İki hücre hattında Resveratrol'ün IC_{50} dozlarını karşılaştırıldığımızda 50 μM bir fark olduğunu gördük. Literatürde bulunan IC_{50} dozlarına göre daha yüksek dozlar elde etmiş olmamıza rağmen iki hücre hattı arasındaki IC_{50} dozu farkının yakın olduğunu gördük.

Memeli hücre döngüsünü oluşturan fazlar, G1 ve G2, S (DNA sentezi) ve M (mitoz), sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve protein bozulmasına aracılık eden E3 ubiquitin ligazları tarafından düzenlenmektedir. Resveratrol, hücre büyümesini azaltma ve hücre döngüsü, büyüme faktörleri, CDK'ler ve transkripsiyon faktörleri üzerinde doğrudan etki eden hücre proliferasyonunu inhibe etme işlevine sahiptir. Resveratrol bu etkisi ile kanser hücresi oluşumu ve proliferasyonunda yer alan genleri modüle ederek ve ayrıca kanser hücresi apoptozunu teşvik ederek kemoterapiye duyarlılığa yol açmaktadır (Varoni, Lo Faro, Sharifi-Rad, & Iriti, 2016).

Resveratrol, bir dizi kanser hücresinde hem mitokondriyal hem de mitokondriyal olmayan programlanmış hücre ölümüne yol açan farklı yolları tetikleyebilen güçlü bir proapoptotik ajan olarak tanımlanmaktadır. Stilben türevidir olan Resveratrol, normal (kansersiz) hücreleri önemli ölçüde etkilemeden dirençli kanser hücrelerini hassaslaştırabilmektedir (Niedzwiecki, Roomi, Kalinovsky, & Rath, 2016).

Opipari ve arkadaşları, aralarında A2780'nin de bulunduğu beş insan yumurtalık karsinomu hücre hattından oluşan bir panelde Resveratrol'ün anti-kanser etkilerini değerlendirmişlerdir. Resveratrol'ün A2780 ve diğer yumurtalık kanseri hücre dizileri için sitotoksik olduğunu belirlemişlerdir. Resveratrol'ün hücre döngüsü ilerlemesini etkileyip etkilemediğini analiz etmişlerdir. 24 saat boyunca 50 - 200 μM doz aralığında Resveratrol uygulamış ve 50 μM 'lık bir konsantrasyonda Resveratrol'ün, hücrelerin S-fazında birikmesine neden olduğunu göstermişlerdir. 100 μM Resveratrol uygulaması sonucunda ise hücrelerin çoğunun bunun yerine G_0/G_1 fazında biriktiğini belirtmişlerdir. Bazı hücre tiplerinde, Bcl-2 de dahil olmak üzere antiapoptotik proteinlerin, Resveratrol'ün neden olduğu hücre ölümünü hafiflettiği bildirilmektedir. Yumurtalık kanserinde kemoterapi direncinin araçları olarak Bcl-2 ve Bcl-xL' nin önemi göz önüne alındığında, proteinlerden herhangi birinin Resveratrol kaynaklı apoptozu indükleyip indüklediğini belirlemek için tek gen transfeksiyonunu kullanmışlardır. Yüksek seviyelerde Bcl-2 veya Bcl-xL eksprese etmek için stabil bir şekilde transfekte ettikleri A2780 klonlarının, Resveratrol ve Cisplatin'e tepkilerini belirlemek için vektör kontrolleri ile TUNEL Testi kullanarak apoptotik etkileri karşılaştırmışlardır. Kontrol hücrelerinde (%50) Resveratrol ile indüklenen apoptoz oranını, Bcl-2 (%35) ve Bcl-xL (%40) eksprese eden hücrelerde görülenle karşılaştırmışlardır. Buna karşılık, Cisplatin'in, Bcl-2 (%16.5) ve Bcl-xL (%16.3) eksprese eden hücrelerde kontrol hücrelerinin %51'inde hücre ölümünü indüklediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlarla, Bcl-2 ve Bcl-xL tarafından kontrol edilen apoptotik yolların, A2780 hücrelerinde Resveratrol kaynaklı hücre ölümü için önemli olmadığını belirtmişlerdir (Opipari vd., 2004).

Muhanmode ve arkadaşları, A2780 ve A2780cis yumurtalık kanseri hücrelerinde Kurkumin ve Resveratrol'ün sinerjistik etkilerini araştıran çalışmalarında akridin turuncusu/etidyum bromür (AO/EB) boyaması yaparak hücre apoptozunu tespit etmeye çalışmışlardır. A2780cis hücrelerine sırasıyla 30 μM Kurkumin ve 70 μM Resveratrol uygulamalarını 48. saat boyunca sürdürmüşlerdir. Hücreleri daha sonra DNA bağlayıcı ajan AO/EB ile boyamışlardır. Bu çalışmada apoptozla ilişkili iki biyobelirtecin (p-PARP ve kaspaz-3) ekspresyonlarının A2780 hücrelerine kıyasla Cisplatin tedavisinden sonra arttığını göstermişlerdir ve bu sayede Cisplatin ve fitokimyasallarla tedavi kombinasyonunun apoptozu önemli ölçüde daha da arttırdığını bulmuşlardır. Ek olarak, AO/EB deneyi sonucunda apoptozu giren

hücrelerin oranının Cisplatin ile tedavi edilen hücrelerde daha fazla olduğunu ve Cisplatin ile kombinasyon tedavi sonucu yükseldiğini göstermişlerdir (Muhanmode, Ke Wen, Maitinuri, & Shen, 2019).

Engelke ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada Resveratrol veya Ellagik asidin yumurtalık kanserinde Cisplatin'in etkinliğini iyileştirip iyileştiremeyeceğini A2780 ve A2780cis hücre hatlarında araştırmışlardır. A2780cis hücre serisini, A2780 hücre serisine 26 haftalık döngü boyunca Cisplatin uygulayarak elde etmişlerdir ve A2780cis'in, A2780'e kıyasla Cisplatin'e karşı 4-6 kat daha fazla direnç gösterdiğini belirtmişlerdir. Ellagik asit ve Resveratrol'ün A2780 ve A2780cis hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini, MTT yöntemini kullanarak 72 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirmişlerdir. Resveratrol'ün, sırasıyla A2780 ve A2780cis hücre hatlarında 60,3 ve 70,8 μM ile benzer IC_{50} değerleri gösterdiğini bulmuşlardır. Daha sonra, apoptoz (48 saat inkübasyon) ve hücre döngüsü (24 saat inkübasyon) üzerindeki 10 μM Cisplatin ile indüklenen etkilerini incelemişlerdir. 10 μM Cisplatin ilavesinden önce hücrelerin Ellagik asit veya Resveratrol ile 48 saat önceden inkübasyonunun, sırasıyla A2780 ve A2780cis'de Cisplatin duyarlılığını arttırdığını bulmuşlardır. Apoptotik hücre sayısını Annexin V yöntemi ile belirlemişlerdir. A2780Resv ve A2780Ellag'da, 10 μM Cisplatin ile işleme tabi tutulduktan sonra A2780'dekine benzer sonuçlar bulmuşlardır. A2780'de hücrelerin %43'ü, sırasıyla A2780Resv'de %37 ve A2780Ellag'da %40 apoptotik etki gösterdiği belirtilmiştir. Kontrol olarak kullanılan Paklitaksel'in, tüm hücre dizilerinde bir G_2/M tutuklamasına neden olduğu, Cisplatin'in ise en çok A2780 hücrelerinde ve en az A2780cis'de belirgin olan bir S-fazı tutuklamasına yol açtığını göstermişlerdir. S fazındaki hücre sayısını, A2780 %46, A2780Ellag %41, A2780Resv %39 ve A2780cis %36 olarak hesaplamışlardır. Birlikte ele alındığında, Paklitaksel veya Cisplatin stresinin hücre döngüsü üzerindeki dağılımının, Ellagik asit veya Resveratrol'ün uzun süreli tedavisinden önemli ölçüde etkilenmediği sonucuna varmışlardır (Engelke, Hamacher, Proksch, & Kassack, 2016).

Bizde hücre döngüsü ve apoptoz analizlerini gerçekleştirmek için belirlemiş olduğumuz IC_{50} dozlarını A2780 ve A2780cis hücre hatlarına uyguladık. Resveratrol uygulamadığımız grupları kontrol grubu olarak belirledik ve 48.saatteki IC_{50} dozlarını kullandık (A2780 RV: 215,2 μM ve A2780cis RV: 265,5 μM). Hem hücre döngüsü hem de apoptoz deneylerini 48.saatte sonlandırdık ve sonuçları akış

sitometri cihazında analiz ettik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre A2780 ve A2780 Resveratrol uygulanan gruplarımız arasında 48.saatte G_0/G_1 fazında ~1,05 katlık bir artış gördük. Bu artış Resveratrol'ün G_0/G_1 fazında bir durmaya sebep olabileceğini düşündürdü fakat sonuçlarımız anlamlı değildi. Benzer şekilde A2780cis hücrelerine uygulanan Resveratrol'de de kontrol grubuna kıyasla G_0/G_1 fazında ~1,04 katlık bir artış olduğu gözlemlendi fakat sonuçlarımızın literatürle uyumlu olmadığını gözlemledik. Apoptoz deneyini Resveratrol'ün IC_{50} dozlarını uygulayarak ve 48.saatte deneyi sonlandırarak gerçekleştirdik. Resveratrol uygulamadığımız grupları kontrol grubu olarak belirledik. A2780 hücre hattımızda kontrole kıyasla %62,83 oranında apoptotik etki gözlemledik. Buna kıyasla, A2780cis hücre hattımızdaki apoptotik etki kontrole karşılaştırıldığında %7,96 oranındaydı. İki hücre hattımızda da Resveratrol'ün hücreleri sadece apoptoza yönlendirmediğini aynı zamanda nekrozu da indüklediğini gördük. Bu sonuçlara bakarak Resveratrol'ün A2780 ve A2780cis hücreleri arasında belirgin bir apoptotik fark yarattığını söyleyebiliriz.

Klinik öncesi ve klinik çalışmalar, NF- κ B ve NF- κ B aracılı proinflatuar sitokinlerin kanserle ilişkili semptomların ilerlemesinde merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. İnflatuar sitokinler, kanser ve kansere bağlı semptomların gelişimi ve ilerlemesinde rol oynamaktadır. Bu sitokinler NF- κ B tarafından düzenlenmektedir. Bu nedenle, NF- κ B'yi ve sitokinleri aşağı modüle etme stratejileri, kanserle ilişkili semptomları baskılamak için oldukça umut verici görünmektedir. Emodin, gingerol, resveratrol, likopen, indol-3-karbinol, C vitamini, sülforafan ve ellagik asit gibi çeşitli diyet maddeleri, NF- κ B'nin güçlü inhibitörleri olduğu bulunan doğal kemopreventif maddelerdir. Resveratrol, NF- κ B'nin aktivasyonunu inhibe etmektedir ve ayrıca antioksidan aktiviteye sahiptir (Khuda-Bukhsh, Das, & Saha, 2014). NF κ B'nin anormal aktivasyonu, ilaç direncini arttırmakta ve kanser hücrelerini farmakolojik ilaçlar tarafından indüklenen apoptoza karşı korumakta, bu nedenle çoğu kanser önleyici ajan, NF- κ B inhibitörleri olarak işlev görmektedir (Xu, Deng, Lian, & Yu, 2021).

Said ve arkadaşları, Resveratrol'ün Cisplatin kaynaklı yumurtalık hasarına karşı potansiyel koruyucu etkisinin altında yatan moleküler mekanizmayı bir sıçan modelinde araştırmışlardır. Sıçanları, her biri 15 sıçan olacak şekilde rastgele dört tedavi grubuna ayırmışlardır ve belirli zamanlarda sıçanlara Cisplatin ve Resveratrol enjeksiyonu yapmışlardır. Bu çalışma ile immünohistokimya tekniğini kullanarak

yumurtalıkta NF-κB'nin (p65) hücrel lokalizasyonunu tespit etmişlerdir. Resveratrol tedavisinden sonra aşağı regüle edilen Cisplatin grubunun yumurtalık oositinde, granüloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde NF-κB p65'in (aktif form) ekspresyonunun arttığını bulmuşlardır. Yumurtalık içindeki artan proinflamatuvar sinyal, yumurtalık folikül havuzunun Cisplatin kaynaklı tükenmesinden sorumlu olabileceği, Resveratrol ile birlikte tedavinin, Cisplatin kaynaklı yumurtalık hasarına karşı bir anti-inflamatuvar ajan olarak hizmet edebileceği sonucuna varmışlardır (Said, Mantawy, & El-Demerdash, 2019).

Tino ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada, Resveratrol ve Asetil-resveratrol'ün NF-κB proteini ve fosforilasyonu (pNF-κB) üzerindeki etkilerini araştırmak için yumurtalık kanseri hücre hatları olan SKOV-3 ve OVCAR-5'i kullanarak western blot ve immünofloresan yöntemleri ile protein miktarını belirlemişlerdir. Hücreleri 2, 4 ve 6 gün boyunca 10, 20 veya 30 µM Resveratrol veya asetil-resveratrol'e maruz bırakmışlardır. İki hücre hattı arasında NF-κB ve pNF-κB'nin miktarında bariz bir fark olduğunu gözlemlemişler ve SKOV-3 hücre hattının daha fazla miktarda protein ifade ettiğini bulmuşlardır (Tino, Chitcholtan, Sykes, & Garrill, 2016).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarına göre Resveratrol'ün IC₅₀ dozları A2780 ve A2780cis hücrelerine uygulandıktan sonra A2780 hücrelerinin NF-κB geninde 0,91 katlık bir azalışa ve A2780cis hücrelerinin NF-κB geninde 8,30 katlık bir artışa neden olduğunu gördük. Literatür araştırmalarımız sonucunda RT-PCR sonuçlarımızın literatürle uyumlu olmadığı ve NF-κB geninin ekspresyon düzeyinde beklenildiği şekilde bir azalmanın olmadığını gördük. Resveratrol'ün bu gen üzerindeki inhibe edici etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için protein ifadelerinin Western Blot yöntemi ile tayin edilmesi ve fosforilasyon düzeyinin belirlenmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz. Ek olarak A2780 ve A2780cis hücrelerinin Resveratrol ile belirli zamanlarda ve literatürle uyumlu dozlarda tedavi edilmesi gerektiği ve bunun sonucunda hücrelerin Cisplatin duyarlılığının artıp artmayacağını irdelenmesinin yararlı olacağını düşünmekteyiz.

6. Sonuç ve Öneriler

Resveratrol, son yıllarda metabolik, kardiyovasküler, nörodejenerasyon ve kanser dahil olmak üzere pek çok hastalığa karşı güçlü koruma sağlayan bir bileşik olarak ortaya çıkmıştır. Özellikle kanser hücreleri üzerindeki kemopreventif ve kemoterapötik özellikleri Resveratrol'ü ilgi çekici hale getirmiştir. Yumurtalık kanseri heterojen bir hastalıktır ve aynı zamanda jinekolojik malignitelere kadınlarda başlıca ölüm nedenidir. Yumurtalık kanseri için ana tedavi cerrahi ve kemoterapi kombinasyonudur. Ne yazık ki, ilk cerrahi ve kemoterapiye iyi yanıt oranlarına rağmen, çoğu hastada kemoterapiye direnç gelişmekte ve bu genellikle hasta sağ kalım oranını düşürmektedir. Araştırmamız, kemoterapötik bir ajan olarak sıklıkla kullanılan Cisplatin'e direnç gelişimi gösteren yumurtalık kanseri hücrelerinde Resveratrol'ün terapötik etkilerine ışık tutmaktadır. Çalışmamızda, Resveratrol'ün yumurtalık kanseri proliferasyonunu, apoptoz indüksiyonunu, hücre döngüsünü düzenlemesini ve NF-κB sinyal yolunun inhibisyonu aracılığıyla dirençli hücreleri ilaca duyarlı hale getirip getirmediği araştırıldı. Sonuçlarımız Resveratrol'ün ve Cisplatin'in yumurtalık kanserinde sitotoksik bir etkisi olduğunu kanıtlar niteliktedir. Ayrıca Resveratrol'ün A2780 ve A2780cis hücre hatlarının proliferasyonunu önlediğini gösterdik. Resveratrol'ün A2780 ve A2780cis hücrelerinde hücre döngüsünü durdurmadığını ve apoptozu anlamlı derecede indüklediğini gözlemledik. İlaça dirençli ve duyarlı hücre hatlarımızla ilişkilendirdiğimiz NF-κB geninin Resveratrol aracılığı ile ekspresyonunda beklediğimiz bir azalma olmadığını ve literatürle uyumlu olmadığını gördük. Bu nedenle sonraki çalışmalarımızda Resveratrol'ün bu genin ifadesi üzerindeki etkisini daha iyi anlayabilmek için protein ifadesine ve fosforilasyon düzeyine bakılmasının uygun olacağını ve ayrıca hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki etkisinin ortaya konulabilmesi için Cisplatin ile birlikte kombine doz şeklinde uygulanmasının yarar sağlayacağını düşündük. Çalışmamız, yumurtalık kanserinde ve Cisplatin direncinde Resveratrol'ün rolünün daha iyi anlaşılması, yumurtalık kanserinin önlenmesi ve tedavisi için yeni bir bakış açısı sunmaktadır.

7. Kaynaklar

- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research*, 24(5A).
- Aghajanian, C. (2004). Clinical update: Novel targets in gynecologic malignancies. *Seminars in Oncology*, 31(SUPPL. 16), 22–26. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2004.10.015>
- Alghamian, Y., Soukkarieh, C., Abbadly, A. Q., & Murad, H. (2022). Investigation of role of CpG methylation in some epithelial mesenchymal transition gene in a chemoresistant ovarian cancer cell line. *Scientific Reports*, 12(1), 7494. <https://doi.org/10.1038/S41598-022-11634-6>
- Altchek, A., Deligdisch, L., & Kase, N. G. (2003). Diagnosis and Management of Ovarian Disorders: Second Edition. İçinde *Diagnosis and Management of Ovarian Disorders: Second Edition*. Elsevier Inc.
- Annunziata, C. M., Stavnes, H. T., Kleinberg, L., Berner, A., Hernandez, L. F., Birrer, M. J., ... Kohn, E. C. (2010). Nuclear factor κ B transcription factors are coexpressed and convey a poor outcome in ovarian cancer. *Cancer*, 116(13), 3276–3284. <https://doi.org/10.1002/cncr.25190>
- Baribeau, S., Chaudhry, P., Parent, S., & Asselin, É. (2014). Resveratrol Inhibits Cisplatin-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cell Lines. *PLOS ONE*, 9(1), e86987. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0086987>
- Beaufort, C. M., Helmijr, J. C. A., Piskorz, A. M., Hoogstraat, M., Ruigrok-Ritstier, K., Besselink, N., ... Helleman, J. (2014). Ovarian Cancer Cell Line Panel (OCCP): Clinical Importance of In Vitro Morphological Subtypes. *PLoS ONE*, 9(9), 103988. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0103988>
- Bhat, K. P. L., Ii, J. W. K., & Pezzuto, J. M. (2001). Biological Effects of Resveratrol. İçinde *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* (C. 3). Mary Ann Liebert, Inc. Tarihinde adresinden erişildi Mary Ann Liebert, Inc website: www.liebertpub.com

- Biason-Lauber. (2010). Control of sex development. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology & İçinde Metabolism* (C. 24).
- Bristow, R. E., & Armstrong, D. K. (2010). *Ovarian cancer*. Saunders/Elsevier.
- Campbell, G. J., Hands, E. L., & Pette, M. Van de. (2020). *The Role of CDKs and CDKIs in Murine Development*.
- Chandra, A., Pius, C., Nabeel, M., Nair, M., Vishwanatha, J. K., Ahmad, S., & Basha, R. (2019). Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. *Cancer Medicine*, 8(16), 7018–7031. <https://doi.org/10.1002/CAM4.2560>
- Chen, W., Liu, X., Yuan, S., & Qiao, T. (2018). HSPA12B overexpression induces cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer by regulating the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *Oncology Letters*, 15(3), 3883–3889. <https://doi.org/10.3892/OL.2018.7800/HTML>
- Cocetta, V., Ragazzi, E., & Montopoli, M. (2020). Links between cancer metabolism and cisplatin resistance. İçinde *International Review of Cell and Molecular Biology* (C. 354, ss. 107–164). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.01.005>
- Da Costa, A. A. B. A., Do Canto, L. M., Larsen, S. J., Ribeiro, A. R. G., Stecca, C. E., Petersen, A. H., ... Rogatto, S. R. (2019). Genomic profiling in ovarian cancer retreated with platinum based chemotherapy presented homologous recombination deficiency and copy number imbalances of CCNE1 and RB1 genes. *BMC Cancer*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5622-4>
- Dall'acqua, A., Sonogo, M., Pellizzari, I., Pellarin, I., Canzonieri, V., D'andrea, S., ... Baldassarre, G. (2017). CDK6 protects epithelial ovarian cancer from platinum-induced death via FOXO3 regulation. *EMBO Mol Med*, 9, 1415–1433. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607012>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364. <https://doi.org/10.1016/J.EJP HAR.2014.07.025>
- Dorai, T., & Aggarwal, B. B. (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Letters*, 215(2), 129–140.

<https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2004.07.013>

Engelke, L. H., Hamacher, A., Proksch, P., & Kassack, M. U. (2016). Ellagic Acid and Resveratrol Prevent the Development of Cisplatin Resistance in the Epithelial Ovarian Cancer Cell Line A2780. *Journal of Cancer*, 7(4), 353. <https://doi.org/10.7150/JCA.13754>

Erickson, G. F., & Chang, R. J. (2007). Basic Biology: Ovarian Anatomy and Physiology. İçinde *Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinical Aspects*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369443-0.50006-5>

Gaikwad, S. M., Thakur, B., Sakpal, A., Singh, R. K., & Ray, P. (2015). Differential activation of NF- κ B signaling is associated with platinum and taxane resistance in MyD88 deficient epithelial ovarian cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 61, 90–102. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2015.02.001>

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., ... Kroemer, G. (2011). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene 2012 31:15*, 31(15), 1869–1883. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>

Gaona-Luviano, P., Adriana, L., Medina-Gaona, & Magaña-Pérez, K. (2020, Ağustos 1). Epidemiology of ovarian cancer. *Chinese Clinical Oncology*, C. 9. AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/cco-20-34>

Gonzalez-Torres, C., Gaytan-Cervantes, J., Vazquez-Santillan, K., Mandujano-Tinoco, E. A., Ceballos-Cancino, G., Garcia-Venzor, A., ... Maldonado, V. (2017). NF- κ B Participates in the Stem Cell Phenotype of Ovarian Cancer Cells. *Archives of Medical Research*, 48(4), 343–351. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2017.08.001>

Graziottin, A., & Gambini, D. (2015). Anatomy and physiology of genital organs - women. İçinde *Handbook of Clinical Neurology* (C. 130, ss. 39–60). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63247-0.00004-3>

Gupta, S. C., Kim, J. H., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer metastasis reviews*, 29(3), 405. <https://doi.org/10.1007/S10555-010-9235-2>

- Gwak, H. R., Kim, S., Dhanasekaran, D. N., & Song, Y. S. (2016). Resveratrol triggers ER stress-mediated apoptosis by disrupting N-linked glycosylation of proteins in ovarian cancer cells. *Cancer Letters*, 371(2), 347–353. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2015.11.032>
- Harrington, B. S., & Annunziata, C. M. (2019). *NF- κ B Signaling in Ovarian Cancer*. <https://doi.org/10.3390/cancers11081182>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). *Signaling to NF- κ B*. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704>
- Hazafa, A., Iqbal, M. O., Javaid, U., Tareen, M. B. K., Amna, D., Ramzan, A., ... Naeem, M. (2022). Inhibitory effect of polyphenols (phenolic acids, lignans, and stilbenes) on cancer by regulating signal transduction pathways: a review. *Clinical and Translational Oncology*, 24(3), 432–445. <https://doi.org/10.1007/S12094-021-02709-3/TABLES/4>
- Helleman, J., Burger, K., Hamelers, I. H. L., Boersma, A. W. M., De Kroon, A. I. P. M., Stoter, G., & Nooter, K. (2006). *Impaired cisplatin influx in an A2780 mutant cell line: Evidence for a putative, cis-configuration-specific, platinum influx transporter*. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.8.2876>
- Ho, W. C., Dickson, K. M., & Barker, P. A. (2005). Nuclear Factor- κ B Induced by Doxorubicin Is Deficient in Phosphorylation and Acetylation and Represses Nuclear Factor- κ B–Dependent Transcription in Cancer Cells. *Cancer Research*, 65(10), 4273–4281. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3494>
- Hobeika, E., Armouti, M., Kala, H. S., & Stocco, C. (2019). Ovarian Hormones. *Çinde Hormonal Signaling in Biology and Medicine: Comprehensive Modern Endocrinology* (ss. 565–583). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813814-4.00025-0>
- Hu, S., Li, X., Xu, R., Ye, L., Kong, H., Zeng, X., ... Xie, W. (2016). The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(6), 528–535. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw026>
- Javadi, S., Ganeshan, D. M., Qayyum, A., Iyer, R. B., & Bhosale, P. (2016). *Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging*. Tarihinde

adresinden erişildi <https://www.ajronline.org/doi/10.2214/AJR.15.15199>

- Jiang, Z., Chen, K., Cheng, L., Yan, B., Qian, W., Cao, J., ... Yang, W. (2017). Resveratrol and cancer treatment: Updates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1403(1), 59–69. <https://doi.org/10.1111/NYAS.13466>
- Karthikeyan, S., Hoti, S. L., & Prasad, N. R. (2015). Resveratrol loaded gelatin nanoparticles synergistically inhibits cell cycle progression and constitutive NF-kappaB activation, and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 70(C), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.02.006>
- KHAZAEI, Z., NAMAYANDEH, S. M., BEIRANVAND, R., NAEMI, H., BECHASHK, S. M., & GOODARZI, E. (2021). Worldwide incidence and mortality of ovarian cancer and Human Development Index (HDI): GLOBOCAN sources and methods 2018. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 62(1), E174. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/JPMH2021.62.1.1606>
- Khuda-Bukhsh, A. R., Das, S., & Saha, S. K. (2014). Molecular Approaches Toward Targeted Cancer Prevention with Some Food Plants and Their Products: Inflammatory and Other Signal Pathways. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2014.864420>, 66(2), 194–205. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.864420>
- Kim, H., Xu, H., George, E., Hallberg, D., Kumar, S., Jagannathan, V., ... Simpkins, F. (2020). Combining PARP with ATR inhibition overcomes PARP inhibitor and platinum resistance in ovarian cancer models. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17127-2>
- Koshiyama, M., Matsumura, N., & Konishi, I. (2014). Recent concepts of ovarian carcinogenesis: Type i and type II. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/934261>
- Koshiyama, M., Matsumura, N., & Konishi, I. (2017). Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics 2017, Vol. 7, Page 12*, 7(1), 12. <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS7010012>
- Kundu, J. K., & Surh, Y. J. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic

- potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer letters*, 269(2), 243–261. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.057>
- Kurman, R. J., Hedrick, L., Brigitte, E., & Ronnett, M. (2011). *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*.
- Kurman, R. J., & Shih, I. M. (2016). The dualistic model of ovarian carcinogenesis revisited, revised, and expanded. *American Journal of Pathology*, 186(4), 733–747. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.011>
- Lang, F., Qin, Z., Li, F., Zhang, H., Fang, Z., & Hao, E. (2015). Apoptotic Cell Death Induced by Resveratrol Is Partially Mediated by the Autophagy Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0129196>
- Liu, G. H., Wang, S. R., Wang, B., & Kong, B. H. (2006). Inhibition of nuclear factor- κ B by an antioxidant enhances paclitaxel sensitivity in ovarian carcinoma cell line. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 16(5), 1777–1782. <https://doi.org/10.1136/IJGC-00009577-200609000-00009>
- Liu, Y., Tong, L., Luo, Y., Li, X., Chen, G., & Wang, Y. (2018). Resveratrol inhibits the proliferation and induces the apoptosis in ovarian cancer cells via inhibiting glycolysis and targeting AMPK/mTOR signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(7), 6162–6172. <https://doi.org/10.1002/JCB.26822>
- Loren, P., Saavedra, N., Saavedra, K., Torso, N. D. G., Visacri, M. B., Moriel, P., & Salazar, L. A. (2022). Contribution of MicroRNAs in Chemoresistance to Cisplatin in the Top Five Deadliest Cancer: An Updated Review. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.831099>
- Luvero, D., Milani, A., & Ledermann, J. A. (2014). Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential. *Therapeutic advances in medical oncology*, 6(5), 229–239. <https://doi.org/10.1177/1758834014544121>
- Mai, J., Yang, L., Xie, H. J., Li, Y. Y., Wang, X., & Liu, X. X. (2022). Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Oncology Reports*, 47(4). <https://doi.org/10.3892/OR.2022.8293>
- Makovec, T., & Makovec, T. (2019). Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Slovenia |*

www.radioloncol.com Radiol Oncol, 53(2), 148–158.
<https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>

McCluggage, W. G. (2011). Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology, 43(5)*, 420–432. <https://doi.org/10.1097/PAT.0B013E328348A6E7>

Mohan Shankar, G., Swetha, M., Keerthana, C. K., Rayginia, T. P., & Anto, R. J. (2021). Cancer Chemoprevention: A Strategic Approach Using Phytochemicals. *Frontiers in Pharmacology, 12*, 809308. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.809308>

Monisha, J., Padmavathi, G., Kishor Roy, N., Deka, A., Bordoloi, D., Anip, A., & B. Kunnumakkara, A. (2016). NF- κ B Blockers Gifted by Mother Nature: Prospectives in Cancer Cell Chemosensitization. *Current Pharmaceutical Design, 22(27)*, 4173–4200. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160609110231>

Muhanmode, Y., Ke Wen, M., Maitinuri, A., & Shen, G. (2019). Curcumin and resveratrol inhibit chemoresistance in cisplatin-resistant epithelial ovarian cancer cells via targeting P13K pathway. *Human and Experimental Toxicology, 41(1)*, 861–868. <https://doi.org/10.1177/09603271221095928>

Nakanishi, C., & Toi, M. (2005). Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer 2005 5:4, 5(4)*, 297–309. <https://doi.org/10.1038/nrc1588>

Naugler, W. E., & Karin, M. (2008). NF- κ B and cancer — identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development, 18(1)*, 19–26. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2008.01.020>

Nessa, M. U., Beale, P., Chan, C., Yu, J. Q., & Huq, F. (2012). Combinations of resveratrol, cisplatin and oxaliplatin applied to human ovarian cancer cells. *Anticancer Research, 32(1)*, 53–59.

Niedzwiecki, A., Roomi, M. W., Kalinovsky, T., & Rath, M. (2016). Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients, 8(9)*. <https://doi.org/10.3390/NU8090552>

Opipari, A. W., Tan, L., Boitano, A. E., Sorenson, D. R., Aurora, A., & Liu, J. R.

- (2004). Resveratrol-induced Autophagocytosis in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research*, 64(2), 696–703. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2404>
- Perez, R. P., Hamilton, T. C., Ozols, R. F., & Young, R. C. (1993). Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer*, 71(S4), 1571–1580. <https://doi.org/10.1002/CNCR.2820710424>
- Prat, J. (2014). *Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum* ☆. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2013.10.001>
- Rauf, A., Imran, M., Butt, M. S., Nadeem, M., Peters, D. G., & Mubarak, M. S. (2018). Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(9), 1428–1447. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1263597>
- Rezaei-Tazangi, F., Roghani-Shahraki, H., Ghaffari, M. K., Zadeh, F. A., Boostan, A., Arefnezhad, R., & Motedayyen, H. (2021). The Therapeutic Potential of Common Herbal and Nano-Based Herbal Formulations against Ovarian Cancer: New Insight into the Current Evidence. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/PH14121315>
- Said, R. S., Mantawy, E. M., & El-Demerdash, E. (2019). Mechanistic perspective of protective effects of resveratrol against cisplatin-induced ovarian injury in rats: emphasis on anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(10), 1225–1238. <https://doi.org/10.1007/S00210-019-01662-X/FIGURES/5>
- Schmid, B. C., & Oehler, M. K. (2014). New perspectives in ovarian cancer treatment. *Maturitas*, 77(2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/J.MATURITAS.2013.11.009>
- Shen, H. M., & Tergaonkar, V. (2009). NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 14(4), 348–363. <https://doi.org/10.1007/S10495-009-0315-0>
- Shih, I.-M., & Kurman, R. J. (2004). Review Ovarian Tumorigenesis A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis. *Içinde American Journal of Pathology (C. 164)*.

- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003 22:47, 22(47), 7265–7279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63(1), 12–31. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2007.02.001>
- 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: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Tapia, G., & Diaz-Padilla, I. (2013). Molecular Mechanisms of Platinum Resistance in Ovarian Cancer. *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update*. <https://doi.org/10.5772/55562>
- Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., & Kumar, S. (2021). Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*, 13, 303. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267383>
- Tino, A. B., Chitcholtan, K., Sykes, P. H., & Garrill, A. (2016). Resveratrol and acetyl-resveratrol modulate activity of VEGF and IL-8 in ovarian cancer cell aggregates via attenuation of the NF- κ B protein. *Journal of Ovarian Research*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13048-016-0293-0/FIGURES/8>
- Van Waes, C. (2007). Nuclear Factor- κ B in Development, Prevention, and Therapy of Cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(4), 1076–1082. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2221>
- Vang, R., Shih, I.-M., & Kurman, R. J. (2009). *OVARIAN LOW-GRADE AND HIGH-GRADE SEROUS CARCINOMA: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems*.

<https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa>

- Varoni, E. M., Lo Faro, A. F., Sharifi-Rad, J., & Iriti, M. (2016). Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. *Frontiers in Nutrition*, 3, 8. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2016.00008/BIBTEX>
- Webb, P. M., Leader, G., Cancers Group, G., & Jordan, S. J. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 41, 3–14. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2016.08.006>
- White, K. L., Rider, D. N., Kalli, K. R., Knutson, K. L., Jarvik, G. P., & Goode, E. L. (2011). Genomics of the NF- κ B signaling pathway: hypothesized role in ovarian cancer. *Cancer causes & control: CCC*, 22(5), 785–801. <https://doi.org/10.1007/S10552-011-9745-4>
- Xu, X.-L., Deng, S.-L., Lian, Z.-X., & Yu, K. (2021). *Resveratrol Targets a Variety of Oncogenic and Oncosuppressive Signaling for Ovarian Cancer Prevention and Treatment*. <https://doi.org/10.3390/antiox10111718>
- Yamamoto Y., & Gaynor R. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. İçinde *The Journal of Clinical Investigation* (C. 107).
- Yan, Y. B., Tian, Q., Zhang, J. F., & Xiang, Y. (2020). Antitumor effects and molecular mechanisms of action of natural products in ovarian cancer. *Oncology Letters*, 20(5). <https://doi.org/10.3892/OL.2020.12001>
- Yang, G., Xiao, X., Rosen, D. G., Cheng, X., Wu, X., Chang, B., ... Liu, J. (2011). The biphasic role of NF-kappaB in progression and chemoresistance of ovarian cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(8), 2181–2194. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3265>
- Zinatizadeh, M. R., Schock, B., Chalbatani, G. M., Zarandi, P. K., Jalali, S. A., & Miri, S. R. (2020). The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes & diseases*, 8(3), 287–297. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2020.06.005>

8. Ekler

Araştırmamız in vitro hücre kültürü çalışmalarını içerdiğinden ‘‘Etik Kurul Onay Belgesi’’, ‘‘Gönüllü Onam Formu’’ ve ‘‘Olgu Rapor Formu’’ gerektirmemektedir.



9. Teşekkür

Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi, tecrübe ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam ve danışmanım **Sn. Doç.Dr. Zuhale EROĞLU** ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sn. Prof. Cumhuri GÜNDÜZ**'e minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Kapılarını çaldığımda, herhangi bir konuda fikirlerini almak istediğimde her zaman destekleyici ve güler yüzlü davranan değerli öğretim üyelerimiz, **Sn Doç.Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'a**, **Doç.Dr. Buket KOSOVA'ya**, **Doç.Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya**, **Doç.Dr. Nur Selvi GÜNEL'e**, **Doç.Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ'a**, **Doç.Dr. Aslı Tetik VARDARLI'ya** ve **Doç.Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER'e**,

Yeri geldiğinde bir dost, yeri geldiğinde bir öğretmen olan çalışmalarını hayranlıkla seyrettiğim bilgi ve birikimlerini paylaşmaktan geri durmayan, **Doktora öğrencisi Sn Eda DOĞAN'a**, lisans eğitiminden sonra peşlerini bırakmadığım **Doktora öğrencisi Zafer YILDIRIM'a** ve **Doktora öğrencisi İlayda ALÇİTEPE'ye**, çalışmaktan, fikir paylaşımı yapmaktan, gülmeye eğlenmekten her zaman keyif aldığım canım ekip arkadaşım **Doktora öğrencisi Büşra BARA'ya** ve **Doktora öğrencisi Semahat ÇELİKTEN'e**,

Bazen sert eleştirilerle bazen takdir ederek yürüdüğümüz yolda desteğini ve güzel enerjisini hep yanımda hissettiğim, bir ortak müzik çalma listesi ile bütün deneylerimizi güle ağlaya yaptığımız, geceli gündüzlü çalıştığımız yan masa arkadaşım **Yüksek Lisans öğrencisi Sn Sevim AYDEMİR'e**, kahve aralarımızda baktığı fallarla hayata karşı umudumu yeşerten **Yüksek Lisans öğrencisi Yasemen KARAN'a** ve aynı odada bulunmaktan zevk aldığım **Yüksek Lisans öğrencisi oda arkadaşlarım'a**,

Neşesiyle ve enerjisiyle benim ruh halimi anında değiştirebilen, başka bölümde olmasına rağmen hep yanımda olan, kendisinde olmasa bile etrafına motivasyon dağıtan **Sn Burak Çakar'a**,

Kilometrelerce uzakta olsak da derdimi kendine dert edinen, güldüğümde gülen, başardığımda gurur duyan, düştüğümde el uzatan, kalktığımda benimle birlikte nereye olduğunu sorgulamadan yürüyen yol arkadaşım, canım dostum **Sn Yağmur GÜLTEKİN'e**,

Hayatım boyunca aldığım bütün kararlarda yanımda olan beni maddi ve manevi anlamda destekleyen, eğitimim söz konusu olduğunda elini taşın altına koymaktan geri durmayan,

desteklerini ve sevgilerini her daim hissettiğim canım **Ailem'e** ve varlığıyla bana huzur veren canım masa arkadaşım **sevgili kedim Dost'a**,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Son olarak TYL-2021-23326 kodlu BAP projesinin gerçekleşmesini maddi olarak destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir, 12.09.2022

Buse FINDIKLI



10. Özgeçmiş

2015 yılında başlamış olduğum Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik lisans eğitimimi 2019 yılında mezun olarak tamamladım. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Kanser Moleküler Biyolojisi laboratuvarında 2018 yılında stajımı yaptım. 2019 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

