T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROLÜN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA ISI ŞOK PROTEİNİ-90 VE ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Fatma AKAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2020

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROLÜN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA ISI ŞOK PROTEİNİ-90 VE ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Fatma AKAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202023 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2020

ONAYSAYFASI

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV yönetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans eğitimim, tezimin planlanması, geliştirilmesi ve yürütülmesi süresince her konuda benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşıp bana yol gösteren, yardımını, desteğini esirgemeyip her zaman yanımda hissettiren ve bundan sonra da her konuda bilgisine, fikirlerine, deneyimlerine, önerilerine ihtiyaç duyduğum ve her zaman başvurabileceğim değerli danışmanım Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV'e çok teşekkür ederim.

Tezimin çalışılması esnasında desteklerinden dolayı Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK hocam başta olmak üzere eğitimim boyunca bana emek ve destek veren saygıdeğer hocalarım, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Prof. Dr. Ali ÜNLÜ, Prof. Dr. Abdullah Sivrikaya, Doç. Dr. Esma MENEVŞE ve Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Araştırma çalışmalarım süresince birlikte çalışmaktan keyif duyduğum, yardım ve desteklerini esirgemeyip tecrübelerini benimle paylaşan değerli çalışma arkadaşlarım İlkay SAK'a, Hilal TESTİCİ'ye, Oğuzhan TOK'a, Fadime OVALI ve Eissa ALMAGHREBİ'ye ayrı ayrı çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca fedakârlığı öğrendiğim, beni bu günlere getiren, her daim beni destekleyen, sabır gösteren, maddi ve manevi anlamda yardımlarını esirgemeyen ve yanımda olan yol göstericilerim, ilk öğretmenlerim biricik anneme, babama, yaşamımın her alanında her an yanımda olup, bana yoldaş olan, desteğini hep üzerimde gördüğüm, moral ve motivasyon kaynağım çok kıymetli abim Vet. Hek. Murat AKAT'a, önemli destekleriyle değerli eşi ablam Gizem AKAT'a ve kıymetli kardeşime ve dualarıyla her zaman bana destek veren tüm aileme sonsuz teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **ii**

İÇİNDEKİLER ..... **iii**

SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **v**

ŞEKİL DİZİNİ ..... **viii**

TABLO DİZİNİ ..... **ix**

GRAFİK DİZİNİ ..... **ix**

ÖZET ..... **x**

SUMMARY ..... **xii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kanser 6

1.2. Akciğer Kanseri 10

1.2.1. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması 11

1.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi 13

1.2.3. Akciğer Kanseri ve Tedavi 14

1.3. Resveratrol 17

1.3.1. Resveratrolün Tıbbi Yararları 19

1.3.2. Resveratrolün Doza Bağlı Etki Mekanizması 22

1.4. Isı Şok Proteinleri 25

1.4.1. Isı Şok Proteini-90 (Hsp-90) 30

1.4.2. Hsp-90 ve Kanser 31

1.5. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) ve Simetrik Dimetilarginin (SDMA) 33

1.6. Nitrik Oksit 35

1.7. Arginin 36
1.8. Homoarginine (hArg) 38
1.9. Sitruline 39
2. GEREÇ VE YÖNTEM 41
2.1. Gereçler 41
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar 41
2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri 42
2.1.3. Kullanılan Kitler 43
2.2. Yöntem 43
2.2.1. Hücre Kültürü 43
2.2.2. MTT Yöntemi ile Resveratrolün IC_{50} Dozunun Belirlenmesi 44
2.2.3. Hsp-90 Analizi 45
2.2.4. LC-MS/MS ile ADMA Düzeyleri Analizi 45
2.2.5. ADMA Çalışma Prosedürü 46
2.2.6. İstatistiksel Analizler 47
3. BULGULAR 48
3.1. Resveratrolün Hücre Proliferasyonuna Etkisi ve IC_{50} Doz Hesaplamaları 48
3.2. Resveratrolün A549 Akciğer Kanseri ve HEK-293 Hücre Hatlarında Hsp-90 Aktivitesi Üzerine Etkisi 51
3.3. Resveratrolün A549 Akciğer Kanseri ve HEK-293 Hücre Hatlarında ADMA Düzeyleri Üzerine Etkisi 53
4. TARTIŞMA 60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 71
6. KAYNAKLAR 72
7. EKLER 77
8. ÖZGEÇMİŞ 78

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADMA: Asimetrik Dimetilarginin

AGAT: Arginin: Glisin Amidino Transferaz

AGXT2: Alanin Glioksilat Aminotransferaz 2

Akt: Protein Kinaz B

Arg: Arginin

ASS: Arginosukinat Sentataz

ASL: Arginosukinat Liyaz

BT: Bilgisayarlı Tomografi

Cu: Bakır

C-Raf: Proto-Onkogen Serin / Treonin-Protein Kinaz

DCs: Dentritic Hücreler

DDAH: Dimetilarginin Dimetilamino Hidrolaz

DDAH1: Dimetilarginin Dimetilamino Hidrolaz 1

DMA: Dimetilamin

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

eNOS: Endotel NOS

FBS: Fetal Bovine Serum

HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler

HIF-1a: Hipoksiye Bağlı Faktör 1a

Hsp-90: Isı Şok Proteini-90

HSE: Isı Şok Elemanı

HSF1: Isı Şok Faktörü

Hsp: Isı Şok Proteinleri

IL-17: İnterlökin-17

iNOS: İndüklenebilir NOS

L-Arg: L Arginin

L-hArg: L- Homoarginin

LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler

L-NMMA: Monometil Arginin

MDR: Çoklu İlaç Direnci

miRNA: mikro-Ribonükleik Asit

mRNA: Mesajcı Ribonükleik Asit

MTT: Methylthiazoly Diphenyl-Tetrazolium Bromid

NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

nNOS: Nöronal NOS

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

NSCLC: Non-Small-Cell Lung Cancer

OCT: Ornitin Transkarbilaz

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

PRMT: Protein Arginin N-Metiltransferaz

PRMT1: Tip I Protein Arginin Metiltransferaz

p53: Tümör Protein 53

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RSV: Resveratrol

SCLC: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

SDMA: Simetrik Dimetilarginin

SOD: Süperoksit Dismutaz

TNF-α: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa

TTNA: Transtotasik İğne Aspirasyonu

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VLDL: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya çapında her iki cinsiyet, her yaştan 2018' de yeni vaka sayısı.

Şekil 1.2. Dünya çapında her iki cinsiyet, her yaştan 2018'de ölüm sayısı.

Şekil 1.3. Meme ve akciğer kanserlerinde yıllık toplam vakalarda tahmini geçmiş ve gelecek eğilimler.

Şekil 1.4. Hücresel metabolizma.

Şekil 1.5. Kanser bağışıklık döngüsü.

Şekil 1.6. Akciğer kanserinin ana grupları ve oluşum olasılıkları.

Şekil 1.7. Resveratrolün yapısı.

Şekil 1.8. Faydalı eylemlerinin temelini oluşturabilecek, resveratrolün çeşitli eylemlerini gösteren şema.

Şekil 1.9. Resveratrolün bifazik hormetik doza bağlı etkileri.

Şekil 1.10. Resveratrol ve bakır kaynaklı sitotoksisite.

Şekil 1.11. Resveratrolün karsinogenezin tüm aşamalarını etkileyebilmesi.

Şekil 1.12. Isı şok proteinleri-1 (Hsp1) aracılı proteotoksik stres tepkisinin merkezi dogması.

Şekil 1.13. Kanserde ısı şoku proteinleri.

Şekil 1.14. Normal hücrelerde Hsp-90' ın kanser hücrelerine karşı işlevi.

Şekil 1.15. Asimetrik ve simetrik dimetilarginin biyosentezi ve metabolizması.

Şekil 1.16. Genetik olarak değiştirilmiş kanser hücrelerine kıyasla, arginin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin ve metabolik yolların normal hücrelerde bozulmanın şematik gösterimi.

Şekil 1.17. L-arginin (Arg) ve l-homoarginin (hArg) aminoasitlerinin metabolik yolları.

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.1. 2015 DSÖ akciğer kanseri sınıflandırması.

Tablo 1.2. NSCLC için tedavi türleri.

Tablo 3.1. Tablo 3.1. Resveratrolün A549 ve HEK-293 hücre hatlarında doz-zaman bağımlı % canlılıklar.

Tablo 3.2. A549 hücrelerinin Hsp-90 aktiviteleri.

Tablo 3.3. HEK-293 hücrelerinin Hsp-90 aktiviteleri.

Tablo 3.4. Resveratrolün A549 hücre hattında Sitrülin, Homoarginin, LNMMA, SDMA, ADMA ve Arginin düzeyleri üzerine etkisi.

Tablo 3.5. Resveratrolün HEK-293 hücre hattında Sitrülin, Homoarginin, LNMMA, SDMA, ADMA ve Arginin düzeyleri üzerine etkisi.

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 3.1. Resveratrolün A549 hücre proliferayonuna doz-zaman bağımlı etkisi.

Grafik 3.2. Resveratrolün HEK-293 hücre proliferayonuna doz-zaman bağımlı etkisi.

Grafik 3.3. Resveratrolün A549 (A, B) ve HEK-293 (C, D) hücreleri için IC_{50} doz değerlerinin belirlenmesi (A: 24. saate, B: 48. saate ait veriler).

Grafik 3.4. Resveratrolün HEK-293, A549 hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı karşılaştırmalı etkisi.

ÖZET

T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Resveratrolün Akciğer Kanseri Hücre Hattında Isı Şok Proteini-90 Ve Asimetrik Dimetil Arjinin Düzeylerine Etkisi

Fatma AKAT

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2020

Akciğer kanseri, yüksek prevalansı, agresifliği, geç teşhisi, etkili tedavi eksikliği ve kötü prognozu nedeniyle dünyada kanser ölümünün ilk nedenidir. Akciğer kanseri olan hastalar için farklı tedaviler mevcuttur. Cerrahi, radyofrekans ablasyonu, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi akciğer kanseri hastalarının prognozunu büyük ölçüde iyileştirmiştir. Bununla birlikte, yan etkiler ve ilaç direncinin klinikte hala çözülmesi gerekken sorundur. Doğal bileşikler arasında resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilben), fitoaleksin olarak sınıflandırılan, mantar enfeksiyonu, ultraviyole ve radyasyon gibi stresli koşullara yanıt olarak doğal olarak 70' den fazla bitki türünden (üzüm, yaban mersini, ahududu, dut ve yer fıstığı dâhil) üretilebilen doğal bir non-flavonoid polifenoldür. Isı şok proteini 90 (Hsp-90), çok çeşitli alıcı proteinlerinin aktivasyonundan, stabilizasyonundan ve fonksiyonundan sorumludur. Kanserli hücrelerde Hsp-90'ın inhibisyonu, alıcı onkoproteinlerinin bozulmasına neden olur. Aslında, Hsp-90 alıcı proteinleri kanserin ayırt edici özellikleriyle ilişkilidir ve bu nedenle Hsp-90'ı hedeflemek etkili bir antikanser tedavi stratejisi olarak kabul edilmiştir. Asimetrik dimetil arginin (ADMA), insan kanında doğal olarak oluşan ve nitrik oksit (NO) üretimini inhibe ettiği bilinen modifiye edilmiş, dokularda ve hücrelerde bulunan, plazmada dolaşan ve idrarla atılan bir amino asittir. Yaptığımız bu tez çalışmasında, antioksidan, antiproliferatif ve antitümör etkileri, literatürde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmış olan resveratrolün, insan akciğer kanser hücresi A549 ve insan embriyonik böbrek doku epiteli HEK-293 hatlarınının proliferasyonuna etkileri araştırılmıştır. Belirlenen resveratrol konsantrasyonlarıyla Hsp-90 ve ADMA aktiviteleri de incelenmiştir. MTT yöntem ile proliferasyon testi, ELISA yöntemi ile Hsp-90 düzeyleri ve LC-MS/MS yöntemi ile de ADMA düzeyleri çalışılmıştır. Proliferasyon analizi yaptığımız A549 ve HEK-293 hücre hatlarının % hücre canlılık/ konsantrasyon grafiği yardımı ile resveratrol IC_{50} dozları 24. ve 48. saatler için hesaplandı. Buna göre A549 için resveratrolün 24. saatte IC_{50}: 180,30 µM, 48. saatte IC_{50}: 76,45 µM olarak belirlendi. Hsp-90 aktivitelerini değerlendirmek için 180 µM, 90 µM, 45 µM ve 22,5 µM, 0 µM konsantrasyonların 24 ve 48 saatlerdeki proliferasyon sonuçlarından hücre lizatlarının Hsp-90 ve ADMA düzeyleri hesaplanmıştır. Her bir resveratrol konsantrasyonunun zamana göre karşılaştırılmasında ise, 45 µM resveratrol ile muamele edilmiş gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p<0,05$), diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır($p>0,05$). A549 hücre hattı, ADMA düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası anlamlı bir farklılık vardır (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$). Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24./48. saatler) karşılaştırıldığında ise, 0

μM, 45 μM ve 90 μM resveratrol konsantrasyonuna sahip gruplar ($p<0,001$), 180 μM ($p=0,012$) olarak anlamlı bulunurken, 22,5 μM değerindeki gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p=0,474$). Elde ettiğimiz bu sonuçlar doğrultusunda resveratrolün doğrudan takviye tedavi olarak doza bağlı olarak kullanabileceği ve ileri araştırmalarla etki mekanizmasının anlaşılmasıyla, etkili bir antikanser terapötik ilaç hedefi olarak bu parametreleri göstermeyi ve daha sonraki çalışmalara ışık tutmasını hedeflemekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Akciğer kanseri; ADMA; Hsp-90; Resveratrol; Proliferasyon

SUMMARY

REPUBLİC OF TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

INSTITUTE of HEALTH SCIENCES

Effect of Resveratrol on Heat Shock Protein-90 and Asymmetric Dimethyl Arginine Levels in Lung Cancer Cell Line

Fatma AKAT

Department of Medical Biochemistry

MASTER THESIS / KONYA-2020

Lung cancer is the first cause of cancer death in the world due to its high prevalence, aggressiveness, late diagnosis, lack of effective treatment and poor prognosis. Different treatments are available for patients with lung cancer. Surgery, radiofrequency ablation, radiation therapy, chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy have greatly improved the prognosis of lung cancer patients. However, while side effects and drug resistance still need to be resolved in the clinic, they are the problem. Natural compounds include resveratrol (3,4 ', 5-trihydroxy-trans-stilbene), is a natural non-flavonoid polyphenol that can be produced (including mulberry and peanut)classified as phytoalexin, naturally from more than 70 plant species (grapes, blueberries, raspberries, etc.) in response to stressful conditions such as fungal infection, ultraviolet and radiation. Heat shock protein 90 (Hsp-90) is responsible for the activation, stabilization, and function of a wide variety of receptor proteins. Inhibition of Hsp-90 in cancer cells causes degradation of the receptor oncoproteins. In fact, Hsp-90 receptor proteins are associated with the hallmarks of cancer, and therefore targeting Hsp-90 has been recognized as an effective anticancer treatment strategy. Asymmetric dimethyl arginine (ADMA) is a modified amino acid that occurs naturally in human blood and is known to inhibit the production of nitric oxide (NO), found in tissues and cells, circulates in plasma and is excreted in urine. In this thesis study, we investigated the antioxidant, antiproliferative and antitumor effects of resveratrol, which has been proven by in vitro and in vivo studies in the literature, on the proliferation of human lung cancer cell A549 and human embryonic kidney tissue epithelium HEK-293 lines. Hsp-90 and ADMA activities were also examined with the determined resveratrol concentrations. Proliferation test with MTT method, Hsp-90 levels by ELISA method and ADMA levels were studied by LC-MS / MS method. Resveratrol IC_{50} doses were calculated for the 24th and 48th hours with the help of % cell viability / concentration graph of A549 and HEK-293 cell lines for which we analyzed proliferation. Accordingly, the IC_{50} of resveratrol for A549 was determined as: 180.30 µM at the 24th hour and as 76.45 µM at the 48th hour. Hsp-90 and ADMA levels of cell lysates were calculated from the proliferation results of 180 µM, 90 µM, 45 µM and 22.5 µM, 0 µM, at 24 and 48 hours to evaluate the hsp-90 activities. When comparing each resveratrol concentration by time, the difference between the 45 µM resveratrol treated groups was found to be statistically significant ($p < 0.05$), and no significant difference was found between the other groups ($p > 0.05$). A549 cell line, in comparison of 24th and 48th hour measurements of ADMA levels according to resveratrol concentrations; There was a significant difference between the groups ($p < 0.001$, $p < 0.001$, respectively). When each resveratrol concentration is compared according to the time (24-48 hours), the groups with 0 µM, 45 µM and 90 µM resveratrol concentrations ($p < 0.001$) were found to be 180 µM ($p = 0.012$), while the 22.5 µM values There was no statistically significant difference between the groups ($p = 0.474$). In line with these results, we aim to demonstrate these parameters as

an effective anticancer therapeutic drug target and to shed light on future studies, with the understanding of resveratrol's dose-dependent use as a supplementary treatment and its mechanism of action with further research.

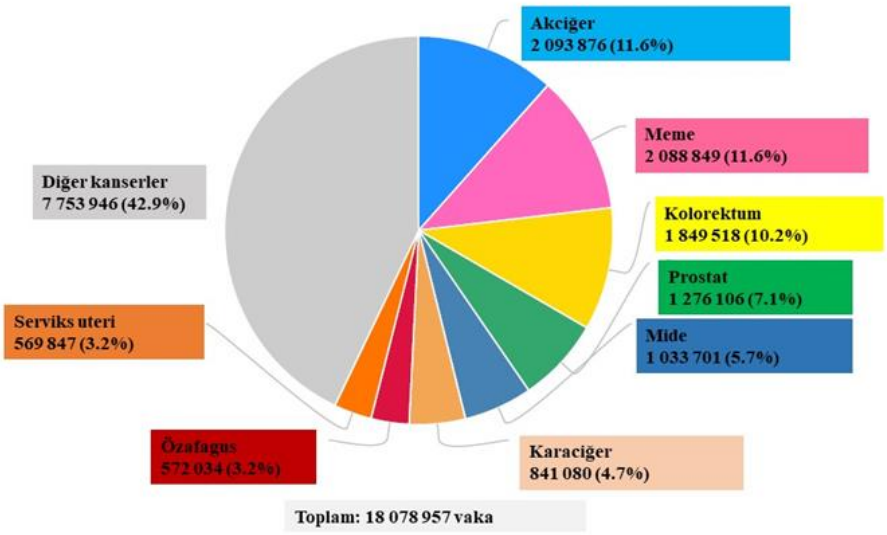
Keywords: Lung cancer; ADMA; Hsp-90; Resveratrol; Proliferation

1. GİRİŞ

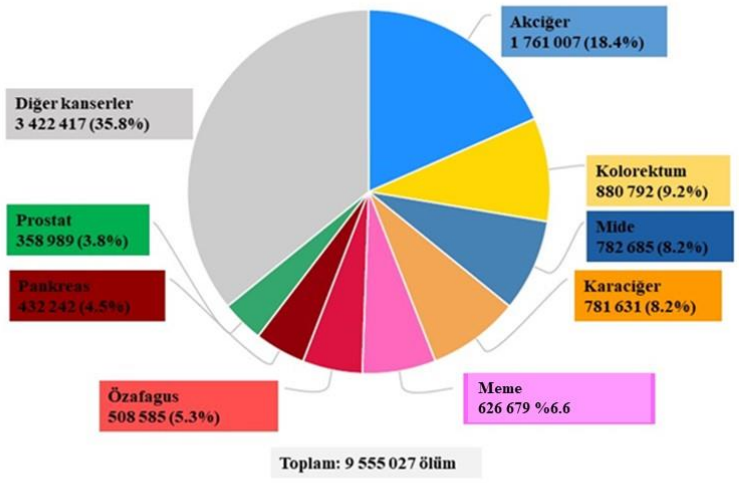
Son yüzyılda, büyük hastalıkların oranı ve görünümü dünya çapında derinden değişti. Hızlı kentleşme ve sağlık hizmetlerinde kaydedilen ilerlemeler bulaşıcı hastalıklardan (özellikle bebeklik döneminde ve çocukluk döneminde) ölüm oranını azaltmada kritik güçler olmuştur. Bulaşıcı olmayan hastalıklar ile sürekli olarak yer değiştirmeleri, enfeksiyon ve sosyal, ekonomik ve sağlık gelişmelerinin fethine bağlı olarak devam eden demografik geçişin bir parçasıdır (Piñeros ve ark 2017). Bulaşıcı olmayan hastalıklar, artık küresel ölümlerin çoğundan sorumludur ve kanserin, ölümün önde gelen nedeni ve 21. yüzyılda dünyanın her ülkesinde artan yaşam beklentisi önünde ki tek önemli engel olarak görülmesi beklenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü' nün 2015 yılında yaptığı tahminlere göre kanser, 70 yaşından önce 172 ülkenin 91' inde ilk veya ikinci ve ek 22 ülkede üçüncü veya dördüncü sırada önde gelen ölüm sebebidir (Bray ve ark 2018).

Kanser anormal hücrelerin normal sınırlarının ötesinde büyümesiyle karakterize edilen ve daha sonra vücudun bitişik kısımlarını istila edebilen ve diğer organlara yayılabilen geniş bir hastalık grubu için genel bir terimdir. Kullanılan diğer yaygın terimler malign tümör ve neoplazmlardır. Kanser vücudun hemen her bölümünü etkileyebilir ve her biri özel tedavi stratejileri gerektiren birçok anatomik ve moleküler alt tipe sahiptir. Kanser dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir (Organization 2020). Şekil 1.1.'de görüldüğü gibi; kanser insidansı ve mortalite dünya çapında hızla artmaktadır. Sebepler karmaşıktır fakat popülasyonun hem yaşlanmasını hem de büyümesini yansıtır, bunun yanı sıra birçoğu sosyoekonomik gelişme ile ilişkilendirilen kanser için ana risk faktörlerinin yaygınlığı ve dağılımındaki değişiklikleri yansıtmaktadır (Bray ve ark 2018).

Global kanser yükünün 2018'de 18.1 milyon yeni vakayı ve 9.6 milyon ölüme yükseldiği tahmin edilmektedir. Dünyada 5 erkekten biri ve dünyadaki 6 kadından biri yaşamları boyunca kanser geliştirmekte, 8 erkekten biri ve 11 kadından biri hastalıktan ölmektedir (Cancer 2018, September 12). Şekil 1.2.'ye bakıldığında; akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanser türleri iken meme, kolorektal, akciğer, servikal ve tiroid kanseri kadınlar arasında en yaygın olanıdır (Bray ve ark 2018). Dünya çapında, 5 yıllık prevelans olarak adlandırılan, 5 yıl içinde kanser teşhis edilen insan sayısının 43.8 milyon olduğu tahmin edilmektedir (Cancer 2018, September 12).



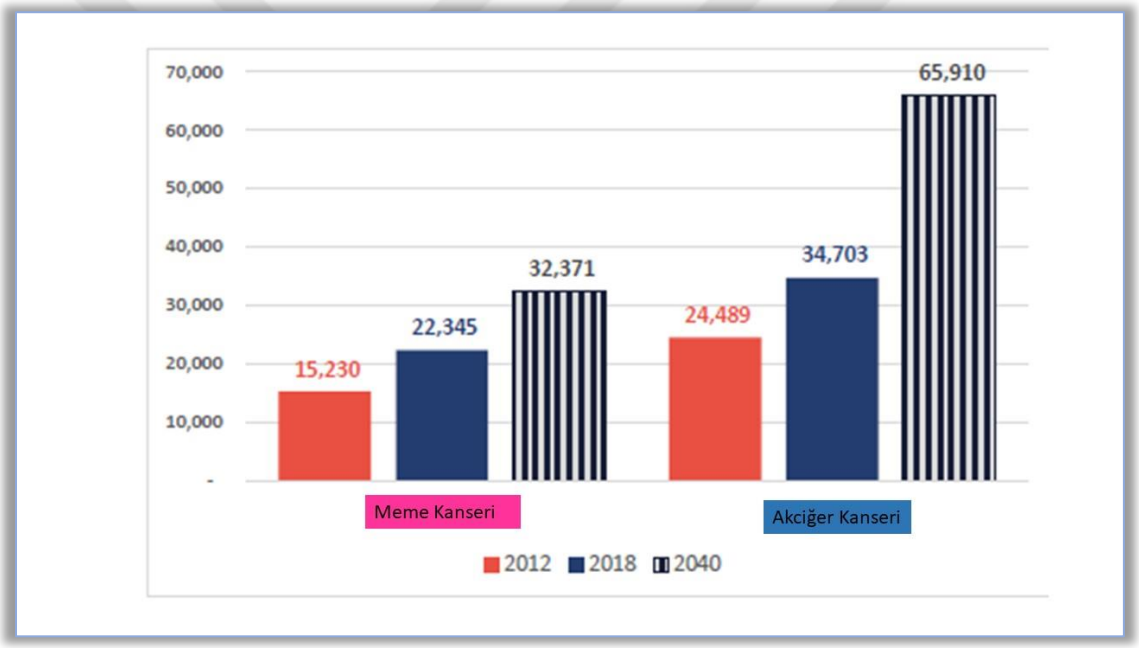
Şekil 1.1. Dünya çapında her iki cinsiyet, her yaştan 2018'de yeni vaka sayısı (Observatory 2019, March).



Şekil 1.2. Dünya çapında her iki cinsiyet, her yaştan 2018'de ölüm sayısı (Observatory 2019, March).

Şekil 1.3.'e bakılacak olursa yıllık küresel kanser insidansının, 2030 yılına kadar 22,2 milyona çıkması ve beklenen ölüm 13,1 milyon olarak öne sürülmektedir. Vakaların üçte ikisinden fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelecektir ki burada yedi kanser (akciğer, kolon, meme, mide, karaciğer, servikal ve özofegeal) vakaların yaklaşık üçte ikisini (% 62) oluşturmaktadır (Piñeros ve ark 2017).

Akciğer kanseri, akciğer dokusunda kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize malign bir akciğer tümörüdür. Hem insidans hem de mortalitede erkeklerde en sık görülen kanserdir. Kadınlar arasında akciğer kanseri, insidansın üçüncü en yüksek, meme kanserinden sonra mortalite içinde ikinci sırada yer almaktadır (Yousef ve ark 2017).



Şekil 1.3. Meme ve akciğer kanserlerinde yıllık toplam vakalarda tahmini geçmiş ve gelecek eğilimler (Organization 2020).

Mevcut birçok antikanser tedavisi rejimi, radyoterapi, cerrahi, kemoterapötik ilaçlar veya monoterapiye dirençli ilerleyici tümörlere sahip hastalarda tedavilerin bir kombinasyonunu içerir (Rasheduzzaman ve ark 2018). Teknolojilerin ve yeni tıbbın hızlı gelişimi ile akciğer kanserinin tedavi seviyesi artmıştır, ancak çok çeşitli yan etkiler nedeniyle genel tedavi etkileri sınırlıdır.

Ağrıyı azaltmak, yaşam kalitesini arttırmak ve hastaların yaşam süresini uzatmak, klinisyenler tarafından takip edilen temel tedavi prensipleridir (Li ve ark 2016). Bitki kaynaklı bileşikler ve biyoaktif gıda bileşenleri yakın zamanda antikanser özelliklerine sahip ajanlar olarak ortaya çıkmıştır (Yousef ve ark 2017).

Resveratrol (3,4',5,-Trihidroksi-stilben; RSV) kırmızı üzüm, çilek, yer fıstığı ve bazı sebzelerde bulunan antioksidan özelliklere sahip, nutrasötik (besleyici özelliğine ilave sağlık yararı sağlayan gıda maddesi) ve doğal bir polifenolik bileşiktir (Hajizadeh-Sharafabad ve ark 2019). Stilben bir yapıya sahiptir ve bitkilerde stres koşulları altında üretilen fitoaleksin (fiziksel uyaranlara karşı antimikrobiyal ve antifungal bileşikler) grubuna aittir (Kisková ve Kassayová 2019). Antioksidan, antienflamatuar, detoksifiye edici, antitümör, antidiyabetik, antiobesite, kardiyoprotektif ve nöroprotektif etkiler dahil olmak üzere resveratrol için çeşitli koruyucu roller bildirilmiştir. Ayrıca, bir anti-glikasyon etken olarak resveratrol oksidatif stresi azaltabilir (Hajizadeh-Sharafabad ve ark 2019). Resveratrol, tümör oluşumunda önemli rol oynayan bazı molekülleri hedefleyerek çeşitli kanserlere karşı ve kanser önleyici terapötik etkiler sergiler (Duan ve ark 2019). Jang ve ark. çığır açan bir çalışma resveratrolün antikanser özelliklerine sahip olduğunu bulmuştur ve o zamandan beri çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmış ve diğer çalışmalar da kanser kemopreventif olarak işlev gördüğünü göstermiştir(Yousef ve ark 2017).

Isı şok proteini 90 (Hsp-90), çok çeşitli alıcı proteinlerinin aktivasyonundan, stabilizasyonundan ve fonksiyonundan sorumludur (Liu ve ark 2019). ATP' ye bağımlı bir moleküler şaperon olan Hsp-90, substrat proteinlerinin olgunlaşmasına yardımcı olur ve daha sonra Hsp-90' ın inhibisyonu, kanserdeki çoklu sinyal yollarının eşzamanlı olarak bozulmasına neden olmaktadır (Ojha ve ark 2018). Hsp-90 melanom, meme kanseri, gastrointestinal stromal tümörler ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerin ortaya çıkması ve ilerlemesi için vazgeçilmez olan çeşitli onkoproteinlerin konformasyonlarının ve biyolojik fonksiyonlarının korunmasında önemli bir rol oynar (Liu ve ark 2019). Çeşitli hücre dışı ve hücre içi hasarlar sırasında homeostazı korumak için, kanser hücreleri birçok proteini stabilize etmek için Hsp-90'a güvenir. Hücre hayatta kalmasından, büyümesinden ve çoğalmasından sorumlu sinyal ağları oluşturur (Hyun ve ark 2018). Kanser hücrelerinde Hsp-90'ın ekspresyon seviyesi normal hücrelerde olduğundan çok daha yüksektir, bu da onu kanserlerin tedavisi için çekici bir ilaç hedefi yapar. Kanser hücrelerinde Hsp-90'ın inhibisyonu, alıcı onkoproteinlerinin bozulmasına neden olur (Liu ve ark 2019). Aslında, Hsp-90 alıcı proteinleri kanserin ayırt edici özellikleriyle ilişkilidir ve bu nedenle Hsp-90'ı hedeflemek etkili bir antikanser tedavi stratejisi olarak kabul

edilmiştir (Hyun ve ark 2018). Kansere ek olarak, Hsp-90, nörodejeneratif hastalıklar (örneğin Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı), viral hastalık, mantar hastalığı ve paraziter hastalık için potansiyel ilaç hedefi olarak bulunmuştur (Liu ve ark 2019).

Asimetrik dimetil arginin (ADMA), insan kanında doğal olarak oluşan ve nitrik oksit (NO) üretimini inhibe ettiği bilinen modifiye edilmiş (Helmi ve ark 2018), dokularda ve hücrelerde bulunan, plazmada dolaşan ve idrarla atılan doğal olarak oluşan bir amino asittir (Ma ve ark 2015). ADMA metillenmiş proteinlerin proteolizinden sentezlenen arginin metabolitidir. ADMA, esas olarak dimetilarginin dimetilamino hidrolaz (DDAH) enzimi tarafından sitrülin ve dimetilamine enzim tarafından metabolize edilen veya renal atılım yoluyla vücuttan elimine edilen endojen bir NO sentaz (NOS) inhibitörüdür (Damiati 2019). Oksidanlar, akciğer epitel hücrelerinin hasar görmesine aracılık eden önemli sinyal molekülleri olarak giderek daha fazla tanınmaktadır ve nitrik oksit (NO) sinyalleşmesinde bir işlev bozukluğu, akciğerin patolojik tepkilerine aracılık edebilir. ADMA, sayısız hastalığa aracılık eden önemli bir faktör olduğu gösterilen endojen olarak üretilen NO sentezinin rekabetçi bir inhibitörüdür (Lim ve ark 2013). İki farklı gen tarafından kodlanan iki izoform; DDAH1 ve DDAH2 vardır. DDAH1, *in vivo* ADMA bozunması için ana izoformdur (Trittmann ve ark 2019), DDAH2 akciğerde daha bol izoformdur (Lim ve ark 2013). Son zamanlarda DDAH aktivitesinin akut akciğer hasarına aracılık ettiği bildirilmiştir (Lim ve ark 2013). ADMA esas olarak arginin kalıntılarının tip I protein arginin metiltransferaz (PRMT1) ve müteakip proteoliz ile metilasyonundan elde edilirken, esas olarak dimetilarginin dimetilamino hidrolaz 1 (DDAH1) ile ayrıştırılır. İnsan akciğer dokularının immüno-histokimyasal boyanması, DDAH1' in hem alveoler hem de bronşiolar epitelde eksprese edildiğini göstermiştir (Wang ve ark 2016).

Sitotoksik geleneksel tedavi yaklaşımları, kök hücre terapisi, hormon terapisi, immünoterapi ve amino asit yoksunluğu tedavisi dâhil olmak üzere daha seçici yaklaşımlara kapı açmıştır. Bu yaklaşımlar da, kanser hücrelerinin normal hücrelerden çok daha yüksek bir oranda çoğalmasına, daha yüksek miktarda besin gerektirmesine ve amino asitleri sentezleme kapasitelerini aşmasına bağlıdır. Bu nedenle, gereksiz amino asitler esansiyel olur ve kanser hücresi onlara mutant hale gelir. Bu yöntem, kanser hücresindeki belirli bir amino asidin normal metabolizması bozulduğunda, hücreyi çevreye daha bağımlı hale getirdiğinde ve böylece tedaviyi daha seçici ve verimli hale getirdiğinde daha da etkilidir (Al-Koussa ve ark 2020).

Çalışmamızın amacı; antioksidan, antiproliferatif ve antitümör etkileri, literatürde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kanıtlanmış olan resveratrolün, insan akciğer kanser hücresi A549 ve insan embriyonik böbrek doku epiteli HEK-293 hatlarınının proliferasyonuna etkilerini araştırmaktır. Bu hücre hatlarına farklı süre ve konsantrasyonlarda resveratrol uygulayarak IC_{50} değerlerini belirlenecek ve bu belirlenen IC_{50} değerlerinin alt ve üst konsantrasyonlarını da çalışmamıza dahil edip Hsp-90 ve ADMA aktivitelerini de inceledik. Çalışmamızın sonucunda farklı süre ve konsantrasyonlarda resveratrol uygulanan hücre hatlarının Hsp-90 ve ADMA ekspresyonlarını karşılaştırıp, etkili bir antikanser terapötik ilaç hedefi olarak bu parametreleri göstermek ve daha sonraki çalışmalara ışık tutmasını hedefledik.

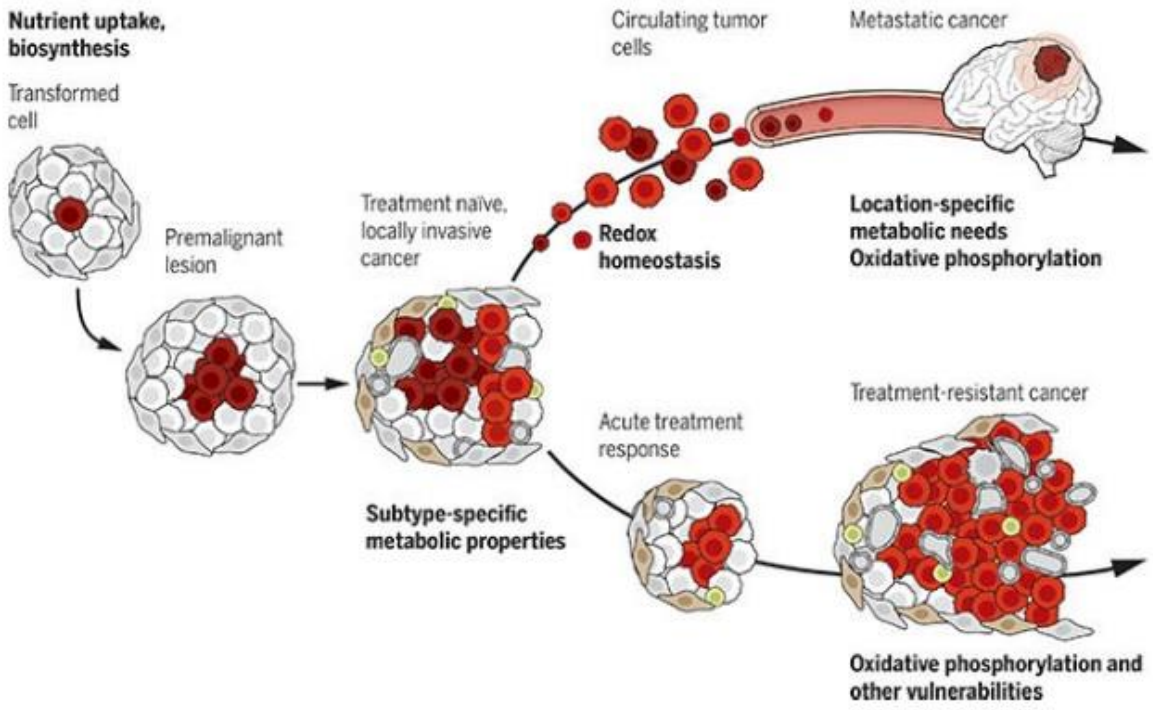
1.1. Kanser

Kanser hücreleri çeşitli şekillerde normal hücrelerden farklıdır. Normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri yeterli olduğunda büyümeyi ve bölünmeyi bırakmaz, böylece hücreler iki katına çıkar ve boyut olarak büyüyen bir yumru (tümör) oluşturur. Sağlıklı hücrelerin aksine, kanser hücreleri olgunlaşmaya devam etmez veya özelleşmez (UK 2017). Tümör oluşumu süreci hücresel, doku ve sistemik seviyelerde değişiklikler içerir (Kisková ve Kassayová 2019).

Kanser vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilecek bir grup hastalık için genel bir terimdir. Beyin, akciğer, meme, prostat, cilt ve kolon malign tümörleri kanser olarak bilinen hastalıklar arasındadır. Diğer kanserlerin örnekleri arasında lösemi, sarkomlar, Hodgkin hastalığı ve Hodgkin olmayan lenfoma bulunur. Hücre değişim süreci normalde yaşam boyunca temel biyolojik mekanizmalar tarafından iyi bir şekilde kontrol edilir. Ancak kanserde kontrol mekanizmaları ters gider (Organization 2002). Malign tümör hücreleri invazyon ve metastaz ile karakterizedir (Sun ve ark 2020). Kanserin etiyolojisi çok faktörlüdür, genetik, çevresel, tıbbi ve yaşam tarzı faktörleri belirli bir malignite üretmek için etkileşir.

Küresel olarak, 2012 ve 2015 yıllarında sırasıyla 14,1 milyon ve 17,5 milyon yeni kanser vakasına kıyasla 2025 için 20 milyondan fazla yeni kanser vakası öngörülmektedir (Nwagbara ve ark 2020). Kanserler, 2018 yılında dünya çapında 18,1 milyon yeni vaka ve 9,6 milyon ölümden sorumlu olan morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri arasındadır (Organization 2018). Düşük ve orta gelirli ülkelerde kanser de dahil olmak üzere, bulaşıcı olmayan hastalıkların artan yükü, halihazırda zayıflamış sağlık sistemi için bir tehdit haline gelmiştir (Nwagbara ve ark 2020). Son raporlara göre, invaziv bir kanser türü tanısı alma olasılığının şimdi %40 kadar yüksek olduğu tahmin edilmektedir (Wang ve ark 2020).

Metabolik ihtiyaçlar ve zayıflıklar kanser ilerlemesi boyunca değişir. Tümör büyümesinin erken aşamalarında, lokal invaziv kanserlerde ortaya çıkan metabolik ihtiyaçlar ile besin alımı ve biyosentez gerekir. Tümörler, kanserin ilerlemesinin sonraki aşamalarında, özellikle metastaz ve terapi direncinde yeni yollara bağımlılık kazanırlar. Bunlar, oksidatif strese direnme mekanizmalarına bağımlılık ve oksidatif fosforilasyona artan bağımlılık gibi potansiyel olarak hedeflenebilir yükümlülükleri içerir. Hücresel metabolizma, dokuların homeostaz ve büyüme taleplerini karşılamasına izin veren esnek bir ağdır (Faubert ve ark 2020).



Şekil 1.4. Hücresel metabolizma (Faubert ve ark 2020).

Kanserde, malign hücreler çeşitli hücre ekstrinsik ve hücre intrinsik ipuçlarına yanıt olarak metabolik adaptasyonlar almaktadırlar (Şekil 1.4). Bu uyarlamaların bazıları dönüşüm sürecini başlatır, bazıları malign hücrelerin büyümesini teşvik eder ve onları anahtar yolların inhibitörlerine duyarlı hale getirmektedir. Tarihsel olarak, çoğu kanser metabolizması araştırması klinik olarak saptanabilir tümörlerde veya bunlardan türetilen deneysel modellerde gözlenen fenotiplere odaklanmıştır. Bu nedenle "kanser metabolizması" ve "metabolik yeniden

programlama" terimleri genellikle yüksek oranda proliferatif tümörlerde veya kanser hücrelerinde gözlenen ortak bir yol kümesini belirtmek için kullanılmaktadır (Faubert ve ark 2020).

Kanser hücreleri, malign proliferasyon ve anormal metabolizma, besinlerden yoksun ve stresli atık ürünlerle dolu hücreleri (örneğin, işlevsiz mitokondri ve yan ürünü, reaktif oksijen türleri [ROS]) bırakırlar (Wang ve ark 2020).

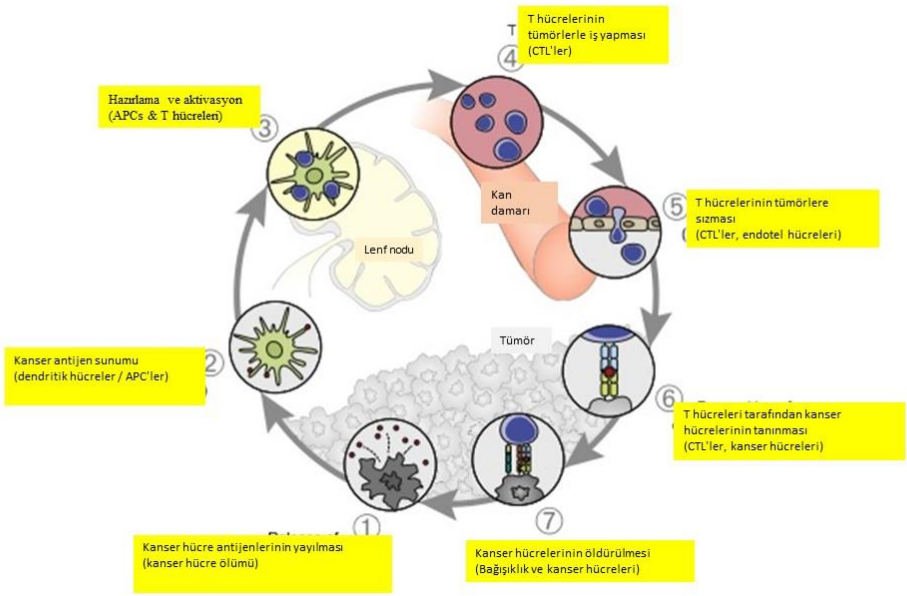
Kanser sürveyansı için en büyük zorluk, her biri kontrol dışı hücre büyümesi ile karakterize edilen ve başlangıçta etkilenen menşe yeri ve tipine göre sınıflandırılan 100'den fazla varlık içeren hastalığın heterojenliğidir (Piñeros ve ark 2017).

Kanser tedavisi zor bir hastalıktır ve enfeksiyon ve inflamasyon ile ilişkilidir. Konakçı bağışıklık sistemi, tümör büyümesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Tümör kaynaklı immünsüpresyonun, immün sürveyansın tümör kaçaklanmasının ana nedenlerinden biri olduğu ortaya çıkmıştır. Efektör T hücrelerinin normal fonksiyonlarını baskılayabilen tümör kaynaklı immünsüpresif faktörlerin, kanser immünoterapisinin sınırlamalarının temel nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle efektör T hücreleri üzerindeki tümör kaynaklı immünsüpresif faktörlerin ortadan kaldırılması ümit verici bir kanser immünoterapötik stratejisidir (Zhao ve ark 2018).

İdeal olarak, bağışıklık sistemi malign hücreleri izleme, tanıma ve yok etme potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, tümörler konak immün aracılı gözetim ve yıkımdan kaçınmak için çeşitli mekanizmalar geliştirir. Bunlar arasında lokal immünosüpresif mikro ortamın genişlemesi, işlevsiz T hücresi sinyalinin indüksiyonu ve malign olmayan koşullar altında öz hücrelere karşı ayrım gözetmeyen bir saldırıyı önleyerek bağışıklık sistemini kontrol altında tutmaya yarayan inhibitör immün kontrol noktalarının up-regülasyonu bulunur (Saab ve ark 2020).

7 basamakta kanserin dinamik anti-tümör bağışıklık tepkilerini gösteren bir "kanser-bağışıklık döngüsü" kavramı önerilmiştir. Kanser antijenleri apoptoz veya hücre ölümü sırasında tümör hücreleri tarafından salınır (Adım 1). Açığa çıkan antijenler, daha sonra olgunlaşan ve aynı anda lenf düğümlerine göç eden dendritik hücreler (DCs) tarafından yakalanır (Adım 2). Lenf düğümlerinde, DC'ler, yakalanan kanser antijenini, ana histo-uyumluluk kompleksi sınıf (MHC) I molekülüne sunar, bu da T hücrelerinin hazırlanmasına yol açar (Adım 3). Aktif T hücreleri, tümöre geçişi başlatır (Adım 4), tümör dokusuna sızar

(Adım 5), kanser hücrelerini tanır (Adım 6) ve onları yaralar (Adım 7). Adım 3 ve 6, T hücrelerinin aktivasyonunun kontrol edildiği bağışıklık kontrol noktaları olarak hizmet eder. Adım 7' de T hücreleri tarafından yaralanan kanser hücrelerinden, kanser antijenleri daha fazla salınır ve kanser bağışıklık döngüsü Adım 1'e geri döner ve devam eder. Birçok kanser hastasında, bu adımlardan biri veya daha fazlası kesilebilir ve bu da kansere karşı etkisiz bağışıklık tepkilerine neden olur (Kunimasa ve Goto 2020).



Şekil 1.5. Kanser bağışıklık döngüsü. (1) Tümör hücrelerinden kanser antijenlerinin salınması; (2) Kanser antijenlerinin, ana histo-uyumluluk kompleksi sınıfı (MHC) üzerinde antijen sunan hücreler tarafından sunumu; (3) MHC üzerindeki kanser antijenlerinin T hücresi reseptörü tarafından tanınması, bunun T hücresi aktivasyonu ile sonuçlanması; (4) Aktifleştirilmiş T hücrelerinin ticareti; (5) Tümöre infiltrasyon; (6) Tümör içindeki MHC üzerindeki kanser antijenlerinin tanınması; (7) Tümör hücrelerine saldırı, tümör hücresi yaralanması / ölümüyle sonuçlanır (Kunimasa ve Goto 2020).

Kanser yükü küresel olarak büyümeye devam eder ve bireyler, aileler, topluluklar ve sağlık sistemleri üzerinde muazzam fiziksel, duygusal ve finansal baskılar uygular. Düşük ve orta gelirli ülkelerdeki birçok sağlık sistemi bu yükü yönetmeye en az hazırlıklıdır ve dünya çapında çok sayıda kanser hastası zamanında kaliteli tanı ve tedaviye erişememektedir. Sağlık sistemlerinin güçlü olduğu ülkelerde, erişilebilir erken teşhis, kaliteli tedavi ve hayatta kalma bakımı sayesinde birçok kanser türünün sağkalım oranları iyileşmektedir (Organization 2020).

1.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri doğal olarak erken evrelerde yayılma veya metastaz yapma eğilimindedir, bu da tehlikeli ve kolayca tedavi edilemeyen zararlı bir hastalığa neden olur. Vücuttaki herhangi bir organ, özellikle adrenal bezler, karaciğer, beyin ve kemikler akciğer kanserleri tarafından saldırıya uğrayabilir. Bununla birlikte, akciğer kanserlerinin % 90-95' inin daha büyük ve daha küçük hava yollarını (bronşlar ve bronşiyoller) kaplayan epitel hücrelerinden kaynaklandığı ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, akciğer kanserlerine bazen bronkojenik kanserler veya bronkojenik karsinomlar denir (Khanmohammadi ve ark 2020).

Akciğer kanseri, yüksek prevalansı, agresifliği, geç teşhisi, etkili tedavi eksikliği ve kötü prognozu nedeniyle dünyada kanser ölümünün ilk nedenidir (Naeli ve ark 2020).

Akciğer kanserine, kanser baskılayıcı genlerdeki apoptotik sinyalin başarısızlığına neden olan kusurlardan dolayı akciğer dokularındaki kontrolsüz hücre büyümesi neden olur. Apoptoz, hücre çoğalmasını kontrol eden programlı hücre ölümü sürecidir. Hücre döngüsü bozulması akciğer kanseri hücrelerinde apoptozun ana nedenidir, çünkü p53, p27, p21 ve siklinler dâhil birçok faktör hücre döngüsünün fazlarını kontrol eder (Lee ve ark 2019).

Akciğer kanseri, inatçı bir malignite olan, erkeklerde kanserle ilişkili mortalitenin önde gelen nedeninin başında yer almaktadır. Çevresel ve genetik faktörlerin akciğer kanseri etiyolojisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir, kısmen tütün kullanımı akciğer kanseri için ana patojenik faktördür (Qi ve Li 2020).

Kanser tedavisi için yeni teşhis teknikleri, kemoterapötik ajanlar ve tedavi edici stratejiler geliştirilmiş olsa da, hastalık ilaç direnci, metastaz ve düşük uzun süreli sağkalım oranları nedeniyle kritik bir zorluk olmaya devam etmektedir (Fan ve ark 2020).

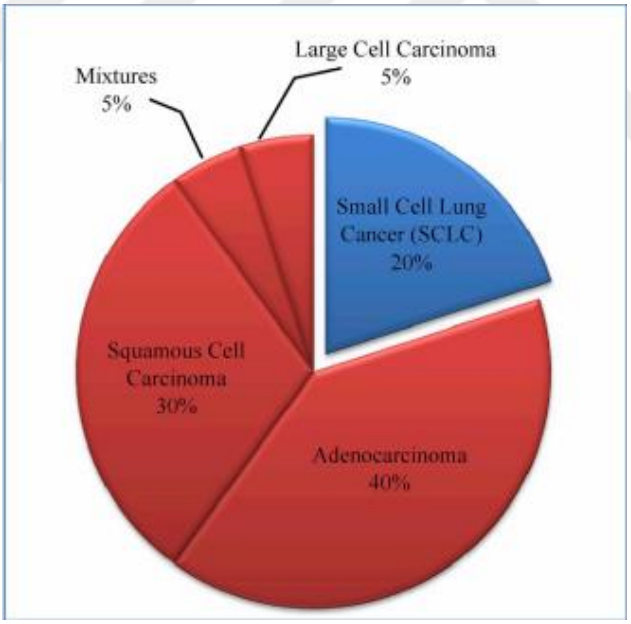
Hastalık erken bir aşamada teşhis edilirse, akciğer kanserinin hayatta kalması iyileşir, ancak hastaların %40'ından azında lokalize hastalık teşhisi konur. Birçok akciğer kanseri semptomunun özgüllüğünün olmaması tanıyı zorlaştırır (White ve ark 2020).

1.2.1. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması

2015 yılında yayınlanan Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre (Tablo 1.1.); akciğer kanseri, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (SCLC) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (NSCLC) olmak üzere iki ana klinikopatolojik kategoride sınıflandırılmıştır (Naeli ve ark 2020). Akciğer kanserinin geleneksel olarak SCLC ve NSCLC'ye sınıflandırılması, akciğer kanserinin gelişimini sağlayan moleküler değişiklikler ve genomik biyobelirteçlerin artan anlayışı ile dönüştürülmüştür (Tan 2020). Şekil 1.6.'da görüldüğü gibi NSCLC, 2 geniş histolojik alt tip, adenokarsinom ve yassı hücreli karsinom olarak kategorize edilen, büyük hücreli karsinom ve karışımlar ile dört alt tipe ayrılan heterojen bir hastalıktır (Lim ve ark 2020). SCLC ayrıca üç kategoriye ayrılır. Bunlar; küçük hücreli karsinom, karışık küçük hücreli/ büyük hücreli karsinom ve kombine küçük hücreli karsinomdur (Khanmohammadi ve ark 2020). SCLC bir tür nöroendokrin tümördür ve bu kanserlerde hücrelerin büyüklüğü NSCLC'dekilerden daha küçüktür (Lee ve ark 2019). Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85-90'ı, SCLC'ye kıyasla ilaç direncinin gelişmesi nedeniyle kanser tedavilerine daha az duyarlı olan NSCLC tipi ile ilişkilidir (Naeli ve ark 2020).

Tablo 1.1. 2015 DSÖ akciğer kanseri sınıflandırması.

1-Adenokarsinom ✓ Lepidik ✓ Papiller ✓ Mikro Papiller ✓ Katı ✓ İnvaziv ✓ Kolloid ✓ Fetal ✓ Enterik ✓ Minimal invaziv	**5-Nöroendokrin Tümörler** ✓ Karsinoid tümörler +Tipik karsinoid +Atipik karsinoid ✓ Küçük hücreli karsinom ✓ Büyük hücreli nöroendokrin karsinom	**9-Tükürük Bezi Tipi Karsinomlar** ✓ Mukoepidermoid karsinom ✓ Adenoid kistik karsinom ✓ Epitelyal miyoepitelyal karsinom	**13- Diğer Karsinomlar** ✓ Lenfoepitelyoma benzeri karsinom ✓ NUT karsinomu
2-Skuamöz Hücre Karsinoması	**6-Büyük Hücreli Karsinom**	**10-Mil Hücreli Karsinom**	**14-Karsinosarkom**
3-Adenoskuamöz Karsinom	**7-Pleomorfik Karsinom**	**11-Dev Hücreli Karsinom**	**15-Pulmoner Blastoma**
4-Mezenkimal Tümörler	**8-Lenfohistiyositik Tümörler**	**12-Ektopik Menşeli Tümörler**	**16-Metastatik Tümörler**



Şekil 1.6. Akciğer kanserinin ana grupları ve oluşum olasılıkları (Khanmohammadi ve ark 2020).

Cerrahi, NSCLC hastaları için radikal bir tedavi olarak önerilmektedir. Bununla birlikte, teşhis sırasında birçok hasta lenf nodu infiltrasyonu ve / veya uzak metastaz ile ileri bir aşamaya girmiştir. Ne yazık ki, metastatik akciğer kanseri hastaları için mevcut tedavi seçenekleri sınırlı ve etkisizdir (Yin ve ark 2020).

Vücuttaki kanser ilerlemesinin şiddetine bağlı olarak, NSCLC I'den IV'e kadar aşamalarda atanır. Evre I'de sadece akciğer dokusu kanserlidir. Sonraki iki aşamada (II ve III), kanser ilerler, ancak göğüs ile sınırlıdır (tümörler III. aşamada daha büyük ve daha invazivdir). Evre IV kanser göğüsten vücudun diğer bölgelerine yayılmıştır (Khanmohammadi ve ark 2020).

Bununla birlikte, NSCLC gelişimi ve ilerlemesini yönlendiren moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (Park ve ark 2020). Metastatik mekanizmayı daha fazla araştırmak ve NSCLC için potansiyel bir terapötik hedef bulmak hayati ve acil bir öneme sahiptir (Wu ve ark 2019). Terapötik ilerlemelere (örneğin, radyasyon, kemoterapi ve hedefli ilaçlar) rağmen, dayanılmaz yan etkiler ve ilaç direnci bu rejimlerin etkinliği ile sınırlıdır (Wang ve ark 2020). Akciğer kanserinde kemoterapi, radyasyon terapisi, cerrahi ve immünoterapide büyük ilerleme kaydedilmesine rağmen, NSCLC için beş yıllık sağkalım oranları sadece %23'tür (Wang ve ark 2020).

1.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Dünya çapında 2011'den bu yana daha fazla akciğer kanseri vakası ve ölümü vardır, 1980-2012 yılları arasında sigara içenlerin sayısı artmış ve tütün içimi ile birlikte gelişmekte olan ülkelerde akciğer kanseri oranları artmaktadır (Bade ve Cruz 2020).

Akciğer kanserinde öngörülen artışlar;

- Nüfusun büyümesi ve yaşlanması
- Kentleşme ve ekonomi
- Sigara içme
- Pasif içicilik
- Hava kirliliği
- Akciğer hastalıkları (tüberküloz, kronik bronşit)
- Obezite
- Fiziksel hareketsizlik ve diyet kalıpları

- Kanserojen kimyasallara mesleki maruz kalma,
- İyonlaştırıcı radyasyon (yani radon bozunma ürünleri ve röntgenler)
- Asbest
- Alkol tüketimi

gibi çeşitli risk faktörlerinin gelişimi ile ilişkili yaşam tarzı faktörlerindeki değişikliklerle de ilişkilidir (Nwagbara ve ark 2020), (de Alencar ve ark 2020).

Akciğer kanserinin patogenezinde, akciğer kanserine (sigara dumanına maruz kalındığında veya kalmadan ve belirli akciğer kanseri türlerinin gelişmesine bağlı olarak) yatkınlığı veya bir bireyin tedavilere karşı duyarlılığı ile ilgili genetik bir bileşen vardır. Ailenin kanser öyküsünün, özellikle erken başlangıçlı akciğer kanseri olan aile üyeleri için önemi, çeşitli akciğer kanseri risk tahmin algoritmalarına dâhil edilmesiyle vurgulanmıştır. Sigara içmeyenlerde ailede akciğer kanseri öyküsü olan sigara içenlerde akciğer kanseri için 2 kat artmış bir risk vardır. Bu nedenle genetik duyarlılığı olan kişiler tütün içiyorlarsa daha yüksek risk altında olabilirler. Akciğer kanserine yönelik genetik riskler daha fazla keşfedildiği için, sigarayı bırakma, tarama ve önleme programlarına yönelik yoğun çabalar da dahil olmak üzere, spesifik müdahaleler için akciğer kanseri yüksek riskli alt grupları hedeflemek mümkün olabilir (Bade ve Cruz 2020). Akciğer kanseri semptomlarının erken teşhis edilmesi ve erken tıbbi yardım arama davranışı, akciğer kanserinden sağkalımı artırma ve mortaliteyi azaltma potansiyeline sahip olabilir. Bununla birlikte, erken evre kanserle tespit edilen ve küratif cerrahi alan hastaların oranı düşüktür ve çalışmaların yaygınlığı %15-20 arasındadır (Cassim ve ark 2019).

1.2.3. Akciğer Kanseri ve Tedavi

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan hastalar için farklı tedaviler mevcuttur. Bazı tedaviler standarttır (şu anda kullanılan tedavi) ve bazıları klinik çalışmalarda test edilmektedir. Klinik çalışmalar yeni tedavinin standart tedaviden daha iyi olduğunu gösterdiğinde, yeni tedavi standart tedavi haline gelebilir (Board 2019). Cerrahi, radyofrekans ablasyonu, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi NSCLC hastalarının prognozunu büyük ölçüde iyileştirmiştir (Huang ve ark 2020).

NSCLC için on tip standart tedavi kullanılır. Bu tedavi yöntemleri Tablo 1.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 1.2. NSCLC için tedavi türleri.

❖ Ameliyat	➢ Klinik çalışmalarda yeni tedavi türleri test edilmektedir.
❖ Radyasyon Tedavisi	1. Kemoprevensiyon
❖ Kemoterapi	2. Radyosensitizör
❖ Hedefli Terapi	3. Yeni kombinasyonlar
❖ İmmünoterapi	
❖ Lazer Tedavisi	
❖ Fotodinamik tedavi (PDT)	
❖ Kriyocerrahi	
❖ Elektrokoter	
❖ Dikkatli Bekleme	

Erken evre NSCLC (evre I – II) için mevcut tedavi standardı rezeksiyondur. Rezeksiyona ek olarak, hastalara stereo taktik radyoterapi, adjuvan kemoterapi veya tümör evresine bağlı olarak her ikisinin bir kombinasyonu sunulur. Evre III – IV teşhisi konmuş olan hastalar kemoterapi, kemoradyoterapi immünoterapisi, kombinasyonlar ve spesifik genetik ilaçlanabilir mutasyonların varlığına dayalı hedefli tedavi gibi sistemik tedavi için uygundur (van Delft ve ark 2020).

Mevcut NSCLC tedavileri esas olarak cerrahi ve kemoterapiyi içerir, ancak geleneksel tedavi etkisizse hedeflenen ilaçlar tercih edilir. Mevcut tedavi rejimleri monoterapi tipik olarak tek hedefli ilaçları içermesine rağmen, kombinasyon terapisinin ilerlemiş veya metastatik hastalığı olan hastalar üzerinde gelişmiş etkileri olabilir. Bununla birlikte, bir çalışma, ilerlemiş NSCLC'li hastaların kombinasyon tedavisine anlamlı bir yanıtı olmadığını ve bunun avantajları konusunda tartışmaya yol açtığını göstermiştir. Ek olarak, hedeflenen ilaçlar hipertansiyon, döküntü, paronişi, ishal, nötropeni ve yorgunluk gibi olumsuz olaylar açısından yüksek bir riskle ilişkilidir. Bu nedenle, kombine bir tedavi uygulanırken olumsuz yan etki insidansındaki potansiyel artışlara büyük önem verilmiştir (Zhou ve ark 2020).

Akciğer kanserinin ileri evrelerinde kemoterapi genellikle sistemik dolaşım yoluyla intravenöz olarak uygulanan ilk tedavi yöntemi olarak kabul edilir. Bununla birlikte, ya tek başına ya da başkalarıyla birlikte kullanılan geleneksel kemoterapi, kullanımını sınırlayan birçok engelle karşı karşıyadır. Kemoterapötik ajanların çoğu, zayıf sulu çözünürlük, seçicilik eksikliği ve ilk geçiş etkisi yoluyla kapsamlı metabolizmaya sahiptir, bu da daha sonra tümör hücrelerini ve normal sağlıklı hücreleri etkileyen terapötik seviyeye ulaşmak için daha yüksek dozlar gerektirir (Abdelaziz ve ark 2019). Bununla birlikte, yan etkilerin ve ilaç direncinin klinikte hala çözülmesi gerekmektedir.

Yenilikçi tedavilerin (hedefli terapi ve immünoterapi gibi) mevcudiyeti açısından elde edilen önemli ilerlemeye rağmen, akciğer kanseri, hastaların yaşam kalitesi üzerinde olumsuz bir etki yaratan fiziksel, psikolojik ve sosyal zorluklarla ilişkili olmaya devam etmektedir. Ayrıca, dispne, kas kaybı, ağrı, yorgunluk, iştah kaybı ve fiziksel uygunluk ve akciğer fonksiyonlarının bozulması gibi kanser ve tedavi ile ilişkili komplikasyonlar, hastaların durumunu daha da bozabilir (Avancini ve ark 2020).

Ne yazık ki, cerrahi radyoterapi ve kemoterapiyi içeren geleneksel tedavi yaklaşımları sınırlı başarı oranı göstermiştir. Bu nedenle, akciğer kanseri gelişimini geriletmek için alternatif tedavileri tanımlamak son derece önemlidir (Saadaoui ve ark 2020).

Kanser türleri, kemoterapötik tedavilere çoklu ilaç direnci (MDR) ile temsil edilen ortak bir özelliğe sahiptir. Toksisite ve sentetik çoklu MDR ajanlarının özgüllüğünün olmaması nedeniyle, son araştırmalar, doğal bileşiklerin kanserde MDR'yi aşmada yararlı etkilerine odaklanmıştır (Costea ve ark 2020).

"Doğal ürünler" terimi, doğal kaynaklardan izole edilmiş saflaştırılmış organik bileşikleri ifade eder. Doğal ürünler kimyasal sentez yoluyla hazırlanabilir, diyet takviyelerinde bulunabilir ve doğal kaynaklardan elde edilen gıdalarda bulunabilir. Doğal bileşiklerin düşük toksisite profillerine sahip oldukları ve kanser hastaları tarafından iyi tolere edildiği bilinmesine rağmen, düşük biyoyararlanım etkinliklerini sınırlar (Wang ve ark 2020). Doğal ürünler, gücü ve hafif yan etkileri nedeniyle çeşitli geleneksel, tamamlayıcı ve alternatif sistemlerde giderek daha popüler hale gelmektedir. Doğal bileşiklerin birçok insan hastalığına, özellikle kanserlere karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark 2020). Bitkiler gibi doğal kökenlerden kansere karşı ilaçları keşfetmek için çeşitli araştırma çalışmaları yürütülmekte ve bilinen kantitatif etkileşimleri olan 195.000'den fazla biyoaktifi tanımlanmaktadır. Bu bileşikler klinik düzeyde

test edilmiş ve 453 kanser hastası üzerinde yapılan son çalışmalar, hastaların %77'sinin bağışıklık sistemini iyileştirerek veya hatta kanseri doğrudan ortadan kaldırarak kanserle ilgili semptomları azaltmak için geleneksel tedaviyi spesifik bitkisel ilaçlarla tamamladığını göstermiştir (Saadaoui ve ark 2020). Bitkisel ilaç fraksiyonları DNA onarım mekanizmalarını uyarır, apoptozu indükler, miRNA'ları düzenler, bu koruyucu enzim seviyelerini arttırır, bağışıklık sistemini uyarır ve antioksidan aktivite uygular (Abdulridha ve ark 2020).

Fitokimyasallar, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan doğal, bitki kaynaklı bileşiklerdir. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalar, tümör proliferasyonu, büyümesi ve metastazı üzerindeki etkilerini göstermiştir. Ayrıca, doğal bileşiklerin kullanımları, sentetik moleküllere kıyasla geniş kullanılabilirlikleri, yüksek toleransları ve maliyet etkinlikleri ile sürdürülmektedir. 8000'den fazla farklı polifenol bileşik (fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignalar) doğal kaynaklardan (meyveler, sebzeler ve tohumlar) alınır (Zanoaga ve ark 2019).

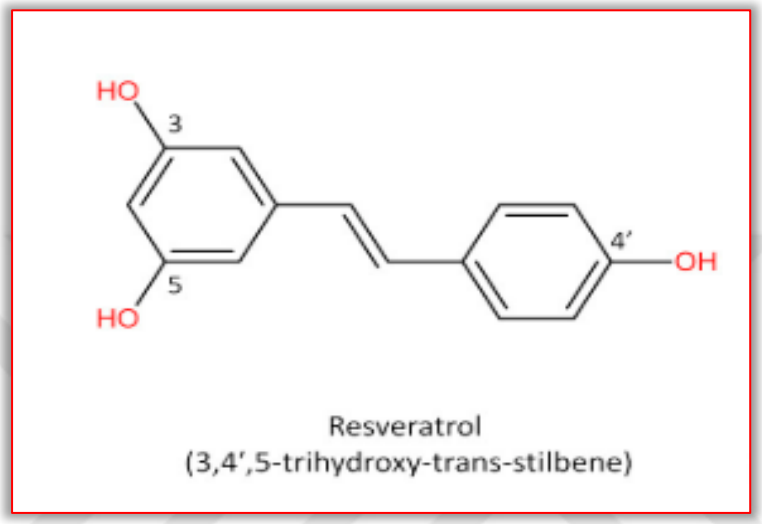
Polifenoller; antioksidan, antienflamatuar, anti-kanserojen, immünomodülatör vb. çok çeşitli sağlık yararları nedeniyle biyolojik aktiviteye sahip önemli diyet bileşenleri olarak kabul edilir. Epidemiyolojik çalışmalar, fenolik bileşikler açısından zengin gıda alımının kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, obezite veya diyabet için kimyasal önleyici etkileri olduğunu göstermiştir. Polifenollerin kanser kimyasal önleyici etkileri, antioksidan kapasitenin, proliferasyonun, hayatta kalmanın, anjiyogenez ve metastazın inhibisyonunun, bağışıklık ve enflamatuar yanıtların modülasyonunun veya pro-karsinojenlerin inaktivasyonunun sonucudur (Costea ve ark 2020).

1.3. Resveratrol

Stilbenler, çok çeşitli bitkilerde ve diyet takviyelerinde bulunan küçük moleküler ağırlıklara (yaklaşık 200-300 g/mol) sahip fitokimyasallardır. Stilben bazlı bileşikler, çok çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle özellikle ilgi çekmiştir.

Bunlar arasında resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilben), fitoaleksin olarak sınıflandırılan, mantar enfeksiyonu ve ultraviyole radyasyon gibi stresli koşullara yanıt olarak doğal olarak 70'den fazla bitki türü (üzüm, yaban mersini, ahududu, dut ve yer fıstığı dahil) tarafından üretilebilen doğal bir non-flavonoid polifenoldür (Ferraz da Costa ve ark 2020). Bununla birlikte en yüksek resveratrol konsantrasyonları kırmızı üzümde ve daha kesin olarak kırmızı üzüm derisinde yoğunlaşmıştır. Çay, çilek, nar, fındık, yaban mersini ve bitter

çikolatanın da değişen konsantrasyonlarda resveratrol içerdiği bildirilmektedir (Shaito ve ark 2020). Üzüm derisi gram başına 50-100 mg resveratrol içerir, ek olarak baskın olarak bildirilen bir diğer kaynak geleneksel Çin ve Japon tıbbında yaygın olarak kullanılan *Polygonum* cuspidatum'un (Japon Madımağı) köküdür (Yousef ve ark 2017). Resveratrol ilk olarak 1939'da *Veratrum grandiflorum*'dan (Beyaz karaca otu) Takaoka tarafından izole edilmiştir (Shaito ve ark 2020).



Şekil 1.7. Resveratrolün yapısı (Ferraz da Costa ve ark 2020).

Resveratrol cis- ve trans- olarak iki geometrik izomer olarak bulunur. Trans- ve cis-resveratrol serbest olabilir veya glikoza bağlanabilir. Dönüşümün başlıca biyolojik etkileri olduğu görülmektedir (Repossi ve ark 2020). Ayrıca, izomerleri, katkı maddeleri, türevleri ve konjugatları, antioksidan ve anti-kanserojen etkileri için yoğun bir şekilde incelenmektedir (Kisková ve Kassayová 2019). Ancak trans formu baskın formdur ve yan zincirlerinin düşük sterik engeli nedeniyle en güçlü terapötik faydalara sahiptir. Resvetarolün trans formu Şekil 1.7.'de gösterilmiştir. Trans formu rekombinant olarak maya ekstraktlarından (Saccharomyces cerevisiae) elde edilebilir ve endüstride bir gıda takviyesi veya kozmetik bir bileşen olarak kullanılır.

Bitkilerde bulunan trans-resveratrol bileşiği oldukça konjüge edilmiş bileşiktir ve trans formunun 300-340 nm aralığında ışık, ısı veya ultraviyole radyasyona maruz kalması durumunda daha az biyoaktif cis formuna izomerizasyon meydana gelebilir (Kim ve ark 2020, Shaito ve ark 2020).

Biyoyararlanım, metabolik olarak biyoaktif bitki bileşenlerinin önemli bir özelliğidir. Moleküllerin biyoyararlanımı, yapı ve konformasyon, polarite, çözünürlük, bölme katsayısı ve sindirim sistemindeki stabilite gibi fiziko-kimyasal özelliklerinin bir sonucudur. Resveratrol suda sadece az çözünür (0.069 g/L) (Kim ve ark 2020). Suda zayıf çözünürlük göstermesi biyoyararlanımını bozar. Bununla birlikte, artan dozaj (50 mg·kg-1'e kadar) veya hatta siklodekstrinlerle kaplanmışsa, resveratrolün biyoyararlanımını geliştirmez. Ayrıca, resveratrolün zayıf metabolik stabilitesinin biyoyararlanımını azalttığı ve böylece biyoaktivitesini azalttığı bildirilmektedir (Yang ve ark 2019). Bununla birlikte, resveratrolün zayıf biyoyararlanımı, tamamlayıcı tedavinin uygulanmasıyla ele alınabilir. Polifenollerin diğer biyoaktif bileşenler ve mikro besinlerle birleştirilmesinin, muhtemelen polifenollerin biyoyararlanımını arttırarak ve kombine ajanların metabolik etkilerini genişleterek sinerjik terapötik etkiler ürettiği bildirilmiştir (Shaito ve ark 2020).

Suda düşük çözünürlüğü sayesinde resveratrol, kan akışındaki proteinlere ve protein taşıyıcılara bağlanır. Plazma taşıyıcılarından biri olan albümin ile hücre yüzeyini yakalamak için veya HDL<LDL<çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) sırasıyla lipoproteinler ile etkileşime girer. Resveratrol emilimi, pasif difüzyon veya hücre zarından hücre içi biyolojik etkilerine izin vermek için iyon kanalları yoluyla bir nakil yoluyla meydana gelir (Kisková ve Kassayová 2019).

1.3.1. Resveratrolün Tıbbi Yararları

Resveratrol 1997'den beri Jang ve ark. ilk önce farelerde tümör başlangıcı, terfisi ve ilerlemesini inhibe ederek *in vivo* karsinogenezi modüle etme yeteneğini göstermiştir. Bundan sonra, resveratrolün çok aşamalı karsinogenez sürecini engellemedeki rolü ile ilgili yayınlanmış makale sayısı önemli ölçüde artmıştır (Ferraz da Costa ve ark 2020). Resveratrolün 1997'de saygın Science dergisinde tümör başlatma, yükselme ve ilerleme aşamalarında güçlü antikanser özelliklerine sahip olduğu bildirildiğinden, biyoaktiviteleri ve sağlık yararları yoğun bir şekilde araştırılmıştır (Meng ve ark 2020).

Resveratrolün, anti-enflamatuar, antioksidan, anti-trombosit, anti-hiperlipidemik, immüno-modülatör, anti-kanserojen, kardiyoprotektif, vazorelaksan ve nöroprotektif etkiler dahil olmak üzere birçok terapötik fayda sergilediği bildirilmiştir. Özellikle, bu polifenolün, endotel fonksiyonunu iyileştirebileceği, reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyebileceği, iltihabı azaltabileceği, trombosit agregasyonunu inhibe edebileceği, lipid profilini ve

aterosklerozu artırabilecek diğer ana faktörleri iyileştirebileceği görülmektedir (Shaito ve ark 2020).

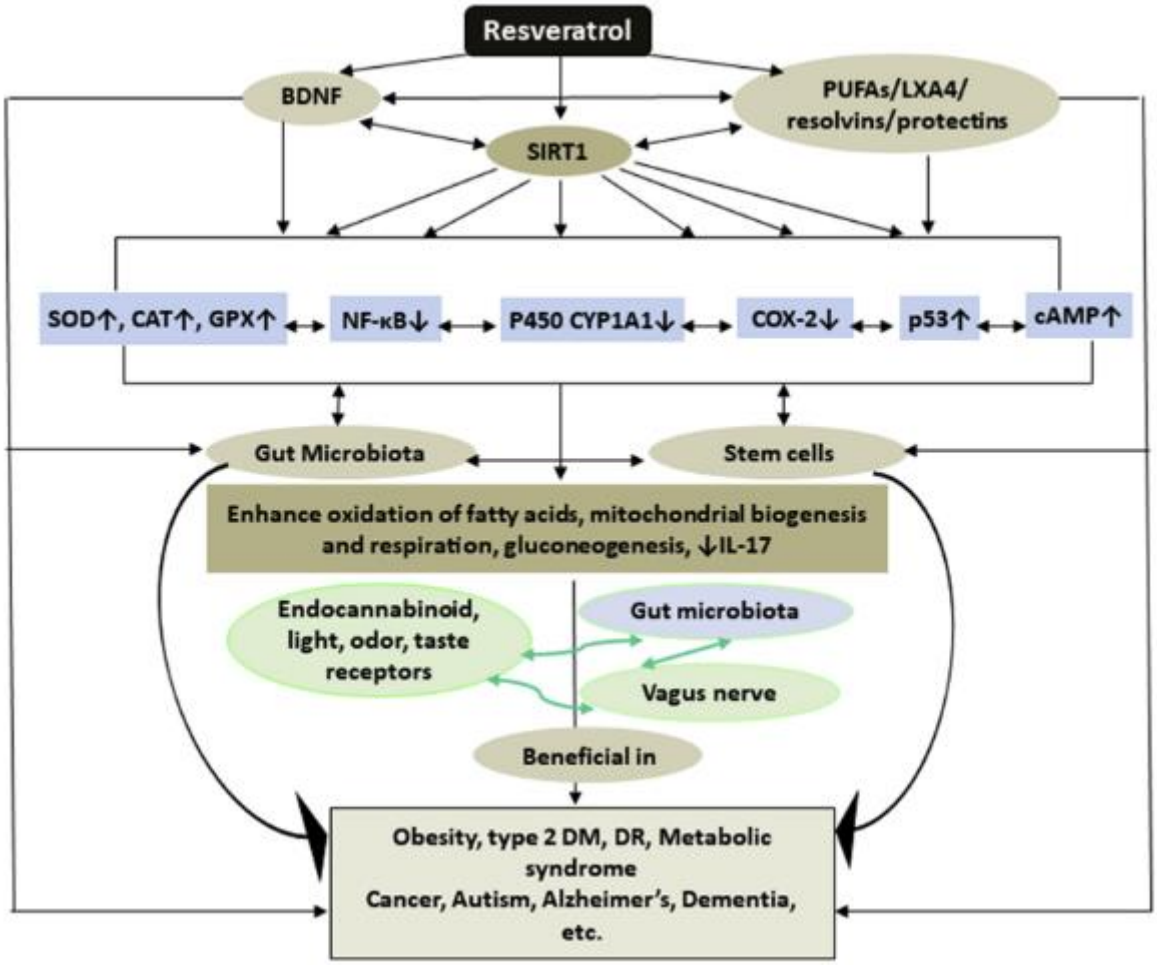
Birçok epidemiyolojik çalışma resveratrolün kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi bazı hastalıkların önlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Ek olarak, çok sayıda deneysel çalışma resveratrolün kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite, kanser, karaciğer hastalıkları, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı dahil olmak üzere redoks/enflamatuar / bağışıklık sinyal yolları ve lipit ve glikoz metabolizması arasında karşılıklı etkileme yoluyla çok çeşitli hastalıklara faydalı olduğunu göstermiştir (Meng ve ark 2020). Resveratrolün ayrıca makrofajlar ve efektör T hücreleri de dahil olmak üzere bazı bağışıklık hücrelerini aktive ettiği ve anti-tümör etkilerini arttırdığı ileri sürülmüştür (Zhao ve ark 2018). Deneysel araştırmaların ümit verici sonuçlarından yola çıkarak, birçok klinik çalışma, bazı hastalıklara karşı resveratrolün etkinliğini de ortaya koymuştur (Meng ve ark 2020). Ayrıca redoks ile ilişkili mekanizmalar, resveratrolün kardiyoprotektif etkilerini ortaya çıkardığı potansiyel yollar olarak belirtilmiştir. Bu redoks ile ilişkili mekanizmalar, hipoksi / yeniden oksijene bağlı oksidatif stres altında mitokondriyal fonksiyonun korunmasını, peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin up-regülasyonunu ve nitrik oksit (NO) üretiminin modülasyonunu içermektedir (Shaito ve ark 2020).

Resveratrolün çeşitli faydaları, antioksidan özelliklerine atfedilir, ancak kardiyoprotektif, immünomodülatör, antienflamatuar ve kemopreventif aktiviteleri diğer mekanizmalara dayanır. Resveratrolün antioksidan potansiyeli ile ilgili olarak, bu bileşik çok sayıda antioksidan enzimin aktivitesini indükleme kabiliyeti nedeniyle hem serbest radikal temizleyicisidir hem de güçlü bir antioksidandır. Son on yılda, çeşitli çalışmalar, ROS oksidatif stres gelişimini tahkim etmede oynadığı kritik rolü vurgulamıştır. Düşük ROS sentezi seviyeleri, proliferasyon, sinyal iletimi, gen ekspresyonu ve konakçı savunması gibi fizyolojik fonksiyonların korunmasına izin verirken, ROS birikimindeki fazlalık, hücresel makromolekülleri (lipit, proteinler ve nükleik asitler) etkileyen, zararlı potansiyel ile karakterize edilen oksidatif değişiklikler nedeniyle zararlı olabilir. Gerçekten de, azotlu bazlar ve şeker fosfat omurgası ile reaksiyona girerek potansiyel tek ve çift zincirli DNA kopmalarına neden olabilen ROS tarafından deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı mutajenez, onkogenez ve yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir (Gianchecchi ve Fierabracci 2020).

Son yıllarda, resveratrolün antitümör etkilerinden sorumlu moleküler mekanizmaların netleştirilmesinde hızlı ilerleme kaydedilmiştir. Daha spesifik olarak, resveratrolün kimyasal

önleyici kabiliyeti bazı yetenekleriyle bağlantılıdır. Bunlar: farklı kanserojenlerin aktivasyonunu durdurma ve/ veya detoksifikasyonunu artırma, hedef hücre DNA'sının oksidatif hasarını önleme, enflamasyonu azaltma, tümör hücrelerinin proliferasyonunu azaltma (Gianchecchi ve Fierabracci 2020) ve anjiyogenezi inhibe etmedir (Duan ve ark 2019). Resveratrolün hem *in vitro* hem de *in vivo* kemoterapötik potansiyeli, kanser ilerleme anjiyojenik ve metastatik süreçlerinin inhibisyonu ve kemoterapi direncinin zayıflatılmasıyla sürdürülmektedir. Resveratrol, PI3K / Akt / mTOR ve mitojenle aktifleştirilen protein kinaz yollarını (MAPK) içeren birden fazla yolu düzenleyerek veya inhibe ederek çeşitli premalign veya kanserli hücrelerin apoptozunu teşvik eder. Bu yetenekler kimyasal önleyici ve kemoterapötik potansiyelinin temelini oluşturabilirmektedir (Gianchecchi ve Fierabracci 2020).

Şekil 1.8.'de görüldüğü gibi; flavonoid resveratrolün, anti-enflamatuar etkilerine, transkripsiyon faktörü NF-kB, sitokrom P450 izoenzim CYP1A1, siklooksijenaz (COX) enzimleri, Fas / Fas ligand aracılı apoptoz, p53, mTOR, siklinler, çeşitli fosfo-diesterazlar ve Epac1/ CaMKKb/ AMPK/ SIRT1/ PGC-1 yolunda modülatör eylemleri aracılık eder. Bu eylemler yağ asitlerinin oksidasyonunu, mitokondriyal biyogenezi ve solunumu ve glukoneogenezi kolaylaştırır. Resveratrol, aktif T hücrelerinin apoptozunu indükler, pro-enflamatuar tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), interlökin-17 (IL-17) ve diğer pro-enflamatuar moleküllerin üretimini baskılar. Hipoksiye bağlı faktör- la (HIF-1a) ve vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonlarını inhibe ederek, diyabetik retinopati ve kanserde faydalı olabileceğini ima eden neo-anjiyogenezde bir azalmaya yol açar. Resveratrol, histon deasetilazlara ait bir molekül olan Sirtuin 1'i (SIRT1) ve peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör-g koaktivatör-1a'yı (PGC-1a) aktive eder ve böylece mitokondri fonksiyonunu geliştirir. SIRT1 bir yaşlanma karşıtı molekül olarak işlev görebildiğinden ve yaşa bağlı hastalıkları geciktirdiğinden, resveratrolünde benzer bir işlevi olabileceğini düşündürmektedir. SIRT1 ve resveratrolün aşırı ekspresyonu, insülin duyarlılığını artırır (Repossi ve ark 2020).



Şekil 1.8. Faydalı eylemlerinin temelini oluşturabilecek, resveratrolün çeşitli eylemlerini gösteren şema (Repossi ve ark 2020).

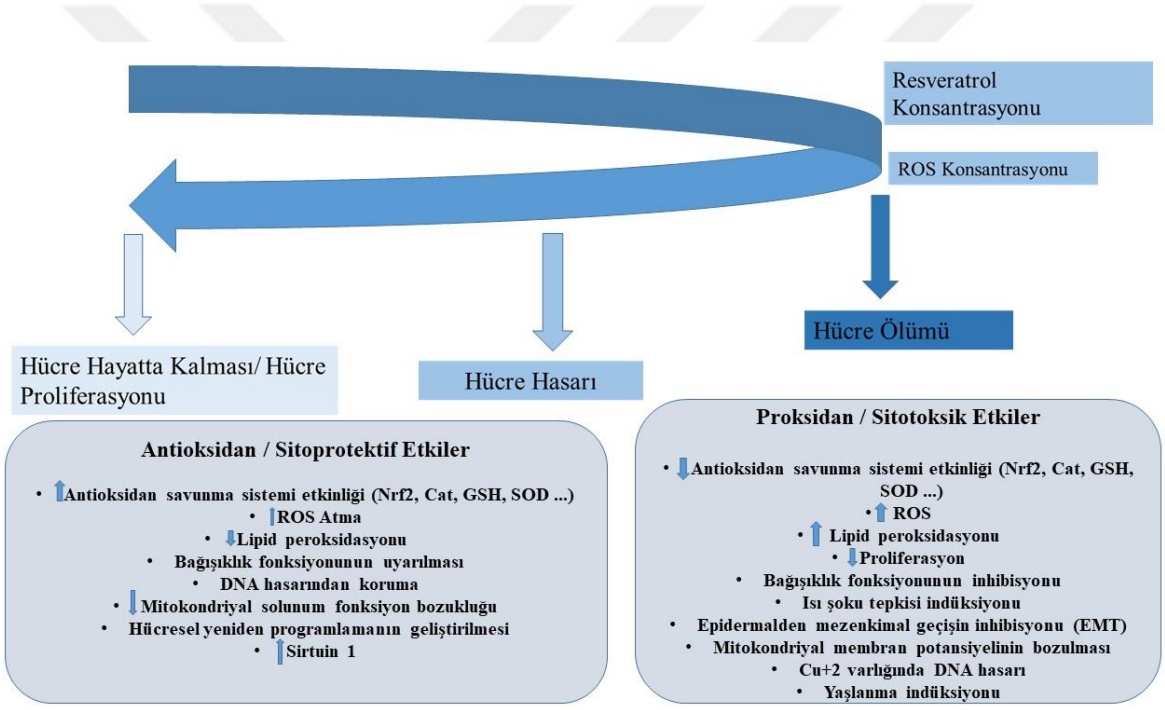
Ek olarak resveratrol, kemoterapötik ajanların çoğuyla ilişkili çoklu ilaç direncinin (MDR) üstesinden gelinmesinde hayati bir rol oynar. Bu, P-glikoprotein aktivitesini yasaklama yeteneğine atfedilmiş, böylece birlikte uygulanan kemoterapötik faydalı yüklerin hücre içi birikimini güçlendirmiştir (Abdelaziz ve ark 2019).

1.3.2. Resveratrolün Doza Bağlı Etki Mekanizması

Her ne kadar *in vitro*, *ex vivo* ve hayvan çalışmaları resveratrolün çeşitli sağlık yararları ve kardiyovasküler koruma uygulayabildiğini gösterse de, özellikle şu ana kadar mevcut olan insan klinik çalışmaları resveratrolün hastalıklara ve bunların sekellerine karşı koruyucu etkileri ile ilgili tartışmalı sonuçlar göstermiştir. Bu çelişkili bulguların ardındaki nedenler çeşitlidir;

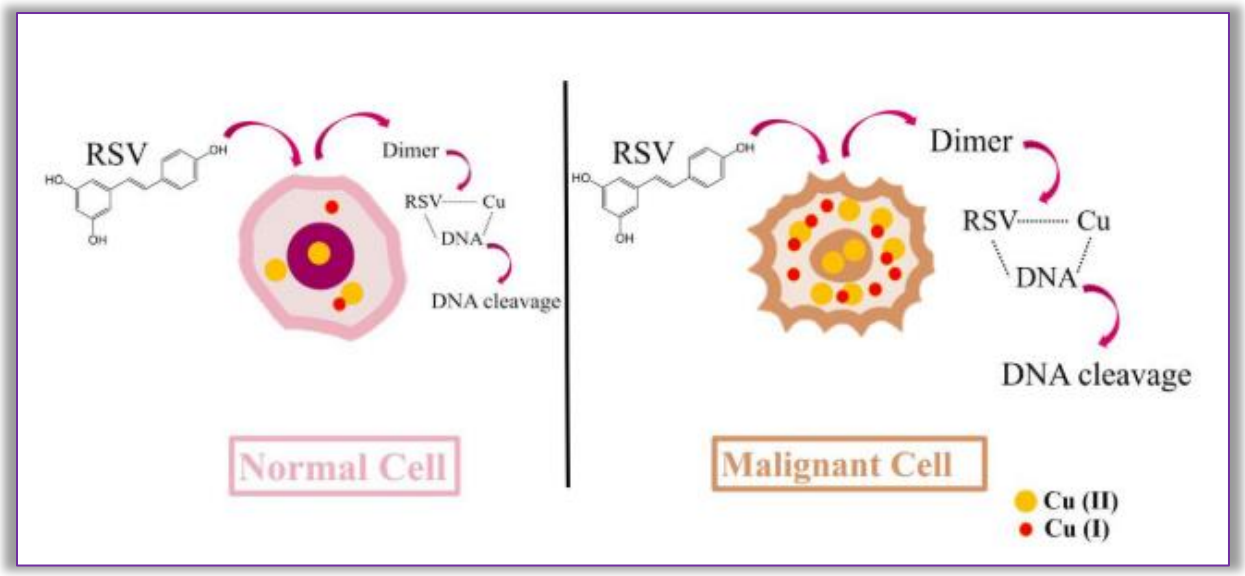
bununla birlikte, kayıtlı hastaların özellikleri, kullanılan resveratrol dozları ve takviye sürelerindeki farklılıklar, en azından kısmen, olası nedenler olarak önerilmiştir. Özellikle, toksisite sorunlarını artırmadan resveratrol sağlık yararlarını en üst düzeye çıkarabilen optimal resveratrol dozu açıklanmaya devam etmektedir ve kapsamlı bir araştırma alanıdır (Shaito ve ark 2020).

Resveratrol ile etkileşime giren hedeflerin ve yolların sayısı şaşırtıcıdır. Çünkü çoklu gruplar iltihap, redoks, hücre döngüsü, ölüm ve hayatta kalma, kinazlar, mitokondriyal fonksiyon, otofaji ve çoklu reseptörleri, transkripsiyon faktörlerini ve iyon kanalını etkilediğini bulmuştur. Resveratrol sonuç olarak doza bağlı olarak genellikle bifaziktir (Nunn ve ark 2020).



Şekil 1.9. Resveratrolün bifazik hormetik doza bağlı etkileri.

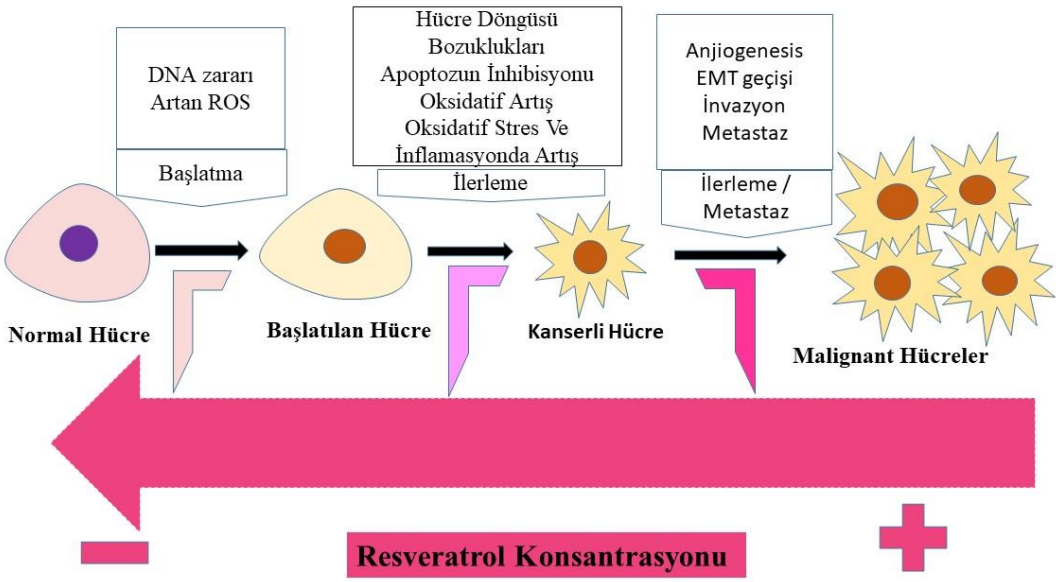
Şekil 1.9.'da görüldüğü gibi, resveratrol, bifazik doza bağlı etkiler sergiler. Düşük konsantrasyonlarda, DNA hasarından ve oksidatif stresden koruyabilen bir antioksidan görevi görmektedir. Öte yandan resveratrolun, yüksek konsantrasyonlarda oksidatif stresi arttırırken DNA hasarını destekleyen pro-oksidan görevi görür. Düşük ve yüksek konsantrasyonlar, sırasıyla kanser oluşumunun önlenmesinde (kanser önleyici) ve kanser tedavisinde (sitotoksik) faydalı etkiler sunar.



Şekil 1.10. Resveratrol ve bakır kaynaklı sitotoksisite (Shaito ve ark 2020).

Resveratrolün sitotoksik mekanizmaları arasında kromatin bağlı bakır da dahil olmak üzere endojen bakır iyonlarının mobilizasyonu bulunur. Şekil 1.10.'a bakılacak olursa resveratrol, Cu (II) varlığında (malign hücrelerde önemli ölçüde artmış olan) bir dimere oksidasyona uğrar. Bu elektron transferi Cu (II)'yi Cu (I)'e düşürür. Dimer, DNA'yı, DNA'nın etkili bir şekilde yarılmasını sağlayan bir DNA-Resveratrol–Cu (II) üçlü kompleksi oluşturacak şekilde bağlayabilir. Kanser hücrelerinde resveratrol ve bakır kaynaklı DNA hasarının önemli ölçüde daha fazla olacağı düşünüldüğünde, bu mekanizma yüksek konsantrasyonlarda resveratrol kullanarak kanser hücrelerinin seçici olarak öldürülmesi için bir yol sunmaktadır (Shaito ve ark 2020).

İlginç bir şekilde, resveratrol gibi bitki polifenollerinin pro-oksidan etkisinin, kanser hücrelerinin malign fenotipini inhibe edebilen sitotoksik özellikleri için ortak bir mekanizma olabileceği öne sürülmüştür. Düşük resveratrol dozlarının kanserin erken evrelerini (başlangıç ve terfi) hedeflediği bildirilirken, yüksek resveratrol konsantrasyonları pro-oksidan etkileri nedeniyle hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Bu, birkaç kansere karşı potansiyel bir kemoterapi olarak kullanılabilen bir fırsat penceresi sunar (Şekil 1.9. ve Şekil 1.10.). Gerçekten de resveratrol, malign melanom hücrelerinin apoptozuna ve hücre döngüsü durmasına yol açabilir (Shaito ve ark 2020).



Şekil 1.11. Resveratrolün karsinogenezin tüm aşamalarını etkileyebilmesi.

Şekil 1.11.'de görüldüğü gibi; resveratrol konsantrasyonuna bağlı olarak kanser gelişiminin çeşitli aşamalarını zayıflatabilmektedir. Düşük ila orta konsantrasyonlarda resveratrol, kimyasal önleyici bir ajan olarak hareket ederek kanser başlangıcını engelleyebilir. Bu, spontan mutasyonların baskılanması ve tümör büyümesinin azalmasına yol açabilecek kanser tanıtımının azaltılmasıyla elde edilir. Daha yüksek konsantrasyonlarda resveratrol, karsinogenezin geç aşamalarını değiştirebilir. Bir sitotoksik ajan olarak hareket ederek, anjiyogenezin inhibisyonu ve primer tümör hücrelerinin istilası yoluyla kanser hücrelerinin ilerlemesini ve metastazını durdurabilir. Bu nedenle resveratrol, erken evrelerinde kanser oluşumunu önlemek veya sitotoksik bir ajan olarak hareket ederek ilerlemeyi ve müteakip metastazı durdurmak için kullanılabilmektedir.

1.4. Isı Şok Proteinleri

Isı şok proteinleri (Hsp), hücrelerde her yerde ifade edilen moleküler şaperonların üyeleridir ve protein katlanması, protein stabilitesi ve hücresel homeostazın korunmasında önemli bir rol oynarlar (Mittal ve Rajala 2020). "Moleküler şaperonlar" terimi, polipeptit zincirlerinin katlanmasını ve çeşitli alıcı proteinlerin moleküllerindeki konformasyonel geçişleri düzenleyen belirli bir hücresel protein sınıfını belirtir. Böyle bir aktivite, her yerde

şaperonların biyosentezi kontrol etmesine izin verir. Proteinlerin olgunlaşması ve parçalanması, zarlar boyunca protein taşınması, protein oligomerlerinin birleştirilmesi, farklı enzimlerin, reseptörlerin, transkripsiyonel faktörlerin vb. uyumlu fonksiyonları ve dolayısıyla hücredeki hemen hemen tüm hayati süreçlerin önemli modülatörleri olabilir (Kabakov ve ark 2020). Aksi takdirde, bunlara atfedilen fonksiyonlar, "alıcı" proteinlerinin hücre altı taşınmasını veya belirli sinyal yollarına katılımı içerir. Strese yanıt olarak, kısmen denatüre edilmiş birçok protein birikir ve kümeleşir ve hidrofobik kalıntılarının maruz kalması yoluyla protein agregatları oluşturur (Jego ve ark 2020).

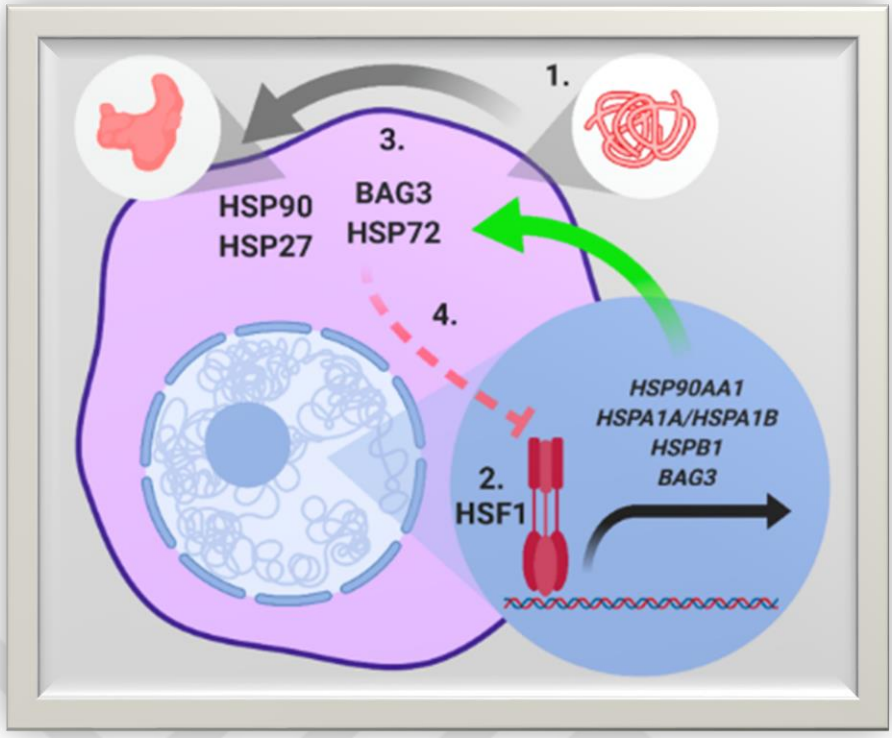
Bu proteinler, ısıya, oksidatif strese ve kimyasallara yanıt olarak, hücrelerin çevresel strese rağmen hayatta kalmasını sağlayan önemli bir hücresel mekanizma olarak yüksek oranda ifade edilmiştir (Jafari ve ark 2020). Hsp'ler ilk olarak ısı stresi ile indüklenen bir grup protein olarak keşfedilmiştir, ancak şimdi UV ışığına, yara iyileşmesine, doku yeniden şekillenmesine, patojenlere, kanserlere vb. yanıt olarak ifade edildiği bilinmektedir (Mittal ve Rajala 2020). Kanser hücreleri, protein sentezinde hızlı proliferasyon ve azalmış kalite kontrolü nedeniyle sabit bir hücresel stres durumundadır. Bu durumları sağlayarak, Hsp'ler birçok kanserde yüksek oranda eksprese edilir ve tümör oluşumu sırasında hücresel yanıtın işlevinde ve düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır (Jafari ve ark 2020). Isı şoku proteinleri insan kanserinde teşhis, prognostik ve terapötik biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır (Sun ve ark 2020). Stres proteinleri olarak da adlandırılan Hsp'ler kemoterapi de dahil olmak üzere çok çeşitli eksojen veya hücre içi streslerin neden olduğu yüksek oranda korunmuş moleküler şaperonlardır (Jego ve ark 2020).

Molekül ağırlıklarına göre, Hsp'ler korunmuş beş ailede sınıflandırılmıştır. Bunlar: Hsp110 (HspH) olarak da adlandırılır), Hsp-90 (HspC), Hsp-70 (HspA), Hsp-60 (HspD / E) ve küçük Hsp' lerdir (HspB). Hsp'lerin ekspresyonu çoğunlukla, bir ısı şok elemanı (HSE) olarak bilinen kısa, yüksek oranda korunmuş bir DNA sekansına bağlanmak için stresi takiben sitoplazmadan çekirdeğe geçebilen ısı şok faktörü 1 (HSF1) tarafından düzenlenir (Jego ve ark 2020).

Hsp-27, düşük moleküler kütleli bir proteindir ve küçük Hsp'leri alt ailesinin bir üyesidir. Fonksiyonu, translasyon sonrası bir modifikasyon olan fosforilasyon ile düzenlenir; Hsp-27'nin anormal fosforilasyonunun kanser ilerlemesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Cpn60 ve HSPD1 olarak da bilinen Hsp-60, yapısal olarak ilgili şaperoninler ailesine aittir. İnsanlarda Hsp60, kromozom 8 üzerinde bulunan HSPD1 geni tarafından kodlanır. Hsp-60, büyük ölçüde

mitokondri matriksinde bulunur ve mitokondriyal proteinlerin katlanmasında geniş bir rol oynamaktadır. Fonksiyonel Hsp-60, substrat bağlanması ve katalitik aktivitesi için bir kofaktör görevi gören Hsp10'u gerektirmektedir. 70 kDa moleküler ağırlığa sahip bir protein olan Hsp-70, iki ana izoform içeren yüksek oranda korunmuş moleküler şaperonlar ailesine aittir. Hsp-70 ailesi proteinlerinin diğer üyeleri organel ve dokuya özgü lokalizasyon gösterir; glikoz-regüle protein (Grp) 78, endoplazmik retikulumda bulunur ve Grp75, mitokondrinin bir sakinidir. Hsp-70, ısı stresi altında ve toksik kimyasallara yanıt olarak yukarı regüle edilen çok çeşitli protein katlama işlemlerinde yer almaktadır. Bu proteinler ayrıca hücreleri hipoksi, değişen pH, oksidatif stres, DNA hasar tepkisi ve diğer birçok stres koşullarında canlı tutmaktadır (Mittal ve Rajala 2020).

Moleküler şaperon genleri ya yapısal olarak sentezlenebilir ya da uyarılabilir Hsp genleri durumunda, gerilmemiş hücrelerde sessiz ya da zayıf bir şekilde eksprese edilmektedir. Ancak stres sonrası, protein katlanmasındaki krizle başa çıkmak için dramatik oranlarda açılır. İndüklenebilir Hsp genlerinin her biri, promotörleri içinde, strese neredeyse anında maruz kalan, bir monomerden trimer formuna dönüşen ve Hsp genlerini güçlü bir şekilde indükleyen bir protein olan ısı şoku transkripsiyon faktörü 1 (HSF1) için bağlanma yerleri içermektedir (Lang ve ark 2019).



Şekil 1.12. Isı şok proteinleri-1 (HSP1) aracılı proteotoksik stres tepkisinin merkezi dogması (Lang ve ark 2019).

Şekil 1.12.'de; (1) Isı şoku, oksidatif stres, ağır metallere maruz kalma veya proteazom inhibisyonu gibi, doğal olmayan protein konformasyonlarının (proteotoksik stres) yüksek seviyelerini indükleyen hücresel stres faktörleri, HSF1' in aktivasyonuna yol açar. (2) HSF1 çekirdeğe taşınır ve HSF1 trimerleri, stres ile indüklenebilir genlerin promotör bölgesinde hızlı bir şekilde ısı şoku elemanlarına (HSE) bağlanır ve mRNA ekspresyonunu transaktive eder. (3) Artmış sitosolik Hsp seviyeleri, doğal fonksiyonel protein yapısına ulaşmak için doğal olmayan konformasyonlardaki proteinlerin yeniden katlanmasını teşvik eder. (4) Proteostaz geri yüklendiğinde, HSP72 daha sonra HSF1 aktivitesini daha fazla inhibe eden bir negatif geri besleme döngüsü vardır (Lang ve ark 2019).

Son zamanlarda, birkaç çalışma Hsp ekspresyonunun kanserde yüksek seviyelerde (onkoproteinler, hipoksi ve genomik instabilite nedeniyle) korunduğunu bildirmiştir (Ban ve ark 2019). Ekspresyonlarının artması genellikle tümör hücresi sağkalımı, istila, metastaz ve kemorezistans ile ilişkilidir. Kanserin ilerlemesini sağlamak için çeşitli onkogenlerle etkileşime

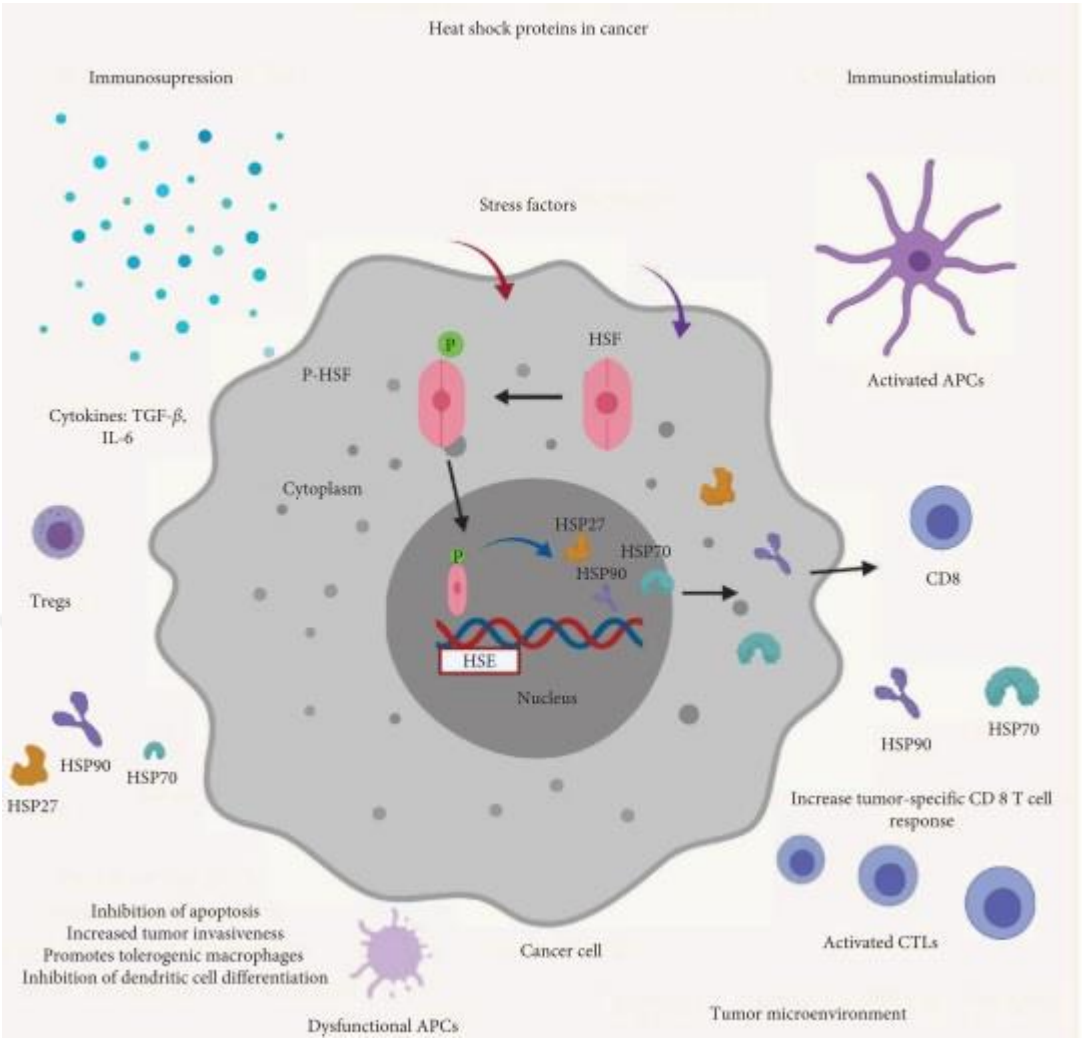
girerler. Ayrıca, Hsp ekspresyonunun arttığı hücreler radyasyona bağlı hücre ölümüne karşı korunmuştur. Tüm bu gözlemler toplu olarak kanser hücrelerinin ölümcül koşullar altında bile hayatta kalma ve çoğalma için Hsp ekspresyonuna olası bağımlılığını ima etmektedir (Mittal ve Rajala 2020).

Bu nedenle Hsp'leri, hücre ölümleri ve hayatta kalma arasında ince bir denge sağlamanın merkezinde yer alır ve biyolojik sonuçları önemli ölçüde etkiler. Hsp'lerin karsinogenezin modüle edilmesinde ortaya çıkan rolü hakkındaki güçlü kanıtlar, basit teşhis biyobelirteçlerinden kanser terapötiklerindeki merkezi hedeflere olan ilgilerini tam olarak genişletmiştir.

Artan Hsp seviyelerinin malign büyümeye katkıda bulunduğu ve ilaç veya radyasyonla tedavi edilen kanser hücrelerini apoptoz, nekrotik ölüm, otofajik ölüm, yaşlanma ve mitotik felaketten koruyabildiği tespit edilmiştir (Kabakov ve ark 2020).

Transkriptomik ve proteomik çalışmalarla Hsp ekspresyon profili ile akciğer tümörleri arasındaki korelasyon kanıtı, klinisyenlere bu moleküler şaperonların daha iyi hasta yönetimi için potansiyel biyobelirteçler olarak hizmet edebileceği konusunda umut vermektedir. Akciğer kanseri hastalarında yüksek Hsp seviyesi ile ilişkili kötü prognoz, bu proteinlerin terapötik hedefler olarak düşünülmesini ve mevcut akciğer kanseri tedavi stratejilerinin üstünde veya üzerinde tedavi seçenekleri sunmasını sağlamaktır (Mittal ve Rajala 2020).

Hsp'ler sadece tümör ilerlemesinde değil, aynı zamanda tedaviye yanıtlarının belirlenmesinde rol oynamaktadır. Kritik Hsp'lerin bazıları, tümör mikro-ortamı içindeki koruyucu ve yıkıcı immünolojik tepkiler arasındaki ince dengeyi karmaşık bir şekilde düzenler (Şekil 1.13.), böylece onkoimmünolojideki merkezi rollerinin anlaşılmasını zorunlu kılmaktadır. Hsp şaperonlarının ekspresyonunu veya aktivitesini modüle etmek, antikanser terapötik bir strateji olarak araştırılmıştır (Das ve ark 2019).



Şekil 1.13. Kanserde ısı şoku proteinleri (Das ve ark 2019).

1.4.1. Isı Şok Proteini-90 (Hsp-90)

Hsp-90, ısı şok proteinleri ailesinde moleküler ağırlığı 90 kD olan, çok çeşitli alıcı proteinlerinin aktivasyonundan, stabilizasyonundan ve fonksiyonundan sorumludur ve ATP' ye bağımlıdır (Liu ve ark 2019). Hsp-90 neo-sentezlenmiş veya yanlış katlanmış proteinlerin katlanmasını destekleyen ve bunların toplanmasını bloke eden yüksek oranda korunmuş bir moleküler şaperondur (Condelli ve ark 2019). Büyüme faktörü reseptörleri, steroid hormon reseptörleri, protein kinazlar, bazı onkogenlerin ürünleri, sinyal transdüksiyonu ve gen transkripsiyonu düzenleyicileri Hsp-90'ın alıcı proteinleri arasındadır. Bu alıcı proteinlerin çoğu, malignitelerin invaziv ve metastatik büyümesini veya kemoterapi ve radyoterapiye

direncini sağlayan kanser epigenetiği ve kanser hücresi sinyalinin düzenleyicisidir (Kabakov ve ark 2020). Stresle ilişkili çeşitli proteinler arasında en yaygın olanıdır.

İndüklenebilir Hsp-90α ve konstitütif Hsp-90β; omurgalılarda iki Hsp-90 izoformu olarak bildirilmiştir (Mittal ve Rajala 2020). Hsp-90α indüklenebilir form iken Hsp-90β yapısal olarak ifade edilen formdur. Her ikisi de dimerler oluşturur ve dimerizasyonu Hsp-90'ın fizyolojik koşullarda işlevselliği için gereklidir. Önemli bir fark, α formunun kolayca dimerleşmesi, ß formunun ise çok daha az etkili olmasıdır. Hücresel fonksiyon bağlamında, Hsp-90α hızlı bir tepki, sitoprotektif izoform, büyümenin teşviki, hücre döngüsü regülasyonu ve kanser hücresi invazivitesinde yer almaktadır. Hsp-90ß ise erken embriyonik gelişim, hücresel dönüşüm, sinyal iletimi ve uzun süreli hücresel adaptasyon ile ilişkili olma eğilimindedir (Jafari ve ark 2020). Dikkat çekici yapısal ve fonksiyonel benzerlik nedeniyle, çalışmaların çoğu iki izoform arasında net bir ayrım sağlamamıştır (Condelli ve ark 2019).

Tanımlanan alıcı proteini arasında, bazıları insan karsinogenezinde son derece alakalı olan birkaç hücre fonksiyonunda yer alan proteinler vardır. Hsp-90 şaperonları tarafından kontrol edilen kritik fonksiyon; hücresel sinyal yolakları, hücre sağkalımı, hücre iskeleti bütünlüğü, hücre döngüsü ve hücresel farklılaşmadır. Son olarak, Hsp-90α'nın (eHsp-90α) hücre dışı formu, immünolojik fonksiyonlar, hücre motilitesi ve yara iyileşmesinde rol oynamaktadır (Condelli ve ark 2019).

Protein katlanması, alıcı protein olgunlaşması ve protein kaçakçılığı da dahil olmak üzere proteostaz, hücrelerin fizyolojik ve patolojik koşullarda hayatta kalması için kritik öneme sahiptir (Jafari ve ark 2020). Hsp-90 disfonksiyonu üzerine, alıcı proteinler inaktive edilir, stabilize edilmez ve hızlı bir şekilde bozunur. Ardından tümör hücrelerinin proliferatif ve savunma potansiyelinin başarısız olması; sonuç olarak, Hsp-90 hedefleme ajanlarının bazen kanser tedavisinde kullanılması beklenmektedir (Kabakov ve ark 2020). Kansere ek olarak, Hsp-90 nörodejeneratif hastalıklar (örneğin, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı), viral hastalık, mantar hastalığı ve paraziter hastalık için potansiyel ilaç hedefi olarak bulunmuştur (Liu ve ark 2019).

1.4.2. Hsp-90 ve Kanser

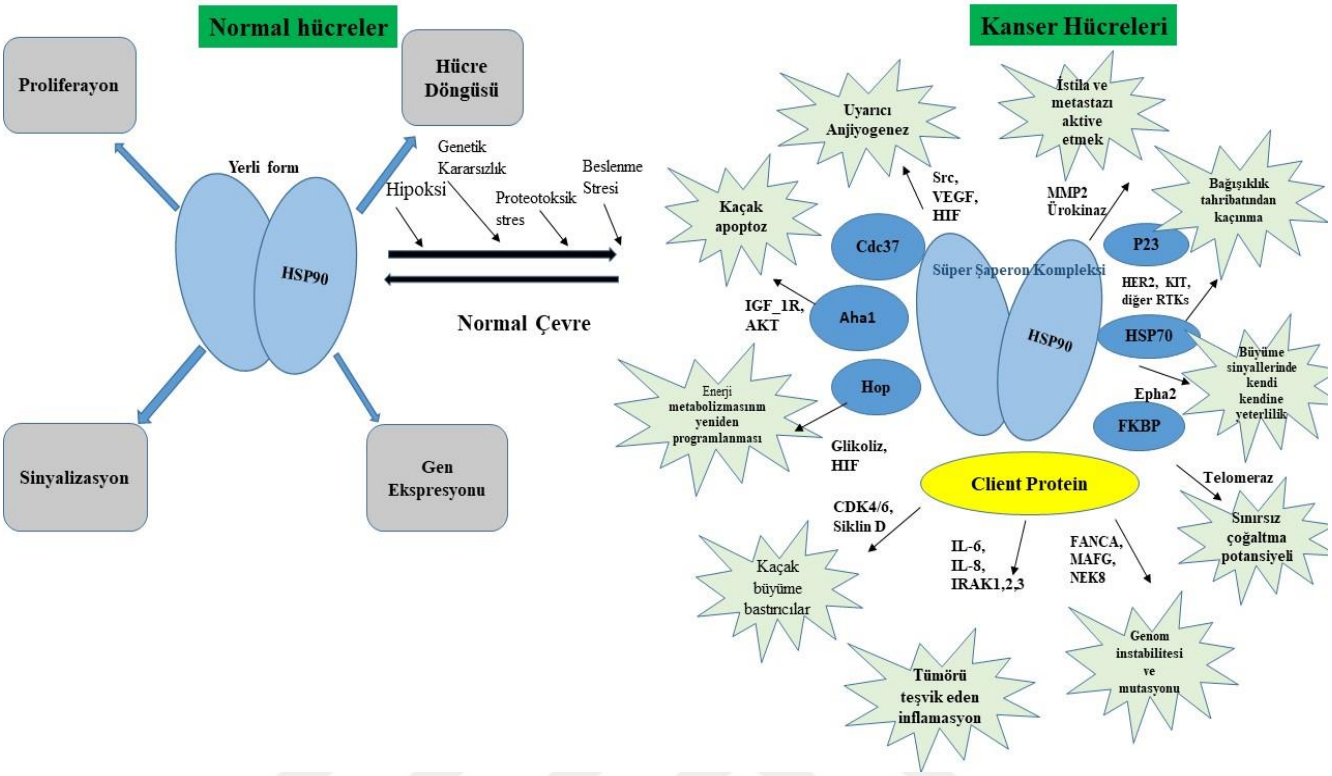
Daha önce belirtildiği gibi, Hsp-90 hücre büyümesi, hücre hayatta kalması ve farklılaşması, sinyal yolları, hücresel strese tepki ve apoptoz gibi birçok hücresel sürece rehberlik etmektedir (Şekil 1.14.) (Jafari ve ark 2020). Bu nedenle, kanseri kontrol etme

stratejisi olarak Hsp-90'ın inhibisyonu, aynı anda birden fazla onkojenik protein ve yolun down-regülasyonuna yol açtığı için caziptir. Şimdiye kadar 18 Hsp-90 inhibitörü klinik gelişime girmiştir. Bununla birlikte, esas olarak zor formülasyon ve hepatotoksisite gibi olumsuz etkiler nedeniyle, klinik sonuçlar orta derecede başarılı olmuştur. Yalnızca 2017 yılında, anti-Hsp-90 ilaçlarını değerlendiren 17 klinik çalışma aktif olmuştur (Spiegelberg ve ark 2020).

Genel olarak, Hsp-90 normal hücrelerde düşük seviyelerde eksprese edilmekte, ancak hücresel proteinleri hedeflerinin hasar görmesine veya toplanmasına karşı korumak için stres koşulları altında ekspresyonu artmaktadır (Ban ve ark 2019). Gerçekten, Hsp-90'ın aşırı ekspresyonu birçok tümör hücresinde bulunmaktadır. Meme, over, endometriyal, akciğer, özofagus, kemik, kolorektal, idrar ve prostat kanseri dâhil olmak üzere birçok kanserin tanısında yararlı olmuştur. Şekil 1.14.'de gösterildiği gibi, kanser hücrelerinde Hsp-90, normal hücrelerde ayrılmamış inaktif bir formdayken, alıcı proteininin olgunlaşmasını modüle eden çok şaperon kompleksleri formundadır. Hsp-90'ın yüksek ekspresyonu, kanser hücrelerinin hipoksi, düşük pH, beslenme yetersizlikleri ve kimyasallara veya UV ışığına maruz kalma gibi kötü fizyolojik ve stresli durumlarda hayatta kalmasına yardımcı olur. Bu bağlamda Hsp-90 ve onun alıcı proteinleri kanser hücrelerinin bazı özelliklerinde yer alabilmektedir. Bunlar: apoptoz, doku invazyonu ve metastazdan kaçınma, bağışıklık tahribatından kaçınma, sürekli anjiyogenez, büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, anti-büyüme sinyallerinin duyarsızlığı ve enerji metabolizmasının yeniden programlanması şeklindedir (Jafari ve ark 2020).

Kanser hücrelerinde Hsp-90'ın inhibisyonu, alıcı onkoproteinlerinin bozulmasına neden olur. Bu nedenle Hsp-90 inhibitörü, kanserlerin tedavisi için önemli bir strateji olarak kabul edilmektedir (Liu ve ark 2019).

EGFR, Akt ve C-Raf gibi çoğu Hsp-90 alıcı proteini, tümörlerin büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalması için çok önemlidir (Wang ve ark 2019). Plazmadaki indüklenebilir Hsp-90α'nın akciğer tümörü hastalarında normal sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu ve ekspresyon seviyesi kanserin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Mittal ve Rajala 2020). Plazma Hsp-90α protein seviyeleri akciğer kanserinde tanısal bir biyobelirteç olarak faydalıdır (Pan ve ark 2018).



Şekil 1.14. Normal hücrelerde Hsp-90'ın kanser hücrelerine karşı işlevi.

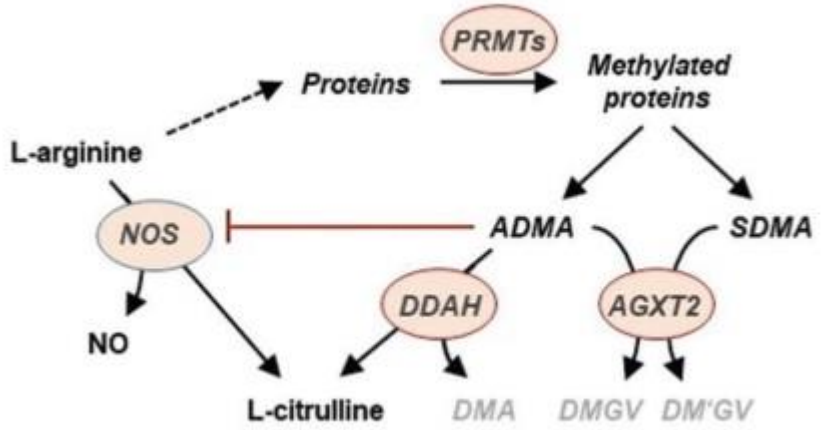
1.5. Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) ve Simetrik Dimetilarginin (SDMA)

Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) ve bunun enantiyomeri simetrik dimetilarginin (SDMA), hücre içinde üretilen doğal olarak oluşan amino asitlerdir. Bunlar, translasyon sonrası modifiye edilmiş normal protein döngüsü sırasında üretilen arginin formlarıdır. İlk olarak 1970 yılında Kakimoto ve Akazawa tarafından insan idrarında izole edilmiştir. (Oliva-Damaso ve ark 2019).

ADMA, esas olarak dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından sitrülin ve dimetilamine enzim tarafından metabolize edilir veya böbrek yoluyla atılır. ADMA hem de SDMA, üremik toksinler olarak kabul edilir (Damiati 2019). İki farklı DDAH1 ve DDAH2 geni tarafından kodlanan izoform vardır. DDAH1, in vivo ADMA bozunması için ana izoformdur. DDAH1'i aşırı eksprese eden transgenik farelerde yapılan çalışmalar, düşük

plazma ADMA seviyeleri, artmış NO üretimi ve NOS aktivitesi göstermiştir. Bunun yanı sıra düşük plazma ADMA seviyeleri iskemi veya inflamasyondan sonra artmış anjiyogenez de göstermiştir (Trittmann ve ark 2019).

Özellikle, DDAH/ ADMA/ NO yolunun, lokal NO mevcudiyetinin artmasına neden olan düzensizliği, sıklıkla tümör anjiyogenezi, büyümesi, istilası ve metastazının teşviki ile ilişkilidir. Son yıllarda farklı kökenlerdeki tümörlerde DDAH enzimlerinin artan ekspresyonu rapor edilmiştir. Hücre kültür modellerinde ve *in vivo* çalışmalarda DDAH ekspresyonunun ve / veya aktivitesinin inhibisyonu, bu yolu hedeflemenin potansiyel terapötik faydasını göstermiştir (Hulin ve ark 2019).



Şekil 1.15. Asimetrik ve simetrik dimetilarginin biyosentezi ve metabolizması (Böger ve Hannemann 2020).

İnsan akciğer dokularının bağışıklığı, DDAH1'in hem alveoler hem de bronşiolar epitelde eksprese edildiğini göstermiştir. Son zamanlarda ortaya çıkan kanıtlar, ADMA-DDAH1 yolunun solunum yolu hastalığının patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Örneğin, artmış akciğer ADMA seviyelerinin ve azalmış DDAH ekspresyonunun, bir fare alerjik astım modelinde hava yolu inflamasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, DDAH1'in aşırı ekspresyonunun organik toz ekstraktını veya ev tozu akarı kaynaklı hava yolu enflamasyonunu hafiflettiği bulunmuştur (Wang ve ark 2016).

1.6. Nitrik Oksit

Kısa ömürlü serbest radikal gazı olan sinyal molekülü nitrik oksit (NO), farklı dokulardaki çeşitli fizyolojik süreçlerde temel bir role sahiptir. NO'nun bir dizi hücresel işlemdeki önemi, hem mekansal hem de dozaj kontrolü için kritik olan çoklu seviyelerde sıkı regülasyonu ile daha da vurgulanmaktadır (Hulin ve ark 2019).

NO, endojen pulmoner vazodilatör ve pulmoner anjiyogenezin önemli bir düzenleyicisidir. NO, üç üyesi bulunan nitrik oksit sentazlar tarafından yapılır. Bunlar: endotel NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). Pulmoner endotelde NO' nun birincil kaynağı eNOS'tur. NO, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) aracılı anjiyogenezin önemli bir aşağı akış efektöridir. Ayrıca, eNOS eksikliği olan farelerde anormal pulmoner anjiyogenez ve anormal akciğer gelişimi vardır. Asimetrik dimetilarginin (ADMA), eNOS' un endojen bir inhibitörüdür (Trittmann ve ark 2019).

Bu NOS izoformları, l-arginin (l-Arg) ve l-homoarginin (l-hArg), en güçlü fizyolojik vazodilatörlerden ve trombosit agregasyon inhibitörlerinden biri olan nitrik oksite (NO) dönüşmesini katalize etmektedir (Tsikas ve ark 2018).

Üç NOS izoformunun da aktivitesi, rekabetçi ADMA ve monometil arginin (L-NMMA) inhibitörleri tarafından düzenlenir. Bunlar, NOS aktif bölgesine bağlanma için NOS substratı l-Arg ile rekabet eden, protein yıkımının her yerde bulunan endojen metabolitleridir (Hulin ve ark 2019).

Yapısal olarak Arg'ye benzer olan homoarginin (hArg) esas olarak arginin: glisin amidinotransferazın (AGAT) katalitik aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Ancak muhtemelen üre döngüsü enzimleride dâhil edilmektedir. Homoarginin, düşük afiniteli olmasına rağmen, bir NOS substratı olarak hizmet eder. Dahası, enzim arginazını inhibe ederek Arg' ın biyoyararlanımının artmasına neden olabilir. Arg'ın diğer endojen türevleri simetrik dimetilarginin (SDMA), ADMA ve monometilgininindir (NMMA). İlk önce proteinler, protein arginin metiltransferazlar (PRMT) I veya II ile metillenir. PRMT I metil gruplarını asimetrik olarak katalize ederken, PRMT II simetrik bir düzenlemeye yol açar. Daha sonra, metilan arginin kalıntıları ile proteinlerin proteolizi sırasında metilerginin kalıntıları salınır. ADMA ve NMMA, Arg ve hArg ile rekabet eden endojen NOS inhibitörleridir (Grosse ve ark 2020).

NO sentezi genellikle sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir işlem olduğu için, anormal ve düzensiz NO üretimi, çeşitli patofizyolojik koşullarda ortaya çıkmaktadır. Değişen NO

sentezinin kanser başlangıcı ve ilerlemesi, özellikle kansere bağlı anjiyogenez, vaskülogenik taklit ve sonuçta metastaz ile ilişkili olduğu giderek daha fazla kabul görmüştür. NO'nun kanserdeki ikili rolü, NO' nun kanser türü, yeri, evresine ve ayrıca yerel NO konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı davranış sergileyebileceğini vurgulayan birkaç incelemeye konu olmuştur. NO konsantrasyonunun modülasyonu, azalmış NO sinyali ile karakterize edilen kanserler için tümör regresyonuna ve tedavisine aracılık etmede yararlı görünmektedir. Bu son yıllarda birkaç araştırma grubunun odağı olmuştur (Hulin ve ark 2019). Spesifik olarak, endotel türevi NO, apoptozun inhibisyonu ve endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunun arttırılması yoluyla anjiyogenezi teşvik etmektedir (Hulin ve ark 2017).

Tümör hücreleri ve çevresindeki stroma arasındaki enerji bağlantısı da yakın çalışma kapsamındadır. Doku hipoksisi ve glikoliz, laktik asit birikmesine ve dolayısıyla asidik, hipoglisemik bir mikro çevreye yol açmaktadır Bu mikro-ortamın, anjiyogenez, istila ve metastazın teşvik edilmesi de dahil olmak üzere bir dizi tümöre izin veren ve bağışıklık baskılayıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Fahrmann ve ark 2020).

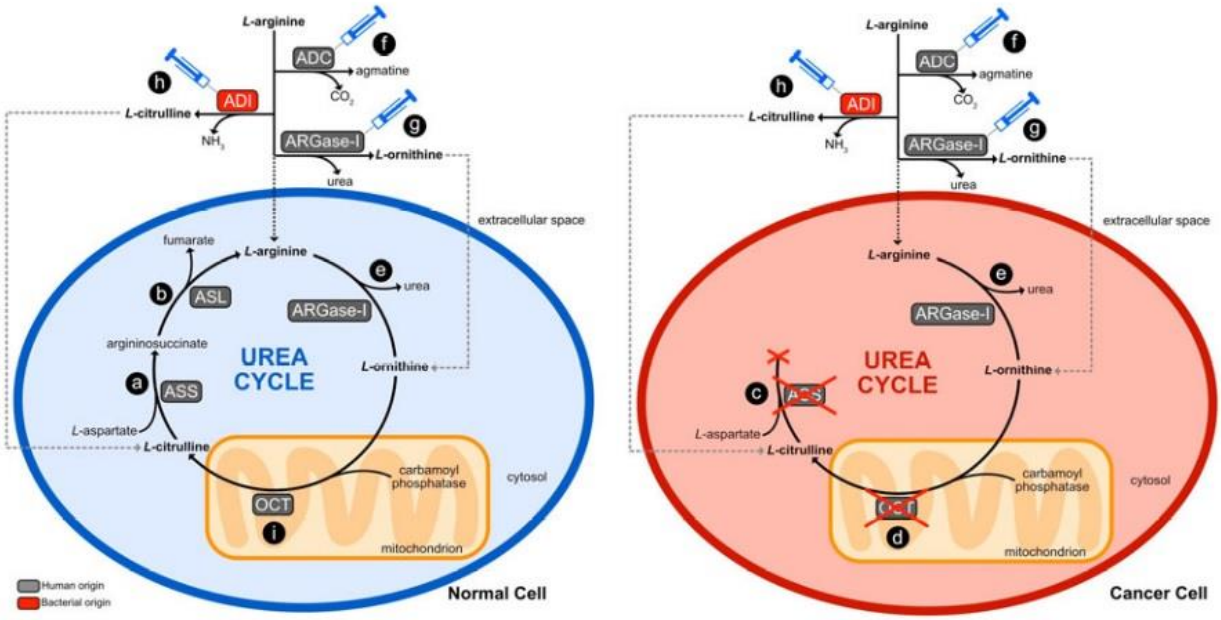
1.7. Arginin

Arginin (Arg), herhangi bir organizmada protein sentezi için temel bir yapı taşıdır. Ancak memelilerde azot metabolizması, kreatin, agmatin ve poliamin sentezi NO üretimi ve anabolik hormon salınımı gibi bir dizi önemli biyolojik yolun önemli bir öncüsü/aracısıdır (Fernandes ve ark 2017).

Umut verici amino asit yoksunluğu tedavilerinden biri, arginin tüketen bir ajanın verilmesine dayanan arginin yoksunluğudur. Arginin yarı esansiyel bir amino asittir; diyet kaynaklarından alınır ve böbreklerdeki üre döngüsü ile sentezlenmektedir. Bazı kanser hücresi tipleri, büyüme için arginin gerektirir. Bu da onları arginin oksotrofik (bazı maddeleri sentezleme yeteneği olmayan mutant mikroorganizma) veya kısmen oksotrofik yapmaktadır. İlginç bir şekilde, farklı çalışmalar kanser hücresi göçünün arginin tükenmesinden etkilendiğini göstermiştir. Motilite, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim ve bağışıklık tepkileri ile ilişkili normal bir fizyolojik süreç olsa da, kanser hücreleri tarafından diğer organlara metastaz yapmak için kullanılan bir süreçtir. Bu nedenle, argininin tükenmesi kanser hücresinin metastaz yapma yeteneğini bozmaktadır. Ancak, değer düşüklüğü mekanizması hala araştırılmaktadır (Al-Koussa ve ark 2020).

Arginin metabolizması, tümör ilerlemesinden sorumlu mekanizmalardan biridir ve çeşitli hücrelerde arginin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin ekspresyonu nedeniyle oldukça bölümlere ayrılmıştır. L-arginin, güçlü immünomodülatör özelliklere sahip olan poliaminler ve NO dâhil olmak üzere çoklu metabolitler için bir öncü görevi gören çok amaçlı bir amino asittir (Kim ve ark 2018)

Arginin, hücre kendi argininini sentezleyebildiğinden, esansiyel olmayan bir amino asit olarak kabul edilir. Bununla birlikte, katabolik stres altındayken, ağırlıklı olarak ortamdan arginin elde edilmesine dayanır ve arginini "şartlı olarak" zorunlu hale getirir. Arjinin sentezi normalde böbrekte gerçekleşen üre döngüsü ile yapılır. Arjininin de novo sentezi, arginosukinat sentetaz (ASS1) ve arginosukinat liyazın (ASL) l-sitrülinin argininine dönüştürülmesini içerir. Sonuç olarak, arginin yoksun kanser hücrelerine l-sitrülin eklenmesi hücreleri kurtarabilmekte ve üre döngüsünün akışını artırabilmektedir. Bu, l-sitrulin ve aspartik asidin arginosüksinata dönüşümünü katalize eden ASS1 enzimi ile gerçekleştirilir. Daha sonra ASL tarafından l-arginin ve fumarik aside dönüştürülür. 1-ornitin, ornitin transkarbamilaz (OCT) ile dönüştürülmesi yoluyla arginin üretmek için bir substrat da olabilir. Bazı tümörlerin arginin metabolize edici enzimleri down-regüle edilir, bu da mevcut substratlardan arginin üretmelerini önler ve arginin oksotropik hale getirmektedir (Al-Koussa ve ark 2020).



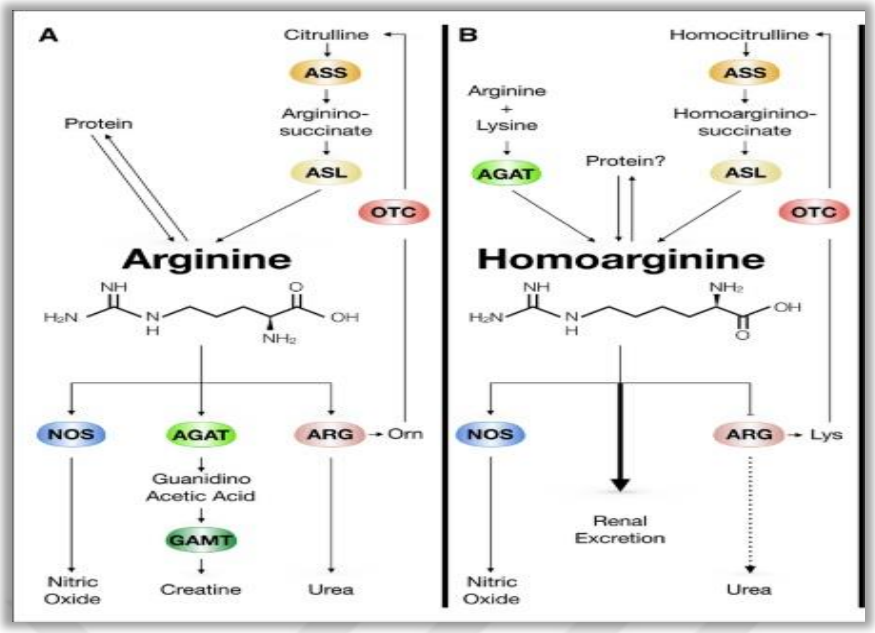
Şekil 1.16. Genetik olarak değiştirilmiş kanser hücrelerine kıyasla, arginin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin ve metabolik yolların normal hücrelerde bozulmanın şematik gösterimi (Fernandes ve ark 2017).

Kanser hücreleri içindeki metabolik düzensizlik, hem hücreler içinde hem de mikroçevre içinde derin değişikliklere yol açmaktadır. Metabolik bir yolun düzensizliğinin tek başına bir nedeni olmayabilirken, aynı değişiklikler sıklıkla gözlenir. Bu nedenle tedavi için cazip bir hedef olarak hizmet etmektedir. Bununla birlikte, yollar, fazlalık, heterojenlik ve plastisite arasındaki bağlantı, metabolik inhibisyonun daha büyük bir bulmacada sadece bir parça oluşturabileceği anlamına gelebilmektedir. Bu yollar hem enerjik hem de amino asit metabolizmasına yakından bağlıdır. Mikro ortamdan serin gibi öncü moleküllerin tükenmesi T hücresi fonksiyonu üzerinde doğrudan etkilere sahiptir (Fahrmann ve ark 2020).

1.8. Homoarginine (hArg)

hArg bazı gıdalarda bulunur ve gastrointestinal sistemde kolayca emilir. Ancak hArg'ın ana diyet kaynakları hala tamamen açık değildir ve enzimatik üretime karşı gıda alımından ne kadar endojen hArg türetildiğinin belirlenmesi gerekmektedir. Mitokondriyal enzim AGAT (arginin: glisin amidinotransferaz), arginin ve lizinden hArg sentezini katalize edebilmektedir.

Son yıllarda, hArg'ın kardiyovasküler bozukluklardaki rolü için zengin bir bilgi birikimi var. Yapısal olarak, hArg Arg ile yakından ilişkilidir. Ancak hArg'ın proteinojenik olmayan bir aminoasit olabileceği düşünülürse protein sentezindeki rolü farklıdır. Bununla birlikte, hArg hala aterosklerozda ek bir terapötik hedef olarak konumlandıran çeşitli hücre tiplerinde NOS için bir substrat olarak önerilmektedir. Potansiyel hedef mekanizmaları anlamak için hArg metabolizması Şekil 1.17'de gösterilmiştir. Arg'ın aksine, biyoyararlanabilen hArg'nin büyük bir çoğunluğu 2 ayrı yolla yeni bir şekilde sentezlenir. Birincisi, genom çapında birleşme çalışmaları AGAT enzimini hArg biyosentezi için anahtar enzim olarak tanımlamıştır. Hem AGAT knockout fareleri hem de AGAT eksikliği olan hastalar, AGAT'ın ağırlıklı olarak böbrek ve karaciğerde Arg ve lizinden hArg oluşumunu katalizlediğini kanıtlamak için kullanılmıştır. Daha ileri çalışmalar ayrıca hArg'ın homositrülinden üre döngüsü enzimleri (OTC [ornitin transkarbamilaz], ASS [argininosukinat sentetaz] ve ASL [argininosukinat liyaz]) yoluyla sentezlenebileceğini ileri sürmüştür. NOS için zayıf bir substrat olarak hizmet etmenin yanı sıra, çeşitli gruplar Arg'nin hArg tarafından inhibisyonunu göstermiştir. Fizyolojik hArg konsantrasyonları belirlenmiş olmasına rağmen, son çalışma oral uygulamadan sonra idrarda vücutta hArg sınırlı katabolizmasını gösteren % 95'lik bir iyileşme oranı göstermiştir (Nitz ve ark 2019).



Şekil 1.17. L-arginin (Arg) ve l-homoarginin (hArg) aminoasitlerinin metabolik yolları (Nitz ve ark 2019).

Şekil 1.17.'de görüldüğü gibi, A, diyet ve de novo sentezlenmiş Arg metabolik yollarıdır. Arg sentezi, üre döngüsü içinde katalize edilir. Ornitin (Orn), OTC (ornitin transkarbamilaz) tarafından, ASS (argininosukinat sentetaz) ve ASL (argininosüksinat liyaz) tarafından daha da metabolize edilen sitrüline dönüştürülür. NOS (nitrik oksit sentaz) ve Arg (arginaz), sırasıyla NO ve üre oluşumunu katalize etmek için Arg'i substrat olarak kullanır. AGAT (l-arginin: glisin amidinotransferaz), GGT (guanidoasetat metiltransferaz) ile daha da dönüştürülen bir ara madde olan Arg ve glisinden guanidino asetik aside dönüşümü katalize eder. B, diyet ve de novo sentezlenmiş hArg metabolik yolları. Endojen hArg, Arg ve lizinden (Lys) AGAT dönüşümü ile üretilir. Alternatif olarak hArg, homositrülinden üre döngüsü enzimleri (OTC, ASS ve ASL) yoluyla sentezlenebilir. hArg baskın olarak böbrekler tarafından atılmasına rağmen, hücre içi hArg, NOS için alternatif bir substrat ve aynı zamanda ARG için varsayılan inhibitör olarak işlev görebilmektedir (Nitz ve ark 2019).

1.9. Sitruline

Sitrulin, peptitil-argininin posttranslasyonel bir deiminasyonuyla vücutta üretilen kodlayıcı olmayan bir amino asittir (Yuzhalin 2019). Sitrulin, esansiyel olmayan bir alfa-amino asit, karaciğer ve böbreklerde üre döngüsünün önemli bir modülü ve glutamin metabolizmasının nihai ürünüdür. Sitrülin karpuzda yüksek konsantrasyonda bulunurken, ancak diğer bazı gıdalarda (salatalık, kabak, kabak yaprağı, kavun, kabak, çikolata) az miktarda

bulunmaktadır. Glutamin, bağırsak tarafından sitrüline dönüştürülebilen ornitin için bir öncüdür. Sitrulin, arginin ve dolayısıyla NO sentezinde kullanılabilir. Sitrülinden endojen arginin sentezi, sitrülin ince bağırsaktan dolaşıma salındığında ve böbrek tarafından ekstrakte edildiğinde ortaya çıkmaktadır. (Azizi ve ark 2020).

Diyet zayıf bir sitrulin kaynağıdır ve vücuttaki ana kaynağı endojen sentezdir. Sitrülinin de novo oluşumu, ince bağırsak-enterositlerin epitelyal emici hücrelerinde gerçekleşir. Bağırsak sitrulin sentezi için substratlar diyetten türetilen amino asitlerdir. Bağırsakta oluşan sitrulin, kan dolaşımına salınır ve kanla taşınan amino asitlerin miktarını artırır. Sitrulin metabolizmasında yer alan enzimlerin doku dağılımı, serbest dolaşan sitrülinin üç metabolik yolunu göstermektedir. Bunlar: arginin biyosentezi, arginin-sitrulin-nitrik oksit döngüsü ve üre döngüsüdür (Barzał ve ark 2014).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Resveratrol: Sigma-Aldrich R5010-100mg (≥99% (HPLC)
- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), GoldBio Catalog # T-030 [CAS 298-93-1, mw = 414.32 g/mol])
- DMSO: Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich D2650-100ml
- Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mix F12 (1:1) (DME/F12-HEPES): F-12K Medium, Kat. No: ECM0095L
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Strptomycin Solüsyon 10,000 units/ml Penicil (BIO-IND, BI03-031-1C) (20 ml)
- Glutamin-L-glutamin Solüsyonu, 29.2 mg/ml in Saline) (200 mmol) (BIO. IND,BI03-020-1B) (100 ml)
- Fetal Bovin Serum (FBS): European Grade Heat Inactivated (BIO-IND, BI04-127-1B) (100ml)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS): Kat. No: D8537-500
- Tripsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol Biological Industries Kibutz Haemek: (BIO. IND, BI03-053-1B) (100 ml)
- RIPA Lysis Buffer System: Ripa lizis solüsyonu: Santa Cruz Kat. no: sc-24948
- Nitrojen Tüpü (Habaş)
- HPLC kolonu (Retsek pinnacle marka DB C8, 50x4,6mm, 3µm)
- İnternal standart (d4) (9,11,12,12-D4,%98-d4,%98) Cambridge DLM-2218-0 (Lot:PR20446)
- Metanol (Sigma: 34885-2,5L-R (Lot: S2BD126SV))
- HPLC grade su (Chemsolute,(Bach no: Q2A085192A) Almanya)
- Formik asit (HCOOH)(Sigma Aldrich, Lot no: 81420)
- Etil asetat (merck: 2,5l (Lot no: 1.00868.2500) darmstadt, Almanya)

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri

- CO_2 inkübatörü: SANYO O_2/CO_2 INCUBATOR MCO-175M
- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
- Santrifüj: Sigma 3K30
- Işık mikroskobu: Leica Dmil Led (inverted microscope)
- -80˚C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S
- Buzdolabı (+4˚C ve -20˚C): ALTUS AL 302
- Azot tankı: LS 750 Las Systems Taylor-Wharton
- 96 kuyucuklu steril plaka: Corning® Costar® 96-well plate
- ELISA Reader: CLARIOstar
- Falcon tüp 15 ml/ 50 ml
- Kriyo tüp
- Mikropipet (1000, 200, 10µl)
- Petri Kabı: Corning® 100x20mm Lot: 430167
- Serolojik pipet: (5 ve 10 ml)
- Sıcak su banyosu: Wise Bath fuzzy systems
- Steril filtre: 0,22 µm
- Thoma lamı: IsoLab, Tiefe depth profendeur 0,200mm
- Otomatik Eliza okuyucusu ve yıkayıcısı (Rayto Microplate Washer RT-2600,
- Rayto Microplate Reader RT-2100C marka, Çin)
- Tandem MS (ABSCIEX API 3200) (Singapur)
- Vortex (Heidolph, Almanya)
- Santrifüj (Beckman Coulter AllegraTM X-2212) (Kazlauskaite ve ark)
- HPLC [(SHIMADZU UFLC; DGU-20 A3 (degasser), LC-20 AD (A pompası)
- LC20 AD (B pompası) ve SIL-20 AC HT (oto sampler)](Japonya)
- Evaporator (Teknosem TEB 40-WEL WT, Türkiye)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand, Almanya)
- Ultrasonik Banyo

2.1.3. Kullanılan Kitler

- Human Heat Shock Protein 90 ELISA Kit: Bioassay Kat. No: E3061Hu

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürü

Resveratrolün; akciğer kanseri hücresi proliferasyonu üzerine etkileri ve yarı maksimum önleyici konsantrasyonda ve belirlenen diğer konsantrasyonlarda Hsp-90 ve ADMA aktiviteleri olan etkilerinin gözlemlenmesi için insan akciğer kanseri hücresi A549 ve insan embriyonik böbrek epitel hücresi HEK-293 hücre hatları kullanılmıştır.

A549 (ATCC® CCL-185™) hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)' ndan satın alınmıştır. Her iki hücre hattı nemlendirilmiş, %5 CO_2 içeren ve 37˚C'lik atmosferde, %10 FBS ve %1 PSG içeren F-12K Medium besi yeri ortamında kültüre edilmiştir.

Hücrelerin pasajlanması 2-3 günde bir olacak şekilde, PBS ile yıkanıp, tripsin-EDTA ile kaldırılarak ve 1300 rpm'de 4-5 dakika santrifüj edilerek 100 cm^2'lik petri kaplarına besi yerine alınması şeklinde yapılmıştır.

Hücre stoklanması tripsin-EDTA ile muamele edilmiş hücrelerin, santrifüjden sonra besi yerinin uzaklaştırılması, %90 FBS ve %10 DMSO içeren solüsyonla karıştırılıp daha sonra 1,5 ml'lik kriyo tüplerle -20˚C'ye alınması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Hücreler, -20˚C'de 1 gece bekletildikten sonra -80˚C'ye alınmıştır. Uzun süre muhafaza edilmesi gereken hücreler ise -80˚C'den sıvı azot tankına taşınmıştır.

Bu yöntemle depolanan hücreler gerekli olması halinde 37℃'de hızlı bir şekilde çözülüp, üzerine 3-4 ml besi yeri eklenerek santrifüj edilmiştir. Santrifüje edilen hücrelerin süpernatant kısmı atılıp, hücre pelleti tekrar 1 ml besi yerinde pipetaj yöntemiyle çözülerek, petri kabında taze besi yeriyle pasajlanmıştır. Pasajlanan hücreler, %70-80 oranında konflüent olduğunda yeniden pasajlamak ya da deney işlemleri için tripsinize edilip kaldırılıp, hücre sayımları yapılmıştır.

Hücre sayımı için, tripsin-EDTA ile muamele edilen hücreler 1300 rpm'de 3-4 dk santrifüj edildikten sonra, kalan hücre pelleti, 1–2 ml besi yerine alınmıştır. Eppendorfa 20 µl hücre süspansiyonu ve 20 µl Tripan-mavisi alınarak pipetaj yapılmıştır. Bu karışımdan 10'ar µl

Thoma lamının üst ve alt kısımlarına aktarılıp, Thoma lamında bulunan 16 küçük karede hücrelerin sayımı yapılıp ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

2.2.2. MTT Yöntemi ile Resveratrolün IC_{50} Dozunun Belirlenmesi

Tiazolil mavi tetrazolium bromür (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (genellikle MTT olarak adlandırılır), hücre çoğalma tahlillerinde veya hücre büyüme tahlillerinde kullanılan yaygın bir boyadır. MTT, çözünmeyen bir formazana indirgendiğinde mora dönen sarı bir tetrazolium boyadır. Bu azalma, hücrelerin içindeki NADH veya NADPH'ye bağımlı oksidoredüktaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Aktif oksidoredüktaz enzimlerinin seviyesi, hücresel metabolik aktiviteyi yansıtır. Bir hücreden üretilen formazanın çözündürülmesinden sonra, absorbans ölçülebilir ve hücresel metabolik aktivitenin artmış veya azalmış olup olmadığını belirlemek için bir kontrol çözeltisindeki formazan absorbansı ile karşılaştırılabilir. Bu nedenle MTT, ilaçların hücre çoğalmasını veya sitotoksisitesini değerlendirmek için kullanılabilmektedir. Rengin yoğunluğu daha sonra 570 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçülebilir.

Resveratrol 2×10^{-3} M olacak şekilde %0,1 DMSO içinde çözülerek, 0,22 µm çaplı steril filtreden geçirilip muhafaza edildi. Diğer dozlar hazırlanmış olan bu stok resveratrolden besiyeri ile dilüsyon yapılarak hazırlandı.

96 kuyucuklu steril plakalara kuyucuk başı 100 µl F-12 Medium eklenmiş ve ardından hücrelerin sayımı yapılarak her bir kuyucuğa 7×10^{3} hücre olacak şekilde her iki hücre hattından eklendi. Hücrelerin tutunması için gerekli inkübasyon süresinden sonra (24 saat), belirlenmiş olan resveratrol doz grupları (0 µM (hücre kontrol grubu) 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM 300 µM) hücreler ile muamele edildi. Hücreler 24 ve 48 saat süresince analiz edilerek, 24. ve 48. saatlerin sonunda kuyucuk başına 20 µl olacak şekilde MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür) reaktifi eklenip, yaklaşık 3-4 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreleri rahatsız etmeden kuyucularda ki besiyeri ve MTT reaktifi dikkatlice uzaklaştırılarak, kuyucuklara 150 µl DMSO eklenerek 15-20 dakika karıştırıcıda karışması sağlandı. İnkübasyon sonunda 570 nm dalga boyunda ELISA mikroplate okuyucu ile her kuyucuğun absorbansı alınıp bu kuyucukların absorbanslarının ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Her bir doz beş tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Diğer deneyler için resveratrolün her iki hücre hattının da IC_{50} değerleri belirlenmiştir.

2.2.3. Hsp-90 Analizi

Resveratrol ile muamele edilip, MTT yöntemi ile IC_{50} değerlerini belirlediğimiz hücrelerin (A549 hücre hattı 24. saat için IC_{50}: 180 µM) bu değerlerine ek olarak, Hsp-90 aktivitelerini gözlemleyebilmek için çalışmamıza 90µM, 45µM ve 22,5µM konsantrasyonlarındaki değerler de dahil edilmiştir.

60 cm^2'lik steril petri kablarına 3000 µl F-12 Medium eklenmiş ve ardından hücrelerin sayımı yapılarak her bir kuyucuğa 25×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonrasında kontrol grubu hariç, belirlenmiş olan resveratrol doz grupları (0 µM (hücre kontrol grubu), 22,5 µM, 45 µM, 90 µM ve 180 µM) ile hücreler muamele edildi. Hücreler 24 ve 48 saat süresince analiz edilerek, 24. ve 48. saatlerin sonunda hücreler, tripsin-EDTA ile kaldırılıp, 2000-3000 rpm' de yaklaşık 20 dakika santrifüje edilmiş, santrifüjden sonra hücre süpernatları dikkatlice toplanıp, Hsp-90 analizi için 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Hsp-90 analizi için kullandığımız ELISA prosedürüne göre; tüm reaktifleri, standart çözeltileri ve hücre süpernatları talimatlara göre hazırlanıp, kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Standart kuyucuğa 50 µl standart eklenip (standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyucuğa antikor eklenmemiştir), örnek kuyucuklarına 40 µl numune eklendi. Sonra numune kuyucuklarına 10 µl anti-Hsp-90 antikoru eklenip, sonra numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Karıştırıcıda iyice karışması sağlanmıştır. Plaka bir sızdırmazlık maddesi ile kapatılıp, 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra sızdırmazlık çıkarılıp plaka otomatik yıkama için, tüm kuyuları aspire edilip yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklenip daha sonra her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu B eklenmiştir. Yeni bir sızdırmazlık maddesi ile kaplı plaka karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edilip, her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir. Stop solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroplaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlenmiştir. Standartlara göre çizilmiş kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak örneklerin Hsp-90 konsantrasyonları hesaplanmıştır.

2.2.4. LC-MS/MS ile ADMA Düzeyleri Analizi

Hsp-90 analizi için; belirlenmiş doz grupları ile muamele edilip, 24. ve 48. saatlerin sonunda tripsin-EDTA ile kaldırılan, 2000-3000 rpm'de yaklaşık 20 dakika santrifüje edilmiş, santrifüjden sonra, 24. ve 48. saatlerde hücre süpernatanları toplanan hücrelerin dipte kalan

hücre pelletleriyle deneye devam edilmiştir. Hücre lizatlarının hazırlanması için Radyoimmünopresipitasyon Analiz Tamponu (RIPA) kullanılmıştır. RIPA, radyoimmünopresipitasyon, protein analizleri, protein saflaştırma ve diğer analitik prosedürlerde kullanılmak üzere hücreleri ve dokuları lize etmek için kullanılmaktadır. İyonik deterjan bileşimi nedeniyle, RIPA nükleer membranları bozabilir ve sitoplazmik proteinleri çözündürerek yüksek protein verimi sağlar.

Hücreleri parçalamadan hemen önce, tam RIPA hazırlamak için 1 × RIPA Lizis tamponu ml başına 10 µl PMSF çözeltisi, 10 µl sodyum ortovanadat çözeltisi ve 20 µl proteaz inhibitörü kokteyl çözeltisi birleştirilmiştir. Hücre lizis solüsyonu (sc-24948; Ripa lizis solüsyonu) hazırlanarak her grubun hücrelerine 1 ml liziz solüsyonu eklenmiş ve steril eppendorflara alınmıştır. Hücreler 1 saat 4℃'lik buzdolabında inkübasyona bırakılarak daha sonra analizleri yapılmak üzere -80°C'lik dolaba kaldırılmıştır.

Hücrelerin LC-MS/MS ile ADMA düzeyleri analizlerinden önce ön işlemler yapılmıştır. -80℃'den çıkarılan hücreler, sonikatörde 25-30 dk süreyle parçalanmış ve parçalanan bu hücreler 14.000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüj edilmiştir.

2.2.5. ADMA Çalışma Prosedürü

Türevleştirici reaktif (% 5 asetilklorid içeren bütanol): Bir cam veya behere 10 µl bütanol, üzerine 1 ml asetilklorid eklenmiştir. Her örnek için 200 µl kullanıldı.

Çözdürücü reaktif: 18 ml HPLC grade distile su bir cam beher veya erlene alınıp, üzerine 2 ml metanol eklendi. Bu solüsyon karışımı (90:10) oranında su-metanoldür. Bu karışımdan 20 µl çekilip atılarak üzerine 20 µl formik asit eklendi. Taze hazırlanıp her örnek için 200 µl kullanıldı.

Mobil Faz A: 1 ml HPLC grade su içerinden 1 ml çekilip atılarak, üzerine 1 ml formik asit ilave edildi.

Mobil Faz B: 1 ml metanol içerisinden 1 ml çekilip atılarak, üzerine 1 ml formik asit ilave edildi.

- Eppendorflar sıralanıp numunelerin listesine göre numaralandırıldı.
- Numunelerden 200 µl, eppendorflara sırasına göre uygun olarak eklendi. (izotoptan her numuneye 100 ml konulur)

- Üzerine 1 ml metanol eklenip, hafifçe vortekslendikten sonra 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatatlar dikkatlice temiz can tüplere alınarak, 60 ℃'de azot gazı altında uçuruldu.
- 200 µl türevleştirici reaktiften (% 5 asetil klorid içeren bütanol) eklenip 65 ℃'de 20-25 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 25 dakikadan sonra tekrar azot gazı altında uçurma işlemi yapıldı.
- 200 µl çözdürücü reaktif ile çözdürülerek viallere alındı.

2.2.6. İstatistiksel Analizler

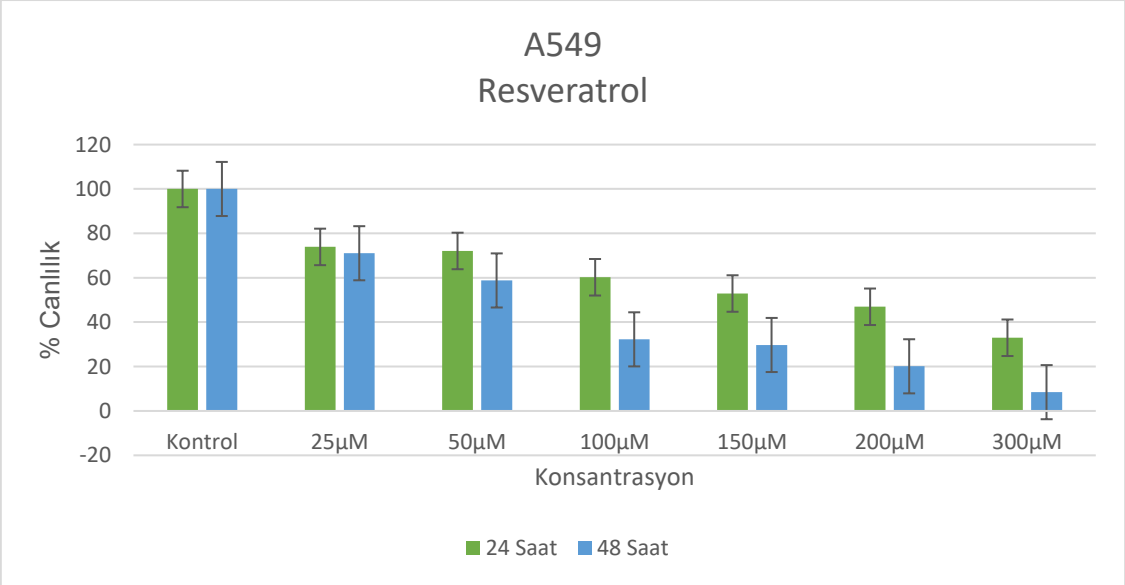
Tüm istatistiksel analizler R 3.6.0 (www.r-project.com) programı yardımıyla gerçekleştirildi. Verilere ilişkin tanımlayıcı istatistikler ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. Ölçümlerin Resveratrol Konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans analizi (ANOVA), her bir resveratrol konsantrasyonunda zamanlara göre karşılaştırılmasında ise Bağımlı örneklem t testi (Paired t test) kullanıldı. ANOVA testinden sonra çoklu karşılaştırmalar Tukey HSD post-hoc testleri ile gerçekleştirildi. Tukey HSD sonucunda anlamlı farklılık bulunan gruplar arasında harflendirme yapıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ değeri alındı.

3. BULGULAR

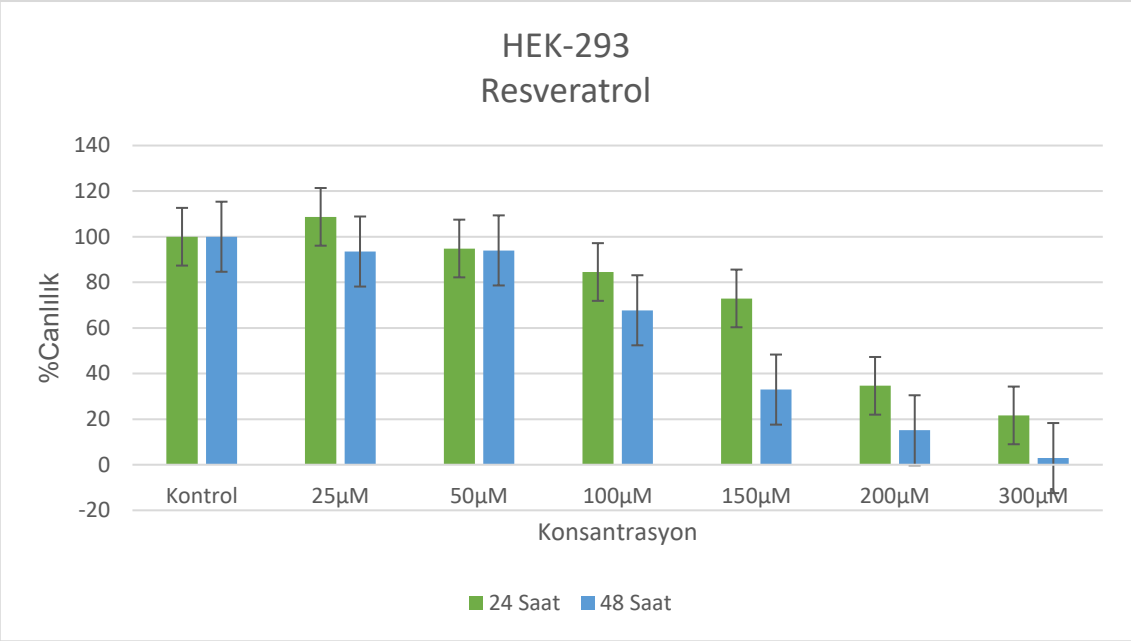
3.1. Resveratrolün Hücre Proliferasyonuna Etkisi ve IC_{50} Doz Hesaplamaları

Resveratrolün A549 ve HEK-293 hücre proliferasyonuna doz ve zamana bağımlı etkisi MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür) hücre canlılık testiyle analiz edildi. Belirlenen doz konsantrasyonlarında resveratrol ile muamele edilen hücre proliferayonları 24 ve 48 saat süresince takip edildi. Resveratrolün her iki hücre hattındaki etkileri, çizilen konsantrasyon-absorbans grafiklerinde doz ve zamana bağlı olarak gözlemlenmiştir. (Grafik 3.1. A,B)

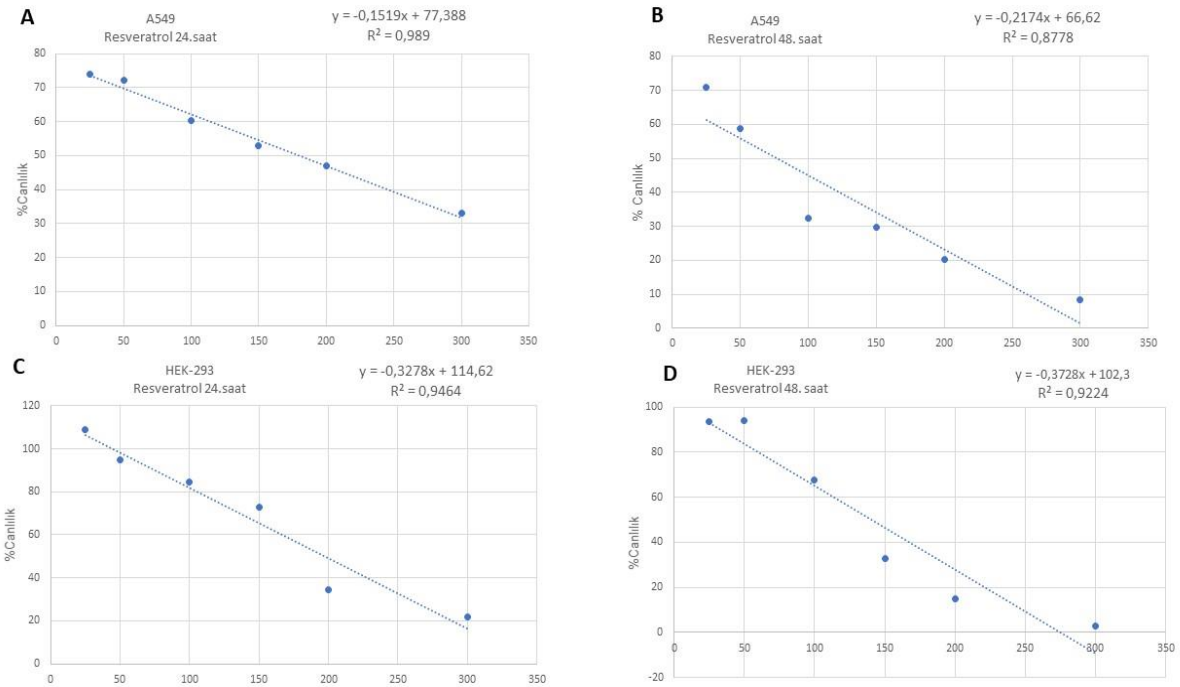
Resveratrolün A549 ve HEK-293 hücre hatlarının proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür.



Grafik 3.1. Resveratrolün A549 hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi.



Grafik 3.2. Resveratrolün HEK-293 hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi.



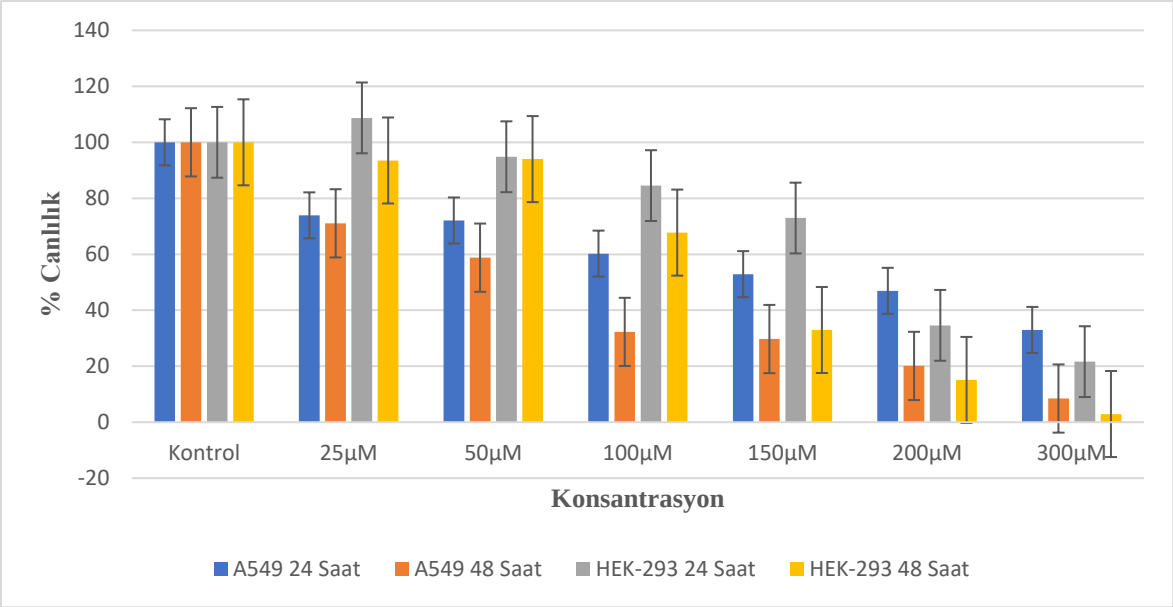
Grafik 3.3. Resveratrolün A549 (A, B) ve HEK-293 (C, D) hücreleri için IC_{50} doz değerlerinin belirlenmesi (A: 24. saate, B: 48. saate ait veriler).

% Hücre canlılık-konsantrasyon grafiklerinden resveratrol IC_{50} dozları 24. ve 48. saatler için hesaplandı. Buna göre A549 için resveratrolün 24. saatte IC_{50}: 180,30 µM, 48. saatte IC_{50}: 76,45 µM (Grafik 3.3. A, B); HEK-293 için resveratrolün 24. saatte IC_{50}: 197,13 µM, 48. saatte IC_{50}: 140,29 µM (Grafik 3.3. C, D) olarak belirlendi.

Tablo 3.1.' de resveratrolün A549 ve HEK-293 hücre hatlarında 24. ve 48. saatlerdeki etkilerine bakıldığında; A549 hücre hattı için 24. saatte en yüksek konsantrasyon olan 300 µM ve en düşük konsantrasyon olan 25 µM' de % hücre canlılıkları sırasıyla 32,97 ve 73,9; 48. saatte 300 µM ve 25 µM'de % hücre canlılıkları sırasıyla 8,46 ve 71,05 olarak gözlemlenmiştir. HEK-293 hücre hattı için 24. saatte en yüksek konsantrasyon olan 300 µM ve en düşük konsantrasyon olan 25 µM'de % hücre canlılıkları sırasıyla 21,63 ve 108,72; 48. saatte 300 µM ve 25 µM' de % hücre canlılıkları sırasıyla 2,92 ve 93,51 olarak gözlemlenmiştir.

Tablo 3.1. Resveratrolün A549 ve HEK-293 hücre hatlarında doz-zaman bağımlı % canlılıklar.

Resveratrol Konsantrasyonları	**A549**		**HEK-293**	
	24. saat % Canlılık	48. saat % Canlılık	24. Saat % Canlılık	48. Saat % Canlılık
300 µM	32,97	8,46	21,63	2,92
200 µM	46,93	20,11	34,61	15,1
150 µM	52,9	29,72	72,94	32,95
100 µM	60,23	32,26	84,53	67,74
50 µM	72,08	58,79	94,84	94
25 µM	73,9	71,05	108,72	93,51



Grafik 3.4. Resveratrolün HEK-293, A549 hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı karşılaştırmalı etkisi.

3.2. Resveratrolün A549 Akciğer Kanseri ve HEK-293 Hücre Hatlarında Hsp-90 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Hücre hatlarında resveratrolün Hsp-90 aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için, A549 ve HEK-293 hücreleriyle yapılan deneylerde, Human Heat Shock Protein 90 kiti kullanılarak ELISA cihazında (CLARIOstar) ölçüldü.

Resveratrol ile muamele edilen A549 (bkz. Tablo 3.2.) ve HEK-293 (bkz. Tablo 3.3.) hücre hatlarının, 24. ve 48. saatlerde belirlenen IC_{50} dozlarına ek olarak, Hsp-90 aktivitelerini gözlemleyebilmek için grafiklerden yararlanarak, (180 µM, 90 µM, 45 µM ve 22,5 µM, 0 µM (hücre kontrol grubu) konsantrasyonlarındaki değerler ile çalışılarak, örneklerin Hsp-90 düzeyleri hesaplanmıştır.

Tablo 3.2. ve Tablo 3.3.'e bakılacak olursa, veriler Ortalama±SD olarak gösterilmiştir. a, b, c, d, e: Tukey HSD' ye göre; gruplar arasındaki farklılık anlamlıdır ($p<0,05$) ve her grubun kendi içinde farklılığı sırasıyla (a<b<c<d<e) şeklinde gösterilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir. Aynı harf olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Tablo 3.2. A549 hücrelerinin Hsp-90 aktiviteleri.

A549						
	Resveratrol Konsantrasyonları	24. saat Ortalama±SD	p	48. saat Ortalama±SD	p	p
Hsp-90 (ng/ml)	0 µM	1,995±0,008	0,623	2,495±0,238	0,698	0,178
	22,5 µM	2,211±0,152		2,595±0,166		0,287
	45 µM	2,148±0,038		2,432±0,061		**0,020**
	90 µM	2,077±0,107		2,403±0,137		0,223
	180 µM	2,205±0,141		2,274±0,137		0,768

a: p< 0,005, b: p<0,001

Tablo 3.3. HEK-293 hücrelerinin Hsp-90 aktiviteleri.

HEK-293						
	Resveratrol Konsantrasyonları	24. saat Ortalama±SD	p	48. saat Ortalama±SD	p	p
Hsp-90 (ng/ml)	0 µM	2,331±0,076 a	**0,011**	2,255±0,114	0,086	0,153
	22,5 µM	2,486±0,130 a		2,884±0,277		0,221
	45 µM	2,514±0,103		2,720±0,065		0,145
	90 µM	2,181±0,089		2,433±0,084		0,192
	180 µM	2,035±0,048 b		2,414±0,168		0,099

a: p< 0,005, b: p<0,001

Elde ettiğimiz A549 Hsp-90 verilerine göre, 24. ve 48. saat ölçümlerin resveratrol konsantrasyonlarına göre tek yönlü varyans analizi (ANOVA) verilerinin karşılaştırılmasında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ve değerler sırasıyla, (p=0,623), (p=0,698) şeklindedir (bkz. Tablo 3.2.). Her bir resveratrol konsantrasyonunun zamana göre karşılaştırılmasında ise (paired t testi), 45 µM resveratrol ile muamele edilmiş gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş *(p<0,05)*, diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur (Tablo 3.2.).

Tablo 3.3.'de HEK-293 hücrelerine bakıldığında ise elde ettiğimiz ölçümlerin resveratrol konsantrasyonlarına göre tek yönlü varyans analizi (ANOVA) verilerinin karşılaştırılmasında 24. saat Hsp-90 verilerine göre, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuş ***(p<0,05)*** ve 22,5 µM, 45 µM, 180 µM grupları arasındaki farklılık sırasıyla (a),(a),(b) şeklindedir (aynı harf olan gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur) ve 180 µM grubundaki hücrelerin Hsp-90 değerlerinde 22,5 µM ve 45 µM'e kıyasla anlamlı bir artış bulunmuştur. 48. saat Hsp-90 verilerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır *(p=0,086)*. Her bir resveratrol konsantrasyonunun zamana göre karşılaştırılmasında ise (paired t testi), anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (bkz. Tablo 3.3.).

3.3. Resveratrolün A549 Akciğer Kanseri ve HEK-293 Hücre Hatlarında ADMA Düzeyleri Üzerine Etkisi

Resveratrol ile muamele edilen A549 (Tablo 3.4.) ve HEK-293 (Tablo 3.5.) hücre hatlarının, 24. ve 48. saatlerde belirlenen IC_{50} dozlarına ek olarak grafiklerden yararlanarak, (180 µM, 90 µM, 45 µM ve 22,5 µM, 0 µM (hücre kontrol grubu) konsantrasyonlarındaki değerler ile çalışılarak, örneklerin "Sitrülin (ng/ml), Homoarginin (µmol/l), LNMMA (µmol/l), SDMA (µmol/l), ADMA (µmol/l) ve Arginin (µmol/l)" düzeyleri hesaplanmıştır.

Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.'e bakılacak olursa, veriler Ortalama±SD olarak gösterilmiştir. a, b, c, d, e: Tukey HSD' ye göre; gruplar arasındaki farklılık anlamlıdır (*p<0,05*) ve her grubun kendi içinde farklılığı sırasıyla (a<b<c<d<e) şeklinde gösterilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir. Aynı harf olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Tablo 3.4. Resveratrolün A549 hücre hattında Sitrülin, Homoarginin, LNMMA, SDMA, ADMA ve Arginin düzeyleri üzerine etkisi.

	Resveratrol Konsantrasyonları	24. saat Ortalama±SD	p	48. saat Ortalama±SD	p	p
Sitrulline (ng/ml)	0 µM (Kontrol Grubu)	2,750±0,039 b	**< 0,001**	6,270±0,004 a	**< 0,001**	**< 0,001**
	22,5 µM	3,180±0,025 c		5,910±0,023 a		**< 0,001**
	45 µM	10,500±0,460 e		7,000±1,472 a		<0,116
	90 µM	1,490±0,025 a		14,300±0,108 b		**< 0,001**
	180 µM	6,590±0,025 d		12,100±0,216 b		**< 0,001**
Homoarginine (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	0,092±0,000 a	**<0,001**	0,073±0,002 c	**<0,001**	**0,002**
	22,5 µM	0,080±0,000 b		0,084±0,000 d		**<0,001**
	45 µM	0,090±0,000 ab		0,043±0,000 a		**<0,001**
	90 µM	0,116±0,004 c		0,080±0,000 d		**0,002**
	180 µM	0,121±0,003 c		0,049±0,000 b		**<0,001**
LNMMA (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	0,004±0,000 a	**<0,001**	0,003±0,000 a	**<0,001**	**0,029**
	22,5 µM	0,004±0,000 b		0,006±0,000 c		**<0,001**
	45 µM	0,006±0,000 d		0,006±0,000 d		**<0,001**
	90 µM	0,016±0,000 e		0,007±0,000 e		**<0,001**
	180 µM	0,005±0,000 c		0,004±0,000 b		**<0,001**
SDMA (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	0,026±0,000 b	**<0,001**	0,026±0,000 a	**<0,001**	**0,006**
	22,5 µM	0,029±0,000 d		0,029±0,000 b		0,832
	45 µM	0,027±0,000 c		0,025±0,000		**0,029**
	90 µM	0,039±0,000 e		0,043±0,000 c		**<0,001**
	180 µM	0,021±0,000 a		0,029±0,000 b		**<0,001**
ADMA (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	0,021±0,000 a	**<0,001**	0,032±0,000 d	**<0,001**	**<0,001**
	22,5 µM	0,028±0,000 b		0,028±0,000 b		0,474
	45 µM	0,052±0,000 c		0,023±0,000 a		**<0,001**
	90 µM	0,021±0,000 a		0,023±0,000 a		**<0,001**
	180 µM	0,017±0,002 a		0,029±0,000 c		**0,012**
Arginine (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	20,000±1,080 b	**<0,001**	1,070±0,022 d	**<0,001**	**<0,001**
	22,5 µM	24,300±0,178 c		0,609±0,004 c		**<0,001**
	45 µM	0,428±0,001 a		1,130±0,029 d		**<0,001**
	90 µM	32,500±0,178 d		0,453±0,002 a		**<0,001**
	180 µM	1,650±0,022 a		0,376±0,003 b		**<0,001**

a: p< 0,005, b: p<0,004, c: p<0,003, d:0,002, e: p<0,001

Tablo 3.5. Resveratrolün HEK-293 hücre hattında Sitrülin, Homoarginin, LNMMA, SDMA, ADMA ve Arginin düzeyleri üzerine etkisi.

	Resveratrol Konsantrasyonları	24. saat Ortalama±SD	P	48. saat Ortalama±SD	P	P
Sitrulline (ng/ml)	0 µM (Kontrol Grubu)	5,060±0,023 a	**<0,001**	9,280±0,019 b	**<0,001**	**<0,001**
	22,5 µM	6,960±0,025 b		16,400±0,255 d		**<0,001**
	45 µM	12,400±0,286 c		22,600±0,216 e		**<0,001**
	90 µM	17,500±0,147 e		12,100±0,216 c		**<0,001**
	180 µM	14,500±0,187 d		4,240±0,025 a		**<0,001**
Homoarginine (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	0,071±0,000 b	**<0,001**	0,048±0,000 a	**<0,001**	**<0,001**
	22,5 µM	0,083±0,000 c		0,064±0,000 a		**<0,001**
	45 µM	0,059±0,000 a		0,088±0,000 c		**<0,001**
	90 µM	0,097±0,000 e		0,088±0,000 c		**<0,001**
	180 µM	0,084±0,000 d		0,107±0,001 d		**<0,001**
LNMMA (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	0,007±0,000 c	**<0,001**	0,005±0,000 b	**<0,001**	**<0,001**
	22,5 µM	0,015±0,000 e		0,009±0,000 d		**<0,001**
	45 µM	0,011±0,000 d		0,006±0,000 c		**<0,001**
	90 µM	0,003±0,000 a		0,005±0,000 b		**<0,001**
	180 µM	0,004±0,000 b		0,004±0,000 c		0,908
SDMA (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	0,037±0,000 c	**<0,001**	0,022±0,000 a	**<0,001**	**<0,001**
	22,5 µM	0,031±0,000 a		0,035±0,000 d		**0,003**
	45 µM	0,029±0,000 a		0,048±0,000 e		**<0,001**
	90 µM	0,039±0,000 c		0,025±0,000 b		**<0,001**
	180 µM	0,033±0,0001 b		0,031±0,000 c		0,062
ADMA (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	0,026±0,000 b	**<0,001**	0,013±0,000 a	**<0,001**	**<0,001**
	22,5 µM	0,031±0,000 c		0,025±0,000 c		**<0,001**
	45 µM	0,027±0,000 b		0,022±0,000 b		**<0,001**
	90 µM	0,025±0,000 b		0,033±0,000 e		**<0,001**
	180 µM	0,020±0,000 a		0,027±0,000 d		**<0,001**
Arginine (µmol/L)	0 µM (Kontrol Grubu)	0,595±0,004 c	**<0,001**	0,672±0,002 a	**<0,001**	**<0,001**
	22,5 µM	0,628±0,003 c		0,568±0,002 a		**<0,001**
	45 µM	0,513±0,001 b		0,542±0,003 a		**0,002**
	90 µM	0,429±0,004 a		0,539±0,002 a		**<0,001**
	180 µM	9,710±0,031 d		30,600±0,227 b		**<0,001**

a: p< 0,005, b: p<0,004, c: p<0,003, d:0,002, e: p<0,001

A549 hücre hattı, sitrülin düzeylerinde 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası anlamlı bir farklılık vardır (sırasıyla ***p<0,001 p<0,001***) (bkz. Tablo 3.4. Sitrulline(ng/ml)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (b), (c), (e), (a), (d); 48. saatte 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı ise sırasıyla (a), (a), (a), (b), (b) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, 45 µM resveratrol konsantrasyonuna sahip grup hariç (*p=0,116*), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ***(p<0,001)***.

HEK-293 hücre hattının 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasındaki sitrülin düzeylerine bakılacak olursa; gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır (sırasıyla ***p<0,001***, ***p<0,001***) şeklindedir (bkz. Tablo 3.5. Sitrulline(ng/ml)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (a), (b), (c), (d), (e); 48. saatte ise (b), (d), (e), (c), (a) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (***p<0,001***).

A549 hücre hattı, homoarjinin düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (sırasıyla ***p<0,001***, ***p<0,001***) (bkz. Tablo 3.4. Homoarginine(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (a), (b), (ab), (c), (c); 48. saatte ise sırasıyla (c), (d), (a), (d), (b) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, 0 µM ve 45 µM resveratrol konsantrasyonuna sahip gruplar ***(p=0,002)*** olarak istatiksel olarak anlamlı bulunurken, diğer gruplar olan 22,5 µM, 45 µM ve 180 µM arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (***p<0,001***).

HEK-293 hücre hattı, homoarjinin düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (sırasıyla ***p<0,001***, ***p<0,001)*** (bkz. Tablo 3.5. Homoarginine(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (b), (c), (a), (e), (d); 48. saatte ise sırasıyla (a), (b), (c), (c), (d) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (***p<0,001)***.

A549 hücre hattı, LNMMA düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (***p<0,001***, ***p<0,001***) (bkz. Tablo 3.4. LNMMA(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (b), (c), (a), (e), (d); 48. saatte ise sırasıyla (a), (b), (d), (e), (c); 48. saatte ise sırasıyla (a), (c), (d), (e), (b) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, 0 µM olan grup ***(p=0,029)*** anlamlı bulunurken diğer gruplar arasında ***(p<0,001)*** olarak istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır.

HEK-293 hücre hattı, LNMMA düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (***p<0,001***, ***p<0,001***) (bkz. Tablo 3.5. LNMMA(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (c), (e), (d), (a), (b); 48. saatte ise sırasıyla (b), (d), (c), (b), (a) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, 180 µM resveratrol konsantrasyonuna sahip gruplar hariç *(p=0,062)*, diğer gruplar olan 0 µM, 22,5 µM, 45 µM ve 90 µM arasında ***(p<0,001)*** şeklinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır.

A549 hücre hattı, SDMA düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (sırasıyla ***p<0,001, p<0,001***) (bkz. Tablo 3.4. SDMA(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (b), (d), (c), €, (a); 48. saatte ise sırasıyla (a), (b), (a), (c), (b) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, 0 µM ve 45 µM resveratrol konsantrasyonuna sahip gruplar (sırasıyla ***p=0,006***, ***p=0,029***) şeklinde; 90 µM, 180 µM resveratrol konsantrasyonuna sahip gruplar ***(p<0,001)*** şeklinde istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, 22,5 µM grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

HEK-293 hücre hattı, SDMA düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (sırasıyla ***p<0,001***, ***p<0,001***) (bkz. Tablo 3.5. SDMA(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (c), (a), (a), (c), (b); 48. saatte ise sırasıyla (a), (d), (e), (b), (c) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, 0 µM, 45 µM, 90 µM gruplar ***(p<0,001)***,

22,5 µM konsantrasyonundaki gruplar ***(p=0,003)*** şeklinde istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, 180 µM grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ***(p=0,062)***.

A549 hücre hattı, ADMA düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası (sırasıyla ***p<0,001***, ***p<0,001***) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (bkz. Tablo 3.4. ADMA(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (a), (b), (c), (a), (a); 48. saatte ise sırasıyla (d), (b), (a), (a), (c) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, 0 µM, 45 µM ve 90 µM resveratrol konsantrasyonuna sahip gruplar ***(p<0,001)***, 180 µM ***(p=0,012)*** olarak anlamlı bulunurken, 22,5 µM değerindeki gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ***(p=0,474)***.

HEK-293 hücre hattı, ADMA düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası (sırasıyla ***p<0,001***, ***p<0,001*** şeklinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (bkz. Tablo 3.5. ADMA(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (b), (c), (b), (b), (a); 48. saatte ise sırasıyla (a), (c), (b), (e), (d) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ***(p<0,001)***.

A549 hücre hattı, arjinin düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (sırasıyla ***p<0,001***, ***p<0,001)***] (bkz. Tablo 3.4. Arginine(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (b), (c), (a), (d), (a); 48. saatte ise sırasıyla (d), (c), (d), (a), (b) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ***(p<0,001)***.

HEK-293 hücre hattı, arjinin düzeylerinin 24. ve 48. saat ölçümlerinin resveratrol konsantrasyonlarına göre karşılaştırılmasında; gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (sırasıyla ***p<0,001***, ***p<0,001***) (bkz. Tablo 3.5. Arginine(µmol/L)). 0 µM, 22,5 µM, 45 µM, 90 µM, 180 µM gruplarının kendi içinde farklılığı 24. saatte sırasıyla (c), (c), (b), (a), (d); 48. saatte ise sırasıyla (a), (a), (a), (a), (b) şeklindedir. Her bir resveratrol konsantrasyonu zamanlara göre (24-48. saatler) karşılaştırıldığında ise, 0 µM, 22,5 µM, 90 µM,

180 µM grupları arasında ***(p<0,001)***, 45 µM grubunda ise ***(p=0,002)*** şeklinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır.

4. TARTIŞMA

Resveratrolün *in vitro* ve *in vivo* yapılmış birçok çalışma ile kanserli hücre serileri ve hayvan modellerindeki antikanserojenik etkileri araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar ile elde edilmiş olan sonuçlar resveratrolün kanser hücrelerindeki antiproliferatif ve anti-oksidan etkilerini ortaya koymaktadır.

Epidemiyolojik çalışmalar ile birçok fitokimyasalın çoklu hastalıklar için faydalı rolü, (kardiyovasküler olaylar, obezite, diyabet ve kanser) geniş çapta belgelenmiştir. Doğal bir polifenol olan resveratrol normal hücreler üzerinde birçok olumlu etki göstermiştir. Genel olarak bakıldığında 0,1-50 μM dozlarda resveratrol hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz, anjiyogenez, antioksidan mekanizmada yer alan sinyal ve transkripsiyon faktörlerini aktive etmiştir. Bununla birlikte bağışıklık hücrelerinde siklooksijenaz 2 ve NF-kB'yi down- regüle ettiği, kalpteki mitokondriyal fonksiyonu iyileştiren ROS temizleyici kapasitesi (artan NOS ekspresyonunu ve SIRT1 aktivasyonunu) gösterilmiştir. Nöronlarda resveratrol, yaşlanma modellerinde Alzheimer ve Parkinson hastalıklarına karşı koruyucu bir rol gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca normal hücreler için belirgin düşük toksisite ile kanser gelişiminin başlamasını, ilerlemesini de engellediği bildirilmiştir (Rodriguez-Enriquez ve ark 2019).

Chen ve ark. yaptıkları bir çalışmada, bir antikanser ve antioksidan bileşik olarak resveratrolün potansiyel faydalarını kapsamlı bir şekilde araştırmışlardır. Bu çalışmada 24 saat sodyum arsenit ($NaAsO_2$) ile indüklenen sitotoksisite üzerindeki 1 ila 20 μM konsantrasyonlarda resveratrolün insan akciğer adenokarsinom epitel (A549) hücre hattında maruz kaldıktan sonra, DNA ve kromozomal hasar, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz ve oksidatif stres etkileri incelenmiştir. Resveratrolün düşük ve yüksek konsantrasyonlarda karşıt etkisine karşılık olarak, DNA ve kromozomal hasar, hücre apoptotik oranı ve oksidatif stres seviyesi de düşük resveratrol konsantrasyonları (1, 5 μM) ile hafifletilmiş, ancak daha yüksek konsantrasyonlu (20 μM) resveratrol ile şiddetlenmiştir. Çalışma, resveratrolün 1 ve 5 μM'deki hücreler için en faydalı olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak konsantrasyona bağlı etkisi nedeniyle resveratrolün bir antikanser terapötik ajan veya nutrasötik takviye olarak uygulanmasında dikkatli olunması sonucuna varmışlardır (Chen ve ark 2013).

Toplayıcı Reseptör B1 (SR-B1), cilt de dahil olmak üzere çeşitli dokularda kolesterol alımında rol oynamaktadır. Daha önce sigara içme maruziyetinin SR-B1 ekspresyonunu azaltan aldehitler (HNE) eklentilerinin oluşumunu indüklediğini gösterilmiştir (Sticozzi ve ark 2014).

Sticozzi ve ark. yaptıkları bir çalışmada HaCaT hücrelerinde resveratrolün kutanöz dokuda sigara içmenin neden olduğu SR-B1 ekspresyonunun azaltılmasına karşı koruyucu bir ajan olarak olası rolünü araştırmayı amaçlamışlardır. HaCaT hücreleri, yanan sigaradan hava çekmek ve hücre akımları üzerinde duman akımını yönlendirmek için bir vakum pompası kullanarak İngiltere filtrelenmemiş bir araştırma sigarasını (12 mg katran, 1.1 mg nikotin) yakarak sigara içmeyi üreten bir maruziyet sisteminde taze sigaraya maruz bırakılmıştır. Hücreler 50 dakika sigara dumanına maruz bırakılmış. Bu çalışmada, 0,5 ile 10 μM arasındaki dozlarda resveratrolün toksik olmadığını, SR-B1 protein seviyelerini insan keratinositlerinde doz bağımlı bir şekilde artırabildiğini göstermişlerdir. Ayrıca, farklı dozlarda resveratrol ile önceden muamele edilen hücreler sigaraya maruz bırakıldığında, SR-B1 kaybı doza bağlı bir şekilde önlenmiştir. Ek olarak, keratinositlerde resveratrol, sigara içme tarafından indüklenen HNE protein eklentilerinde bir artışı önleyebilmiştir. Özellikle resveratrol, HNE-SRB1 eklenti oluşumunu önleyebilmiştir. Bu nedenle resveratrol, esansiyel kolesterol reseptörü SR-B1'i koruyarak cilde eksojen stres faktörlerine karşı savunma sağlayabilen doğal bir bileşik olarak göründüğü sonucuna varmışlardır (Sticozzi ve ark 2014).

Wang ve ark. yaptığı bir çalışmada, resveratrolün akciğer adenokarsinomu A549 hücreleri üzerindeki etkisini ve potansiyel mekanizması araştırılmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda resveratrol (0, 25, 50, 100 ve 200 μmol / L) olan ortam, hücrelere ilave edilmiş ve hücreler düşük resveratrol konsantrasyonu ile muamele edildiğinde, hücre boyutu arttırılırken, hücre sayısı azalttığını gözlemlemişlerdir. Resveratrol konsantrasyonu 200 μmol/L' ye yükseltildiğinde, belirgin hücre apoptozu gözlenmiştir. Resveratrol tedavisinden sonra A549 hücrelerinin ara boşluğu azalmış ve hücre çekirdeğinde granüler malzeme artmıştır. Bu değişiklikler, artan resveratrol konsantrasyonu ile önemli ölçüde korele bulunmuştur. Resveratrol, A549 hücrelerinde apoptozu indükler ve doza bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe eder. Ayrıca resveratrol tedavisinden sonra p53, Bax ve bölünmüş kaspaz-3 proteininin ekspresyonunun önemli bir şekilde up-regüle iken, Bcl-2 ve Bcl-2 / Bax oranının down-regüle olduğu gösterilmiştir. Çalışmada, resveratrolün p53, Bax, Bcl-2 ve bölünmüş kaspaz-3 ekspresyonunun düzenlenmesiyle proliferasyonu inhibe ettiğini ve A549 hücrelerinin apoptozunu indüklediği sonucuna varmışlardır (Wang ve ark 2015).

Li ve ark. yaptıkları bir çalışmada ise, resveratrolün *in vitro* A549 hücrelerinde küçük hücreli dışı akciğer kanseri üzerindeki etkilerini ve ilgili mekanizmalarını gözlemlemeyi amaçlamışlardır. Resveratrolün kanser karşıtı etkileri hücre canlılığı, migrasyon ve invazyon, proliferasyon ve apoptoz üzerinde analiz etmişlerdir. Hücre canlılığı suphohodamin B (SRB)

analizleri ile belirlenmiştir. Hücre proliferasyonu ve apoptozu, akış sitometrisi ile belirlenmiştir. STAT-3 ekspresyonunu, gerçek zamanlı PCR ve western blot ile incelemişlerdir. STAT-3'ün aşırı eksprese edici vektörü de resveratrolün STAT-3 sinyallemesi üzerindeki etkilerini gözlemlemek için A549 hücrelerine inşa edilmiş ve transfekte edilmiştir. Sonuç olarak resveratrolün A549 hücre canlılığı üzerinde doza bağlı ve zamana bağlı bir sitotoksisite etkisi sergilediğini gözlemlemişlerdir. Resveratrol ayrıca proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu inhibe etmiş ve 0 ila 72 saat arasında zamana bağlı bir şekilde apoptozu teşvik etmiştir. Daha sonraki çalışmalar resveratrolün STAT-3'ün mRNA'sını ve protein ekspresyonunu inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Aşırı eksprese edilen STAT-3'ün resveratrolün tamamen veya kısmen proliferasyon, apoptoz, migrasyonu üzerindeki etkilerini ortadan kaldırdığını göstermiştir. Resveratrolün anti-kanser etkilerine STAT-3 sinyallemesi aracılık ettiğini gösterdiği sonucuna varmışlardır (Li ve ark 2016).

Umut verici bir anti-kanser adayı olan resveratrol, zayıf biyoyararlanımı nedeniyle uygulamada sınırlıdır. Bununla birlikte, bazı resveratrol türevlerinde daha iyi biyoyararlanım bulunmuştur. Yang ve ark. yaptığı bu çalışmada, insan mesane kanseri T24 hücrelerinde resveratrol ve analoglarının (polidatin [PD], oxyresveratrol [ORV], asetilresveratrol [ARV]) metabolik profillerini ve yapılarını-aktivite ilişkisi araştırılmıştır. Daha sonra tümör hücrelerinin kaderini belirleyebilecek aktif formlarını ve kilit kimyasal fonksiyonel grupları değerlendirilmiştir. Hücreler çeşitli konsantrasyonlarda RV, ARV, ORV ve PD (0–200 μmol/L) ile tedavi edilmiş olan, T24 hücreleri ile sırasıyla 6, 12, 24, 48 ve 72 saat inkübasyondan sonra MTT analizi, HE boyama ve akış sitometri analizi ile değerlendirilmiştir. Daha sonra canlı ve ölü T24 hücrelerinde, ayrıca T24 hücresi süpernatanı ve lizatlarındaki ilaç metabolitlerini, sırasıyla yüksek performanslı sıvı kromatografisi, tandem kütle spektrumu ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometri teknolojileri ile birleştirilmiş sıvı kromatografisi ile niteliksel ve kantitatif olarak analiz etmişlerdir. Resveratrol ve analogları T24 hücreleri üzerinde farklı inhibe edici etki göstermiştir. ORV, %67,68'lik güçlü bir inhibisyon sergilemiş ve IC_{50} değerini 47.46 μM bulmuşlardır. Ek olarak, resveratrol ve ARV'nin IC_{50}'si 69,33 ve 53,49 μM ve T24 hücrelerine karşı inhibisyon oranları sırasıyla %54,34 ve %61,29 olarak bulmuşlardır. Bununla birlikte, PD' nin IC_{50}'si elde edilmemiş ve 100 μM PD tedavisinden sonra sadece % 8.64 inhibisyon göstermiştir (Yang ve ark 2019).

Metabolizmaya bağlı reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi, kanserler gibi birçok hastalığın başlangıç noktasını oluşturan hayati makromoleküllerin oksidasyonuna yol açar. ROS' u temizleyebilen veya daha az zararlı türlere zararlı ROS'u metabolize edebilen

antioksidan enzimleri indükleyebilen antioksidanların kullanımı oldukça faydalı olabilir. Resveratrol, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve renoprotektif özelliklere sahip bir polifenoldür. Gadacha ve ark. yaptığı bir çalışma, akut resveratrol uygulamasının, 12 saatlik karanlık ışık döngüsü ile senkronize edilmiş erkek sıçanların kalp, karaciğer ve böbreğinde bulunan lipoperoksidasyon seviyesine doz-zaman bağımlılığını araştırmışlardır. Resveratrol karanlık (karanlık başlangıçtan 6 saat sonra) veya ışık açıklığı (karanlık başlangıçtan 18 saat sonra), tiyobarbitürik asit reaktif türler (TBARS) sırasıyla 10 ve 22 saatlik karanlık başlangıcından 4 saat sonra ölçülmüştür. Üç organdaki bazal Tiyobarbitürik asit reaktif türleri düzeyleri, gece boyunca gündüz ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Tiyobarbitürik asit reaktif türlerin dokular üzerindeki resveratrol etkisi de dozaj süresine bağlı olduğu gösterilmiştir. Karanlık faz sırasında uygulandığında, resveratrol tiyobarbitürik asit reaktif tür seviyelerini düşürürken, ışık aralığında polifenol üç organdaki tiobarbitürik asit reaktif türlerini arttırmıştır. Resveratrol, karanlık açıklık sırasında bir antioksidan ve ışık açıklığı sırasında bir pro-oksidan olarak davranmıştır. Bu veriler bazal lipoperoksidasyonda ve resveratrol antioksidan etkisinde bir gündüz / gece ritmi olduğunu düşündürmektedir sonucuna varmışlardır (Gadacha ve ark 2009).

Resveratrol şu anda klinik öncesi çalışmalarda potansiyel bir kanser kanser/kimyasal koruyucu ajan ve kardiyovasküler stres salma bileşiği olarak değerlendirilmesine rağmen, resveratrol ile tedavi, önceden var olan gastrik ülserlerin iyileşmesini ciddi şekilde geciktirmektedir. Resveratrol tedavisi ayrıca endotel NOS (eNOS) ekspresyonunu indükleyebilir. Guha ve ark. yaptığı bir çalışmada, resveratrolün ülser etkilerini hafifletmek için eNOS yoluyla NO üretimi modüle etmeye çalışılmıştır. Gastrik ülserler, tek doz indometasin ile farelerde indüklenmiştir. L-arginin ile ön-muamelenin, bu farelerde resveratrolün ülser önleyici etkileri üzerindeki etkileri daha sonra değerlendirilmiştir. Bir gen ekspresyon çalışması ile birlikte ülser hasar skorları (DS), miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, prostaglandin E2 (PGE2) ve NO oluşumu ölçülmüştür. Resveratrol, artmış DS ve MPO aktivitesinin gösterdiği gibi, indometasine bağlı mide ülserlerinden gelen hasarı ve gecikmiş iyileşmeyi önemli ölçüde arttırmıştır. Bununla birlikte, resveratrol tedavisi eNOS gen ekspresyonunu indüklenmiş ve eNOS/iNOS dengesini değiştirmiştir. İndometasine bağlı ülseri olan farelerde resveratrolden önce verilen L-Arginin, doku NO sentezini önemli ölçüde arttırmış ve ülser iyileşmesini geliştirmiştir. Ekzojen L-arginin, resveratrol ile indüklenen ve resveratrolün pro-ülser etkilerine karşı korunan yüksek eNOS seviyeleri ile NO oluşumunu arttırmıştır. Bu nedenle, L-arginin,

hastalarda resveratrolün ülser yan etkilerinin hafifletilmesi için yararlı olabileceği sonucuna varmışlardır (Guha ve ark 2010).

Geçmişte yapılan çalışmalar, antikanser (pro-apoptoz) ve yaşamı uzatan (sağkalım yanlısı) bileşik olarak resveratrolün potansiyel faydasını aydınlatmıştır. Bununla birlikte, bu iki farklı etki farklı konsantrasyon aralıklarında gözlenmiştir. Peltz ve ark. yaptığı bu çalışmada, resveratrolün 0,1 ila 10 μM arasında değişen konsantrasyonlarda, çeşitli dokularda bulunan bir tür yetişkin kök hücre olan insan mezenkimal kök hücrelerinin (hMSC) hücre kendini yenileme ve farklılaşması üzerindeki etkilerini hem kısa hem de uzun süreli maruziyetten sonra incelemişlerdir. Sonuçlar 0,1 μM'de resveratrolün hücresel yaşlanmayı inhibe ederek hücrenin kendini yenilemesini desteklediğini, 5 μM veya daha yüksek bir hızda resveratrolün yaşlanma oranını, hücre ikiye katlanma süresini ve S-faz hücre döngüsü durmasını artırarak hücrenin kendini yenilemesini engellediğini ortaya koymaktadır. 1 μM'de hücre yenilenmesi üzerindeki etkisi minimal olduğu, ancak uzun süreli maruziyetten sonra artan yaşlanma oranıyla birlikte inhibitör bir etki uyguladığı gözlenmiştir. Tüm konsantrasyonlarda resveratrol, yüksek konsantrasyonlarda hücre kendi kendini yenileme üzerindeki önleyici etkisi ile dengelenen, dozaja bağlı bir şekilde osteojenik farklılaşmayı teşvik etmiştir. Aksine, resveratrol kısa süreli maruz kalma sırasında adipojenik farklılaşmayı bastırıp, ancak uzun süreli maruziyetten sonra bu süreci desteklemektedir. Çalışma, resveratrolün 0,1 μM'de kök hücre gelişiminde en faydalı olduğunu göstermektedir. Resveratrolün, bir antikanser terapötik ajan veya hMSC'ler üzerindeki doza bağlı etkisi nedeniyle resveratrol uygulanmasında dikkatli olunması gerektiği sonucuna varmışlardır (Peltz ve ark 2012).

Doğal antioksidanların diyetle alınmasının oksidatif ilişkili kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağladığı düşünülmektedir. Birçok in vivo çalışmalara ve klinik çalışmalara rağmen, bu konu kesin olarak çözülmemiştir. Resveratrol en çok incelenen diyet polifenolik antioksidanlarından biridir. Paradoksal olarak, daha önce yüksek resveratrol konsantrasyonlarının, hücre ölümüne yol açan ROS seviyelerini yükselterek pro-oksidan bir etki gösterdiğini gösterilmiştir. Posadino ve ark. yaptığı bir çalışma ile resveratrol ile indüklenen oksidatif hücre ölümünü destekleyen moleküler determinantları araştırmak amaçlanmıştır. İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC'ler) kullanılarak, artan resveratrol konsantrasyonlarının DNA sentezi ve apoptozu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ek olarak, hücre canlılığı veya apoptoz genlerinin mRNA ve protein seviyeleri ile protein kinaz C aktivitesi belirlenmiştir. Yüksek resveratrol konsantrasyonları protein kinaz C aktivitesini azaltırken, DNA sentezini inhibe ettiği ve apoptozu indüklerken, düşük resveratrol

konsantrasyonları zıt bir etki ortaya çıkarmıştır. Resveratrolün protein kinaz C aktivitesi üzerindeki bu iki fazlı konsantrasyona bağımlı etkisi, moleküler düzeyde yansıtılmaktadır. Bu çalışma resveratrolün endotelyal fonksiyon/işlev bozukluğu üzerindeki etkisine yeni bir moleküler kavrayış sağlayarak, optimal bir faydasını elde etmenin konsantrasyona bağlı olduğunu doğrulamıştır (Posadino ve ark 2019).

Glikozun yol açtığı oksidatif stres endotelyal disfonksiyonda rol oynar. Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) ve arginaz, endotelyal NO sentazının (eNOS) düzenleyicileridir. Frombaum ve ark. yaptığı bir çalışmada, 25 μM glukoz altında 24 saat boyunca sığır aort endotel hücrelerinde iki polifenolik antioksidan, resveratrol ve pikeatannolün DDAH ve arginaz yolları üzerindeki etkisini karşılaştırmayı amaçlanmıştır. Bu hücrelerde DDAH aktivitesi ve ekspresyonu kontrol hücrelerine kıyasla azalırken arginaz aktivitesi değişmemiştir. DDAH inhibisyonu, doğal bir eNOS inhibitörü olan asimetrik dimetilarginin (ADMA) hücre içi birikmesine yol açmıştır. Bu koşullar altında, resveratrol (0,1 - 10 μM) ile hücre ön tedavisi, bazal DDAH aktivitesini ve doza bağlı bir etki ile ADMA seviyesini geri yüklemiştir. Piceatannol, DDAH yolağında resveratrol görevi görmüş, ancak 10 kat daha düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur. Bu çalışma ile endotelyal disfonksiyonu iyileştirmek için resveratrol veya pikeatannol uygulamasını hedefleyen potansiyel terapötik müdahale olarak önerilmesi sonucuna varılmıştır (Frombaum ve ark 2011).

Caddeo ve ark. yaptığı çalışmada, güçlü antioksidan ve serbest radikal süpürücü özelliklere sahip bir polifenol olan resveratrolün, hücre çoğalması ve lipozomal birleşmeyle fotokoruma etme üzerindeki etkinliğini artırma olasılığı araştırılmıştır. Resveratrol ile yüklenen farklı lipit bileşimlerinin oligolamellar vezikülleri hazırlanmış ve 60 gün boyunca boyut, zeta potansiyeli, katılma etkinliği, elektron mikroskopisi ve stabilitesinin değerlendirilmesi ile karakterize edilmiştir. Serbest ve lipozomal resveratrolün HEK-293 hücrelerinin yaşayabilirliği ve UV-B ışınlaması sonrası fotokoruması üzerine etkisi MTS yöntemi ile değerlendirilmiştir. Resveratrol, 100 μM konsantrasyonda hücre canlılığını azaltırken, 10 μM'de hücre proliferasyonunu arttırmış ve aynı zamanda en etkili fotokorumayı sağlamıştır. Ters ışık ve flüoresans mikroskobu işleminden geçirilen hücrelerin fotomikrografları, 10 μM'de resveratrol etkinliği ve ayrıca hücre şekli, ayrılma ve apoptotik özelliklerdeki değişikliklere bağlı olarak daha yüksek konsantrasyonlardaki toksisitesini göstermiştir. Resveratrolün, hücrelerin proliferasyonunu uyarma kabiliyetini ve UV-B ışığının neden olduğu stres koşulları altında hayatta kalma kabiliyetini arttırdığı sonuçlarına varmışlardır (Caddeo ve ark 2008).

Abd El-Fattah ve ark. yaptığı çalışmada, resveratrol ve curcumin' in di- (2-etilheksil) ftalat (DEHP) tarafından indüklenen oksidatif testiküler hasar üzerindeki koruyucu rolünü değerlendirmek amaçlanmıştır. Erkek Wistar sıçanları altı gruba ayrılmıştır; üç grup, testiküler hasarı indüklemek için 45 gün boyunca oral günlük dozlarda DEHP (2 g / kg BW) almıştır. Bu grupların ikisi DEHP uygulamasından 30 gün önce ve 45 gün sonra oral olarak resveratrol (80 mg / kg BW) veya kurkumin (200 mg / kg BW) almıştır. Diğer iki sıçan grubuna sadece resveratrol veya kurkumin verilmiştir. DEHP uygulanan sıçanların testislerinde toplam antioksidan kapasite (TAC) ve glutatyon (GSH) seviyelerinde azalma ve malondialdehit (MDA) seviyelerinde oksidatif hasar gözlenmiştir. DEHP uygulaması, Nrf2, HO-1, HSP60, Hsp-70 ve Hsp-90'ın testiküler gen ekspresyon seviyelerinde önemli artışlara neden olmuştur. DEHP' nin yol açtığı bu patolojik değişiklikler resveratrol ve kurkumin ile ön işleme tabi tutularak zayıflatılmıştır. Testisin biyokimyasal, moleküler ve histolojik yapısında DEHP kaynaklı yaralanmaların resveratrol ve curcumin ile ön tedavi yapılarak iyileştiği sonucuna varmışlardır. Bu bileşiklerin kemoprotektif etkileri, Nrf2, Hsp-60, Hsp-70 ve Hsp-90 gen ekspresyon seviyelerini arttırmanın yanı sıra içsel antioksidan özelliklerinden kaynaklanabildiği ve yararlı potansiyel araçlar olabileceğini öne sürmüşlerdir (Abd El-Fattah ve ark 2016).

Sun ve ark yaptığı bu çalışma, resveratrolün bir sıçan üremi modelinde böbrek fonksiyonu üzerindeki etkilerini ve ısı şoku proteinlerinin ekspresyonunu araştırmayı amaçlamıştır. Bir rodasiyanin boyası olan Hsp-70 inhibitörü MKT-077 kullanılmıştır. Çalışma grupları, sahte ameliyatlı sıçanlar (sahte grup), üremi sıçan modeli (model grubu), çözücü ile tedavi edilen kontrol grubu, resveratrol grubu ile tedavi edilen sıçan modeli (resveratrol grubu), MKT-077 (MKT-077 grubu) ile tedavi edilen sıçan modeli ve resveratrol + MKT-077 grubu olarak ayrılımıştır. Böbrek dokuları histolojik olarak incelenmiş, renal hücre apoptozu TÜNEL yöntemi ile tespit edilmiştir. Sham grubu ile karşılaştırıldığında, sıçan model grubunun böbreğindeki ısı şoku proteinleri Hsp-70, Hsp-90, Hsp-27, Hsp-25, Hsp-40 ve Hsp-60 ekspresyon seviyeleri farklı derecelerde artmıştır. Model grubu ile karşılaştırıldığında, resveratrol grubundaki Hsp-70 seviyeleri önemli ölçüde artmıştır ($p < 0.05$). Model grubu ile karşılaştırıldığında, MKT-077 ile tedavi, resveratrol tedavisinin ardından artan sıçanların hayatta kalma oranını düşürmüştür. Resveratrol grubu ile karşılaştırıldığında, resveratrol+ MKT-077 grubundaki böbrek fonksiyonu önemli ölçüde azalmıştır. Bir sıçan üremi modelinde, resveratrol böbrek hasarını azaltmış ve Hsp-70'in artan ekspresyonu ile ilişkili olan hem böbrek fonksiyonunu hem de sağkalımı iyileştirmiştir (Sun ve ark 2020).

Liu ve ark. yaptığı bir çalışmada, 42 günlük toplam 300 siyah kemikli civciv rastgele olarak beş tedavi grubuna atanmış ve pozitif kontrol tavukları normal sıcaklıkta (NT, 24 ± 2°C) bir bölmede tutulmuş ve bazal diyetle beslenmiştir. Diğer dört grup, 8 saat boyunca dairesel bir yüksek sıcaklık (HT, 37 ± 2 °C) bölmesinde tutulmuş ve 15 gün boyunca kg resveratrol başına 0, 200, 400 veya 600 mg ile desteklenen bir bazal diyetle beslenmiştir. Bu çalışmada resveratrol takviyesinin bağırsak yaralanmalarını hafifletip hafifletemeyeceğini araştırmayı ve resveratrolün Hsp-70, Hsp-90, nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve epidermal büyüme faktörünü (EGF) nasıl düzenlediğini araştırmayı amaçlamışlardır. Sonuçlar, ısı-stresi tepkilerinin jejunum ve ileumun villus yapılarına zarar verdiğini, bu da kısalmış bağırsak villusları, derinleşmiş kriptler ve villus yüksekliği / kript derinliği (V/ C) oranının azalmasına ve goblet hücrelerinin sayısının azalmasına neden olduğunu göstermiştir. Isı stresi ayrıca Hsp-70, Hsp-90 ve NF-κB'nin artmış mRNA ve protein ekspresyonuna ve jejunal mukozada azalmış EGF'ye neden olmuştur. Resveratrolün kg başına 400 mg ile diyet takviyesi, villus morfolojisini iyileştirmiş, goblet hücrelerinin ve lenfositlerin sayısını artırmıştır. Isı stresinin 6., 10. ve 15. gününde Hsp-70, Hsp-90 ve NF-κB'nin mRNA aşırı ekspresyonunu zayıflatmıştır. Resveratrol, 15 günlük ısı stresinden sonra jejunal villusta Hsp-70, Hsp-90 ve NF-κB'nin protein ekspresyonunu azaltmıştır. Bu sonuçlar, diyet resveratrolün, Hsp'lerin mRNA ve protein ekspresyonunu ve dairesel ısı stresine maruz kalan siyah kemikli tavuklarda epitel büyüme faktörü ve transkripsiyon faktörünü modüle ederek bağırsak morfolojisini iyileştirmek ve jejunum mukoza hasarlarını hafifletmek için potansiyel bir beslenme stratejisi sunduğunu göstermektedir (Liu ve ark 2016).

Yuan ve ark. yaptığı bir çalışmada, Resveratrolün, sirtuin 1 (SIRT1) ve dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) / asimetrik dimetil arjinin (ADMA) yolağının aktivasyonu yoluyla yaşlanma üzerinde inhibe edici etkiler uyguladığı bildirilmiştir. Resveratrolün yeni bir türevi olan BTM-0512'nin, DDAH / ADMA yolunu düzenleyerek yüksek glukoz kaynaklı hücresel yaşlanma üzerinde faydalı etkiyi uygulayıp uygulamadığını araştırmayı ve bunun düzenleyici etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçlamışlardır. DDAH / ADMA yolundaki BTM-0512, SIRT1'in aktivasyonu ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Endotel hücrelerinin yaşlanma modeli, yüksek glikoz ile indüklenmiş ve hücreler, beta-galaktosidaz ve DDAH aktivitesi, ADMA seviyesi, DDAH ve SIRT1 mRNA ekspresyonunun belirlenmesi için toplanmıştır. Sonuçlar, yüksek glikozun, BTM-0512 ile ön işlemle zayıflatılan, azalmış DDAH aktivitesi, down-regüle edilmiş DDAH2 ve SIRT1 mRNA ekspresyonları ve artan ADMA seviyeleri ile birlikte yaşlanan hücrelerin oranını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bu

çalışmadaki sonuçlar, BTM-0512'nin, DDAH / ADMA yolunu düzenleyerek yüksek glikozla indüklenen hücresel yaşlanma üzerinde faydalı etkiler uygulayabildiğini ve DDAH / ADMA yolundaki düzenleyici etkisinin SIRT1 aktivasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Yuan ve ark 2010).

Tabatabaie ve ark. yaptığı bu çalışma, mikronize resveratrol desteğinin, tip 2 diyabetli hastalarda asimetrik dimetil arjinin (ADMA) ve paraoksonaz-1 (PON1) aktivitesinin serum seviyeleri üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlamıştır. Bu çift kör randomize çalışmaya, tip 2 diyabetli 76 hasta dahil edilmiştir. Katılımcılar, 8 hafta boyunca günde 1000 mg resveratrol veya plasebo kapsülleri (metilselüloz) tüketmeleri için rastgele seçilmiştir. Enzime bağlı immünosorbent test yöntemi kullanılarak müdahalenin başında ve sonunda serum ADMA ve PON1 enzim aktivitesi seviyelerini ölçmüşlerdir. Bulgular ile 8 haftalık resveratrol desteğinin, tip 2 diyabetli hastalarda ADMA ve PON1 enzim aktivitesinin serum seviyeleri üzerinde faydalı etkiler yaratabileceği düşünülmekte olduğu sonucuna varmışlardır. Bununla birlikte, bu sonuçların doğruluğunu teyit etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Tabatabaie ve ark 2020).

Yaptığımız yüksek lisans tez çalışmamızda, resveratrolün A549 akciğer kanseri hattı ve insan embriyonik böbrek doku epiteli HEK-293 hücre hatlarınının proliferasyonuna etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Çalışmamızın sonucunda farklı süre ve konsantrasyonlarda resveratrol uygulanan hücre hatlarının Hsp-90 ve ADMA ekspresyonlarını karşılaştırıp, etkili bir antikanser terapötik ilaç hedefi olarak bu parametreleri göstermek ve daha sonraki çalışmalara ışık tutması hedeflenmiştir. Bu hücre hatlarına farklı süre ve konsantrasyonlarda resveratrol uygulayarak IC_{50} değerleri belirlendi. Çalışmamızda, resveratrolün akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiğini gözlemledik. % Hücre canlılık-konsantrasyon grafiklerinden resveratrol IC_{50} dozları 24. ve 48. saatler için hesaplandı. Buna göre A549 için resveratrolün 24. saatte IC_{50}: 180,30 µM, 48. saatte IC_{50}: 76,45 µM HEK-293 için resveratrolün 24. saatte IC_{50}: 197,13 µM, 48. saatte IC_{50}: 140,29 µM olarak belirlendi. Sonuçlarımız literatüre bakıldığında uyumlu olduğu görülmüştür. Aynı zamanda embriyonik böbrek doku epitel hücrelerinin ise doz ve zamana bağlı olarak, 25-50 µM dozlarda koruyucu bir rol gösterdiği de çalışmamızda gözlemlenmiştir.

Chen ve ark. yaptığı bu çalışmada A549 hücre hattına ek olarak bir sağlıklı kontrol hücresi kullanmamış olmaları çalışmalarındaki eksikliği göstermektedir. Bizim çalışmamızda A549 hücre hattında kullandığımız resveratrol konsantrasyonlarında doza bağımlı olarak

konsantrasyonlar arttıkça hücrelerin proliferasyonunu azaltmıştır. HEK-293 hücre hattında ise konsantrasyonlar azaldıkça ve zamana bağımlı olarak hücre proliferasyonu artmış ve korunmuştur. Çalışmamız resveratrolün iki fazlı özelliğini her iki hücre hattında da karşılaştırmalı olarak çalışılarak kanıtlamıştır.

24. saatteki IC_{50} 180 µM dozuna ek olarak, 90 µM, 45 µM, 22,5 µM konsantrasyonlardaki dozlarda çalışmamıza dâhil edilip Hsp-90, ADMA ekspresyonlarını 24. ve 48. saatlerde inceledik.

Elde ettiğimiz A549 Hsp-90 verilerine göre, ölçümlerin resveratrol konsantrasyonlarına göre tek yönlü varyans analizi (ANOVA) verilerinin karşılaştırılmasında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır [24 ve 48. saatlerde sırasıyla (*p=0,623*, *p=0,698*)]. Her bir resveratrol konsantrasyonunun zamana göre karşılaştırılmasında ise (paired t testi), 45 µM resveratrol ile muamele edilmiş gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş *(p<0,05)*, diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Kanser hücresi ve insan böbrek epitel hücresine uyguladığımız anti-kanser ve anti-oksidan özellikteki resveratrolün hücre proliferasyonunu inhibe etmesiyle, hücrelerin Hsp-90 düzeylerinde değişim arasındaki ilişki net olarak bilinmemektedir. Hsp-90 aktivitelerinde resveratrol konsantrasyonuna göre verilerin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edememiş olmamız ve her bir konsantrasyonun zamanlara göre karşılaştırılmasında 45 µM resveratrol konsantrasyonuna sahip grup harici diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmaması, nedenlerin incelenmesi ve bu çalışmaya ek olarak yapılacak başka çalışmalar ile sonuçlarımızın daha net anlaşılması beklenmektedir.

HEK-293 hücrelerine bakıldığında da, elde ettiğimiz ölçümlerin resveratrol konsantrasyonlarına göre tek yönlü varyans analizi (ANOVA) verilerinin karşılaştırılmasında 24. saat Hsp-90 verilerine göre, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuş ***(p<0,05)*** ve 22,5 µM, 45 µM, 180 µM grupları arasındaki farklılık sırasıyla (a),(a),(b) şeklindedir ve 180 µM grubundaki hücrelerin Hsp-90 değerlerinde 22,5 µM ve 45 µM'e kıyasla anlamlı bir artış bulunmuştur. 48. saat Hsp-90 verilerinde ise değişen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır *(p=0,086).* Her bir resveratrol konsantrasyonunun zamana göre karşılaştırılmasında ise, anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Literatür incelendiğinde kontrol grupları ile birlikte resveratrol uyguladığımız kanserli hücre hattı ve epitel hücresiyle karşılaştırmalı böyle bir çalışmanın yapılmamış olmaması çalışmamızı özgün kılmıştır. Çalışmamızda kanser hücresi ve insan böbrek epitel hücresine uyguladığımız anti-kanser ve

anti-oksidan özellikteki resveratrolün hücre proliferasyonunu inhibe etmesiyle, hücrelerin Hsp-90 düzeylerinde değişim arasındaki ilişki net olarak anlaşılamamıştır. Nedenlerin ve sonuçlar arasındaki ilişkilerin net olarak anlaşılması için literatür taraması yapıldığında herhangi bir çalışmanın yapılmamış olması, çalışmamızda aktivitesi incelenen Hsp-90 aktivitelerine ek yapılacak Hsp-90α izoformu, protein tayini analizleri gibi daha fazla çalışmaya gereksinim duyulduğunu göstermektedir.

Resveratrol ile muamele ettiğimiz A549 ve HEK-293 hücre hatlarının, (180 µM, 90 µM, 45 µM ve 22,5 µM, 0 µM (kontrol grubu) konsantrasyonlarındaki değerler ile çalışılarak, örneklerin "Sitrülin, Homoargin, LNMMA, SDMA, ADMA ve Arginin" düzeyleri hesaplanmıştır. Resveratrol ile yapılmış diğer çalışmalar literatürde incenmiş ve daha önce böyle bir çalışmanın yapılmamış olduğu görülmüştür. Sonuçlarımız incelendiğinde gruplar içinde resveratrol konsantrasyonlarının karşılaştırılması ve zamanlara göre resveratrol konsantrasyonları karşılaştırmalarına bakıldığında, "Sitrülin, Homoarginin, LNMMA, SDMA, ADMA ve Arginin" düzeyleri sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Fakat grupların tek yönlü resveratrol konsantrasyonlarına göre ve konsantrasyonların zamanlara göre karşılaştırılmalarındaki anlamlı bulunan sonuçlar arasındaki etki mekanizmaları net olarak anlaşılamamıştır. Nedenler ve sonuçlar arasındaki ilişkilerin net olarak anlaşılması için literatür taraması yapıldığında herhangi bir çalışmanın yapılmamış olması ve çalışmamızda aktivitesi incelenen "Sitrülin, Homoarginin, LNMMA, SDMA, ADMA ve Arginin" düzeylerine ek olarak yapılacak daha fazla çalışmaya gereksinim duyulduğu görülmektedir.

Diğer yapılan çalışmalara bakıldığında; Yang ve ark. yaptığı çalışmada, insan mesane kanseri T24 hücrelerinde resveratrol ve analoglarının (polidatin, oxyresveratrol, asetilresveratrol) metabolik profilleri ve yapıları bakımından aktivite ilişkisi araştırılmıştır. Böyle bir çalışmada T24 kanser hücre hattına ek olarak karşılaştırmalı olarak sağlıklı epitel hücreyle çalışılmamış olması çalışmanın eksikliğini göstermektedir. Hsp-90 ve ADMA düzeyleri ile ilgili yapılan farklı çalışmalara bakıldığında çalışmaların yetersiz kaldığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda ADMA düzeylerine ek olarak kontrol hücresi ile birlikte çalışılan "Sitrülin, Homoargin, LNMMA, SDMA, ADMA ve Arginin" düzeyleri literatüre katkı sağlamıştır. Fakat sonuçların doğruluğunun tartışılması, karşılaştırma yapılabilmesi, etki mekanizmalarının ortaya konulması ve bu parametrelerin bir biyobelirteç olarak gösterilebilmesi için protein tayini analizleri, genomik çalışmalar, biyokimyasal yolakların analizi gibi literatürde eksik görülen böyle çalışmaların tamamlanması beklenmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile resveratrolün, insan akciğer kanser hücresi A549 hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiğini, insan embriyonik böbrek doku epiteli HEK-293 hücrelerinin proliferasyonunun ise resveratrol konsantrasyonuna bağlı olarak, düşük konsantrasyonlarda proliferasyonu artırdığını MTT yöntemiyle ortaya koyulmuştur. Aynı zamanda, kanser hücrelerinde ve resveratrol uygulanmış hücre hatlarında Hsp-90 ve ADMA düzeyleri incelenmiştir. Dahası bu çalışma resveratrolün iki fazlı, anti-kanser, anti-tümör, anti-oksidan ve anti-proliferatif özellikleriyle kanser hastalarında diğer tedavilere destek olabileceği görüşlerini desteklemektedir.

Resveratrol ile muamele ettiğimiz A549 ve HEK-293 hücre hatlarının kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı Hsp-90 ve "Sitrülin, Homoarginin, LNMMA, SDMA, ADMA ve Arginin" düzeylerinin incelenmesi literatürdeki çalışmalar araştırıldığında daha önce böyle bir çalışmanın yapılmamış olması çalışmamızı özgün kılmaktadır. ADMA ve diğer parametre düzeylerinde, kanser hücresi ve insan böbrek epitel hücresine anti-kanser ve anti-oksidan özellikteki farklı dozlarda uygulanan resveratrol ile anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. . Fakat bu anlamlı değişim arasındaki ilişki net olarak anlaşılamamıştır. Biyokimyasal yolaklar ve genomik çalışmalar ile ilintili çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmaya ek olarak yapılması gerekli ileri çalışmalarla, değişimler üzerindeki bu etki mekanizmaları daha net ortaya konulup, akciğer kanseri konusuna büyük katkı sağlayıp, umut vadedeceği düşünülmektedir. Ancak hücresel fonksiyon bağlamında, hızlı bir tepki, sitoprotektif izoform, büyümenin teşviki, hücre döngüsü regülasyonu ve kanser hücresi invazivitesinde yer alan Hsp-90α düzeyleri için bu çalışmaya ek yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bütçe kısıtlılığı nedeniyle Hsp-90'nın izoformu olan Hsp-90α düzeyleri çalışılamamıştır. Elde ettiğimiz Hsp-90 düzeyleri arasındaki mekanizmanın daha net ortaya konulabilmesi ve sonuçlar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bulunamayan gruplar arasındaki nedenlerin araştırılması için yapılacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

Abd El-Fattah AA, Fahim AT, Sadik NAH, Ali BM, 2016. Resveratrol and curcumin ameliorate di-(2-ethylhexyl) phthalate induced testicular injury in rats. Gen Comp Endocrinol, 225, 45-54.

Abdelaziz HM, Elzoghby AO, Helmy MW, Samaha MW, Fang J-Y, Freag MS, 2019. Liquid crystalline assembly for potential combinatorial chemo–herbal drug delivery to lung cancer cells. International journal of nanomedicine, 14, 499.

Abdulridha MK, Al-Marzoqi AH, Al-awsi GRL, Mubarak SM, Heidarifard M, Ghasemian A, 2020. Anticancer Effects of Herbal Medicine Compounds and Novel Formulations: a Literature Review. Journal of Gastrointestinal Cancer, 1-9.

Al-Koussa H, El Mais N, Maalouf H, Abi-Habib R, El-Sibai M, 2020. Arginine deprivation: a potential therapeutic for cancer cell metastasis? A review. Cancer Cell International, 20, 1, 1-7.

Avancini A, Sartori G, Gkountakos A, Casali M, Trestini I, Tregnago D, Bria E, Jones LW, Milella M, Lanza M, 2020. Physical activity and exercise in lung cancer care: will promises be fulfilled? The oncologist, 25, 3, e555.

Azizi S, Mahdavi R, Vaghef-Mehrabany E, Maleki V, Karamzad N, Ebrahimi-Mameghani M, 2020. Potential roles of Citrulline and watermelon extract on metabolic and inflammatory variables in diabetes mellitus, current evidence and future directions: a systematic review. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 47, 2, 187-98.

Bade BC, Cruz CSD, 2020. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. Clinics in Chest Medicine, 41, 1, 1-24.

Ban HS, Han T-S, Hur K, Cho H-S, 2019. Epigenetic alterations of heat shock proteins (HSPs) in cancer. International journal of molecular sciences, 20, 19, 4758.

Barzał JA, Szczylik C, Rzepecki P, Jaworska M, Anuszewska E, 2014. Plasma citrulline level as a biomarker for cancer therapy-induced small bowel mucosal damage. Acta Biochimica Polonica, 61, 4.

Board PATE, 2019. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®). In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Eds: National Cancer Institute (US), p.

Böger R, Hannemann J, 2020. Dual role of the L-arginine–ADMA–NO pathway in systemic hypoxic vasodilation and pulmonary hypoxic vasoconstriction. Pulmonary Circulation, 10, 2.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A, 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 68, 6, 394-424.

Caddeo C, Teskac K, Sinico C, Kristl J, 2008. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. Int J Pharm, 363, 1-2, 183-91.

Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018, 2018, September 12. Erişim. Erişim adresi, https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf?ua=1.

Cassim S, Chepulis L, Keenan R, Kidd J, Firth M, Lawrenson R, 2019. Patient and carer perceived barriers to early presentation and diagnosis of lung cancer: a systematic review. BMC cancer, 19, 1, 25.

Chen C, Jiang X, Zhao W, Zhang Z, 2013. Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis. Food and Chemical Toxicology, 59, 8-17.

Condelli V, Crispo F, Pietrafesa M, Lettini G, Matassa DS, Esposito F, Landriscina M, Maddalena F, 2019. HSP90 molecular chaperones, metabolic rewiring, and epigenetics: impact on tumor progression and perspective for anticancer therapy. Cells, 8, 6, 532.

Costea T, Vlad OC, Miclea L-C, Ganea C, Szöllősi J, Mocanu M-M, 2020. Alleviation of Multidrug Resistance by Flavonoid and Non-Flavonoid Compounds in Breast, Lung, Colorectal and Prostate Cancer. International Journal of Molecular Sciences, 21, 2, 401.

Damiati S, 2019. A pilot study to assess kidney functions and toxic dimethyl-arginines as risk biomarkers in women with low vitamin D levels. Journal of Medical Biochemistry, 38, 2, 145.

Das JK, Xiong X, Ren X, Yang J-M, Song J, 2019. Heat Shock Proteins in Cancer Immunotherapy. Journal of Oncology, 2019.

de Alencar VTL, Formiga MN, de Lima VCC, 2020. Inherited lung cancer: a review. ecancermedicalscience, 14.

Duan J, Zhan JC, Wang GZ, Zhao XC, Huang WD, Zhou GB, 2019. The red wine component ellagic acid induces autophagy and exhibits anti-lung cancer activity in vitro and in vivo. Journal of cellular and molecular medicine, 23, 1, 143-54.

Fahrmann JF, Vykoukal JV, Ostrin EJ, 2020. Amino acid oncometabolism and immunomodulation of the tumor microenvironment in lung cancer. Frontiers in Oncology, 10.

Fan J, Ren D, Wang J, Liu X, Zhang H, Wu M, Yang G, 2020. Bruceine D induces lung cancer cell apoptosis and autophagy via the ROS/MAPK signaling pathway in vitro and in vivo. Cell Death Dis, 11, 2, 126.

Faubert B, Solmonson A, DeBerardinis RJ, 2020. Metabolic reprogramming and cancer progression. Science, 368, 6487.

Fernandes H, Silva Teixeira C, Fernandes P, Ramos M, Cerqueira N, 2017. Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections. Expert opinion on therapeutic patents, 27, 3, 283-97.
Ferraz da Costa DC, Pereira Rangel L, Martins-Dinis MMDd, Ferretti GDdS, Ferreira VF, Silva JL, 2020. Anticancer Potential of Resveratrol, β-Lapachone and Their Analogues. Molecules, 25, 4, 893.
Frombaum M, Therond P, Djelidi R, Beaudeux JL, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D, 2011. Piceatannol is more effective than resveratrol in restoring endothelial cell dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression and activity after high-glucose oxidative stress. Free Radic Res, 45, 3, 293-302.
Gadacha W, Ben-Attia M, Bonnefont-Rousselot D, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N, Touitou Y, 2009. Resveratrol opposite effects on rat tissue lipoperoxidation: pro-oxidant during day-time and antioxidant at night. Redox Report, 14, 4, 154-8.
Gianchecchi E, Fierabracci A, 2020. Insights on the Effects of Resveratrol and Some of Its Derivatives in Cancer and Autoimmunity: A Molecule with a Dual Activity. Antioxidants, 9, 2, 91.
Grosse GM, Schwedhelm E, Worthmann H, Choe C-u, 2020. Arginine Derivatives in Cerebrovascular Diseases: Mechanisms and Clinical Implications. International Journal of Molecular Sciences, 21, 5, 1798.
Guha P, Dey A, Chatterjee A, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay S, 2010. Pro-ulcer effects of resveratrol in mice with indomethacin-induced gastric ulcers are reversed by l-arginine. British journal of pharmacology, 159, 3, 726-34.
Hajizadeh-Sharafabad F, Sahebkar A, Zabetian-Targhi F, Maleki V, 2019. The impact of resveratrol on toxicity and related complications of advanced glycation end products: A systematic review. BioFactors.
Helmi N, Choudhry H, Qari M, Kumosani TA, AL-Malki AL, Moselhy SS, Kumosani AT, 2018. Association of serum asymmetric dimethyl-arginine and troponin I levels as a risk of myocardial infarction in thalassemia. African health sciences, 18, 3, 720-6.
Huang X, Wang J, Lin W, Zhang N, Du J, Long Z, Yang Y, Zheng B, Zhong F, Wu Q, 2020. Kanglaite injection plus platinum-based chemotherapy for stage III/IV non-small cell lung cancer: A meta-analysis of 27 RCTs. Phytomedicine, 67, 153154.
Hulin J-A, Gubareva EA, Jarzebska N, Rodionov RN, Mangoni AA, Tommasi S, 2019. Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) enzymes as an emerging therapeutic strategy to target angiogenesis and vasculogenic mimicry in cancer. Frontiers in Oncology, 9.
Hulin J-A, Tommasi S, Elliot D, Hu DG, Lewis BC, Mangoni AA, 2017. MiR-193b regulates breast cancer cell migration and vasculogenic mimicry by targeting dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1. Scientific reports, 7, 1, 1-15.
Hulin JA, Gubareva EA, Jarzebska N, Rodionov RN, Mangoni AA, Tommasi S, 2019. Inhibition of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (DDAH) Enzymes as an Emerging Therapeutic Strategy to Target Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Cancer. Front Oncol, 9, 1455.
Hyun SY, Le HT, Nguyen C-T, Yong Y-S, Boo H-J, Lee HJ, Lee J-S, Min H-Y, Ann J, Chen J, 2018. Development of a novel Hsp90 inhibitor NCT-50 as a potential anticancer agent for the treatment of non-small cell lung cancer. Scientific reports, 8, 1, 13924.
Jafari A, Rezaei-Tavirani M, Farhadihosseinabadi B, Taranejoo S, Zali H, 2020. HSP90 and Co-chaperones: Impact on Tumor Progression and Prospects for Molecular Targeted Cancer Therapy. Cancer Investigation, just-accepted, 1-34.
Jego G, Hermetet F, Girodon F, Garrido C, 2020. Chaperoning STAT3/5 by Heat Shock Proteins: Interest of Their Targeting in Cancer Therapy. Cancers, 12, 1, 21.
Kabakov A, Yakimova A, Matchuk O, 2020. Molecular Chaperones in Cancer Stem Cells: Determinants of Stemness and Potential Targets for Antitumor Therapy. Cells, 9, 4, 892.
Khanmohammadi A, Aghaie A, Vahedi E, Qazvini A, Ghanei M, Afkhami A, Hajian A, Bagheri H, 2020. Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: A review. Talanta, 206, 120251.
Kim H, Seo K-H, Yokoyama W, 2020. Chemistry of pterostilbene and its metabolic effects. Journal of Agricultural and Food Chemistry.
Kim S-H, Roszik J, Grimm EA, Ekmekcioglu S, 2018. Impact of l-arginine metabolism on immune response and anticancer immunotherapy. Frontiers in oncology, 8, 67.
Kisková T, Kassayová M, 2019. Resveratrol Action on Lipid Metabolism in Cancer. International journal of molecular sciences, 20, 11, 2704.
Kunimasa K, Goto T, 2020. Immunosurveillance and Immunoediting of Lung Cancer: Current Perspectives and Challenges. International Journal of Molecular Sciences, 21, 2, 597.
Lang BJ, Guerrero-Giménez ME, Prince TL, Ackerman A, Bonorino C, Calderwood SK, 2019. Heat Shock Proteins Are Essential Components in Transformation and Tumor Progression: Cancer Cell Intrinsic Pathways and Beyond. International journal of molecular sciences, 20, 18, 4507.
Lee J, Jang H-J, Chun H, Pham T-H, Bak Y, Shin J-W, Jin H, Kim Y-I, Ryu HW, Oh SR, 2019. Calotropis gigantea extract induces apoptosis through extrinsic/intrinsic pathways and reactive oxygen species generation in A549 and NCI-H1299 non-small cell lung cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine, 19, 1, 134.

Li X, Wang D, Zhao QC, Shi T, Chen J, 2016. Resveratrol inhibited non–small cell lung cancer through inhibiting STAT-3 signaling. The American journal of the medical sciences, 352, 5, 524-30.
Lim SK, Choi H, Park MJ, Kim DI, Kim JC, Kim GY, Jeong SY, Rodionov RN, Han HJ, Yoon KC, Park SH, 2013. The ER stress-mediated decrease in DDAH1 expression is involved in formaldehyde-induced apoptosis in lung epithelial cells. Food Chem Toxicol, 62, 763-9.
Lim SM, Hong MH, Kim HR, 2020. Immunotherapy for non-small cell lung cancer: current landscape and future perspectives. Immune Network, 20, 1.
Liu L, Fu C, Yan M, Xie H, Li S, Yu Q, He S, He J, 2016. Resveratrol modulates intestinal morphology and HSP70/90, NF-kappaB and EGF expression in the jejunal mucosa of black-boned chickens on exposure to circular heat stress. Food Funct, 7, 3, 1329-38.
Liu P, Chen X, Zhu J, Li B, Chen Z, Wang G, Sun H, Xu Z, Zhao Z, Zhou C, 2019. Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Hsp90N-terminal Inhibitors Without Induction of Heat Shock Response. ChemistryOpen, 8, 3, 344-53.
Liu Y, Liu X, Li L, Dai R, Shi M, Xue H, Liu Y, Wang H, 2019. Identification and Structure-Activity Studies of 1, 3-Dibenzyl-2-aryl imidazolidines as Novel Hsp90 Inhibitors. Molecules, 24, 11, 2105.
Ma T, Liu X, Liu Z, 2015. Role of asymmetric dimethylarginine in rat acute lung injury induced by acute ischemic kidney injury. Molecular medicine reports, 12, 2, 1923-8.
Meng X, Zhou J, Zhao C-N, Gan R-Y, Li H-B, 2020. Health Benefits and Molecular Mechanisms of Resveratrol: A Narrative Review. Foods, 9, 3, 340.
Mittal S, Rajala MS, 2020. Heat shock proteins as biomarkers of lung cancer. Cancer Biology & Therapy, 1-9.
Naeli P, Yousefi F, Ghasemi Y, Savardashtaki A, Mirzaei H, 2020. The role of microRNAs in Lung Cancer: Implications for diagnosis and therapy. Current Molecular Medicine.
Nitz K, Lacy M, Atzler D, (2019). Amino acids and their metabolism in atherosclerosis, Am Heart Assoc.
Nunn AV, Guy GW, Botchway SW, Bell JD, 2020. From sunscreens to medicines: Can a dissipation hypothesis explain the beneficial aspects of many plant compounds? Phytotherapy Research.
Nwagbara UI, Ginindza TG, Hlongwana KW, 2020. Health systems influence on the pathways of care for lung cancer in low-and middle-income countries: a scoping review. Globalization and health, 16, 1, 1-11.
Observatory GC, 2019, March. All cancers.
Estimated number of new cases in 2018, worldwide, both sexes, all ages, 2019, March. Erişim. Erişim adresi, https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=.
Ojha R, Huang H-L, HuangFu W-C, Wu Y-W, Nepali K, Lai M-J, Su C-J, Sung T-Y, Chen Y-L, Pan S-L, 2018. 1-Aroylindoline-hydroxamic acids as anticancer agents, inhibitors of HSP90 and HDAC. European journal of medicinal chemistry, 150, 667-77.
Oliva-Damaso E, Oliva-Damaso N, Rodriguez-Esparragon F, Payan J, Baamonde-Laborda E, Gonzalez-Cabrera F, Santana-Estupiñan R, Rodriguez-Perez JC, 2019. Asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginines in chronic kidney disease: a clinical approach. International journal of molecular sciences, 20, 15, 3668.
Organization WH, 2002. National cancer control programmes: policies and managerial guidelines, World Health Organization, p.
Organization WH, 2018. WHO guidelines for the pharmacological and radiotherapeutic management of cancer pain in adults and adolescents.
Cancer, 2020. Erişim. Erişim adresi, https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
Organization WH, 2020. Cancer Country Profile 2020.
Pan J, Jiang F, Zhou J, Wu D, Sheng Z, Li M, 2018. Hsp90: a novel target gene of miRNA-628-3p in A549 cells. BioMed research international, 2018.
Park S, Lim JM, Chun JN, Lee S, Kim TM, Kim DW, Kim SY, Bae DJ, Bae SM, So I, 2020. Altered expression of fucosylation pathway genes is associated with poor prognosis and tumor metastasis in non-small cell lung cancer. International journal of oncology, 56, 2, 559-67.
Peltz L, Gomez J, Marquez M, Alencastro F, Atashpanjeh N, Quang T, Bach T, Zhao Y, 2012. Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development. PLoS One, 7, 5, e37162.
Piñeros M, Frech S, Frazier L, Laversanne M, Barnoya J, Garrido C, Gharzouzi E, Chacón A, Fuentes Alabi S, Ruiz de Campos L, 2017. Advancing reliable data for cancer control in the Central America Four region. Journal of global oncology, 4, 1-11.
Piñeros M, Znaor A, Mery L, Bray F, 2017. A global cancer surveillance framework within noncommunicable disease surveillance: making the case for population-based cancer registries. Epidemiologic reviews, 39, 1, 161-9.

Posadino AM, Giordo R, Cossu A, Nasrallah GK, Shaito A, Abou-Saleh H, Eid AH, Pintus G, 2019. Flavin oxidase-induced ROS generation modulates PKC biphasic effect of resveratrol on endothelial cell survival. Biomolecules, 9, 6, 209.
Qi G, Li L, 2020. Long non-coding RNA PVT1 contributes to cell growth and metastasis in non-small-cell lung cancer by regulating miR-361-3p/SOX9 axis and activating Wnt/β-catenin signaling pathway. Biomedicine & Pharmacotherapy, 126, 110100.
Rasheduzzaman M, Jeong J-K, Park S-Y, 2018. Resveratrol sensitizes lung cancer cell to TRAIL by p53 independent and suppression of Akt/NF-κB signaling. Life sciences, 208, 208-20.
Repossi G, Das UN, Eynard AR, 2020. Molecular Basis of the Beneficial Actions of Resveratrol. Archives of Medical Research.
Rodriguez-Enriquez S, Pacheco-Velazquez SC, Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Robledo-Cadena DX, Hernandez-Resendiz I, Garcia-Garcia JD, Belmont-Diaz J, Lopez-Marure R, Hernandez-Esquivel L, Sanchez-Thomas R, Moreno-Sanchez R, 2019. Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol, 370, 65-77.
Saab S, Zalzale H, Rahal Z, Khalifeh Y, Sinjab A, Kadara H, 2020. Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment. Frontiers in immunology, 11.
Saadaoui I, Rasheed R, Abdulrahman N, Bounnit T, Cherif M, Al Jabri H, Mraiche F, 2020. Algae-Derived Bioactive Compounds with Anti-Lung Cancer Potential. Marine Drugs, 18, 4, 197.
Shaito A, Posadino AM, Younes N, Hasan H, Halabi S, Alhababi D, Al-Mohannadi A, Abdel-Rahman WM, Eid AH, Nasrallah GK, 2020. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. International Journal of Molecular Sciences, 21, 6, 2084.
Spiegelberg D, Abramenkovs A, Mortensen ACL, Lundsten S, Nestor M, Stenerlöw B, 2020. The HSP90 inhibitor Onalespib exerts synergistic anti-cancer effects when combined with radiotherapy: an in vitro and in vivo approach. Scientific reports, 10, 1, 1-11.
Sticozzi C, Belmonte G, Cervellati F, Muresan XM, Pessina F, Lim Y, Forman H, Valacchi G, 2014. Resveratrol protects SR-B1 levels in keratinocytes exposed to cigarette smoke. Free Radical Biology and Medicine, 69, 50-7.
Sun Y, Li M, Liu G, Zhang X, Zhi L, Zhao J, Wang G, 2020. The function of Piezo1 in colon cancer metastasis and its potential regulatory mechanism. J Cancer Res Clin Oncol, 146, 5, 1139-52.
Sun Z, Zheng W, Teng J, Fang Z, Lin C, 2020. Resveratrol Reduces Kidney Injury in a Rat Model of Uremia and is Associated with Increased Expression of Heat Shock Protein 70 (Hsp70). Med Sci Monit, 26, e919086.
Tabatabaie M, Abdollahi S, Salehi-Abargouei A, Clark CCT, Karimi-Nazari E, Fallahzadeh H, Rahmanian M, Mozaffari-Khosravi H, 2020. The effect of resveratrol supplementation on serum levels of asymmetric de-methyl-arginine and paraoxonase 1 activity in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind controlled trial. Phytother Res.
Tan AC, 2020. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). Thorac Cancer, 11, 3, 511-8.
Trittmann JK, Almazroue H, Jin Y, Nelin LD, 2019. DDAH1 regulates apoptosis and angiogenesis in human fetal pulmonary microvascular endothelial cells. Physiological Reports, 7, 12, e14150.
Tsikas D, Bollenbach A, Hanff E, Kayacelebi AA, 2018. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and homoarginine (hArg): the ADMA, SDMA and hArg paradoxes. Cardiovascular diabetology, 17, 1, 1.
Cancer cells, 2017. Erişim. Erişim adresi, https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/cancer-cells.
van Delft F, Koffijberg H, Retèl V, Heuvel Mvd, IJzerman M, 2020. The Validity and Predictive Value of Blood-Based Biomarkers in Prediction of Response in the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review. Cancers, 12, 5, 1120.
Wang H, Guo Y, Liu L, Guan L, Wang T, Zhang L, Wang Y, Cao J, Ding W, Zhang F, Lu Z, 2016. DDAH1 plays dual roles in PM2.5 induced cell death in A549 cells. Biochim Biophys Acta, 1860, 12, 2793-801.
Wang K, Gong Q, Zhan Y, Chen B, Yin T, Lu Y, Zhang Y, Wang H, Ke J, Du B, 2020. Blockage of autophagic flux and induction of mitochondria fragmentation by Paroxetine hydrochloride in lung cancer cells promotes apoptosis via the ROS-MAPK pathway. Frontiers in cell and developmental biology, 7, 397.
Wang L, Fan Y, Mei H, Liu Y, Zhang L, Xu J, Huang X, 2019. Novel Hsp90 Inhibitor C086 Potently Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Cells As A Single Agent Or In Combination With Gefitinib. Cancer Manag Res, 11, 8937-45.
Wang L, Qu J, Liang Y, Zhao D, Rehman FU, Qin K, Zhang X, 2020. Identification and validation of key genes with prognostic value in non-small-cell lung cancer via integrated bioinformatics analysis. Thoracic Cancer, 11, 4, 851-66.
Wang X-J, Chen J-Y, Fu L-Q, Yan M-J, 2020. Recent advances in natural therapeutic approaches for the treatment of cancer. Journal of Chemotherapy, 1-13.

Wang X, Wang D, Zhao Y, 2015. Effect and mechanism of resveratrol on the apoptosis of lung adenocarcinoma cell line A549. Cell biochemistry and biophysics, 73, 2, 527-31.
Wang XJ, Chen JY, Fu LQ, Yan MJ, 2020. Recent advances in natural therapeutic approaches for the treatment of cancer. J Chemother, 1-13.
White V, Bergin RJ, Thomas RJ, Whitfield K, Weller D, 2020. The pathway to diagnosis and treatment for surgically managed lung cancer patients. Fam Pract, 37, 2, 234-41.
Wu G, Yan Y, Zhou Y, Duan Y, Zeng S, Wang X, Lin W, Ou C, Zhou J, Xu Z, 2020. Sulforaphane: Expected to Become a Novel Anti-tumor Compound. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics.
Wu Y, Lin L, Wang X, Li Y, Liu Z, Ye W, Huang W, Lin G, Liu H, Zhang J, 2019. Overexpression of Krüppel-like Factor 4 Suppresses Migration and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer. Frontiers in Pharmacology, 10, 1512.
Yang Y, Zhang G, Li C, Wang S, Zhu M, Wang J, Yue H, Ma X, Zhen Y, Shu X, 2019. Metabolic profile and structure–activity relationship of resveratrol and its analogs in human bladder cancer cells. Cancer management and research, 11, 4631.
Yin C, Lin X, Wang Y, Liu X, Xiao Y, Liu J, Snijders AM, Wei G, Mao J-H, Zhang P, 2020. FAM83D promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and cisplatin resistance through regulating the AKT/mTOR pathway in non-small-cell lung cancer. Cellular Oncology, 1-13.
Yousef M, Vlachogiannis I, Tsiani E, 2017. Effects of resveratrol against lung cancer: in vitro and in vivo studies. Nutrients, 9, 11, 1231.
Yuan Q, Peng J, Liu SY, Wang CJ, Xiang DX, Xiong XM, Hu CP, Li YJ, 2010. Inhibitory effect of resveratrol derivative BTM-0512 on high glucose-induced cell senescence involves dimethylaminohydrolase/asymmetric dimethylarginine pathway. Clin Exp Pharmacol Physiol, 37, 5-6, 630-5.
Yuzhalin AE, 2019. Citrullination in cancer. Cancer research, 79, 7, 1274-84.
Zanoaga O, Braicu C, Jurj A, Rusu A, Buiga R, Berindan-Neagoe I, 2019. Progress in Research on the Role of Flavonoids in Lung Cancer. International journal of molecular sciences, 20, 17, 4291.
Zhao Y, Shao Q, Zhu H, Xu H, Long W, Yu B, Zhou L, Xu H, Wu Y, Su Z, 2018. Resveratrol ameliorates Lewis lung carcinoma-bearing mice development, decreases granulocytic myeloid-derived suppressor cell accumulation and impairs its suppressive ability. Cancer science, 109, 9, 2677-86.
Zhou K, Zhao S, Guo W, Ding L, 2020. Efficacy and safety of erlotinib combined with bevacizumab in the treatment of non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. Medicine, 99, 3, e18771.

7. EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 29/01/2019-E.10603

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 42933958-100/
Konu : FATMA AKAT HK

Sayın Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

Enstitü Yönetim Kurulumuzun 24.01.2019 tarih ve 4/19 Sayılı Kararı yazımız ekinde gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YORULMAZ
Enstitü Müdür Yardımcısı

Ek : 1 SAYFA
Dağıtım:
Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğüne
Sayın Doç. Dr. Hüsamettin Vatansev
(Sbe)Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Başkanlığına

Evrakı Doğrulamak için : http://193.255.244.181/enVision-Sorgula/Validate_Doc.aspx?V=BEAC5JZUB
T.C. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Alaeddin Keykubad Yerleşkesi Yeni İstanbul Caddesi
No:335 Selçuklu-KONYA
Bilgi için: Ümmüye ÖZTÜRK Faks:3322410551
e-Posta :sagbil@selcuk.edu.tr Elektronik Ağ :www.selcuk.edu.tr selcukuniversitesi@hs01.kep.tr
Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kimlik bilgileri

Adı Soyadı : Fatma Akat
Doğum Tarihi : 01.07.1994
Doğum Yeri : Konya
Medeni Hali : Bekar
Öğrenim durumu :Yüksek Lisans
E-posta : fatmakat94@gmail.com
Adres : Karahüyük Mah. Tarlabaşı Sok No:11/4 Meram/Konya
Telefon : 05412579013

Eğitim

- Lise:

Muhittin Güzelkılınç Anodolu Lisesi (2007 -2011)

- Lisans:

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu – Hemşirelik Bölümü (2011-2015) (3,09/4)-(76,80/100)

- Yüksek Lisans:

Selçuk Üniversitesi Tıbbi Biyokimya ABD (2017-2020) (81,41/100)

Yabancı Dil

İngilizce

İş/Staj Deneyimleri

1. Meram Tıp Fakültesi – 2012
Staj: Hemşirelik Esas ve Araştırmaları
2. Meram Tıp Fakültesi – 2013
Staj: İç Hastalıkları Hemşireliği
Cerrahi hastalıkları hemşireliği
3. Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi – 2014
Staj: Doğum ve Kadın Sağlığı Hemşireliği
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği

- **İşe Başlama-Sonlandırma Tarihi:** 15.09.2015- 30.9.2018
- Özel Emre Sağlık Kabini -Fatma AKAT

Adres: Turgut Reis Mah. Dr. Ahmet Özcan Cad. No: 182/ D

Katıldığı Eğitim ve Seminerler

- "Obezite ve Aşırı Tuz Tüketimi" - 14.03.2013 - (Karaman Devlet Hastanesi)

- ”Hemşirelikte Geçmişten Geleceğe” - 26.03.2013 – (KMÜ)
- ”Sterilizasyon Süreçleri ve Ameliyathanede Pozitif Ortamın Geliştirilmesi” - 27.03.2013 (KMÜ)
- “Transgenik ve Klan Hayvan Üretim Teknikleri ve Kullanım Alanları” - 04.04.2013 (KMÜ)
- “Bağımlılık Paneli” - 02.05.2013 (KMÜ)
- “ Hastane İnfeksiyonları” - 26-27.12.2013 (KMÜ)
- “Sertifikalı Eğitim Programı (Diksiyon, Etkili İletişim, Profesyonel Yönetici Asistanlığı)- 20-21.12.2014
- “ II. Ulusal Farmakovijilans Kongresi” - 5-6.11.2015 (Türk Hemşireleri Derneği)
- “ Osteoartrit / Artroplasti ve Hemşirelik Yaklaşımı - 07.06.2016 (Türk Hemşireleri Derneği)
- “ Geriatri Hemşireliği Kursu” - 09.06.2016 (Hacettepe Üniversitesi)
- “ Sertifikalı Eğitim Programı “PRP-CGF Uygulamaları” – 24.11.2018

Yayınlar

- A Potential Biomarker MicroRNAs in the Diagnosis of Some Psyhiatric and Neurodegenerative Disorders (Yayın aşamasında)

- Dracaena Cinnabari Reçinesi Ve Tıbbi Olarak Kullanımı (Yayın aşamasında)