

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROL VE OLAPARİB KOMBİNASYONUNUN
PARENTAL VE OLAPARİB-DİRENÇLİ MCF-7 MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDEKİ ANTI-NEOPLASTİK POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESRA POLAT ELALDI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi MEHMET KADİR ERDOĞAN

BİNGÖL-2023

**RESVERATROL VE OLAPARİB KOMBİNASYONUNUN PARENTAL VE
OLAPARİB-DİRENÇLİ MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ
ANTİ-NEOPLASTİK POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN danışmanlığında, Esra POLAT ELALDI tarafından hazırlanan bu çalışma/...../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Abdullah ASLAN *İmza* :
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN *İmza* :
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK 1002 projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 120S774

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilgi birikimi ve deneyimiyle bana yol gösteren, çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan, destek ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Motive edici rehberliğiyle desteğini her zaman hissettiren, laboratuvar çalışmalarında bilgi birikimi ve deneyimlerini benimle paylaşan hocam Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamda proje desteklerinden ötürü TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında destek ve katkılarından ötürü Yusuf TOY ve Aydın SEVER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince hayatımın her alanında olduğu gibi bana destek olan, ışıklarıyla yolumu aydınlatan annem Ayten POLAT ve babam Abdullah POLAT'a, canım kardeşlerim Semra ve Serhat'a teşekkür ederim. Bu süreçte her zaman yanımda olan kıymetli eşim Mesut ELALDI'ya ve bana motivasyon kaynağı olan biricik kızım Defne'ye sonsuz teşekkürler.

Esra POLAT ELALDI

Bingöl 2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Hücre Kültürü.....	15
3.2.2. Olaparib Dirençli MCF-7 Hücrelerinin Oluşturulması.....	16
3.2.3. Hücre Canlılığı Deneyi.....	16
3.2.4. İzobologram Analizi ile Sinerjizmin Belirlenmesi.....	17
3.2.5. Koloni Oluşum Deneyi.....	17
3.2.6. 3D Soft Agar Analizi.....	18
3.2.7. Western Blot ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi....	18
3.2.8. İstatistiksel Analizler.....	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	20
4.1. Sitotoksisite Bulguları.....	20
4.2. Kombinasyon İndeksi ve Sinerjizmin Belirlenmesi.....	22

4.3. Koloni Sağ Kalımı Bulguları.....	25
4.4. Soft Agar Bulguları.....	27
4.5. Protein İfade Düzeylerine Ait Bulgular.....	29
4.6. PARP1/2 İnhibitörü Olaparibe Karşı Dirençli Meme Kanseri Hücrelerinin Koloni Sağ Kalım Bulguları.....	31
4.7. Resveratrol ve Olaparib ile Kombine Tedavi Edilen Olaparib-Dirençli Meme Kanseri Hücrelerinde (MCF7/PIR) Hücre Canlılığı, Koloni Sağ-kalımı ve 3D Tümör Oluşum Bulguları.....	32
4.8. Resveratrol ve Olaparib ile Kombine Tedavi Edilen Olaparib-Dirençli Meme Kanseri Hücrelerinde MCF7/PIR) Hücre Döngüsü, DNA Hasar/Tamiri Ve Apoptosis Proteinlerinin İfade Düzeylerine Ait Bulgular.....	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
6. KAYNAKLAR LİSTESİ.....	42
7. ÖZGEÇMİŞ.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

α	: Alfa
HR	: Homolog rekombinasyon
Bcl-2	: B hücreli lenfoma-2
Bax	: Bcl-2 ilişkili x proteini
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
Rad51	: DNA onarım proteini
BRCA1/2	: Meme kanseri duyarlılık genleri
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
cPARP	: Cleaved Poli (ADP-riboz) polimeraz
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DPBS	: Dulbecco'nun fosfat tamponlu tuz çözeltisi
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
DDR	: DNA hasar yanıtı
FBS	: Fetal bovin serum
CO ₂	: Karbondioksit
kDa	: Kilo dalton
μ L	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
KCl	: Potasyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
HCl	: Hidroklorik asit
NaF	: Sodyum florür
Na ₃ VO ₄	: Sodyum orthovanadate
NaN ₃	: Sodyum azit
H ₃ PO ₄	: Fosforik asit

PMSF	: Fenil metil sülfonil florür
DTT	: Dithiothreitol
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGTA	: Etilenglisoltetraasetik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
NaOH	: Sodyum hidroksit
PVDF	: Poliviniliden diflorid
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi
TBS-T	: tris tamponlu salin ve Tween 20 karışımı
ECL	: Hassas kemilüminesans görüntüleme
OLAP	: Olaparib
RES	: Resveratrol
°C	: Santigrat derece
p21	: Sikline bağlı kinaz inhibitörü 1
p53	: Tümör protein 53
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Meme kanseri oluşumu ile ilgili genler.....	5
Şekil 2.2.	PARP inhibitörlerinin etki mekanizması	9
Şekil 2.3.	PARP inhibitörlerinin kimyasal formülleri.....	10
Şekil 2.4.	Resveratrolün yapısal formülü.....	13
Şekil 4.1.	Resveratrol ile 24,48,72 ve 96 saat tedavi edilen parental MCF-7 hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafiği.....	21
Şekil 4.2.	Olaparib ile 24,48,72 ve 96 saat tedavi edilen parental MCF-7 hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafiği.....	21
Şekil 4.3.	Olaparib ve resveratrol kombinasyon tedavisine bağlı MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılık grafiği.....	24
Şekil 4.4.	Resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisine bağlı MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılık grafiği.....	24
Şekil 4.5.	Resveratrol ve olaparib mono- ve kombo- tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni sağ kalımı sonuçları.....	26
Şekil 4.6.	Resveratrol ve olaparib kombine tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni sağ kalımı deneyi sonuçları.....	27
Şekil 4.7.	Resveratrol ve olaparib ile kombine tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 3D tümör oluşturma kapasitesi.....	28
Şekil 4.8.	Resveratrol ve olaparib kombine tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü, DNA hasar/tamir ve apoptosis proteinlerinin ifade düzeyleri.....	30
Şekil 4.9.	PARP1/2 inhibitörü olan olaparibe karşı dirençli MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni sağ kalımı deneyi sonuçları.....	32
Şekil 4.10.	Resveratrol ve olaparib kombine tedavi edilen Olaparib-dirençli MCF7 meme kanseri hücrelerinin (MCF7/PIR) koloni sağ kalımı deneyi sonuçları.....	34
Şekil 4.11.	Resveratrol ve olaparib ile kombine tedavi edilen Olaparib-dirençli meme kanseri hücrelerinin 3D tümör oluşturma kapasitesi.....	35

Şekil 4.12. Resveratrol ve olaparib ile kombine tedavi edilen Olaparib-dirençli MCF7 meme kanseri hücrelerinde (MCF7/PIR) hücre döngüsü, DNA hasar/tamir ve apoptosis proteinlerinin ifade düzeyleri..... 37



TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.	Kombine olarak olaparibin IC25 dozu ve farklı konsantrasyonlarda resveratrol ile 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle tedavi edilen MCF7 meme kanseri hücrelerinin tedavi protokolü.....	23
Tablo 4.2.	Kombine olarak resveratrolün IC25 dozu ve farklı konsantrasyonlarda olaparib ile 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle tedavi edilen MCF7 meme kanseri hücrelerinin tedavi protokolü.....	23



RESVERATROL VE OLAPARİB KOMBİNASYONUNUN PARENTAL VE OLAPARİB-DİRENÇLİ MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ ANTI-NEOPLASTİK POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Kanser, Dünya genelinde yaygın olarak görülen ciddi bir hastalıktır ve ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelmektedir. Kanser tedavisinde radyoterapi, kemoterapi gibi klasik yöntemler kullanılsa da hedef dışı etkileri, edinilmiş ilaç direnci gibi etmenler nedeniyle tümör yayılımını önlemede genellikle etkili değildir. Mevcut tedavi yaklaşımlarına karşı gelişen ilaç direnci nedeniyle yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışılmaktadır. İlaç direncinin üstesinden gelmek için yaygın olarak kullanılan yöntem; bir ilacı başka bir ilaçla birleştirilerek yani kombine tedavi yaparak etkisini arttırmaktır. Bu bağlamda kemoterapötik ajanların çok hedefli doğal bileşikler olan fitokimyasallarla kombinasyonu ilaç direncine karşı etkili olabilmektedir. Bitki temelli bileşenler toksik olmadıkları, antimutajen ve antikanser özellik gösterebildiği ve hücre farklılaşmasını inhibe ederek kanser ilerlemesini kontrol altına alabildiği için kanser tedavisinde önemli bir yere sahiptir.

Bu çalışmada, resveratrol ile tedavi edilen meme kanseri hücrelerinde PARP1/2 inhibitör sitotoksitesinin artabileceğini test etmek ve PARP1/2 inhibitörlerinin meme kanserindeki anti-tümör yanıtında, HR regülatörü olan RAD51 gen ekspresyonu üzerinde etkisi olan resveratrolün rolünün araştırıldığı *in vitro* ön çalışmalar gerçekleştirildi. Parental ve olaparib dirençli MCF7 insan meme kanseri hücreleri artan konsantrasyonlarda olaparib ve resveratrol ile tedavi edildi ve sitotoksik etki WST-1 hücre canlılığı analizi ile ölçüldü. IC50 dozları belirlenen olaparib ve resveratrolün sinerjistik etkisi belirlendi. Koloni sağkalımı deneyi ile resveratrol ve olaparib kombinasyonunun parental ve olaparib dirençli MCF7 hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini baskılayıcı etkisi gösterildi. Soft Agar deneyi ile olaparib ve resveratrol ile mono- ve kombo- tedavi edilen parental ve olaparib dirençli MCF7 hücrelerinin tümör oluşturma kapasiteleri incelendi. Western Blot tekniği ile olaparib ve resveratrol ile mono- ve kombo- tedavi edilen MCF7 hücrelerinde hücre döngüsü, DNA hasarı ve apoptotik proteinlerin ifade düzeyleri analiz edildi.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, resveratrolün olaparib ile kombine halde kullanımının mekanistik rolünün tam olarak aydınlatılmasının ve fonksiyonel işlevinin *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmasının klinikte PARP inhibitör tedavisine karşı hasta stratifikasyonunda önem arz edeceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Olaparib, resveratrol, MCF-7, BRCA1/2, kanser, DNA hasarı, apoptoz.

INVESTIGATION OF ANTI-NEOPLASTIC POTENTIAL OF RESVERATROL AND OLAPARIB IN PARENTAL AND OLAPARIB-RESISTANT MCF-7 BREAST CANCER CELLS

ABSTRACT

Cancer is a serious disease that is common in the world and is among the causes of death after cardiovascular diseases. Although classical methods such as radiotherapy and chemotherapy are used in cancer treatment, they are generally not effective in preventing tumor spread due to factors such as off-target effects and acquired drug resistance. New treatment approaches are being tried to be developed due to drug resistance against existing treatment approaches. Commonly used method to overcome drug resistance; In this context, the combination of chemotherapeutic agents with phytochemicals, which are multi-targeted natural compounds, can be effective against drug resistance. Plant-based components have an important place in cancer treatment because they are non-toxic, can show antimutagen and anticancer properties, and can control cancer progression by inhibiting cell differentiation.

In this study, *in vitro* preliminary studies were carried out to test that PARP1/2 inhibitor cytotoxicity may increase in breast cancer cells treated with resveratrol and to investigate the role of resveratrol, which has an effect on the HR regulator RAD51 gene expression, in the anti-tumor response of PARP1/2 inhibitors in breast cancer. . Parental and olaparib-resistant MCF-7 human breast cancer cells were treated with increasing concentrations of olaparib and resveratrol, and the cytotoxic effect was measured by WST-1 cell viability assay. The synergistic effect of olaparib and resveratrol, whose IC₅₀ doses were determined, was determined. The colony survival assay demonstrated the suppressive effect of resveratrol and olaparib combination on the colony forming capacity of parental and olaparib resistant MCF-7 cells. Tumor-forming capacities of parental and olaparib-resistant MCF-7 cells mono- and combo-treated with olaparib and resveratrol were investigated with the Soft Agar assay. Cell cycle, DNA damage and expression levels of apoptotic proteins were analyzed in MCF-7 cells mono- and combo-treated with olaparib and resveratrol by Western Blot technique.

The findings from this study showed that the full elucidation of the mechanistic role of resveratrol in combination with olaparib and the demonstration of its functional function by *in vivo* studies will be important in clinical patient stratification against PARP inhibitor therapy.

Keywords: Olaparib, resveratrol, MCF-7, BRCA1/2, cancer, DNA damage, apoptosis.

1. GİRİŞ

Kanser kavramı; Latince "cancer" ve Yunanca "carcinoma" sözcüklerinden gelen ve kontrol edilemeyen anormal hücre çoğalması veya fizyolojik koordinasyonunu kaybetmiş hücrelerin sorumsuz çoğalması şeklinde tanımlanabilir (Bayık et al., 1989). Kanser; insan vücudundaki organlarının çoğunda görülebilen, normal doku sınırlarını aşarak uzak organlara metastaz yapabilen hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize edilen çeşitli epidemiyolojiye sahip 100'den fazla hastalığı kapsar (Stratton et al., 2009).

Kanser dünya çapında ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Küresel demografik özellikler, önümüzdeki yıllarda kansere yakalanma olasılığının artacağını öngörmektedir (Zugazagoitia et al., 2016). Kanser oluşumu, ilerlemesi, yayılması ve ilaç direncinin ortaya çıkışı biriken mutasyonlardan kaynaklanır (Dancey et al., 2012).

Kanserin tedavisinde radyoterapi, kemoterapi, cerrahi, immünoterapi, hormon terapisi, hedefe yönelik terapiler ve gen terapisi gibi yöntemler kullanılır (Fitzmaurice et al., 2015). Bu yöntemlerin kullanılmasına rağmen tedavilerde yanıt alınamamasının ana nedenlerinden biri, kanser hücrelerinin ilaç direnci geliştirmesidir (Komarova, 2006). Mevcut tedavi yaklaşımlarına karşı gelişen ilaç direnci nedeniyle yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışılmaktadır (Sert ve Küçükılınç, 2022). Bu bağlamda fitokimyasalların kanser tedavisindeki yararlı etkilerini araştıran bilimsel araştırmaların sayısı hızla artmaktadır. Fitokimyasallar ve diğer bitkisel kaynaklı besin bileşenleri; dünya genelinde önde gelen dört ölüm nedeni olan kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon gibi hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde etkili bulunmuştur (Abby Bloch, 1995).

Fitokimyasallar, önemli antikanserojen ve antimutajen özelliklere sahip bitki bazlı bileşenlerdir. Bitkilerin kanser tedavisinde uzun bir geçmişi vardır ve şu anda kullanılan antikanser ajanların %60'ından fazlası doğal kaynaklıdır. Kansere karşı koruyucu olan fitokimyasalların çoğunun aktif bileşenleri, kurkumin (zerdeçal), genistein (soya fasulyesi), resveratrol (kırmızı üzüm), allisin (sarımsak), likopen (domates)'dir (Khuda-

Bukhsh et al., 2014). Kimyasal olarak 3,5,4'-trihidroksistilben olarak bilinen resveratrol; üzüm, çilek, yer fıstığı ve kırmızı şarapta bulunan doğal olarak oluşan bir polifenolik antioksidan bileşiktir (Bai et al., 2010). Birçok dokuda antikanser etkisi görülen resveratrolün, tüm etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması beklemektedir. Resveratrol, hücre farklılaşmasını inhibe ederek kanserin ilerlemesini kontrol altına alabildiği tespit edilmiştir (Karabekir et al., 2017).

Rad51, DNA çift iplik kırıklarının HR onarımında görev alan bir rekombinazdır ve farklı kanser hücresi tiplerinde Rad51'in aşırı ekspresyonu görülmüştür (Richardson, 2005). Yapılan bir çalışmada MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Rad51, BRCA1 ve BRCA2 gibi HR ile DNA onarımında yer alan bazı genlerin ekspresyonunun resveratrol tarafından aşağı regüle edildiği gözlemlenmiştir (Leon-Galicia et al., 2013).

Meme kanseri de dünyada en sık rastlanan ikinci kanser türüdür. Kadınlarda ise en sık rastlanan kanser türüdür (Sung et al., 2021). Dünyada yaşamı boyunca her 8-9 kadından birisi meme kanserine yakalanmaktadır. Sık görülmesi, erken evrelerde tedavi edilebilir olması, erken evrelerde günümüz koşullarında tanınmasının olanaklı olması meme kanserinin önemini artırmaktadır (Aydıntuğ, 2004). Metastatik bir kanser olan meme kanseri genellikle kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi organlara yayılabilir, bu da esas olarak tedaviyi zorlaştırır. Hastalığın erken teşhisi, iyi bir prognozu ve yüksek bir sağkalımı sağlayabilir (DeSantis et al., 2016).

Meme kanseri oluşumunda birçok tümör baskılayıcı gen, onkogen ve DNA tamir genleri rol oynamaktadır. Tümör baskılayıcı genlerden BRCA-1-2'de meydana gelen mutasyonların meme kanserine yol açtığı bilinmektedir (Akkuzu et al., 2019). BRCA1 ve BRCA2 eksikliği olan kanser hücreleri, sentetik öldürücülük mekanizması yoluyla Poli ADP Riboz Polimeraz (PARP1) inhibitörlerine daha duyarlıdır (D'Andrea, 2018). Bugüne kadar 18 tane PARP üyesi enzim tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlisi PARP-1 izoformudur. PARP, ökaryot hücrelerde bol miktarda bulunan ve DNA hasarında aktifleşen bir enzimdir. PARP-1 tek zincir DNA kırıklarını, baz eksizyon tamir mekanizmasıyla onarır. PARP-1 inhibisyonu, radyasyonun ve kemoterapötik ajanların etkilerini artırır (Tok ve KocyigitKaymakcioglu, 2015).

Olaparib, katı tümörlerin tedavisi için geliştirilen oral, küçük molekülü, PARP inhibitörüdür. Olaparib tek başına veya kemoterapötik ajanlar veya radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanıldığında anti-tümör aktivitesi göstermiştir (Deeks, 2015). Olaparib, tekrarlayan platine duyarlı BRCA mutasyonlu ilerlemiş yumurtalık kanseri ve BRCA1/2 mutasyonlu metastatik meme kanserinin tedavisi için FDA onayı alan ilk ilaçtır. Ancak BRCA1/2 germ hattı mutasyonları, tüm meme kanseri vakalarının yalnızca yaklaşık %5'inde görülür. BRCA vahşi tip, HR-yeterli meme kanserini tedavi etmek için konusunda çalışma eksikliği vardır. Bu nedenle, PARP inhibitörlerinin şu anda bu meme kanseri vakalarında diğer kemoterapötik ilaçlarla kombine etkisi araştırılmaktadır (Sinha, 2022).

Çalışmamızın amacına yönelik olarak resveratrol ile tedavi edilen meme kanseri hücrelerinde PARP1/2 inhibitör sitotoksitesinin artabileceğinin test edildiği ve PARP1/2 inhibitörlerinin meme kanserindeki anti-tümör yanıtında, HR regülatörü olan RAD51 gen ekspresyonu üzerinde etkisi olan resveratrolün rolünün detaylı araştırıldığı *in vitro* çalışmalar gerçekleştirildi. Çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulgular resveratrolün PARP1/2 inhibitör tedavisi üzerinde etkisinin uzun vadede klinikteki meme kanseri hastalarına daha iyi tedavi seçenekleri sunabileceğini ortaya koymaktadır.

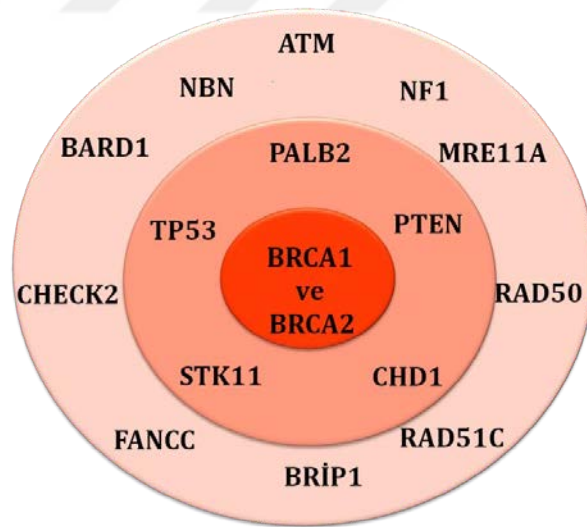
2. KAYNAK ÖZETLERİ

DNA'nın mutajenlere maruz kalması sonucu DNA dizilerinde meydana gelen anormalliklerden kaynaklanan ve aynı zamanda kalıtsal olarak da aktarılabilen kanser, farklılaşmış hücrelerin çoğalarak klonal yayılım göstermesidir (Futreal et al., 2001). Kanser oluşumunda büyüme uyarıcı genler ekstra işlev kazanıp daha fazla eksprese olurken tümör süpresör genler normal işlevlerini kaybeder (Auyang, 2006). Dünya genelinde kanser, ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alır. Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi klasik yöntemler kullanılsa da bu yöntemler tümörlerin metastatik yayılımını önlemede genellikle etkili değildir (Schuster et al., 2006). Kanserli hücreler başlangıçta kemoterapiye duyarlı olsa da, zamanla DNA mutasyonları ve ilaç inhibisyonunu destekleyen metabolik değişiklikler gibi mekanizmalar yoluyla direnç geliştirebilirler (Housman et al., 2014).

Türkiye kanser insidansı diğer ülkelerle karşılaştırıldığında ülkemizde kanser gelişiminin daha düşük bir hızda seyrettiği görülmektedir. Erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri; kadınlarda ise meme kanseri en fazla görülen kanser türleridir (M. Gültekin ve Boztaş, 2014). Dünya çapında kanser insidansının giderek artacağı ve 2030 yılına kadar her yıl 26 milyon yeni kanser vakasının ortaya çıkacağı öngörülmektedir (Boyle and Levin, 2008). Nüfus artışı, obezite, tütün ürünlerinin kullanımı, yaşlılık ve gelişmişlikle ilişkili olarak üreme modellerinin değişmesi gibi etmenler sonucunda kanser oluşumu giderek artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde kanser insidans oranları gelişmekte olan ülkelere göre iki kat daha fazladır ancak kansere bağlı ölüm oranları ise yalnızca %8-15 daha fazladır (Torre et al., 2015)

Dünya genelindeki kanser vakalarının yaklaşık %11,7' sini meme kanseri oluşturur. Kadınlarda her 4 kanser vakasından 1'ini meme kanseri oluşturur (Sung et al., 2021). Meme kanseri yaygın olarak görülen bir hastalık olmakla beraber insidansı giderek artmaktadır. Yapılan araştırmalara göre %18,4 oran ile meme kanseri vakalarının en fazla olduğu ülke Çin'dir ve ABD %11,8 ile Çin'i takip etmektedir (Lei et al., 2021). Meme

kanseri türlerinin yaklaşık %75'i hormon reseptörü (östrojen reseptörü [ER] veya progesteron reseptörü [PgR]) pozitif, %15'i HER2 pozitif ve %10'u da bu üç reseptörün olmaması olarak tanımlanan üçlü negatif gruptadır (Spyratos et al., 2003). Meme kanseri hücre hatlarından biri olan MCF-7 hücreleri çalışmaların önemli bir kısmında kullanılmıştır ve ER-pozitif grupta yer almaktadır (Sweeney et al., 2012). BRCA1, BRCA2, TP53, AT, AR (Androjen reseptörü) meme kanseri duyarlılık genleri olarak bilinir ve meme kanserine genetik yatkınlıktan sorumlu genlerdir (Antoniou and Easton, 2006). BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarından daha az görülen, başka genlerdeki mutasyonlar da meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur. Bu genler arasında TP53, PALB2, PTEN, STK11, CHD1, ATM, MRN Kompleksi, RAD51C, FANCC, BRİP1 bulunur (Şekil 2.1) (Tokdemir et al., 2019). Meme kanseri vakalarının yaklaşık %5-10'unda BRCA1 VE BRCA2 genlerinde mutasyon görülür. Kemoterapi, radyoterapi gibi yöntemlerin meme kanseri tedavisinde kullanımı ile meydana gelen ciddi yan etkiler ve sağlıklı hücrelerin zarar görmesi gibi istenmeyen sonuçlar nedeniyle tedavide monoklonal antikorlar ve enzim inhibitörleri gibi yeni umut verici yöntemlerin kullanımı üzerinde çalışılmaktadır (Majeed et al., 2014).



Şekil 2.1. Meme Kanseri Oluşumu İle İlgili Genler (Tokdemir et al., 2019)

Geçmiş yıllarda kanser tedavisinde gösterilen başarılarla rağmen, kemoterapötik ajanlara ve yeni hedefli ilaçlara direnç, kanser tedavisinde sorun olmaya devam etmektedir. Tedaviden önce var olan ya da tedavi sürecinde veya tedaviden sonra ortaya çıkan ilaç direnci, başlıca ölüm nedenlerinden olan kanserin nüksetmesinin bir nedenidir

(X. Wang et al., 2019). Kanserde ilaç direnci, kalıtsal veya edinilmiş olarak ortaya çıkar. Kalıtsal ilaç direnci, kanserli hücrenin belirli bir ilaca ilk tepkisizliği iken; edinilmiş direnç ise ilk başarılı ilaç tedavisinden sonra karşılaşılan ilaç direncidir. Kanser tedavisinde ilaç direncinin nasıl engelleneceği araştırılmakta olan önemli bir konudur (P. Wang et al., 2015).

Kanser hücrelerinde meydana gelen ilaç direnci; genellikle hücre zarı taşıyıcıları gibi belirli proteinlerin artan aktivitesinden kaynaklanır. Tümör hücrelerinde çoklu ilaç direnci (MDR), çoğu kanser türünde kemoterapinin başarısının önünde ciddi bir engeldir. Çoklu ilaç direnci, bir sitotoksik maddeyle muamele edilen in vitro tümör hücrelerinin, yapısal ve işlevsel olarak ilgisiz birden fazla bileşiğe karşı çapraz direnç geliştirmesi sonucu oluşur (H.Thomas and HM.Coley, 2003). Kanser hücrelerinde ilaç direncinin en büyük zorluklarından biri, direncin çok faktörlü olmasıdır. İkinci zorluk ise direncin heterojen olmasıdır (Konieczkowski et al., 2018). Hastalığın ilerlemesiyle tümörler genellikle heterojen hale gelir ve tedaviye karşı farklı özelliklerde yanıtlar ile hücre popülasyonu oluşturur. Heterojenlik, tedaviye direnç oluşumuna neden olur. Bu nedenle etkili tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için tümör heterojenitesinin detaylı bir şekilde değerlendirilmesi gerekir (Dagogo-Jack and Shaw, 2018).

Kanserin çeşitli moleküler yollardaki hatalardan kaynaklandığı bilinmektedir. Mevcut geleneksel kemoterapötik ilaçlarla yapılan tedaviler bir veya birkaç proteini hedeflediğinden zayıf kalmaktadır. Bu nedenle bu ilaçlar, kanser hücrelerini yok etmek için yüksek dozlarda uygulanmakta ve bu da hastalığın kendisinden daha kötü etkiler doğurmasına sebep olmaktadır (Bordoloi et al., 2018). Günümüzde kanser tedavisi, spesifik olmayan yöntemlerden spesifik yöntemleri içeren bir yöne doğru ilerlemektedir. Klasik tedavi yöntemlerinden kemoterapinin kanserli hücrelerin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar verdiği göz önüne alınarak bireyselleştirilmiş, tümöre özgü tedavilere olan ilgi artmaktadır (Wayteck et al., 2013). Bu minvalde tümörler için hedeflenen ilaç iletiminde kullanılacak yeni teknolojiler geliştirmek ve böylece taşınan ilaçların terapötik etkisini iyileştirmek önemlidir (Andresen et al., 2005).

Kanserin karakteristik özelliği, genomik kararsızlıktır. Kanserler, genetik kararsızlığa neden olan mutasyonların birikmesiyle oluşur. Normal hücrenin kanserleşmesi; hücre

döngüsünün düzenlenmesi, apoptozis (programlı hücre ölümü), hücre farklılaşması ve diğer birçok hücre fonksiyonunu etkileyen birçok mutasyon ile olur (Debele et al., 2006). Yumurtalık, meme, prostat gibi kanserler dahil olmak üzere çoğu insan kanser hücreleri, homolog rekombinasyon onarımında kusurlara sahiptir. Bu kanser hücrelerinin neden HR onarımını gerçekleştirmediği net değildir. Yaygın görüş, HR onarımının kaybının kanser hücrelerini genomik kararsızlıkla besleyerek daha fazla mutasyonun oluşmasına ve kanserin ilerlemesine neden olduğu yönündedir (Andrea, 2018).

DNA tamirinde rol oynayan OGG1, ERCC1, XRCC1, XRCC2, XRCC3, XPC, XPD, XPF, BRCA2, MRE11, NBS1, Ku70/80, LIG4, RAD...vb. genlerdeki farklılıklar, proteinlerin işlevini ve hasarlı DNA'nın onarılma kapasitesini değiştirebilmektedir. Hatalı onarımı genomik kararsızlığa dolayısıyla da kansere neden olabilmektedir (Goode et al., 2002). Kanserle ilişkili vücut hücrelerindeki mutasyonların birikimi sadece DNA tamir mekanizmasındaki bir hatadan kaynaklı değil, hücre ölüm mekanizmasının hasarlı hücreleri yok etme yeteneğinin azalmasından da kaynaklanır (Imyanitov et al., 2005).

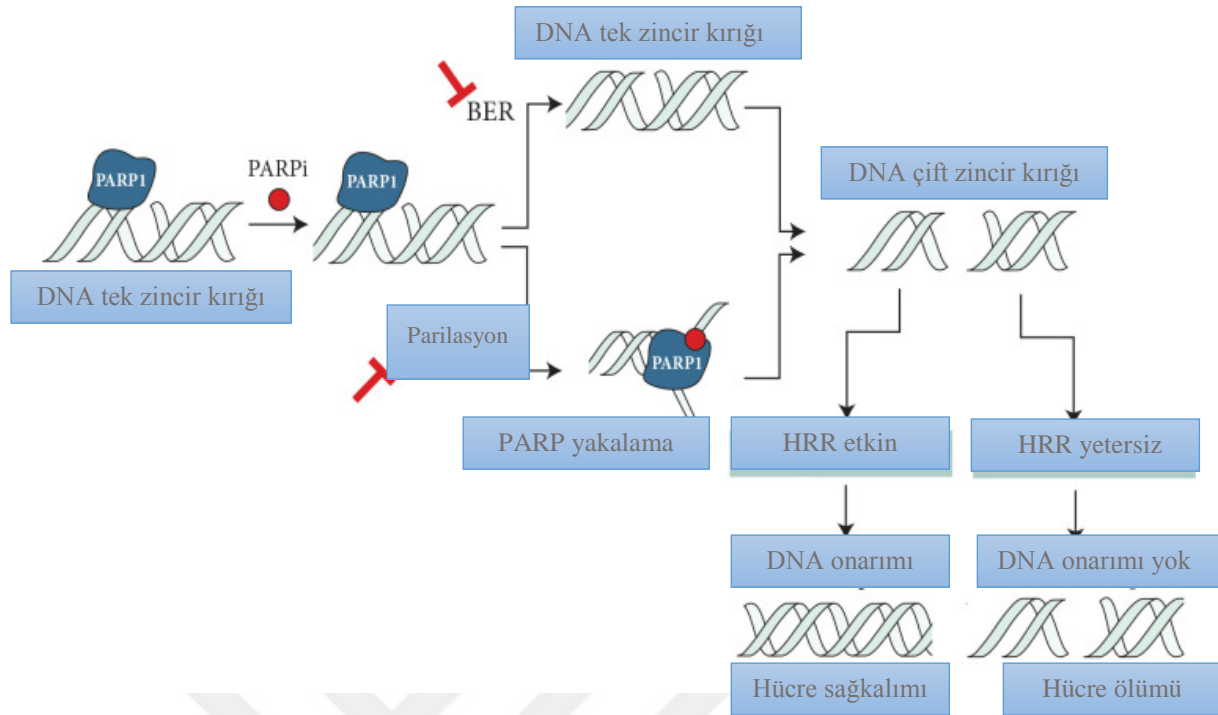
Apoptozis kavramı, “programlı hücre ölümü” olarak ilk kez 1964 yılında tanımlanmıştır. Çeşitli uyarılara maruz kalan hücreler ölürler ve bunu programlı olarak bir yol izleyerek yaparlar. Bu durum apoptozisi diğer bir hücre ölümü olarak bilinen nekrozdan ayırır. Nekroz olarak bilinen hücre ölüm yolunda hücreler genler tarafından kontrol edilmeksizin inflamatuvar bir yanıt sonucu lizise uğrarlar (Gör et al., 2004). Apoptoz, canlılığın gelişmesi ve doku homeostazının sağlanmasındaki en önemli olaylardan biridir. Kanser hücrelerinin yok edilmesinin amaçlandığı tedavilerde apoptotik yolları aktive eden proteinler hedef alınmaktadır. Yapılan çalışmalarda azalmış apoptotik aktivitenin, bir kemoterapötik ajan olan cisplatine karşı dirence neden olduğu gösterilmiştir (Cetintas et al., 2012). Apoptoz, Bcl-2 / Bax gen ailesi ile gerçekleştirilir. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları apoptoz inhibitörü olan anti-apoptotik, bazıları ise apoptozu indükleyen pro-apoptotik genler olarak tanımlanır (Nagata & Factor, 1997). Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, CED-9, Mcl-1, c-Abl, Rb gibi proteinler anti-apoptotik düzenleyicilerdir. İkinci grup olan pro-apoptotik düzenleyiciler ise Bax, Bad, Bak, Bcl-xS, p 53, c-Fos, c-Jun gibi proteinlerdir. Bu proteinlerin tamamı Bcl-2 ailesi olarak tanımlanmaktadır (Kaya, 2012). Hücrede DNA hasarı olduğunda p53 hücre döngüsünü G1 fazında durdurup hücreye DNA tamiri için zaman verir. Hasar tamir

edilemezse p53; Bax, Apaf-1 ekspresyonunu arttırıp Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılar ve bu sayede apoptozu indükler (Vousden and Lu, 2002).

Apoptozdaki hatalar, hem tümör oluşumunun hem de ilaç direncinin temelini oluşturur ve bu hatalar kemoterapinin başarısız olma sebeplerinden biridir (Johnstone et al., 2002). p53 mutasyonları gibi apoptoz kusurları olan hücreler, tümör içinde klonal hipoksik strese hayatta kalabilirler (Graeber et al., 1996). Apoptozdaki hatalar aynı zamanda tümör metastazına da neden olabilir (Frisch and Francis, 1994).

Homolog rekombinasyon, BRCA 1/2 gibi birçok genle birlikte DNA çift zincir kırıklarının onarımı işlemidir. Meme, yumurtalık ve pankreas kanserleri başta olmak üzere birçok kanser türünde homolog rekombinasyonda görevli genlerde yaygın olarak değişiklik meydana gelmiştir (Heeke et al., 2018). Kanser hücreleri, gelişmiş bir DNA onarım kapasitesine sahip olduğu için hasarlı DNA'daki hasarları onarıp daha fazla çoğalma eğilimindedir. DNA'daki hasarı onarmak için, DNA hasar bölgesine bağlanan Poli(ADP-riboz) Polimeraz-1'i (PARP-1) kullanırlar (Brown et al., 2017).

Kişiselleştirilmiş tıp, hedefe yönelik kanser tedavileri kullanmayı hedefler. Bu tür tedaviler, en belirgin olarak BRCA mutasyonlarından dolayı homolog DNA rekombinasyon yolunda bir hata olan kanser hücrelerinde küçük molekülü inhibitörler tarafından PARP enziminin inhibe edilmesiyle gerçekleştirilir (Tangutoori et al., 2015). Homolog rekombinasyon onarımındaki hatalara, RAD51, ATM, ATR ve kontrol noktası kinaz 1 ve 2 dahil olmak üzere BRCA1 ve BRCA2 dışındaki proteinlerdeki işlev kaybı da neden olabilir (Venkitaraman and Ph, 2003). Poli(ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP-1), DNA tek zincir kırıklarına bağlanarak aktive olan bir enzimdir (Şekil 2.2). 18 PARP ailesi tanımlanmıştır (Curtin, 2005). PARP1'in p53 proteini gibi ikili etkisi bulunmaktadır. Hem apoptoza neden olur hem de DNA tamirinde görev alır. PARP-1'in inhibe edilmesi bir yandan DNA hasarı ile hücre ölümüne neden olurken bir yandan hücrelerin ömrünü uzatır. Bu nedenle hem apoptoz aktitesinin fazla olduğu hem de az olduğu hastalıklarda PARP-1 inhibitörleri kullanılabilir (N. Gültekin et al., 2008). S-fazı sırasında PARP1 inhibisyonu DNA tek zincir kırıklarının (SSB) onarımının engellenmesi, DNA çift zincir kırılmalarını (DSB) indükler (Bryant et al., 2005).

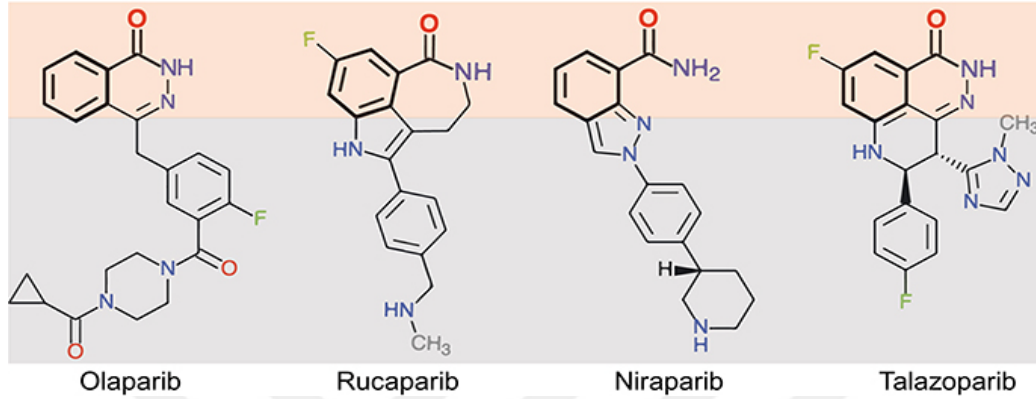


Şekil 2.2. PARP inhibitörlerinin etki mekanizması (Mateo et al., 2019)

PARP inhibitörlerinin en önemli kullanım alanı, meme ve over kaynaklı kanser tedavileridir. Over kanserli çoğu hasta tedaviye olumlu yanıt vermesine rağmen bu hastaların büyük bir kısmı iyileştirilemez. Hastaların %70'inde nüks görülmektedir. Kemoterapiye hızlı direnç geliştiğinden, nüksleri tamamen önlemek pek mümkün değildir. Bu nedenle bu hastaları kurtaracak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Tok ve KocyigitKaymakcioglu, 2015). PARP inhibitörü ile hedefe yönelik tedaviler, kemoterapi veya radyoterapi gibi klasik tedavilere göre daha fazla özgüllüğe ve daha az hedef dışı yan etkiye sahiptir. Bu sayede kanser hastalarında daha olumlu sonuçlar elde edilebilir (Rose et al., 2020). PARP inhibitörlerinin etkileri, hücre ortamına göre farklılık gösterir. DNA hasarının veya metabolik stresin varlığı, PARP inhibisyonunun sonuçları üzerinde etkilidir (Tentori et al., 2002).

Olaparib, rucaparib, niraparib, talazoparib, veliparib, pamiparib ve fluzoparib klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılmakta olan PARP inhibitörleridir (Şekil 2.3). Olaparib, ileri evre kalıtsal BRCA mutasyonlu over kanseri hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere 2014 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Dairesi (EMA) tarafından onaylanan ilk PARP inhibitörüdür (Kaufman et al., 2015).

PARP inhibitörleri, çoklu kanser tedavisinde yüksek beklentiler doğurmuştur. Tek başına veya DNA'ya zarar veren ajanlarla kombinasyon halinde kullanılabilen PARP inhibitörleri, özellikle BRCA mutasyonları nedeniyle DNA onarım mekanizmalarında kusurları olan tümörlere karşı etkilidir (Michels et al., 2013).



Şekil 2.3. PARP inhibitörlerinin kimyasal formülleri (Antolin et al., 2020)

Olaparib, BRCA mutasyonu olan over kanseri de olmak üzere katı tümörlerin tedavisi için geliştirilen bir PARP inhibitörüdür. Olaparib, Lynparza ticari adı altında 2014 yılında AB' de BRCA mutasyonlu over kanserinin tedavisi için onaylanmıştır (European Medicines Agency (EMA), 2021). Ayrıca metastatik meme ve prostat kanseri ile germ hattı BRCA mutasyonu olan hastalarda da umut verici etki göstermiştir (Bochum et al., n.d.).

BRCA 1/2 mutasyonları PARP inhibitörlerine duyarlılığa neden olmasına rağmen, hastaların %40-70'i PARP inhibitörlerine yanıtız kalır veya direnç oluşturur (Gelmon et al., 2011). PARP inhibitörlerine karşı direnç; ilaç püskürtme pompalarının yukarı regülasyonu, PARP veya ilgili diğer proteinlerdeki mutasyonlar gibi ilaç hedefiyle ilgili etkiler, BRCA1/2 etkilerinin restorasyonu nedeniyle homolog rekombinasyondaki onarımlar ile gerçekleşebilir (Dias et al., 2021). BRCA tümörlerinin PARP inhibitörlerine karşı direncinin öncelikle BRCA1/2'deki ters mutasyonlara ve HRR yolağındaki restorasyona bağlı olduğu tanımlanmıştır (Edwards et al., 2008). Ayrıca HRR yolağında etkili RAD51 proteinin aşırı ekspresyonunun kolon kanseri hücrelerini PARP inhibitörüne dirençli hale getirdiği gözlemlenmiştir (X. Liu et al., 2009).

PARP inhibitörüne karşı oluşan direncin üstesinden gelebilmek için tek molekül tedavisine ek olarak kombinasyon tedavisinin yararlı olabileceği düşünülmüştür. Farklı etki mekanizmalarına sahip olan terapötik ajanların birlikte kullanımı, kanser hastalarının hayatta kalma sonuçlarını iyileştirmek için büyük bir etkiye sahiptir. PARP inhibitörünün tek başına kullanımı büyük ilgi görse de, son on yılda kombinasyon halinde kullanımını değerlendiren birçok çalışma yapılmıştır (Dréan et al., 2016).

İlaç direncinin üstesinden gelmek için yaygın olarak kullanılan yöntem; bir ilacı başka bir ilaçla birleştirilerek yani kombine tedavi yaparak etkisini arttırmaktır. Yapılan çalışmalarda özellikle mevcut kemoterapi ilaçlarının güvenli çok hedefli moleküllerle kombinasyonunun, sinerjistik anti-kanser etkileri indükleyerek olumlu sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (Bordoloi et al., 2018).

Günümüzde kemoterapinin etkisini artırmak için çok hedefli fitokimyasal bileşikler araştırılmaktadır. Çünkü kemoterapötik ilaçları doğal polifenollerle birleştirmek gibi çoklu hedefleme stratejisi, kanser tedavisinde umut verici erkiler sunmaktadır (Jimeno and Hidalgo, 2006). Fitokimyasal kavramı kelime olarak, Yunanca su ve bitki anlamına gelen "phyto" kelimesinden türemiştir. Kronik hastalıklarda, kanserde riski azaltmakla bağlantılı olan meyve, sebze ve tahıllar gibi bitkisel gıdalarda bulunan biyoaktif bitki bileşikleri olarak tanımlanır (R. H. Liu, 2003). Fitokimyasallar; karotenoidler, fenolikler, alkaloidler, nitrojen içeren bileşikler ve organosülfür bileşikleri olarak gruplandırılır. En fazla çalışılan grupları fenolikler ve karotenoidlerdir (R. H. Liu, 2004). Fitokimyasallar ve kemoterapötik ajanların kombinasyonunun, monoterapiye kıyasla etkinliği daha fazladır. Bunun nedeni, ilaç kombinasyonlarının, ideal etkiler elde etmek için sinerjistik veya aditif bir şekilde kritik yolları hedeflemesidir (Gao, 2022). Yapılan çalışmalarda doğal bileşikler; kanser hücrelerini radyoterapi ve kemoterapiye karşı daha duyarlı hale getirmek ve bu hücrelerin geliştirmiş olabileceği direnç mekanizmalarının üstesinden gelebilmek için diğer ilaçlarla birlikte kullanılmıştır (Lagunas-rangel and Mar, 2020).

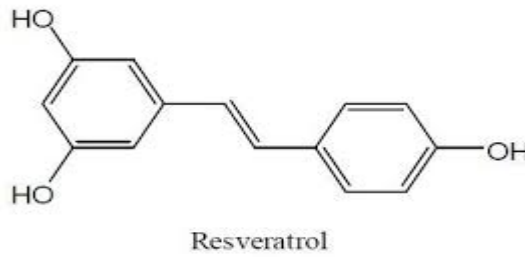
Fitokimyasal bileşiklerin paklitaksel, doksorubisin, tamoksifen ve adriamisin vb. gibi klasik kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonu sonucu çeşitli sinerjistik yaklaşımları çeşitli meme kanseri hücre hatlarında ele alınmıştır. Farklı epidemiyolojik çalışmalar, fitokimyasalların kullanımı ile meme kanseri insidansı arasında ters bir ilişki olduğunu

ortaya çıkarmıştır (Younas et al., 2018). Fitokimyasal bileşiklerin tamamının bazı kanser türlerinin yaygın olarak da meme kanserinin önlenmesinde önemli rolünün olduğu bilinmektedir. Özellikle posa içeriği fazla sebzelerin meme kanseri riskinde düşük oranda azalma sağlayabileceği bildirilmiştir (Ferrari et al., 2013).

Fitokimyasal bileşiklerle ilgili yapılan çalışmalarda en büyük sorun, deneylerde kullanılacak bu ajanların bir kısmının gerekli optimum dozu hakkında fikir birliğinin olmamasıdır. Çünkü fitokimyasallar, kanser önleyici özelliklerini yeterli optimal dozlarda sergilerler (Kotecha et al., 2016). Yapılan çalışmalarda bu doğal bileşiklerin çoğunun meme kanseri hücrelerinde doza bağımlı inhibitör etkiler gösterdiği tespit edilmiştir ve bazı fitokimyasalların düşük konsantrasyonunun meme kanserinde tümör oluşumunu, gelişimini daha da kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Galati and O'Brien, 2004). Fitokimyasallar; sadece kansere neden olan sinyal yollarını baskılamakla kalmaz, aynı zamanda kemoterapi ve radyoterapi ile kullanımıyla sinerjik etki oluşturabilir. Bu sayede doğal bileşik fitokimyasalların anti-kanser etkileri büyük ilgi görmektedir (Pratheeshkumar et al., 2015). Fitokimyasalların kemoterapi veya radyoterapi ile birleştirilerek kombine tedavi yapılması sonucunda sinerjik etkiler, ilaç doz alımını azaltabilir ve bununla birlikte toksisitenin azalmasını sağlayabilir (Russo et al., 2010). Ayrıca bir kaç fitokimyasal maddelerin kombinasyonu, ayrı ayrı kullanımına kıyasla daha etkili olabilir ve kanser tedavisi için daha güçlü terapötik etkiler sağlayabilir (Hosseini & Ghorbani, 2015).

Resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilbene), bir fenolik bileşiktir (Şekil 2.4). Başta üzüm olmak üzere ahududu, dut, yer fıstığı gibi bitkilerde bulunan resveratrol, bitki tarafından savunma mekanizması olarak üretilir (Yaman et al., 2013). Doğal olması nedeniyle resveratrolün güvenli olduğu ve sağlıklı hücreler için zararlı olmadığı düşünülmektedir. Bir çok çalışmada resveratrolün antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-kanser etkileri bildirilmiştir (Ko et al., 2017). Çin ve Japon geleneksel tıbbında da iltihabı, baş ağrılarını, kanseri ve amenoreyi tedavi etmek için kullanılmıştır (Ko et al., 2017). Resveratrol, kanser hücrelerinde hücre siklusunun durdurulmasında ve apoptozisin uyarılmasında önemli rol oynamaktadır (Bai et al., 2010). Resveratrolün meme karsinoma hücreleri olan HL60 ve T47D hücrelerinde apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir (Com et al., 2012). Resveratrolün kanser gelişimini önleme özelliği ilk kez 1997'de Jung ve

arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (Jang et al., 2012). Yapılan bir çalışmada resveratrolün BRCA1, BRCA2, p53, p21, RAD51, pS2 ve Ki67'nin ekspresyonunu ER durumuna bağlı ya da bağımsız olarak koordine bir şekilde değiştirdiği görülmüştür (Le Corre et al., 2004). Aynı zamanda resveratrolün kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştiren hücreleri de tedaviye karşı duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Gupta et al., 2011).



Şekil 2.4. Resveratrolün yapısal formülü (Baur & Sinclair, 2006)

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, oral resveratrol uygulamasının akciğerlere 4T1 fare meme kanseri hücrelerinin metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, resveratrolün insan invaziv tümörlerde aşırı eksprese olan MMP-9'un ekspresyonunu azaltarak metastazı engelleyebileceği doğrulanmıştır (Lee et al., 2012). Yapılan bir diğer çalışmada resveratrolün östrojene duyarlı MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde apoptozu uyardığı fakat aynı etkinin östrojene duyarlı olmayan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında olmadığı görülmüştür (Pozo-Guisado et al., 2005).

Resveratrolün U937 lenfoma hücrelerinde, lösemik hücre hattı MOLT-4'te, HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde ve MCF-7 meme kanseri hücre hattında hücre canlılığını inhibe ettiği ve lösemik hücre hatlarında MCF-7 ve HepG2 hücrelerine göre hücre canlılığını önleyici etkisinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Takashina et al., 2017). Yapılan çalışmalarda; docetaxel dirençli prostat kanseri hücreleri dahil olmak üzere prostat kanseri hücre hattında resveratrolün antikanser aktivite gösterdiği ve aynı zamanda resveratrol ile docetaxel kombinasyonun PC3 prostat kanseri hücre hattında sinerjistik etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Badawi, 2023). KPL-1, MCF-7 ve MKL-F meme kanseri hücre hatlarında denenen resveratrol, yüksek dozlarda hücre proliferasyonunu baskılamıştır. Ayrıca meme kanseri hücre uyarıcısı olan linoleik asidin

etkisini azalttığı tespit edilmiştir (Nakagawa et al., 2001). Bir pilot çalışma kapsamında meme kanseri riski yüksek olan 39 kadına 12 hafta boyunca günde iki kez 50 mg verilen trans-resveratrol sonucunda meme kanseri ile ilişkili bir gen olan RASSF-1a'nın metilasyonun ve meme kanserini teşvik eden PGE2'nin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (Choudhari et al., 2020).

Resveratrolün kanser tedavisinde kullanımının önündeki en büyük engel yetersiz biyoyararlanımıdır. Yapılan çalışmalarda sağlıklı bir insanda resveratrolün iki saatten daha kısa bir sürede metabolize olduğu gösterilmiştir (Boocock et al., 2007). Bu da resveratrolün yüksek bir doz kullanımında dahi antikanser etkisine fazla bir fırsat bırakmamaktadır. Bu engeli aşabilmek için resveratrol metabolizmasının bir şekilde yavaşlatılması ve biyoyararlanımının artması üzerine çalışmalar devam etmektedir (Ndiaye et al., 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal ve sarf malzemeler ile kitler ticari olarak satın alındı. Kullanılan materyaller: Olaparib (MedChem), Resveratrol, LMP agar, Antikorlar (Santa Cruz); DMEM, Penisilin/Streptomisin, FBS, Tripsin-EDTA, DPBS (Gibco); Tris HCl, DMSO, Tween-20, Bromfenol mavisi, β -merkaptoetanol, NP-40, EDTA, EGTA, β -gliserofosfat, H_2O_2 , NaOH, glisin (Merck); tripan mavisi, TEMED, Tris, KCl, NaCl, HCl, NaF, Na_3VO_4 , Commasie blue-G250, NaN_3 , luminol, yağsız süt tozu, Ponceau S, H_3PO_4 , p-kumarik asit, PMSF, DTT, benzamidin, etanol, gliserin, gliserol, sodyum dodesil sülfat (Sigma-Aldrich); 0.45 μm PVDF membran (Millipore); mikrosantrifüj tüpleri, 15 ve 50 mL'lik Eppendorf tüpleri (Isolab); 25 ve 75 cm^2 hücre kültürü flaskları (Sarstedt); 6 ve 96 kuyucuklu mikropalakalar (Corning); 5-10-25 mL steril pipetler ve plastik pipet uçları, 3 ve 6 cm petri kapları (Costar), WST-1 hücre proliferasyonu test kiti şeklindedir. Tüm reaktif ve çözücüler uygun koşullarda saklandı (Buzdolabı 2-8 °C/SEG, Derin dondurucu -20 °C/Vestel, Derin dondurucu -86 °C/Nuaire Glacier NU-9668GC).

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Kanser Araştırma Laboratuvarı'nda hepa filtreli ve hava akımlı laminar flow kabini içerisinde gerçekleştirildi. MCF-7 parental ve MCF-7/PIR hücreleri; DMEM besiyerinde 37°C'de, %95 nem ve %5 CO_2 'li ortamda inkübe edilerek çoğaltıldı. Hücreler her gün kontrol edilerek besiyerleri yenilendi. %80 oranında konflüente olduğu zaman pasajlama için eski DMEM besiyeri aspire edildi ve ardından hücreler DMEM kalıntılarından arındırılmak

için PBS ile yıkandı. PBS aspire edildikten sonra hücreleri kaldırmak için Tripsin-EDTA çözeltisi ile hücrelere muamele edildi. Flasklar 4 dk inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin flask yüzeyinden kalktıkları görüldüğünde, laminar flow kabini içerisinde kullanılan tripsin miktarının iki katı kadar DMEM besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu steril pipetler kullanılarak flaskların içerisinden çekilip falkon tüplere alındı. 4 dk 2500 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 3 mL besiyeri eklenip birkaç kez pipetaj yapılarak homojen bir karışım elde edildi. Karışımında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı ve içinde 4 mL besiyeri bulunan flasklara eşit miktarlarda hücre süspansiyonu konuldu. Stok olarak saklanması için, bazı hücre peletlerinin üzerine freezing medyum eklenip homojen şekilde karışması sağlandı. Karışım dondurma tüplerine (cryo tüp) konularak önce bir gece -86°C 'de bekletilip ertesi gün sıvı azot tankına(-196°C) kaldırıldı. Hücre kültürü çalışmalarında, parental MCF-7 ve olaparib dirençli MCF-7 hücrelerine resveratrol, olaparib ve resveratrol + olaparib tedavileri 72 saat boyunca uygulandı.

3.2.2. Olaparib Dirençli MCF-7 Hücrelerinin Oluşturulması

Olaparibe dirençli MCF-7/PIR hücre klonları oluşturmak için literatür araştırması yapılarak IC₅₀ dozu belirlendi. 3 gün arayla artan dozlarda tedavi uygulanması planlandı. 6-cm'lik kültür kaplarına 3×10^5 MCF-7 hücresi ekildi ve IC₅₀ değerleri dikkate alınarak ilk doz için 1 mM olaparib ile tedaviye başlandı. 20 mM stok konsantrasyonuna sahip olaparib 1:100 dilisyon oranında seyreltildi. İlaçlı besiyeri her 72 saatte bir tazelendi. Haftalık Olaparib doz artırımını (x1,25) sağlandı. %80-90 yoğunluğa ulaşıldığında hücreler pasajlandı. Direnç kazanmaya başlayan hücreler belirli dozlarda pasajlanarak bir kısmı donduruldu ve kalan kısmıyla direnç oluşturma çalışması devam etti. Belirlenen son noktada dirençli hücre klonları ve wild-type (vahşi tip/parental) formları kullanılarak hücre canlılık ve koloni formasyon deneyleri gerçekleştirildi.

3.2.3. Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığı WST-1 analizi ile belirlendi. 96 kuyucuklu mikropklara 5×10^3 hücre olacak şekilde parental ve olaparib dirençli MCF-7 hücreleri ekildi. Artan konsantrasyonlarda olaparib, resveratrol ve olaparib+resveratrol ile tedavi uygulandı ve

ardından hücreler 24, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerle inkübe edildi. Negatif kontrol için 1M H₂O₂ içerisine, pozitif kontrol için ise DMEM+DMSO içerisine ekilen hücreler kullanıldı. Kuyucuklara 10 µL WST-1 reaktifi eklenerek 37°C'de yaklaşık 3 saat süreyle karanlıkta inkübe edildi. Kuyucuklarda meydana gelen renk değişimi spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin % canlılık oranları hesaplandı. Uygulanan hücrelerin canlılıkları (Örnek C) tedavi uygulanmamış kontrol hücreleri referans alınarak hesaplandı ve bu değer %100 canlılık (Maksimum canlılık, MaxC) olarak belirlendi. Hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulanan hücreler, minimum canlılık seviyesinin (Minimum canlılık, MinC) hesaplanmasında referans olarak alındı. Tüm bu değerler ile aşağıdaki formül kullanılarak hücrelerde inkübasyon süresi sonunda oluşan % canlılık oranları hesaplandı.

$$\text{Canlılık (\%)} = [100 \times (\text{ÖrnekC} - \text{MinC}) / (\text{MaxC} - \text{MinC})]. \quad (3.1)$$

3.2.4. İzobologram Analizi ile Sinerjizmin Belirlenmesi

Bu çalışmada MCF-7 parental ve MCF-7/PIR hücrelerinde resveratrol ile olaparib tedavisi arasındaki sinerjizmi belirlemek için izobologram analizi yapıldı. İlaç kombinasyonlarının analizi ve CI değerinin hesaplanması amacıyla medyan-etki denklemi kullanıldı (Chou, 2011). Yapılan işlemler sonucunda uygulanan kombine tedavilere ait kombinasyon indeksi (CI) verileri değerlendirildi (CI<1, =1 ve >1 olması sırasıyla sinerjizm, aditif etki ve antagonizmi gösterir).

3.2.5. Koloni Oluşum Deneyi

6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 2×10^2 hücre olacak şekilde parental MCF-7 ve MCF-7/PIR hücreleri ekildi. Ertesi gün, hücrelere 72 saat boyunca resveratrol ve olaparib ile ayrı ayrı ve kombine tedaviyle muamele edildi. Tedaviden sonra, besiyeri uzaklaştırılıp taze besiyerinde hücreler 15 gün boyunca %5 CO₂ içeren 37°C'de inkübe edildi. Her 3 günde bir besiyeri değiştirildi ve hücreler mikroskop altında incelendi. 15 günün sonunda deney durduruldu, besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler metanol: aseton (3: 1) ile fikse edildi ve 20 dakika boyunca %0,05

kristal viyole ile boyandı. Yapılan bu işlemden sonra kuyucuklar su ile dikkatli bir şekilde yıkanıp koloniler mikroskop altında incelendi.

3.2.6. 3D Soft Agar Analizi

Tedavi baskısı altında bulunan meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturabilme kapasitelerini karşılaştırmak için soft agar analizi yapıldı. %1 LMP agar hazırlamak için cam şişede 0,1 g LMP agar, 10 mL ddH₂O' da çözündürülüp mikrodalga fırında 1 dk ısıtıldı. Ardından akan su altında bir süre bekletilen cam şişedeki agar solüsyonu, 37°C'deki su banyosuna alındı ve 30 dk bekletildi. %20 FBS içeren DMEM hazırlandı. 6 kuyucuklu plaka isimlendirilip MCF-7 hücre hattında sayım yapıldı. 1 mL'de 6000 hücre olacak şekilde 7 mL hücre süspansiyonu hazırlandı. Agar alt tabaka oluşturmak için 3 mL agar+3 mL DMEM karışımı hazırlandı. Her bir kuyucuğa 1 mL eklenip +4 °C' de 30 dk inkübe edildi. Üst tabaka için 7 mL hücre süspansiyonu ve 3,5 mL agar hazırlandı. Her bir kuyucuğa 2 mL eklenip +4 °C' de 30 dk bekletildi ve ardından hücreler inkübatöre alındı. 3-4 günde bir %20 FBS'li DMEM besiyerinden 750 µL kuyuculara eklendi. 21 gün sonunda koloni oluşumları mikroskop altında incelenip ve oluşan koloniler metanol içerisinde hazırlanan %0,005 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Daha sonra boya uzaklaştırılarak 1 mL ddH₂O eklendi. Kuyucuklar (plakalar) taranıp koloni miktar tayini Image J programı ile yapıldı.

3.2.7. Western Blot ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücrelerdeki total protein içerikleri özütlenerek, hedef proteinlerin ifade düzeyleri western blot tekniği ile belirlendi. Olaparib, resveratrol ve olaparib+resveratrol ile tedavi edilen MCF-7/ PIR hücreleri toplandı. Kazıyıcı yardımıyla toplanan hücreler RIPA lizis tamponu kullanılarak homojenize edilip 14000 rpm'de +4°C' de 15 dk santrifüjlendi. Süpernatant kısmı aspire edildi. Protein miktar tayini yapılarak Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonları belirlendi. Örnekler aynı miktarlarda protein içerecek şekilde SDS poliakrilamid jele yüklendi ve yürütüldü. Jelde molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinleri PVDF membrana aktarmak için membran ve jel sandviç yöntemiyle western blot transfer aparatına yerleştirildi. 1X transfer tamponuyla 400 mA'de 1,5 saat transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer buz üstünde yapıldı, ayrıca tankın içine de buz aküsü

koyuldu. Transfer tamamlandıktan sonra proteinlerin transfer olduğu membran %5 BSA'lı TBST ve süt tozu karışımı içinde 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra bloklama tamponu döküldü ve membran 3 kere 10'ar dakika TBST ile yıkandı. İçerisinde TBST, süt tozu ve proteine özgü 1:1000 oranında seyreltilmiş primer antikor (birincil antikor) olan bir falkon tüpe membran konuldu. 1 gün +4°C'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Ertesi gün membran 3 kere 10'ar dakika olmak üzere TBST ile yıkandı. Yıkamadan sonra TBST ve süt tozu karışımı içerisinde membrana 1:5000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ile muamele edildi. +4°C' de 2 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından membran 3 kez 10'ar dakika TBST ile yıkandı. Daha sonra ECL kiti kullanılarak X-ışını filminde oluşan protein bantları gözlemlendi. Bant yoğunluk değerleri, Jel dokümantasyon sistemi kullanılarak beta-aktin ile normalize edilip Image J programıyla analiz edildi.

3.2.8. İstatistiksel Analizler

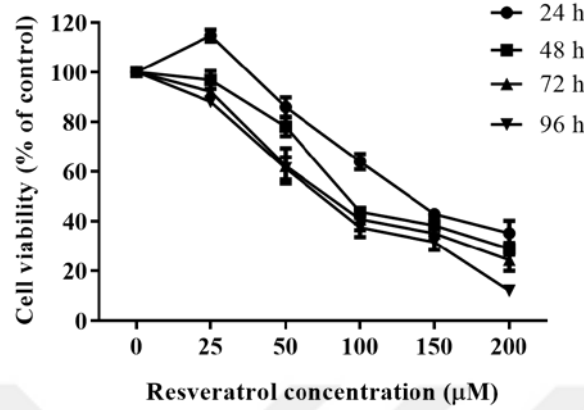
Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde ortalama \pm standart sapma değerleri kullanıldı ve gruplar arasındaki $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sitotoksosite Bulguları

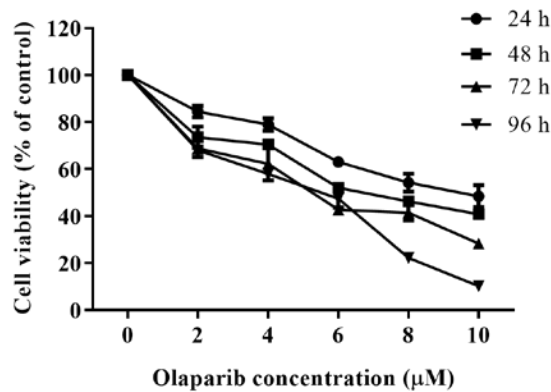
In vitro sitotoksosite analizleri, ara elektron alıcı varlığında mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tarafından suda yüksek oranda çözünür formazan üreten tetrazolyum tuzlarından oluşur. Üretilen formazan miktarı, hücre kültüründe mitokondriyal dehidrojenaz miktarı ile doğru orantılıdır. Böylece analiz, hücrelerin metabolik aktivitesini ölçer (Kamiloglu et al., 2020). *In vitro* hücre canlılığı analizi üretici protokollerine göre gerçekleştirildi. Kısaca, ilgili hücreler DMEM besiyerlerinde %5 CO₂ içeren 37°C'de inkübatörde çoğaltıldıktan sonra, pilot deneyler neticesinde belirlenen miktarda hücre (5×10^3 hücre) 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle artan konsantrasyonlarda olaparib, resveratrol ve kombinasyon grupları ile muamele edildi. Sonrasında, besiyeri ortamdaki uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 10 µL kit reaktifi eklendi ve 2 saat inkübasyondan sonra renk değişimi bir mikropilaka okuyucu (SpectraMax 384 Plus, Molecular Devices, ABD) ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Hücrelerin çoğalma yüzdeleri, tedavi grubunun absorbans değerinden arka plan kontrolünün çıkarılması ve ardından bu değerlerin kontrol grubuna bölünmesiyle hesaplandı. Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi resveratrol ile tüm tedavi sürelerinde özellikle 50 µM ve üstü konsantrasyonlarda MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılığının artan konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlendi. Sadece 24 saatlik tedavi grubunda resveratrolün hücre canlılığını 25 µM'lık konsantrasyonda arttırdığı, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe ettiği görüldü. Elde edilen canlılık değerleri kullanılarak tedavi süreleri için resveratrolün IC50 değerleri hesaplandı. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde resveratrol tedavileri sonucunda IC50 değerleri 24, 48, 72 ve 96 saatlik tedavilerde sırasıyla $124,55 \pm 4,23$; $98,98 \pm 4,37$; $82,45 \pm 1,50$ ve $76,86 \pm 2,76$ µM olarak belirlendi. MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde resveratrolün sitotoksik etkisinin incelendiği ve resveratrolün hücre canlılığı üzerinde artan konsantrasyona bağlı olarak antiproliferatif etki göstererek 48 saatlik

tedavide 101,1 μM IC50 dozuna sahip olduğunun gösterildiği çalışma (Galicia et al., 2018) bulgularımızı desteklemektedir.



Şekil 4.1. Resveratrol ile 24, 48, 72 ve 96 saat tedavi edilen parental MCF-7 hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafiği. 5×10^3 hücre 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra 24 (24h), 48 (48h), 72 (72h) ve 96 (96h) saat süreyle artan konsantrasyonlarda resveratrol ile muamele edildi. Sonrasında her bir kuyucuğa kit reaktifi eklenerek renk değişimi 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplanarak sonuçlar ortalama \pm standard sapma (SD) olarak verildi

Olaparib ile tedavi edilen hücrelerde ise olaparibin doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği gözlemlendi (Şekil 4.2). Olaparibin IC50 değeri MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 24, 48, 72 ve 96 saatlik tedavilerde sırasıyla $9,60 \pm 0,68$; $7,08 \pm 0,31$; $5,24 \pm 0,23$ ve $4,85 \pm 0,26$ μM olarak hesaplandı.



Şekil 4.2. Olaparib ile 24, 48, 72 ve 96 saat tedavi edilen parental MCF-7 hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafiği. 5×10^3 hücre 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra 24 (24h), 48 (48h), 72 (72h) ve 96 (96h) saat süreyle artan konsantrasyonlarda olaparib ile muamele edildi. Sonrasında her bir kuyucuğa kit reaktifi eklenerek renk değişimi 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplanarak sonuçlar ortalama \pm standard sapma (SD) olarak verildi

14 farklı meme kanseri hücre hattı üzerinde iki ayrı PARP inhibitörü olaparib ve iniparibin antiproliferatif aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, MCF-7'nin de dahil olduğu hemen hemen tüm hücre hatlarında olaparibin güçlü bir hücre büyümesi inhibitörü olduğu ve hücrelerin canlılığını doz bağımlı olarak azalttığı rapor edilmiştir (Pierce vd., 2013). Bu bulgular bizim çalışmamızın sonuçlarıyla örtüşmektedir. Aynı çalışmada belirlenmiş olan olaparibin MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki IC50 dozu da (5,8 µM) bizim bulgularımızla uyum göstermektedir.

4.2. Kombinasyon İndeksi ve Sinerjizmin Belirlenmesi

Kemoterapi, birçok yan etkiye rağmen, kanseri tedavi etmenin hala en popüler yollarından birisidir. Polifenolik bileşikler, yan etkilerin azaltılmasının yanı sıra kemoterapi etkinliğinin iyileştirilmesi için umut verir. Kemoterapide yaygın olarak kullanılan birçok ilacın artan direnç ve insanlarda birçok istenmeyen yan etki nedeniyle uygulaması sınırlıdır. Kemoterapotiklerle bitkisel bileşiklerin *in vitro* sinerjik etkisini ortaya koyan pek çok çalışma ile ilaçların etkinliğinin arttırıldığı ve daha düşük dozlarda ilaç kullanımına bağlı olarak istenmeyen yan etkilerin de minimal düzeye indirilebileceği ifade edilmektedir (Lewandowska et al., 2014). Olaparib ve resveratrol kombinasyon tedavisinin MCF-7 meme kanseri hücre canlılığı üzerine olan etkileri araştırıldı. Bunun için öncelikle belirlenen IC50 değerleri göz önüne alınarak *in vitro* sitotoksisite deneyleri yapıldı. 96 kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirilen 1×10^4 MCF-7 hücresinin ertesini gün Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de gösterildiği gibi tedavileri gerçekleştirildi. Elde edilen verilerle kombinasyon indeksleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve kombinasyon tedavisinin sinerjistik anti-kanser etkisi belirlendi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Kombinasyon indeksinin (CI: combination index) hesaplanması:

Olaparib ve resveratrol tedavilerinin kombinasyon indeksi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı (Li et al., 2017).

$$CI = \frac{(A_{olap})_{50}}{(B_{olap})_{50}} + \frac{(A_{res})_{50}}{(B_{res})_{50}} \quad (4.1)$$

$(A_{olap})_{50}$: IC₅₀-resveratrol konsantrasyonunun yarısı uygulandığında %50 inhibisyon etkisine sahip olaparib konsantrasyonu,

$(B_{olap})_{50}$: IC_{50} -olaparib,

$(A_{res})_{50}$: IC_{50} -olaparib konsantrasyonunun yarısı uygulandığında %50 inhibisyon etkisine sahip resveratrol konsantrasyonu,

$(B_{res})_{50}$: IC_{50} -resveratrol.

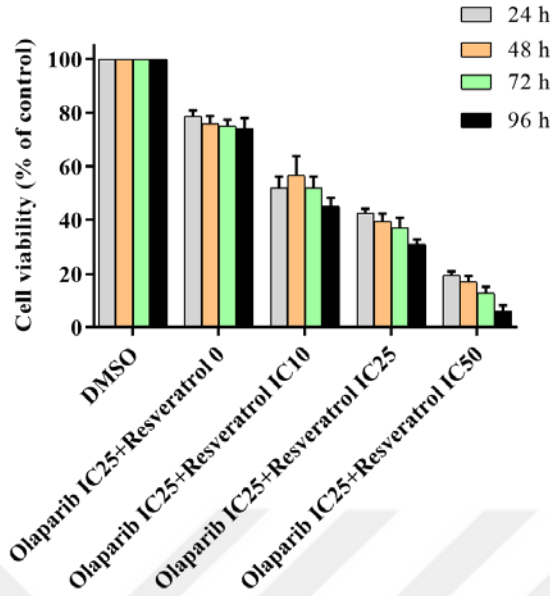
CI > 1: antagonistik, CI = 1: arttırıcı ve CI < 1: sinerjistik etkiyi gösterir (Chou & Talalay, 1984).

Tablo 4.1. Kombine olarak olaparibin IC_{25} dozu ve farklı konsantrasyonlarda resveratrol ile 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin tedavi protokolü

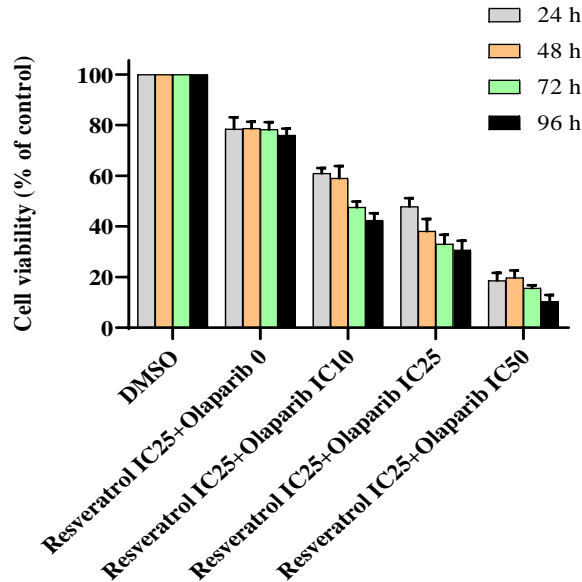
Tedavi süresi	#1	#2	#3	#4	#5
24 saat	DMSO (Kontrol)	Res- IC_{25} ($82,82 \pm 4,70 \mu M$) + Olap-0	Res- IC_{25} + Olap- IC_{10} ($1,59 \pm 0,14 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{25} ($4,13 \pm 0,29 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{50} ($9,60 \pm 0,68 \mu M$)
48 saat	DMSO (Kontrol)	Res- IC_{25} ($56,02 \pm 5,15 \mu M$) + Olap-0	Res- IC_{25} + Olap- IC_{10} ($0,86 \pm 0,20 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{25} ($2,53 \pm 0,43 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{50} ($7,08 \pm 0,31 \mu M$)
72 saat	DMSO (Kontrol)	Res- IC_{25} ($37,34 \pm 6,12 \mu M$) + Olap-0	Res- IC_{25} + Olap- IC_{10} ($0,65 \pm 0,09 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{25} ($1,88 \pm 0,31 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{50} ($5,24 \pm 0,23 \mu M$)
96 saat	DMSO (Kontrol)	Res- IC_{25} ($33,27 \pm 2,83 \mu M$) + Olap-0	Res- IC_{25} + Olap- IC_{10} ($0,62 \pm 0,04 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{25} ($1,83 \pm 0,06 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{50} ($4,85 \pm 0,26 \mu M$)

Tablo 4.2. Kombine olarak resveratrolün IC_{25} dozu ve farklı konsantrasyonlarda olaparib ile 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin tedavi protokolü

Tedavi süresi	#1	#2	#3	#4	#5
24 saat	DMSO (Kontrol)	Res- IC_{25} ($82,82 \pm 4,70 \mu M$) + Olap-0	Res- IC_{25} + Olap- IC_{10} ($1,59 \pm 0,14 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{25} ($4,13 \pm 0,29 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{50} ($9,60 \pm 0,68 \mu M$)
48 saat	DMSO (Kontrol)	Res- IC_{25} ($56,02 \pm 5,15 \mu M$) + Olap-0	Res- IC_{25} + Olap- IC_{10} ($0,86 \pm 0,20 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{25} ($2,53 \pm 0,43 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{50} ($7,08 \pm 0,31 \mu M$)
72 saat	DMSO (Kontrol)	Res- IC_{25} ($37,34 \pm 6,12 \mu M$) + Olap-0	Res- IC_{25} + Olap- IC_{10} ($0,65 \pm 0,09 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{25} ($1,88 \pm 0,31 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{50} ($5,24 \pm 0,23 \mu M$)
96 saat	DMSO (Kontrol)	Res- IC_{25} ($33,27 \pm 2,83 \mu M$) + Olap-0	Res- IC_{25} + Olap- IC_{10} ($0,62 \pm 0,04 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{25} ($1,83 \pm 0,06 \mu M$)	Res- IC_{25} + Olap- IC_{50} ($4,85 \pm 0,26 \mu M$)



Şekil 4.3. Olaparib ve resveratrol kombinasyon tedavisine bağlı MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılık grafiği. 5×10^3 hücre 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra 24 (24h), 48 (48h), 72 (72h) ve 96 (96h) saat süreyle farklı konsantrasyonlarda olaparib+resveratrol ile muamele edildi. 5×10^3 hücre 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra 24 (24h), 48 (48h), 72 (72h) ve 96 (96h) saat süreyle farklı konsantrasyonlarda olaparib+resveratrol ile muamele edildi. Sonrasında her bir kuyucuğa kit reaktifi eklenerek renk değişimi 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplanarak sonuçlar ortalama±standard sapma (SD) olarak verildi

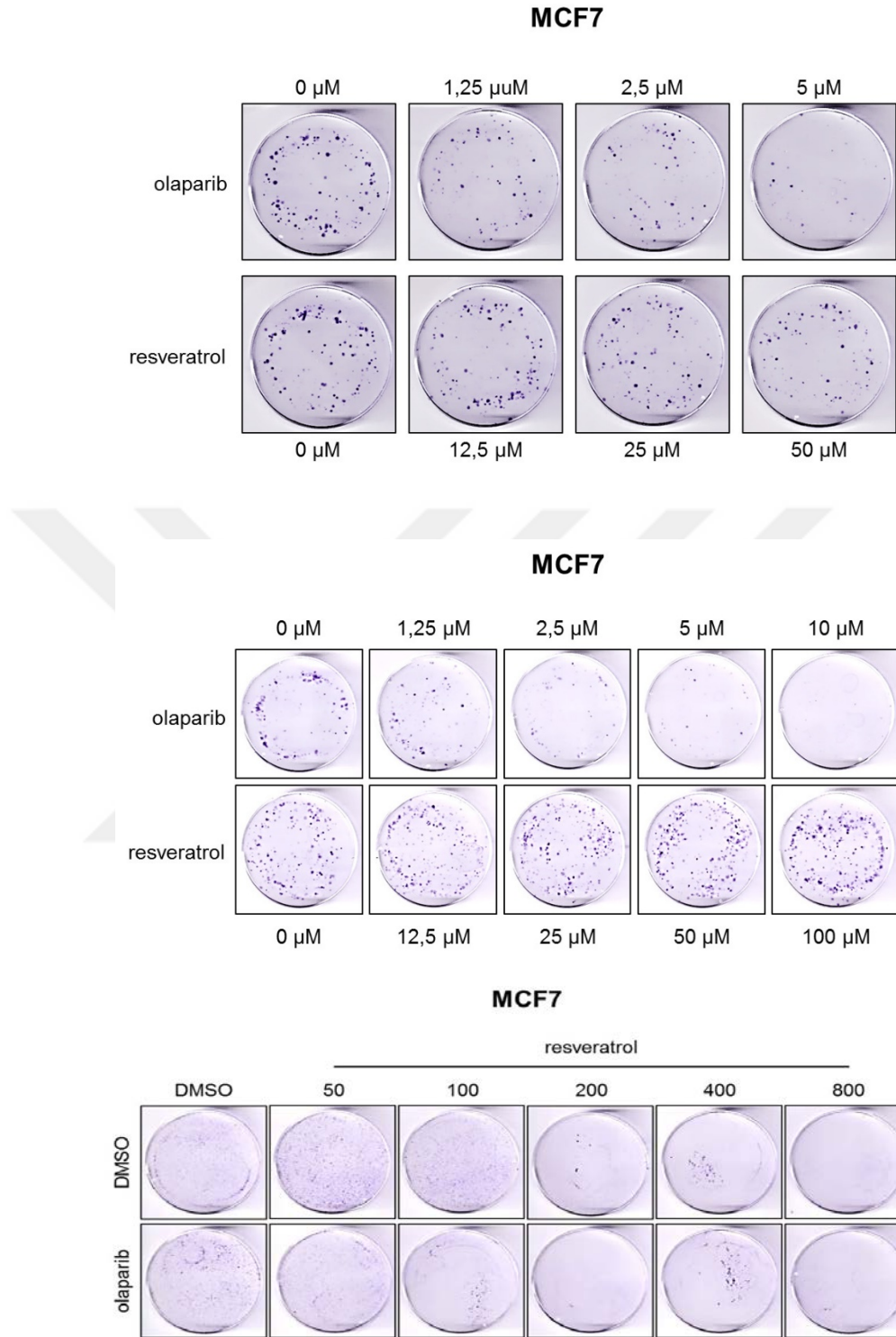


Şekil 4.2. Resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisine bağlı MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılık grafiği. 5×10^3 hücre 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra 24 (24h), 48 (48h), 72 (72h) ve 96 (96h) saat süreyle farklı konsantrasyonlarda resveratrol+olaparib ile muamele edildi. Sonrasında her bir kuyucuğa kit reaktifi eklenerek renk değişimi 450 nm dalga boyunda

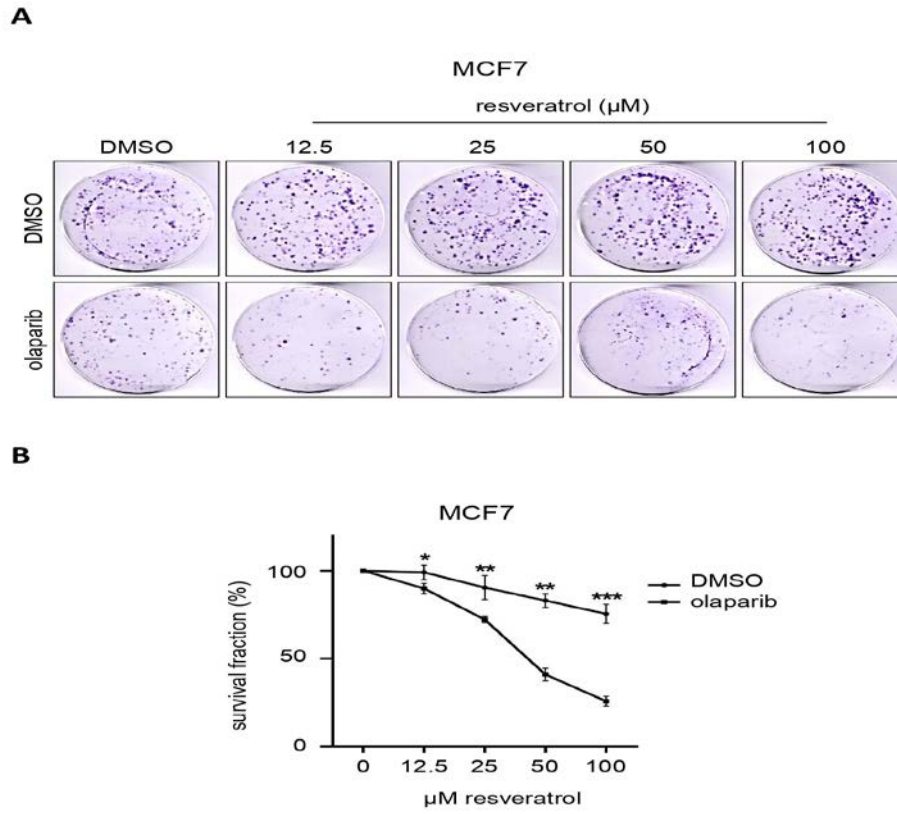
ölçüldü. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplanarak sonuçlar ortalama±standard sapma (SD) olarak verildi. Kombinasyon indeksi 24, 48, 72 ve 96 saatlik tedavilerde sırasıyla 1,31; 0,91; 0,67 ve 0,62 olarak hesaplandı. Bu sonuçlar MCF-7 meme kanseri hücrelerinde resveratrol ve olaparib kombinasyonunun 48, 72 ve 96 saatlik tedavilerde sinerjistik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

4.3. Koloni Sağ Kalımı Bulguları

Koloni sağ kalımı deneyi, tek bir hücrenin bir koloniye dönüşme kabiliyetine dayanan bir *in vitro* hücre hayatta kalma deneyidir. Koloni en az 50 hücreden oluşacak şekilde tanımlanır. Deney esas olarak popülasyondaki her hücreyi “sınırsız” bölünme geçirme kabiliyeti açısından test eder. Koloni sağ kalımı deneyi, sitotoksik ajanların mono- ve kombo- tedavilerinin etkinliğini belirlemek için kullanılır. Tedaviye bağlı olarak sadece hücrelerin bir kısmı koloni üretme kapasitesini korur (Franken et al., 2006). *In vitro* hücre canlılığı analizi ve koloni sağ-kalım deneyleri arasındaki teknik farklılıklar göz önünde bulundurularak (Pierce et al., 2013) kombinasyon koloni sağ-kalım deneylerini gerçekleştirmeden önce pilot koloni sağ-kalım deneyleri düzenlenerek olaparibin ve resveratrolün 2D koloni oluşumu üzerine olan IC50 değerleri belirlendi (Şekil 4.5). 6-cm hücre kültür kutusuna ekimi yapılan $1,5 \times 10^3$ MCF-7 hücresi ertesi gün pilot deneylerle belirlenen dozlara göre olaparib, resveratrol ve olaparib+resveratrol kombinasyonu ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Daha sonra ilaçlı mediumlar uzaklaştırıldı ve hücreler 12 gün boyunca taze ilaçsız mediumda bekletildi. Bu sürenin sonunda boyama işlemi gerçekleştirildi ve kombinasyon tedavisinin meme kanser sağ-kalımı üzerine olan sinerjistik anti-kanser etkisi belirlendi. Resveratrol ve olaparib kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini artan dozla birlikte önemli ölçüde baskıladığı görüldü (Şekil 4.6.A ve B).



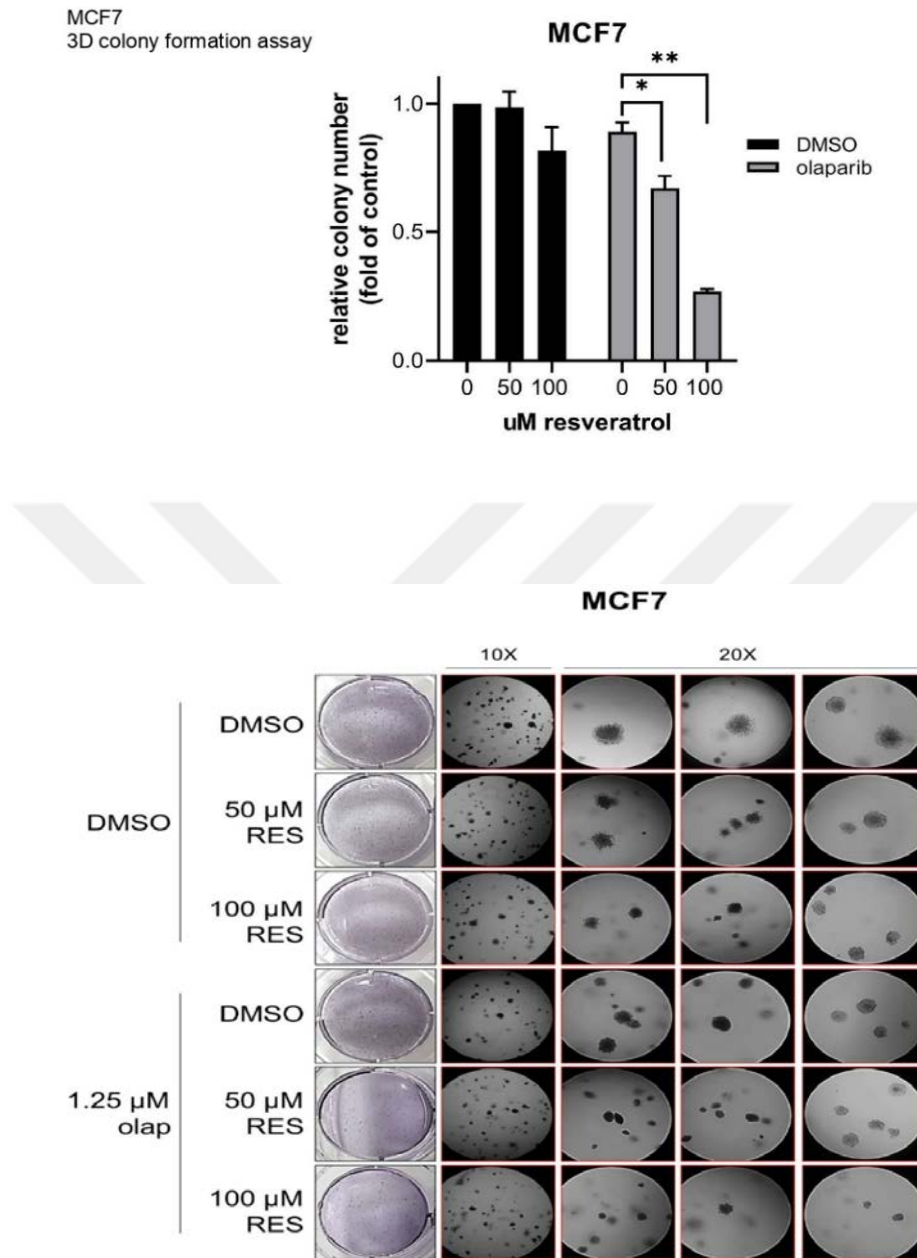
Şekil 4.5. Resveratrol ve olaparib mono- ve kombo- tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni sağ kalımı sonuçları. 6-cm hücre kültür kutusuna ekimi yapılan $1,5 \times 10^3$ MCF-7 hücresi ertesi gün pilot deneylerle dozların belirlenmesi için olaparib, resveratrol ve olaparib+resveratrol kombinasyonu ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Daha sonra ilaçlı mediumlar uzaklaştırıldı ve hücreler 10-12 gün boyunca taze ilaçsız mediumda bekletildi. Bu sürenin sonunda metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika süreyle fikse edilen koloniler %0,5 kristal viyole boyası ile 15 dakika boyunca boyandı. Taranan kolonilerin analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tedavilerin meme kanseri hücrelerinin sağ-kalımı üzerine olan anti-kanser etkisi ve uygun dozlar belirlendi



Şekil 4.6. Resveratrol ve olaparib kombine tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni sağ kalımı deneyi sonuçları. A. 6-cm hücre kültür kutusuna ekimi yapılan $1,5 \times 10^3$ MCF-7 hücresi ertesi gün pilot deneylerle belirlenen dozlara göre olaparib, resveratrol ve olaparib+resveratrol kombinasyonu ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Daha sonra ilaçlı mediumlar uzaklaştırıldı ve hücreler 12 gün boyunca taze ilaçsız mediumda bekletildi. Bu sürenin sonunda metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika süreyle fikse edilen koloniler %0,5 kristal viyole boyası ile 15 dakika boyunca boyandı. B. Taranan kolonilerin analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi ve kombinasyon tedavisinin meme kanser sağ-kalımı üzerine olan sinerjistik anti-kanser etkisi belirlendi. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplanarak sonuçlar ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulguların istatistikî değerlendirilmesi, GraphPad Prism version 8.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) programı kullanılarak yapıldı. Bulgular t-testi ve One-Way Anova testi ile değerlendirildi. P değeri 0,05 (*), 0,01 (**), veya 0,001 (***)'den küçük neticeler anlamlı kabul edildi

4.4. Soft Agar Bulguları

Kanser hücrelerinin en belirgin davranışlarından biri tutunma yüzeyinden bağımsız bir şekilde büyüebilme (3D anchorage-independent growth) kapasiteleridir. Kanser hücrelerinin çeşitli tedavilere karşı soft agar içerisindeki tümör oluşturma kapasitelerinin incelenmesi, yeni tedavi ajanlarının veya kombinasyon tedavilerinin *in vitro* analizinde kullanılan önemli bir hücre kültürü tekniğidir (Borowicz et al., 2014).

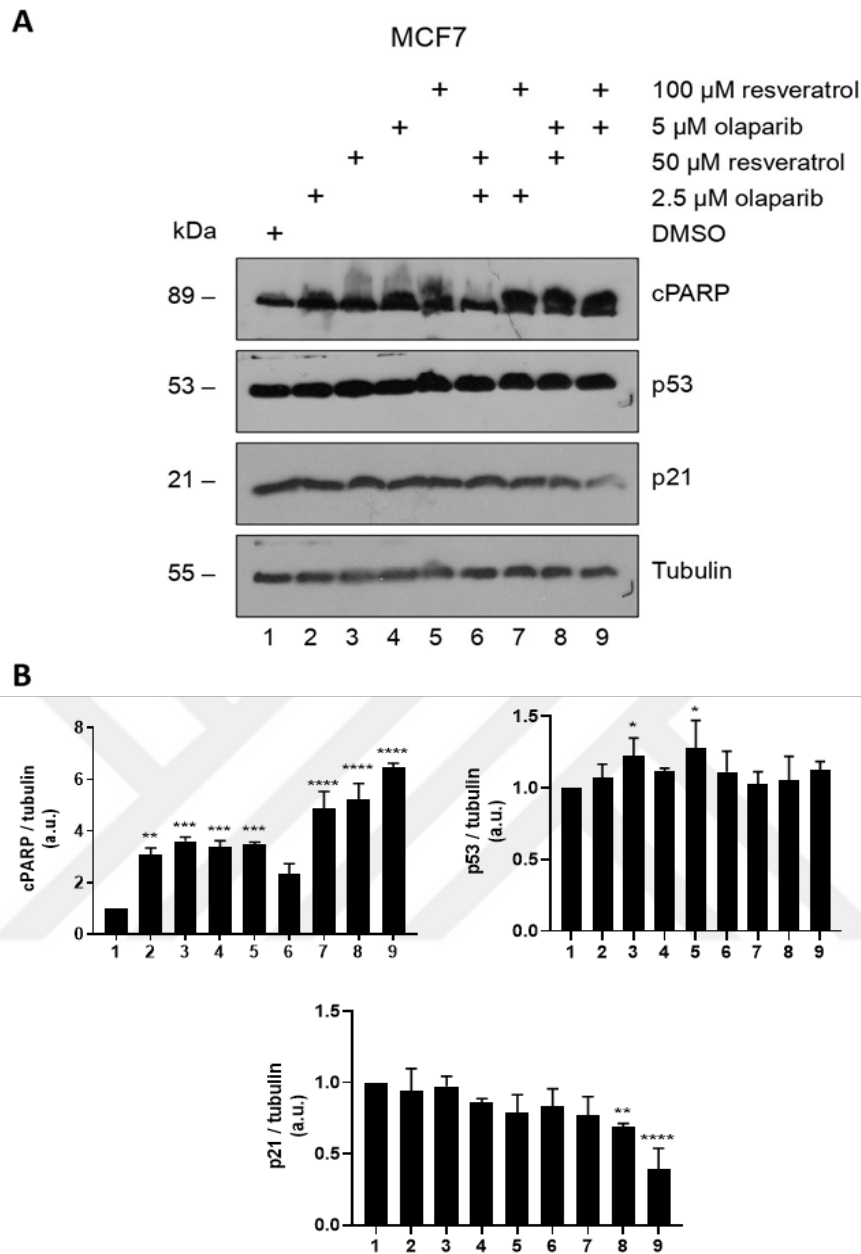


Şekil 4.7. Resveratrol ve olaparib ile kombine tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 3D tümör oluşturma kapasitesi. Soft agar içerisinde ekilen $2,5 \times 10^3$ MCF-7 kanser hücresi koloni sağ-kalım deneylerinde belirlenen en etkin tedavi dozlarıyla (50 μ M resveratrol, 100 μ M resveratrol, 1,25 μ M olaparib, 1,25 μ M olaparib + 50 μ M resveratrol, 1,25 μ M olaparib + 100 μ M resveratrol) 21-28 gün süreyle tedavi edildi. Ardından deneyler sonuçlandırıldı. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplanarak sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulguların istatistiki değerlendirilmesi, GraphPad Prism version 8.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) programı kullanılarak yapıldı. Bulgular t-testi ve One-Way Anova testi ile değerlendirildi. P değeri 0,05 (*), 0,01 (**)'den küçük neticeler anlamlı kabul edildi

Gerçekleştirdiğimiz deneylerde soft agar içerisine ekilen $2,5 \times 10^3$ MCF-7 kanser hücresi koloni sağ-kalım deneylerinde belirlenen en etkin tedavi dozlarıyla (50 μ M resveratrol, 100 μ M resveratrol, 1,25 μ M olaparib, 1,25 μ M olaparib + 50 μ M resveratrol, 1,25 μ M olaparib + 100 μ M resveratrol) 21-28 gün süreyle tedavi edildi. Elde edilen veriler, resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 3D tümör oluşturma kapasitesi üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Kombine tedavilerin oluşan tümörlerin sayısını ve hacmini anlamlı ölçüde baskıladığı ve küçülttüğü ortaya koyuldu (Şekil 4.7).

4.5. Protein İfade Düzeylerine Ait Bulgular

PARP enzimleri, DNA tek zincir kırıklarının onarımı dahil olmak üzere çeşitli hücresel yollarda rol oynamaktadır (Sonnenblick et al., 2015). Bugüne dek yapılan çok sayıda çalışma, PARP ile farklı DDR yollarında rol oynayan genler arasında muhtemel sentetik letal veya canlılık etkileşimlerini tanımlamıştır. Özellikle BRCA1/2 ve PARP arasındaki karakterize edilen sentetik letal ilişki (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005) bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve çok sayıda araştırma farklı DDR regülatörleri arasındaki etkileşimlerin ortaya çıkarılmasını amaçlamıştır (Huang et al., 2020; Jackson and Helleday, 2016; Nickoloff et al., 2017; O'Connor, 2015). PARP inhibitörleri, PARP enziminin katalitik aktivitesini inhibe ederek endojen olarak gelişen DNA tek zincir kırıklarının birikmesine yol açar ve söz konusu lezyonlar hücre döngüsünün S evresinde gerçekleşen DNA replikasyonu esnasında HR ile onarılan katastrofik DNA çift zincir kırıklarına dönüşür. Gerçekleştirilen Western blot analizleriyle, artan dozlarda küçük molekül PARP inhibitörü olaparib ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerindeki cPARP, p53 ve p21 ekspresyon düzeyleri kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. Öncelikle 5×10^5 MCF7 hücresi 60-mm kültür ekim kaplarına ekildi ve ertesini gün 2,5 ve 5 μ M olaparib, 50 ve 100 μ M resveratrol, 2,5 μ M olaparib+50 μ M resveratrol, 2,5 μ M olaparib+100 μ M resveratrol, 5 μ M olaparib+50 μ M resveratrol, 5 μ M olaparib+100 μ M resveratrol ile tedavi edildi. 72 saat süreyle tedavi edilen hücreler tripsinizasyon işlemiyle toplandı ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ile konsantrasyonu belirlenen protein örnekleri SDS-PAGE jelde koşturularak PVDF membrana transfer edildikten sonra ilgili primer ve sekonder antikorlarla inkübe edilip enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktarılarak cPARP, p53 ve p21 protein ekspresyonları karşılaştırıldı.



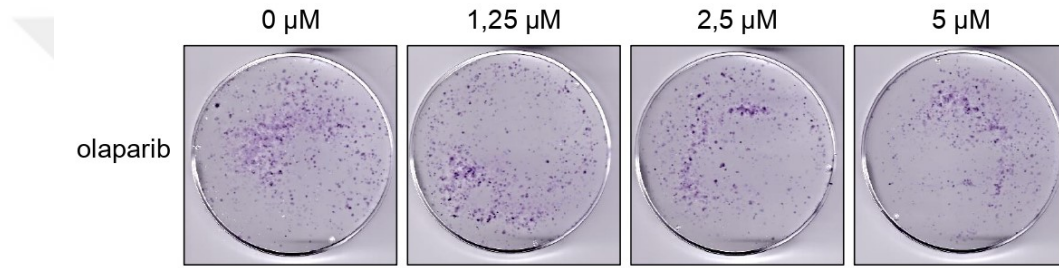
Şekil 4.8. Resveratrol ve olaparib kombine tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü, DNA hasar/tamir ve apoptosis proteinlerinin ifade düzeyleri. A. Western blot analizleriyle, artan dozlarda küçük molekül PARP inhibitörü olaparib ile tedavi edilen MCF7 hücrelerindeki cPARP, p53 ve p21 ekspresyon düzeyleri kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. Öncelikle 5×10^5 MCF-7 hücresi 60-mm kültür ekim kaplarına ekildi ve ertesi gün 2,5 ve 5 µM olaparib, 50 ve 100 µM resveratrol, 2,5 µM olaparib+50 µM resveratrol, 2,5 µM olaparib+100 µM resveratrol, 5 µM olaparib+50 µM resveratrol, 5 µM olaparib+100 µM resveratrol ile tedavi edildi. 72 saat süreyle tedavi edilen hücreler tripsinizasyon işlemiyle toplandı ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ile konsantrasyonu belirlenen eşit miktarda protein örnekleri SDS-PAGE jelde koşturularak PVDF membrana transfer edildikten sonra ilgili primer ve sekonder antikorlarla inkübe edildi ve son olarak enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktarılarak cPARP, p53 ve p21 protein ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. B. Taranan bantların analizi Image J programı kullanılarak gerçekleştirildi

DMSO ile tedavi edilen kontrol hücreleriyle (0 μ M) karşılaştırıldığında, tüm tedavi gruplarında cPARP protein miktarının arttığı, p53 protein miktarının ılımlı olarak arttığı ve p21 protein miktarının ise azaldığı belirlendi (Şekil 4.8.A ve B). Bantların densitometrik analizi yapıldığında, kombine tedavilerden özellikle 2,5 μ M olaparib+100 μ M resveratrol, 5 μ M olaparib+50 μ M resveratrol, 5 μ M olaparib+100 μ M ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde kontrole ve diğer tedavilere kıyasla cPARP protein miktarındaki artışın önemli oranda daha fazla olduğu dikkat çekti. Aynı şekilde, yine bu kombine tedavi gruplarında kontrol hücrelerine kıyasla p21 protein miktarında anlamlı ölçüde bir azalma belirlendi (Şekil 4.8.A ve B).

4.6 PARP1/2 İnhibitörü Olaparibe Karşı Dirençli Meme Kanseri Hücrelerinin Koloni Sağ Kalımı Bulguları

BRCA ile ilişkili kanserin tedavisi için güçlü PARP inhibitörlerinin denemeleri, henüz değerlendirmenin erken aşamalarında ve hastalardan alınan materyaldeki direnç mekanizmalarını değerlendirmek henüz mümkün değildir. Bununla birlikte, bazıları BRCA1 veya BRCA2 mutasyonlarını barındıran yumurtalık karsinomu hastaları, uzun süredir, muhtemelen BRCA seçici etkilerini PARP inhibitörlerine benzer bir mekanizma ile gösteren sisplatin ve karboplatin gibi ajanlarla tedavi edilmiştir. Yumurtalık kanseri olan BRCA1 veya BRCA2 mutasyon taşıyıcıları, ailede hastalık öyküsü olmayan hastalara göre karboplatine daha iyi yanıt verme eğilimindedir; ancak, direnç eninde sonunda ortaya çıkar (Edwards et al., 2008). PARP inhibitörleri pre-klinik ve klinik araştırmalarda başarılı sonuçlar sağlamasına rağmen konvansiyonel kanser tedavilerinde olduğu gibi zamanla ilgili tedaviye karşı direnç gelişmektedir (D'Andrea, 2018; Frizzell and Kraus, 2009). Resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisinin olaparib dirençli hücrelerdeki etkisinin araştırılması amacıyla olaparibe karşı dirençli (PIR: PARP inhibitor resistant) MCF-7 meme kanseri hücreleri oluşturuldu (MCF-7/PIR). Çalışma kapsamında, logaritmik büyüme eğrisine sahip 5×10^5 MCF-7 hücresi 6-cm hücre kültürü plakasına ekildi ve sonraki gün 1 μ M olaparib tedavisi başlatıldı. İlaçlı besiyeri 3-4 günde bir tazelenildi. İlaç dozları her hafta düzenli aralıklarla (yaklaşık x1,25) arttırılarak olaparibe direnç kazanan hücrelerin seleksiyonu sağlandı. Koloni sağ-kalım deneyi için $1,5 \times 10^3$ MCF-7/parental ve MCF-7/PIR hücresi 6-cm petri kaplarına ekildi. Ekim işleminden 24 saat sonra ilgili hücreler DMSO (0 μ M) veya olaparib (1,25 – 2,5 – 5 μ M) ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Tedavi sonrasında ilaçlı besiyeri aspire edildi, hücreler

PBS ile yıkandıktan sonra taze ilaçsız besiyeri eklenerek %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe 10-12 gün süreyle inkübe edildi. Koloni oluşumları düzenli olarak mikroskop altında incelendi. Metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika süreyle fikse edilen koloniler %0,5 kristal viyole boyası ile 15 dakika boyunca boyandı. Sonrasında petri ler musluk suyu ile dikkatlice yıkanarak kurumaları için gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Taranan kolonilerin analizi Image J programı kullanılarak gerçekleştirildi. Parental ve PIR tedavi gruplarının sağ-kalım oranı (SF%) ilgili kontrol gruplarının ekim yeterliliğine (PE%) normalize edildi. Sonuçlar MCF-7 hücrelerinde olaparibe karşı direnç oluşturulduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. PARP1/2 inhibitörü olan olaparibe karşı dirençli MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni sağ kalımı deneyi sonuçları. Koloni sağ-kalım deneyi için $1,5 \times 10^3$ MCF-7/parental ve MCF-7/PIR hücresi 6-cm petri kaplarına ekildi. Ekim işleminden 24 saat sonra ilgili hücreler DMSO (0 µM) veya olaparib (1,25 – 2,5 – 5 µM) ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Tedavi sonrasında ilaçlı besiyeri aspire edildi, hücreler PBS ile yıkandıktan sonra taze ilaçsız besiyeri eklenerek %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe 10-12 gün süreyle inkübe edildi. Koloni oluşumları düzenli olarak mikroskop altında incelendi. Metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika süreyle fikse edilen koloniler %0,5 kristal viyole boyası ile 15 dakika boyunca boyandı. Sonrasında petri ler musluk suyu ile dikkatlice yıkanarak kurumaları için gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Taranan kolonilerin analizi Image J programı kullanılarak gerçekleştirildi

4.7. Resveratrol ve Olaparib ile Kombine Tedavi Edilen Olaparib-Dirençli Meme Kanseri Hücrelerinde (MCF-7/PIR) Hücre Canlılığı, Koloni Sağ-kalımı ve 3D Tümör Oluşumu Bulguları

Kazanılmış ilaç direnci kanser tedavisi için büyük bir zorluktur. Kemorezistansın gelişimi, ilaç inaktivasyonunun artmasına ve ilaç hedefinin mutasyonu dahil olmak üzere çok çeşitli mekanizmalara neden olabilir. Aslında kemo-dirençli hücreler sınırsız çoğalma potansiyelini korur, apoptozdan korunur ve patolojik anjiyogenezi uyararak metastatik hastalığın ilerlemesini teşvik eder. Dirençli kanser hücrelerinin ortaya çıkmasının üstesinden gelmenin veya geciktirmenin olası bir yolu, farklı moleküler mekanizmalara

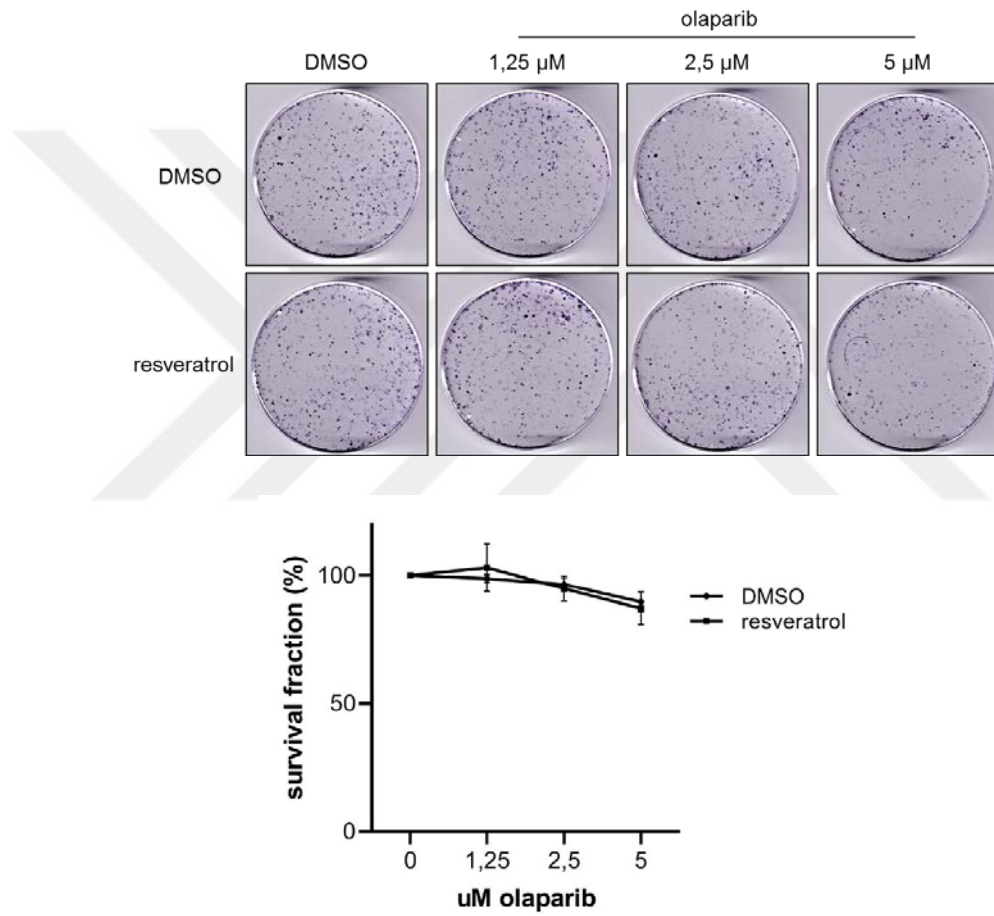
sahip ilaçları birlikte uygulamaktır. Doğal polifenollerin antikanser ilaçlarla kombinasyon tedavileri umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır (Riahi-Chebbi et al., 2019).

MCF-7/PIR hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen hücre canlılığı analizleri gerçekleştirilerek resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisinin olaparib-dirençli MCF-7 hücrelerin canlılığına olan etkisi belirlendi ve kombinasyon indeksi (CI) değerleri hesaplandı. CI değerleri MCF-7/PIR hücrelerinde bu kombinasyonun sinerjistik etki göstermediğini ortaya koydu.

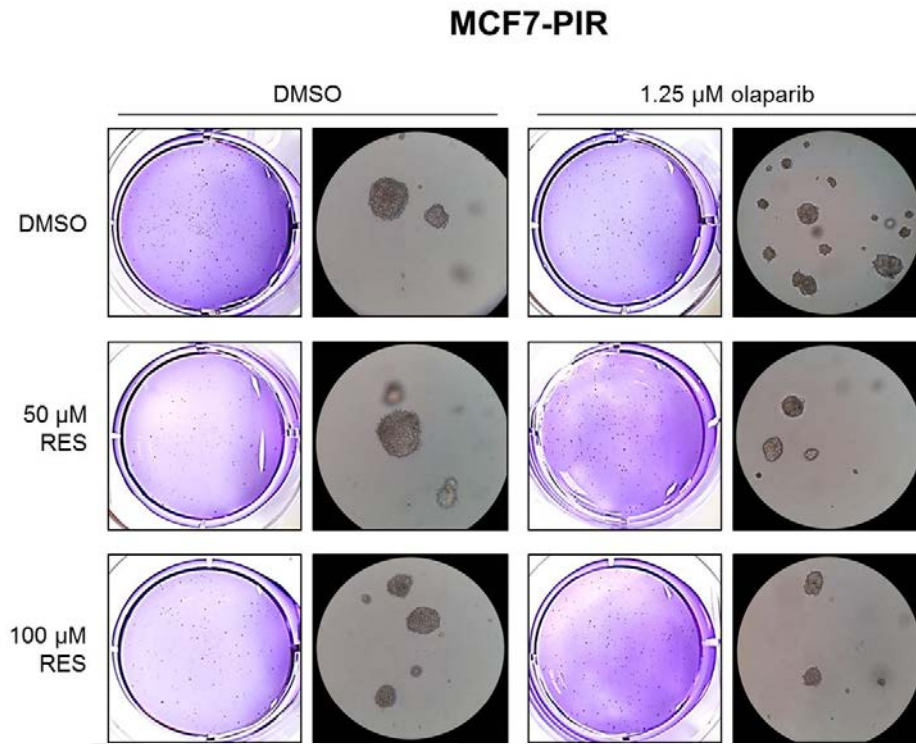
Koloni sağkalımı analizi, tek bir hücrenin *in vitro* koloniler oluşturma kapasitesini ölçer. *In vitro* kültürlerden ve ayrıca farklı kökenlerden gelen *ex vivo* doku preparasyonlarından elde edilen kendi kendini yenileyen memeli hücrelerini tanımlamak ve ölçmek için yaygın olarak kullanılır. 2D koloni sağkalımı ile temel onkolojik ve radyobiolojik çalışmaların gerçekleştirilmesinin önü açılmıştır (Brix vd., 2021). MCF-7/PIR hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni sağ-kalım deneyleri gerçekleştirilerek resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisinin olaparib-dirençli MCF-7 hücrelerin sağ-kalımına olan etkisi belirlendi ve sonuçlar parental hücreler ile karşılaştırıldı. Olaparib ve resveratrol kombinasyonunun MCF-7/PIR hücrelerinde koloni oluşumunu baskılama potansiyelinde hem kontrol grubuna hem de parental hücrelere göre anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.10).

Soft agarda hücrelerin büyümesi, normal hücreler tipik olarak yarı katı matrislerde büyüme yeteneğine sahip olmadığından, hücrel transformasyonun ve kontrolsüz hücre büyümesinin ayırt edici özelliklerinden biridir. Kanser hücresi dönüşümünü saptamak ve kanser hedeflerini doğrulamak için kullanılan soft agar ilaç duyarlılığı analizleri, insan tümörü klonojenik tahlili geliştirildiğinden beri antikanser bileşiklerini test etmek için kullanılmaktadır. Ek olarak, soft agar gibi 3 boyutlu (3-D) bir formatta ilaç ve bileşiklerin test edilmesinin, 3-D'deki hücre büyümesi *in vivo* hücrel ortama daha çok benzediği için, tek tabakalı kültürlerin kullanılmasından daha üstün olduğu öne sürülmektedir. Normal epitel hücreleri, hayatta kalma ve çoğalma sinyalleri sağlayan bazal membranlar tarafından desteklenir ve süspansiyon kültürüne yerleştirildiğinde apoptoza uğrar. Ancak kanser hücreleri, kontrolsüz çoğalmaya yol açan bağlanma ile düzenlenen apoptozdan (anoikis) kaçabilir. Bu nedenle, ankrajdan bağımsız koşullar kullanan analizler, dönüştürülmüş hücrelerin normale dönmesine neden olan ve ankrajdan bağımsız koşullar

altında hücre büyümesini engelleyen bileşikleri test etmek için geliştirilmiştir (Anderson vd., 2007). MCF-7/PIR hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen soft agar deneyleri resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisinin olaparib-dirençli MCF-7 hücrelerinin tümör oluşturma kapasiteleri üzerine olan etkisi belirlendi ve sonuçlar parental hücreler ile karşılaştırıldı. Bulgular (Şekil 4.11), resveratrol+olaparib kombinasyonunun oluşan tümörleri hem kontrol grubuna hem de parental hücelere göre sayıca önemli ölçüde azaltmadığını ve hacimlerini küçültmediğini göstermektedir.



Şekil 4.10. Resveratrol ve olaparib kombine tedavi edilen Olaparib-dirençli MCF-7 meme kanseri hücrelerinin (MCF-7/PIR) koloni sağ kalımı deneyi sonuçları. MCF-7/PIR hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni sağ-kalım deneyleri gerçekleştirilerek resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisinin olaparib-dirençli MCF-7 hücrelerin sağ-kalımına olan etkisi belirlendi ve sonuçlar parental hücreler ile karşılaştırıldı. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplanarak sonuçlar ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi



Şekil 4.11. Resveratrol ve olaparib ile kombine tedavi edilen Olaparib-dirençli meme kanseri hücrelerinin (MCF-7/PIR) 3D tümör oluşturma kapasitesi. MCF-7/PIR hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen soft agar deneyleri resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisinin olaparib-dirençli MCF-7 hücrelerinin tümör oluşturma kapasiteleri üzerine olan etkisi belirlendi ve sonuçlar parental hücreler ile karşılaştırıldı. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplanarak sonuçlar ortalama±standard sapma (SD) olarak verildi

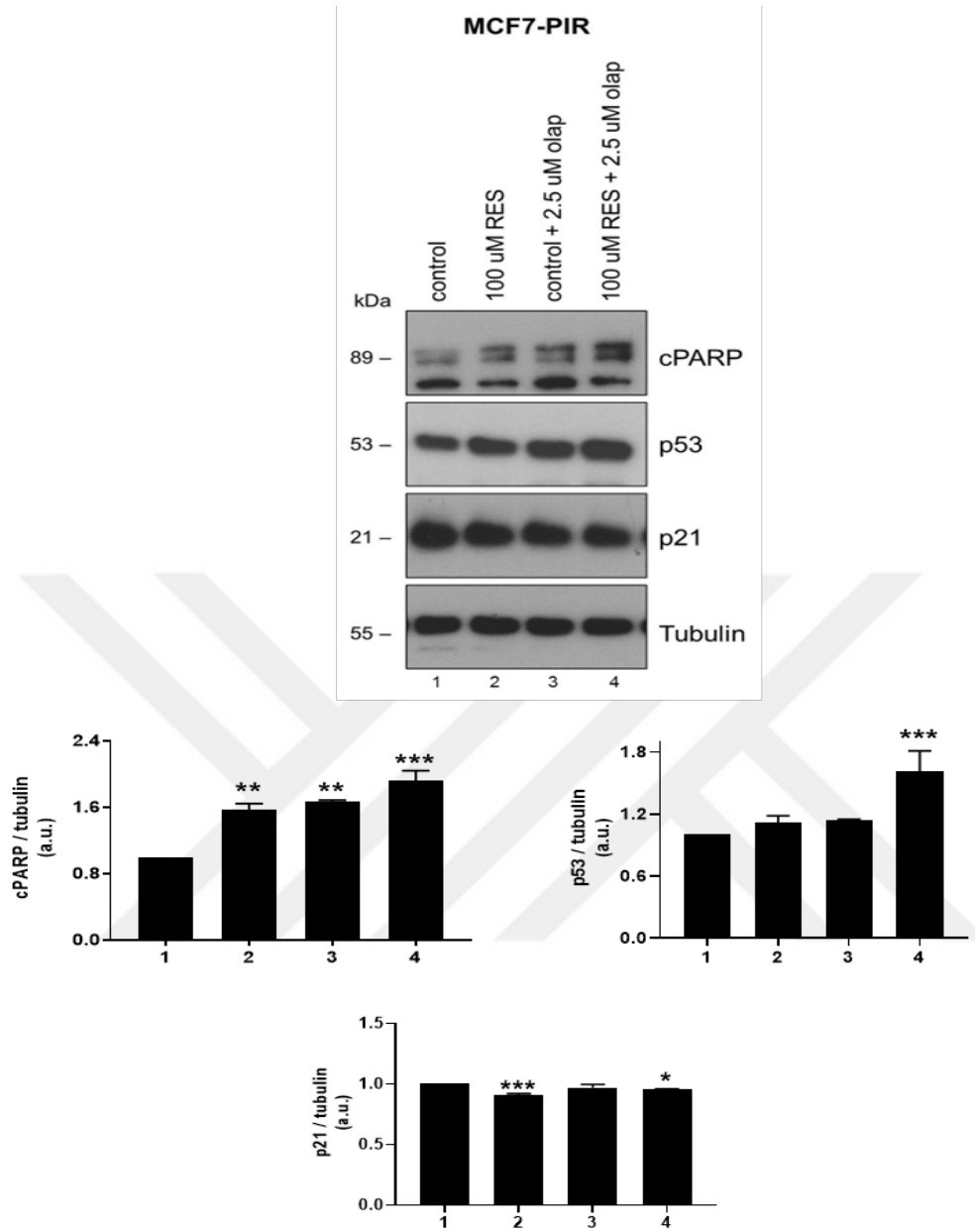
4.8 Resveratrol ve Olaparib ile Kombine Tedavi Edilen Olaparib-Dirençli Meme Kanseri Hücrelerinde (MCF-7/PIR) Hücre Döngüsü, DNA Hasar/Tamir ve Apoptosis Proteinlerinin İfade Düzeylerine Ait Bulgular

İlaç direnci, hastalıklar farmasötik tedavilere toleranslı hale geldiğinde ortaya çıkan iyi bilinen bir olgudur. Birçok kanser türü başlangıçta kemoterapiye duyarlı olsa da, zamanla bunlar DNA mutasyonları, ilaç inhibisyonunu ve bozulmasını destekleyen metabolik değişiklikler gibi diğer mekanizmalar yoluyla direnç geliştirebilirler. Kanser ilacı direnci, ilaç inaktivasyonu, ilaç hedef değişikliği, ilaç akışı, DNA hasarı onarımı, hücre ölümü inhibisyonu, doğal hücre heterojenliği, epigenetik etkiler veya bu mekanizmaların herhangi bir kombinasyonundan etkilenen karmaşık bir olgudur. Mevcut paradigma, kombinasyon tedavisinin en iyi tedavi seçeneği olması gerektiğini, çünkü ilaç direncinin gelişmesini engellemesi ve tek başına herhangi bir ilaçtan daha etkili olması gerektiğini belirtmektedir. Bu nedenle, kanserlerde artan ilaç direnci prevalansına karşı koymak için bu tür tedavi rejimleri düşünülmeli ve geliştirilmelidir (Housman vd., 2014). Resveratrol

ve olaparib mono- ve kombinasyon tedavilerinin hücre döngüsü, DNA hasar yanıt/tamir ve apoptosis yollarında rol oynayan önemli proteinlerin (p53, p21, cleaved-PARP) post-translasyonel ifadelerine olan etkileri Western blot analiziyle tespit edildi. 10-cm hücre kültür kutularına ekimi gerçekleştirilen 1×10^6 olaparib dirençli MCF-7 (MCF-7/PIR) hücrelerinin ertesi gün 100 μ M resveratrol, 2,5 μ M olaparib ve kombinasyon olarak 2,5 μ M olaparib+100 μ M resveratrol olacak şekilde 72 saat süreyle tedaviler gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisinin MCF7-PIR hücrelerinde kontrol grubuna göre p53 ve cPARP protein miktarını anlamlı ölçüde arttırdığı, p21 protein miktarında ise ılımlı bir regüle edici rol oynadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.12).

Gerçekleştirdiğimiz araştırmaların amacı, Resveratrol tedavisinin RAD51 gen ifadesini azaltmasıyla DNA çift zincir kırıklarının tamirinden sorumlu olan homolog rekombinasyon onarım mekanizmasını baskıladığı (Leon-Galicia vd., 2018), öte yandan homolog rekombinasyon onarım mekanizmasının tam olarak çalışmadığı meme kanseri hücrelerinin PARP1/2 inhibitör tedavisine karşı yüksek duyarlılık gösterdiği (Bryant vd., 2005; Farmer vd., 2005) çalışmalar dikkate alındığında, resveratrol tedavisinin PARP1/2 inhibitörlerinin meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkilerini arttıran yeni bir prediktif biyobelirteç olabileceğini ortaya koymaktır.

Çeşitli çalışmalar, doğal bir bitkisel bileşik olan resveratrolün meme, deri, akciğer, prostat ve kolon kanserleri gibi çok çeşitli insan kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebildiğini göstermiştir (Mao vd., 2010; Vanamala vd., 2010). Birçok kemoterapi ilacı, hücrelerin DNA'sında hasar oluşturarak kanser hücrelerini yok eder. Bununla birlikte, kanser vakalarının %50'sinde, kötü huylu hücreler, DNA onarım proteinlerinin yukarı regülasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla tedaviden sağ kurtulur (Kelley vd., 2014). HR yolu, kemoterapiye karşı içsel ve kazanılmış dirençle ilgili bir DNA onarım mekanizması olarak giderek daha fazla tanınmaktadır (Bouwman ve Jonkers, 2012). Önceki bir çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde DNA mikrodizi analizi ile Rad51, BRCA1 ve BRCA2 gibi HR tarafından DNA onarımında yer alan birkaç DNA onarım geninin ekspresyonunun resveratrol tarafından aşağı regüle edildiğini gözlemlenmiştir (Leon-Galicia vd., 2013).



Şekil 4.12. Resveratrol ve olaparib ile kombine tedavi edilen Olaparib-dirençli MCF-7 meme kanseri hücrelerinde (MCF-7/PIR) hücre döngüsü, DNA hasar/tamir ve apoptosis proteinlerinin ifade düzeyleri. Resveratrol ve olaparib mono- ve kombinasyon tedavilerinin hücre döngüsü, DNA hasar yanıt/tamir ve apoptosis yollarında rol oynayan önemli proteinlerin (p53, p21, cleaved-PARP) post-translasyonel ifadelerine olan etkileri Western blot analiziyle tespit edildi. 10-cm hücre kültür kutularına ekimi gerçekleştirilen 1×10^6 olaparib dirençli MCF-7 (MCF-7/PIR) hücrelerinin ertesi gün 100 μ M resveratrol, 2,5 μ M olaparib ve kombinasyon olarak 2,5 μ M olaparib+100 μ M resveratrol olacak şekilde 72 saat süreyle tedaviler gerçekleştirildi. Ardından hücreler tripsinizasyon işlemiyle toplandı ve total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ile konsantrasyonu belirlenen eşit miktarda protein örnekleri SDS-PAGE jelde koşturularak PVDF membrana transfer edildikten sonra ilgili primer ve sekonder antikorlarla inkübe edildi ve son olarak enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktarılarak cPARP, p53 ve p21 protein ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. Taranan bantların analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. Deneysel üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplanarak sonuçlar ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirilmesi, GraphPad Prism version 8.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) programı kullanılarak yapıldı. Bulgular t-testi ve One-Way Anova testi ile değerlendirildi. P değeri 0,05 (*), 0,01 (**), veya 0,001 (***)'den küçük neticeler anlamlı kabul edildi

Rad51, HR yolunun önemli bir parçasıdır ve HR etkinliğinin bir ölçümü olarak DNA hasarı ortaya çıktıktan sonra Rad51 odakları oluşur (Farmer vd., 2005). Kanser hücrelerinde Rad51 aşırı ekspresyonunun artmış kemorezistans ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Hannay vd., 2007). Diğer bulgular, Rad51'in antikanser ilaçlar tarafından aşağı regülasyonunun, HR onarımını, radyo-duyarlılaştırıcı veya kemosenitize edici kanser hücrelerini bozduğunu göstermiştir. Örneğin, imatinib (Gleevec, c-Abl tirozin kinaz inhibitörü), kanser hücrelerinde Rad51 ekspresyonunu etkili bir şekilde azaltır (Choudhury vd., 2009). Seçici bir epidermal büyüme faktörü reseptörü ve tirozin kinaz inhibitörü olan gefitinib, akciğer kanseri hücrelerinde Rad51'i mitomisin C (Kov d., 2008) ve gemsitabine (Tsai vd., 2010) duyarlı hale getirerek aşağı regüle eder. Başka bir çalışmada resveratrolün MCF-7 kanser hücrelerinde Rad51 ekspresyonunu etkili bir şekilde aşağı regüle ettiği bildirilmiştir (Leon-Galicia vd., 2018).

Resveratrolün yüksek konsantrasyonlarda hücreler ve dokular tarafından emilme kabiliyetinin kısıtlı olması, insanlarda tedavi için bir zorluk olarak görülmektedir. Araştırmacılar yakın zamanda resveratrolün kimyasal stabilitesini, biyoyararlanımını ve terapötik etkinliğini iyileştirmeye çalıştılar (Meng vd., 2016; Uberti vd., 2017). Örneğin, biberde bulunan aktif bileşik olan piperin, sıçanlarda kandaki resveratrol seviyelerini 1000 kat arttırdı ve ana metabolitlerinden birinin oluşumunu geciktirdi (Johnson vd., 2011). Buna ek olarak, nanoteknoloji ve çeşitli formülasyonlarda resveratrolün nano parçacıklarının kullanımı ile sıçan denemelerinde umut verici sonuçlar ortaya çıkmıştır (Frezza vd., 2010). Öte yandan, resveratrolün farmakokinetik özelliklerini geliştirmek ve kanserden koruma aktivitesini genişletmek için başka bir strateji, sentetik analogların sentezidir ve *in vitro* modellerde birkaç resveratrol analogu tanımlanmıştır (Leon-Galicia vd., 2018). Resveratrolün umut verici bir analogu, çeşitli kanser hücre hatlarında ve hayvan modellerinde antiproliferatif aktivite gösteren 3,4,5,4'-trans-tetrametoksistilbendir (Sale vd., 2004; Androutsopoulos vd., 2016).

BRCA1/2-mutant kanser hastalarına uygulanan PARP inhibitör tedavisi başarılı sonuçlar sağlamasına rağmen wild-type BRCA1/2 statüsünün de PARP inhibitör hassasiyeti sağlayabileceğini ortaya çıkaran prelinik ve klinik araştırmalar, farklı DDR regülatörlerinin de PARP inhibitör yanıt biyobelirteci olarak kullanılabilirliğini göstermiştir (Cleary et al., 2020; Huang et al., 2020; Jackson and Helleday, 2016;

Nickoloff et al., 2017; Pilié, Gay, et al., 2019; Pilié, Tang, et al., 2019). Bajrami ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada (2014), genome-wide sentetik letalite taraması uygulanarak potansiyel PARP inhibitör yanıt belirleyici genler araştırılmıştır. 16 binden fazla protein kodlayan gen mRNA'sını hedefleyen yaklaşık 60 bin shRNA kompleksinin uygulandığı çalışmada, ekspresyonu baskılanan genlerin MCF7 hücrelerinde PARP inhibitör sitotoksitesine olan katkıları incelenmiştir. Söz konusu çalışmada, *MUM1* geninin de PARP inhibitör prediktif biyobelirteci olma potansiyeli taşıyan genler arasında bulunduğunu ileri sürülmüş ancak bunu kanıtlayan herhangi bir çalışmanın olmadığı belirtilmiştir (Bajrami et al., 2014). Çok sayıda genin aktivitesini engelleyen shRNA havuzunun kullanılmasıyla gerçekleştirilen çalışma da yalnızca CDK12 geninin potansiyel biyobelirteç olma kapasitesi direk analizlerle teyit edilmiştir. Bahsi geçen diğer potansiyel genlerin MCF-7 hücrelerindeki mevcut ekspresyonu ve shRNA muamelesi sonrasında baskılanan ekspresyonları konfirme edilmemiştir (Bajrami et al., 2014). Nitekim, araştırmalarımıza başlamadan önce gerçekleştirdiğimiz ön çalışmalarda, diğer model hücre hatlarıyla kıyaslandığında laboratuvarımızda bulunan MCF-7 hücrelerindeki MUM1 ifadesinin çok sınırlı olduğu belirlendi.

p53, başlıca tümör baskılayıcılardan biridir ve insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan genlerdendir (Tokino vd., 2005). DNA hasarı gibi hücresel stres altında, p53, hücre döngüsü durmasına yol açan bir transkripsiyon faktörü olarak aktive edilir ve bir hücrenin DNA'sını onarmasına veya apoptoza girmesine izin verir (Pflaum vd., 2014). p53, öncelikle en iyi karakterize edilmiş aşağı akış geni olan ve bir sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörünü kodlayan p21'in aktivasyonu yoluyla G1 tutuklanmasını indükler (Waldman vd., 1995). p21, p53'ün en iyi bilinen aşağı akış genlerinden biridir, G1 hücre döngüsü durmasını indükler ve hücre apoptozunu inhibe eder (Pflaum vd., 2014; Luo vd., 2022). p21, N-terminal CDK kinaz motifi ile etkileşimi yoluyla sikline bağımlı bir kinaz (CDK) inhibitörüdür ve G1 arrestine neden olur (Xiao vd., 2020). p21'in bir diğer önemli rolü apoptozu engellemektir; p21 sitoplazmada prokaspaz-3'e ve apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1'e (ASK1) bağlanır ve onu inhibe eder, böylece apoptotik yolu bloke eder (Zhan vd., 2007). p21 esas olarak DNA hasarı üzerine p53 tarafından transkripsiyonel seviyede düzenlenmesine rağmen, translasyon sonrası modifikasyonlar ayrıca ubiquitin aracılı proteazom bozunma sistemi yoluyla p21'in düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (Li vd., 2018; Luo vd., 2022). Poli(adenosin difosfat [ADP]-riboz)

polimeraz (PARP), DNA zincir kırılmaları yoluyla aktive olan hücrel enzim ailesidir. PARP aktivasyonu, nikotinamid adenin dinükleotidi kullanılarak poli(ADP-riboz) polimerlerinin büyük dallanma zincirlerinin sentezine yol açar. Bu poli(ADP-riboz) polimerler, çok çeşitli hücrel proteinlerin fonksiyonlarını bağlayabilir ve değiştirebilir (Gagne vd., 2008). Aktive PARP, DNA onarımını, hücrel proliferasyonu ve PARP'a bağlı apoptoz ve nekroz dahil olmak üzere diğer kritik hücre döngüsü proteinlerine ve onkogenlere sinyal göndermeyi kolaylaştırır (Woodhouse ve Dianov, 2008). Bu aktivasyon tek ve çift zincir kopmaları ile indüklenebilse de, baz eksizyon yoluyla tek zincir kopmalarındaki rolü daha kapsamlı olarak incelenmiştir (Fisher vd., 2007). Bu çalışmadaki bulgular, resveratrol ve olaparib kombinasyon tedavisinin; meme kanseri hücre canlılığı, koloni sağ-kalımı ve 3D tümör oluşturma kapasitesi üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu ve hücre döngüsü, DNA hasar yanıt/tamir ve apoptosis yollarında rol oynayan önemli proteinlerinden olan p53, p21 ve cleaved-PARP'ın (cPARP) post-translasyonel ifadelerini regüle ettiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, DNA metabolizmasını düzenleyen kromatin faktörlerinin ve DDR regülatörlerinin, başta PARP inhibitör tedavisi olmak üzere çok sayıda DDR-hedefli kişiselleştirilmiş anti-kanser tedavi yanıtının tahmin edilmesindeki klinik önemi dikkate alındığında (Aleksandrov et al., 2020; N. J. Curtin, 2013; Nicola J. Curtin, 2012; Helleday et al., 2008; Huang et al., 2020; Jackson and Helleday, 2016; Nickoloff et al., 2017; Pilié, Tang, et al., 2019), gerçekleştirdiğimiz çalışmalar resveratrol ile birlikte tedavi, daha yüksek dozların eşdeğer etkisi için gereken olaparib konsantrasyonlarını etkili bir şekilde azalttı. Resveratrol HR onarımında kilit bir oyuncu olan Rad51'i aşağı regüle ederek hareket eder ve DSB'lerin onarımının bozulmasına yol açar. Resveratrolün düşük toksisitesi, onu kanser kemoterapisi ve kanserin önlenmesi için umut verici bir aday yapmaktadır. Bulgularımız, resveratrolün olaparib ile kombine halde kullanımının mekanistik rolünün tam olarak aydınlatılmasının ve fonksiyonel işlevinin in vivo çalışmalarla kanıtlanmasının klinikte PARP inhibitör tedavisine karşı hasta stratifikasyonunda önem arz edeceğini göstermiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar, resveratrolün PARP inhibitörü olarak ile kombine kullanımının MCF-7 meme kanseri hücrelerinin sağ-kalımını inhibe ettiği ve dolayısıyla resveratrolün PARP inhibitör etkinliğini arttıran bir ajan olma potansiyelini taşıdığına dair *in vitro* kanıtlar sunmaktadır. Resveratrol tedavisinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MRN ve RAD51 proteinlerinin ekspresyonlarını baskılayarak HR aktivitesini azalttığı dolayısıyla ilgili hücreleri cisplatin tedavisine karşı duyarlı hale getirdiği rapor edilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmalarla, hücre döngüsü, DNA hasar yanıt/tamir ve apoptozis yollarında rol oynayan önemli proteinlerin (p53, p21, cleaved-PARP) post-translasyonel ifadelerinin regüle edilmesinde bu kombinasyonun önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Resveratrolün PARP1/2 inhibisyonundaki etkisinin açıklığa kavuşturulması, söz konusu ajanlarla gerçekleştirilecek olan kişiye özgü meme kanseri tedavilerinden daha fazla hastanın yararlanmasını amaçlayan tedavi stratejilerinin ve ürünlerinin geliştirilmesi noktasında klinik öncesi literatüre katkı sağlayacaktır. Dolayısıyla gelecekte yapılacak “kişiye özgü meme kanseri tedavisi”, “sentetik letalite”, “PARP1/2 inhibitör duyarlılık/direnç mekanizmaları”, “bireyselleştirilmiş kanser tedavisinde fitokimyasal polifenolik bileşikler” alanlarındaki daha kapsamlı araştırmalara katkı sağlayacaktır. Son olarak, gelecekteki araştırmalarla resveratrol ve olaparib arasında tanımlanan sinerjistik etkileşimin *in vivo* modellerde doğrulanması (ör. subkütan tümör xenograft model), resveratrolün klinik öneminin anlaşılmasına fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR LİSTESİ

Abby Bloch, C. A. T. (1995). Position of the American Dietetic Association - Phytochemicals and Functional Foods. *Journal of the American Dietetic Association*.

Akkuzu, M. Z., Küçüköner, M., Irtegun, S., Akdeniz, N., Uraççı, Z., Kaplan, A., Büyükbayram, H., ve Işıkdoğan, A. (2019). Özgün Araştırma / Original Article Meme Kanserinde Brca-1 ve Brca-2’de Sık Görülen Polimorfizm Mutasyonların Bölgemizde Varlığı. *Dicle Med J*, 46(4), 623–631. <https://doi.org/10.5798/dicletip>.

Aleksandrov, R., Hristova, R., Stoyanov, S., and Gospodinov, A. (2020). The Chromatin Response to Double-Strand DNA Breaks and Their Repair. *Cells*, 9(1853), 1–45.

Andrea, A. D. D. (2018). Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair*, xxxx, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.021>.

Andresen, T. L., Jensen, S. S., and Jørgensen, K. (2005). Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progress in Lipid Research*, 44(1), 68–97. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.12.001>.

Antolin, A. A., Ameratunga, M., Banerji, U., Clarke, P. A., Workman, P., and Al Lazikani, B. (2020). The kinase polypharmacology landscape of clinical PARP inhibitors. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59074-4>.

Antoniou, A. C., and Easton, D. F. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*, 25(43), 5898–5905. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209879>.

Auyang, S. Y. (2006). Cancer causes and cancer research on many levels of complexity. *Cancer*, 1–15.

Aydıntuğ, S. (2004). Meme Kanserinde Erken Tanı. *Türk Tabipler Birliği Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 13(6), 226–228.

Badawi, J. K. (2023). Resveratrol used as nanotherapeutic: a promising additional therapeutic tool against hormone-sensitive, hormone-insensitive and resistant prostate cancer. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 11(1), 1–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36923720> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC10009313>.

Bai, Y., Mao, Q. Q., Qin, J., Zheng, X. Y., Wang, Y. Bin, Yang, K., Shen, H. F., and Xie, L. P. (2010). Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Science*, 101(2), 488–493. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01415.x>.

- Bajrami, I., Frankum, J. R., Konde, A., Miller, R. E., Rehman, F. L., Brough, R., Campbell, J., Sims, D., Rafiq, R., Hooper, S., Chen, L., Kozarewa, I., Assiotis, I., Fenwick, K., Natrajan, R., Lord, C. J., and Ashworth, A. (2014). Genome-wide Profiling of Genetic Synthetic Lethality Identifies CDK12 as a Novel Determinant of PARP1/2 Inhibitor Sensitivity. *Cancer Research*, 74(1), 287–297. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2541>.
- Baur, J. A., and Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493–506. <https://doi.org/10.1038/nrd2060>.
- Bayik, A., Sa, O. H., ve Dal, A. B. (1989). Kanser epidemiyolojisi.
- Bochum, S., Berger, S., and Martens, U. M. (n.d.). Olaparib. 217–233. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8>.
- Boocock, D. J., Faust, G. E. S., Patel, K. R., Schinas, A. M., Brown, V. A., Ducharme, M. P., Booth, T. D., Crowell, J. A., Perloff, M., Gescher, A. J., Steward, W. P., and Brenner, D. E. (2007). Phase I Dose Escalation Pharmacokinetic Study in Healthy Volunteers of Resveratrol , a Potential Cancer Chemopreventive Agent. 16(June), 1246–1252. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0022>.
- Bordoloi, D., Banik, K., Shabnam, B., Padmavathi, G., Monisha, J., Arfuso, F., Dharmarajan, A., Mao, X., Lim, L. H. K., Wang, L., Fan, L., Hui, K. M., Kumar, A. P., Sethi, G., and Kunnumakkara, A. B. (2018). TIPE Family of Proteins and Its Implications in Different Chronic Diseases. <https://doi.org/10.3390/ijms19102974>.
- Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M. K., Tauler, J., Bikkavilli, R. K., and Winn, R. A. (2014). The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 92, 51998. <https://doi.org/10.3791/5199>.
- Boyle, P., and Levin, B. (2008). World cancer report 2008.
- Brown, J. S., O’Carrigan, B., Jackson, S. P., and Yap, T. A. (2017). Targeting DNA repair in cancer: Beyond PARP inhibitors. *Cancer Discovery*, 7(1), 20–37. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0860>.
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913–917. <https://doi.org/10.1038/nature03443>.
- Cetintas, V. B., Kucukaslan, A. S., Kosova, B., Tetik, A., Selvi, N., Cok, G., Gunduz, C., ve Eroglu, Z. (2012). Cisplatin resistance induced by decreased apoptotic activity in non-small-cell lung cancer cell lines. *Cell Biology International*, 36(3), 261–265. <https://doi.org/10.1042/cbi20110329>
- Chou, T. C. (2011). The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research. *Integrative Biology*, 3(5), 548–559. <https://doi.org/10.1039/c0ib00130a>.

- Chou, T. C., and Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22(C), 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4).
- Choudhari, A. S., Mandave, P. C., Deshpande, M., Ranjekar, P., and Prakash, O. (2020). Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. *Frontiers in Pharmacology*, 10(January), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01614>.
- Cleary, J. M., Aguirre, A. J., Shapiro, G. I., and D'Andrea, A. D. (2020). Biomarker-Guided Development of DNA Repair Inhibitors. *Molecular Cell*, 18(78), 1070–1085. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.035>.
- Com, I., Wheat, J., and Currie, G. (2012). Herbal medicine for cancer patients: An evidence based review. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, 5(2), 1–11. <https://doi.org/10.5580/502>.
- Curtin, N. J. (2013). Inhibiting the DNA damage response as a therapeutic manoeuvre in cancer. In *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.12244>.
- Curtin, Nicola J. (2005). PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(4), 1–20. <https://doi.org/10.1017/S146239940500904X>.
- Curtin, Nicola J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, 12(12), 801–817. <https://doi.org/10.1038/nrc3399>.
- D'Andrea, A. D. (2018). Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair*, 71, 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.021>.
- Dancey, J. E., Bedard, P. L., Onetto, N., and Hudson, T. J. (2012). Review The Genetic Basis for Cancer Treatment Decisions. *Cell*, 148(3), 409–420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.014>.
- Dagogo-Jack, I., and Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>.
- Debele, B., Ege, K., and Dal, B. A. (2006). Mutasyon , DNA Hasarı ,Onarım Mekanizmaları ve Kanserle İlişkisi. *J. Fac. Pharm, Ankara*, 35(2), 149–170.
- Deeks, E. D. (2015). Olaparib: First global approval. *Drugs*, 75(2), 231–240. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0345-6>.
- DeSantis, C. E., Fedewa, S. A., Goding Sauer, A., Kramer, J. L., Smith, R. A., and Jemal, A. (2016). Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 31–42. <https://doi.org/10.3322/caac.21320>.

Dias, M. P., Moser, S. C., Ganesan, S., and Jonkers, J. (2021). Understanding and overcoming resistance to PARP inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(12), 773–791. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00532-x>.

Dréan, A., Lord, C. J., and Ashworth, A. (2016). PARP inhibitor combination therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 108, 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.10.010>.

Edwards, S. L., Brough, R., Lord, C. J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D. A., Boyd, J., Reis-filho, J. S., and Ashworth, A. (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in. 451(February), 1111–1116. <https://doi.org/10.1038/nature06548>.

European Medicines Agency (EMA) (2021). An overview of Libtayo and why it is authorised in the EU What is Libtayo and what is it used for? 44(0), 1–2. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/mylotarg-epar-summary-public_en.pdf.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M. B., Jackson, S. P., Smith, G. C. M., and Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917–921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>.

Ferrari, P., Rinaldi, S., Jenab, M., Lukanova, A., Olsen, A., Tjønneland, A., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Fagherazzi, G., Touillaud, M., Kaaks, R., Von Rüsten, A., Boeing, H., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Benetou, V., Grioni, S., Panico, S., Masala, G., ... Romieu, I. (2013). Dietary fiber intake and risk of hormonal receptor-defined breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97(2), 344–353. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.034025>.

Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., Allen, C., Hansen, G., Woodbrook, R., Wolfe, C., Hamadeh, R. R., Moore, A., Werdecker, A., Gessner, B. D., Te Ao, B., McMahon, B., Karimkhani, C., Yu, C., Cooke, G. S., ... Naghavi, M. (2015). The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncology*, 1(4), 505–527. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.0735>.

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.

Frisch, S. M., and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 124(4), 619–626. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.619>.

Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., and Stratton, M. R. (2001). Cancer and genomics. 409(February).

Galati, G., and O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287–303. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034>

Galicia, I. L., Chavez, J. D., Sanchez, M. E. A., Villa, E. G., and Cruz, R. B. (2018). Resveratrol decreases Rad51 expression and sensitizes cisplatin - resistant M breast cancer cells. 3025–3033. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6336>.

Gao, Q. J. F. W. L. C. W. (2022). Opportunities and challenges for co-delivery nanomedicines based on combination of phytochemicals with chemotherapeutic drugs in cancer treatment. <https://www.sciencedirect.com/>, 188.

Gelmon, K. A., Tischkowitz, M., Mackay, H., Swenerton, K., Robidoux, A., Tonkin, K., Hirte, H., Huntsman, D., Clemons, M., Gilks, B., Yerushalmi, R., Macpherson, E., Carmichael, J., and Oza, A. (2011). Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: A phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *The Lancet Oncology*, 12(9), 852–861. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70214-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70214-5).

Goode, E. L., Ulrich, C. M., and Potter, J. D. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 11(12), 1513–1530.

Gör, Ö., Nur, U., ve Kandaş, Ö. (2004). APOPTOSİS , PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ. 7–10.

Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W., and Giaccia, A. J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. In *Nature* (Vol. 379, Issue 6560, p. 88–91). <https://doi.org/10.1038/379088a0>.

Gültekin, M., ve Boztaş, G. (2014). Katkida Bulunanlar. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 43, 12–32.

Gültekin, N., Karaoğlu, K., ve Küçükates, E. (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarinin keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyoloji Derneği Arsivi*, 36(2), 120–130.

Gupta, S. C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J. H., and Aggarwal, B. B. (2011). Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 150–160. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05852.x>.

Thomas H. and HM.Coley. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on research of natural products. *Drugs of the Future*, 34(1), 53–59. <https://doi.org/10.1358/dof.2009.034.01.1317151>.

Heeke, A. L., Pishvaian, M. J., Lynce, F., Xiu, J., Brody, J. R., Chen, W.-J., Baker, T. M., Marshall, J. L., and Isaacs, C. (2018). Prevalence of Homologous Recombination-Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types. *JCO Precision Oncology*, 2, 1–13. <https://doi.org/10.1200/po.17.00286>.

Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(3), 193–204. <https://doi.org/10.1038/nrc2342>.

Hosseini, A., and Ghorbani, A. (2015). Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(2), 84–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25949949> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4418057>.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., and Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*, 6(3), 1769–1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>.

Huang, A., Garraway, L. A., Ashworth, A., and Weber, B. (2020). Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0046-z>.

Imyanitov, E., Hanson, K., and Zhivotovsky, B. (2005). Polymorphic variations in apoptotic genes and cancer predisposition. *Cell Death and Differentiation*, 12(8), 1004–1007. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401674>.

Jackson, S. P., and Helleday, T. (2016). Drugging DNA repair. *Science*, 352(6290), 1178–1179. <https://doi.org/10.1126/science.aab0958>.

Jang, M., Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V, Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., & Pezzuto, J. M. (2012). Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol , a Natural Product Derived from Grapes Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol , a Natural Product Derived from Grapes. 218(1997), 10–13. <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.218>.

Jimeno, A., and Hidalgo, M. (2006). Molecular biomarkers: Their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(4), 787–796. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0005>.

Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108(2), 153–164. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00625-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00625-6).

Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., ve Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>.

Karabekir, G., Demircan, G., ve Özdaş, Ş. (2017). Resveratrolün MCF-7 hücre soyunda apoptotik etkinin araştırılması Examining the apoptotic effect of resveratrol on MCF-7 cell strain. 3(1), 27–34. <https://doi.org/10.5606/fng.btd.2017.006>.

Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R. K., Audeh, M. W., Friedlander, M., Balmaña, J., Mitchell, G., Fried, G., Stemmer, S. M., Hubert, A., Rosengarten, O., Steiner, M., Loman, N., Bowen, K., Fielding, A., and Domchek, S. M. (2015). Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *Journal of Clinical Oncology*, 33(3), 244–250. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2728>.

Kaya, C. (2012). Apoptozis.

Khuda-Bukhsh, A. R., Das, S., and Saha, S. K. (2014). Molecular approaches toward targeted cancer prevention with some food plants and their products: Inflammatory and other signal pathways. *Nutrition and Cancer*, 66(2), 194–205. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.864420>.

Ko, J. H., Sethi, G., Um, J. Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., Bishayee, A., and Ahn, K. S. (2017). The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 1–36. <https://doi.org/10.3390/ijms18122589>.

Komarova, N. (2006). Stochastic modeling of drug resistance in cancer. 239, 351–366. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.08.003>.

Konieczkowski, D. J., Johannessen, C. M., and Garraway, L. A. (2018). A Convergence-Based Framework for Cancer Drug Resistance. *Cancer Cell*, 33(5), 801–815. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.025>.

Kotecha, R., Takami, A., and Espinoza, J. L. (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: A review of the clinical evidence. *Oncotarget*, 7(32), 52517–52529. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9593>.

Lagunas-rangel, F. A., and Mar, R. (2020). Natural Compounds That Target DNA Repair Pathways and Their Therapeutic Potential to Counteract Cancer Cells. 10(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.598174>.

Le Corre, L., Fustier, P., Chalabi, N., Bignon, Y. J., and Bernard-Gallon, D. (2004). Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. *Clinica Chimica Acta*, 344(1–2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.02.024>.

Lee, H. S., Ha, A. W., and Kim, W. K. (2012). Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutrition Research and Practice*, 6(4), 294–300. <https://doi.org/10.4162/nrp.2012.6.4.294>.

Lei, S., Zheng, R., Zhang, S., Wang, S., Chen, R., Sun, K., Zeng, H., Zhou, J., and Wei, W. (2021). Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020.

Leon-Galicia, I., Diaz-Chavez, J., Garcia-Villa, E., Uribe-Figueroa, L., Hidalgo-Miranda, A., Herrera, L. A., Alvarez-Rios, E., Garcia-Mena, J., and Gariglio, P. (2013). Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention*, 22(1), 11–20. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328353edcb>.

Lewandowska, U., Gorlach, S., Owczarek, K., Hrabec, E., and Szewczyk, K. (2014). Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 68(4468), 528–540. <https://doi.org/10.5604/17322693.1102278>.

Li, J., Wang, R., Kong, Y., Broman, M. M., Carlock, C., Chen, L., Li, Z., Farah, E., Ratliff, T. L., and Liu, X. (2017). Targeting Plk1 to Enhance Efficacy of Olaparib in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(3), 469–479. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0361>.

Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3 SUPPL.), 3–6. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.517s>.

Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134(12 SUPPL.), 3479–3485. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479s>.

Liu, X., Han, E. K., Anderson, M., Shi, Y., Semizarov, D., Wang, G., McGonigal, T., Roberts, L., Lasko, L., Palma, J., Zhu, G. D., Penning, T., Rosenberg, S., Giranda, V. L., Luo, Y., Levenson, J., Johnson, E. F., and Shoemaker, A. R. (2009). Acquired resistance to combination treatment with temozolomide and ABT-888 is mediated by both base excision repair and homologous recombination DNA repair pathways. *Molecular Cancer Research*, 7(10), 1686–1692. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0299>.

Majeed, W., Aslam, B., Javed, I., Khaliq, T., Muhammad, F., Ali, A., and Raza, A. (2014). Breast cancer: Major risk factors and recent developments in treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(8), 3353–3358.

Mateo, J., C. J. Lord, V. S., , A. Tutt, J. B., Castroviejo Bermejo, M., Cruz, C., Oaknin, A., S. B. Kaye, and J.S. de Bono. (2019). A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Annals of Oncology*.

Michels, J., Vitale, I., Sapparbaev, M., Castedo, M., and Kroemer, G. (2013). Predictive biomarkers for cancer therapy with PARP inhibitors. *Oncogene*, 33(30), 3894–3907. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.352>.

Nagata, S., and Factor, D. (1997). Apoptosis by Death Factor. 88, 355–365.

Nakagawa, H., Kiyozuka, Y., Uemura, Y., Senzaki, H., Shikata, N., Hioki, K., and Tsubura, A. (2001). Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid , a potent breast cancer cell stimulator. 258–264.

Ndiaye, M., Kumar, R., and Ahmad, N. (2011). Resveratrol in cancer management : where are we and where we go from here? 1215, 144–149. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05851.x>.

Nickoloff, J. A., Jones, D., Lee, S. H., Williamson, E. A., and Hromas, R. (2017). Drugging the Cancers Addicted to DNA Repair. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(11). <https://doi.org/10.1093/jnci/djx059>.

O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, 60(4), 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040>.

Pierce, A., MCGowan, P. M., Cotter, M., Mullooly, M., O'Donovan, N., Rani, S., O'Driscoll, L., Crown, J., and Dufy, M. J. (2013). Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines. *Cancer Biology and Therapy*, 14(6), 537–545. <https://doi.org/10.4161/cbt.24349>.

Pilié, P. G., Gay, C. M., Byers, L. A., O'Connor, M. J., and Yap, T. A. (2019). PARP inhibitors: Extending benefit beyond BRCA-mutant cancers. *Clinical Cancer Research*, 25(13), 3759–3771. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0968>.

Pilié, P. G., Tang, C., Mills, G. B., and Yap, T. A. (2019). State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. In *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0114-z>.

Pozo-Guisado, E., Merino, J. M., Mulero-Navarro, S., Lorenzo-Benayas, M. J., Centeno, F., Alvarez-Barrientos, A., and Fernandez Salguero, P. M. (2005). Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF- κ B. *International Journal of Cancer*, 115(1), 74–84. <https://doi.org/10.1002/ijc.20856>.

Pratheeshkumar, P., Son, Y. O., Korangath, P., Manu, K. A., and Siveen, K. S. (2015). Phytochemicals in cancer prevention and therapy. *BioMed Research International*, 2015, 2–4. <https://doi.org/10.1155/2015/324021>.

Riahi-Chebbi, I., Soud, S., Othman, H., Haoues, M., Karoui, H., Morel, A., Srairi-Abid, N., Essafi, M., and Essafi-Benkhadir, K. (2019). The Phenolic compound Kaempferol overcomes 5-fluorouracil resistance in human resistant LS174 colon cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36808-z>.

Richardson, C. (2005). RAD51, genomic stability, and tumorigenesis. *Cancer Letters*, 218(2), 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.009>.

Rose, M., Burgess, J. T., O'Byrne, K., Richard, D. J., and Bolderson, E. (2020). PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(September), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.564601>.

Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., and Russo, G. L. (2010). Phytochemicals in cancer prevention and therapy: Truth or dare? *Toxins*, 2(4), 517–551. <https://doi.org/10.3390/toxins2040517>.

Sert, P. İ., ve Küçükılınç, T. T. (2022). Current Approaches in Breast Cancer Treatment. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 42(1), 46–59. <https://doi.org/10.52794/hujpharm.959879>.

Schuster, M., Nechansky, A., Loibner, H., and Kircheis, R. (2006). Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal*, 1(2), 138–147. <https://doi.org/10.1002/biot.200500044>.

Stratton, M. R., Campbell, P. J., and Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>.

Sonnenblick, A., De Azambuja, E., Azim, H. A., and Piccart, M. (2015). An update on PARP inhibitors - Moving to the adjuvant setting. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(1), 27–41. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.163>.

Spyratos, F., Bouchet, C., Ferrero-Poüs, M., Tubiana-Hulin, M., Hacène, K., Konecny, G., Pegram, M., and Slamon, D. J. (2003). Re: Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptors-positive primary breast cancer (multiple letter). *Journal of the National Cancer Institute*, 95(18), 1417–1418. <https://doi.org/10.1093/jnci/djg068>.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and 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>.

Sweeney, E. E., McDaniel, R. E., Maximov, P. Y., Fan, P., and Craig Jordan, V. (2012). Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: Significant clinical progress despite limitations. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 9(2), 143–163. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2011-0004>.

Takashina, M., Inoue, S., Tomihara, K., Tomita, K., and Hattori, K. (2017). Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells. 787–797. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3859>.

Tangutoori, S., Baldwin, P., and Sridhar, S. (2015). PARP inhibitors: A new era of targeted therapy. *Maturitas*, 81(1), 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.01.015>

Tentori, L., Portarena, I., and Graziani, G. (2002). POTENTIAL CLINICAL APPLICATIONS OF POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP) INHIBITORS. 45(2), 10–14. <https://doi.org/10.1006/phrs.2001.0935>.

Tok, F., ve Kocyigit Kaymakcioglu, B. (2015). A New Approach in Cancer Treatment: Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitors. *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.5455/musbed.20141015015238>.

Tokdemir, S. S., Kavasoglu, A. N., Yiğın, A. K., ve Seven, M. (2019). Meme Kanserlerine Klinik Genetik Yaklaşım. *Progress in Retinal and Eye Research*.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., and Ferlay, J. (2015). *Global Cancer Statistics*, 2012. 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.

Venkitaraman, A. R., and Ph, D. (2003). clinical implications of basic research A Growing Network of Cancer-Susceptibility Genes. October, 1917–1919.

Vousden, K. H., and Lu, X. (2002). LIVE OR LET DIE : THE CELL ' S RESPONSE TO P.53. 2(August), 594–604. <https://doi.org/10.1038/nrc864>.

Wang, P., Yang, H. L., Yang, Y. J., Wang, L., and Lee, S. C. (2015). Overcome cancer cell drug resistance using natural products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/767136>.

Wang, X., Zhang, H., and Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2(2), 141–160. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>.

Wayteck, L., Breckpot, K., Demeester, J., and Smedt, S. C. De. (2013). A Personalized View on Cancer Immunotherapy *Cancer Letters*.

Yaman, I., Derici, H., Kara, C., Kamer, E., Diniz, G., Ortac, R., ve Sayin, O. (2013). Effects of resveratrol on incisional wound healing in rats. *Surgery Today*, 43(12), 1433–1438. <https://doi.org/10.1007/s00595-012-0455-7>.

Younas, M., Hano, C., Giglioli-Guivarc'H, N., and Abbasi, B. H. (2018). Mechanistic evaluation of phytochemicals in breast cancer remedy: Current understanding and future perspectives. *RSC Advances*, 8(52), 29714–29744. <https://doi.org/10.1039/c8ra04879g>.

Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., and Paz-Ares, L. (2016). Current Challenges in Cancer Treatment. *Clinical Therapeutics*, 38(7), 1551–1566. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>.