

**MEME KANSERİNDE OLEUROPEİN MADDESİNİN
OKSİDATİF STRESTEKİ ROLÜ**

Yüksek Lisans Tezi

Gamze YILMAZ

Eskişehir 2022

**MEME KANSERİNDE OLEUROPEİN MADDESİNİN OKSİDATİF
STRESTEKİ ROLÜ**

Gamze YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

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

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2010S105 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gamze Yılmaz'ın "Meme Kanserinde Oleuropein Maddesinin Oksidatif Stresteki Rolü" başlıklı tezi 24/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	:Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR
Üye	:Prof. Dr. Güngör KANBAK
Üye	:Prof. Dr. Zerrin SELLER

.....
Prof. Dr. Gülşen Akalın ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

MEME KANSERİNDE OLEUROPEİN MADDESİNİN OKSİDATİF STRESTEKİ ROLÜ

Gamze YILMAZ

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Meme kanseri diğer kanser türlerine göre kadınlar arasında en fazla teşhis edilen kanserdir. Paklitaksel (PTX) taksan sınıfına ait meme kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri gibi birçok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılan etkili bir kemoterapötik ajandır. Oleuropein (OLE) antikanser, antioksidan, antidiyabetik, kardiyoprotektif, nöroprotektif etkiler gösteren doğal bir polifenoldür. Bu tez çalışması kapsamında, OLE ve PTX kombinasyonlarının MCF-7 hücre hattında oksidatif strese olan etkileri incelenmiştir. MCF-7 hücre hattında OLE ve PTX'in sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla xCELLigence RTCA yöntemi kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattında OLE ve PTX'in IC₅₀ değeri sırayla 230 µM ve 7,5 µM olarak hesaplanmıştır. Oksidatif stresin belirlenmesi için Total Oksidan (TOS) ve Total Antioksidan (TAS) durumları ölçülerek Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplanmıştır. OLE ve PTX kombinasyonlarının daha düşük konsantrasyonlarda MCF-7 hücre hattının proliferasyonunu sinerjik etkili olarak inhibe ettiği ve TAS seviyesini arttırdığı saptanmıştır. Oksidatif stres belirteçleri olan süperoksit dismutaz (SOD), redükte glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülmüştür. Tek başına OLE ve PTX uygulamasına göre kombinasyon gruplarındaki SOD ve MDA seviyesinin arttığı GSH seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: MCF-7, Oksidatif stres, Oleuropein, Paklitaksel

ABSTRACT

THE ROLE OF OLEUROPEIN IN OXIDATIVE STRESS IN BREAST CANCER

Gamze YILMAZ

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Breast cancer is the most diagnosed cancer among women compared to other cancer types. Paclitaxel (PTX) is an effective chemotherapeutic agent that belongs to taxane class and is widely used in the treatment of many cancers such as breast cancer, ovarian cancer, lung cancer. Oleuropein (OLE) is a natural polyphenol with anticancer, antioxidant, antidiabetic, cardioprotective and neuroprotective effects. Within the scope of this thesis study, the effects of OLE and PTX combinations on oxidative stress of MCF-7 cell line were investigated. The xCELLigence RTCA method was used to determine the cytotoxic effects of OLE and PTX in the MCF-7 cell line. The IC₅₀ values of OLE and PTX in the MCF-7 cell line were calculated as 230 µM and 7.5 µM, respectively. In order to determine oxidative stress, Oxidative Stress Index (OSI) was calculated by measuring Total Oxidant (TOS) and Total Antioxidant (TAS) states. It was determined that the combinations of OLE and PTX synergistically inhibited the proliferation of the MCF-7 cell line and increased the TAS level treating with lower concentrations. The levels of superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA), which are oxidative stress markers, were also measured after treatment of cells with PTX, OLE and combination. It was observed that the SOD and MDA levels increased in the combination groups compared to the OLE and PTX application alone, on the other had the level of GSH decreased.

Keywords: MCF-7, Oxidative stress, Oleuropein, Paclitaxel

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile en iyi şekilde yetişmemi sağlayan bana bilimi sevdiren, güleryüzü ve hoşgörüsüyle beni cesaretlendiren, her zaman desteğini hissettiğim iyi ki danışmanım olan sevgili hocam Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR'e

Bilgi ve tecrübesiyle hem ders dönemim hem de tez çalışmalarım boyunca yardımcı olan sevgili hocam Prof. Dr. Zerrin SELLER'e

Laboratuvar çalışmalarımda bana destek olan her türlü soruma sabırla cevap veren bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Elif APAYDIN'a

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum güler yüzlü hocalarım Dr. Seda Mehtap SARI KILIÇASLAN, Dr. Yüksel Öğünç KEÇECİ, arkadaşlarım Tayyar Görkem SAYER ve Burcu AKYILDIZ'a

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan babam Turgut YILMAZ'a, annem Emine Yılmaz'a, her zaman en büyük destekçilerim olan kardeşlerim Şeyma YILMAZ, Elif YILMAZ ve Gökhan YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.1.1. Kanser epidemiyolojisi.....	1
1.2. Meme Kanseri	3
1.2.1. Meme kanseri insidansı	4
1.2.2. Meme kanseri risk faktörleri	4
1.2.3. Erkeklerde meme kanseri.....	5
1.2.4. MCF-7 meme kanseri hücre hattı.....	6
1.3. Serbest Radikaller	6

1.3.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	7
1.3.1.1. ROS'un kanser hücrelerindeki rolü	8
1.4. Oksidatif Stres.....	9
1.5. Lipid Peroksidasyonu.....	9
1.6. Antioksidanlar	10
1.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	12
1.6.2. Katalaz (CAT)	13
1.6.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)	14
1.7. Apoptoz.....	15
1.8. Oleuropein.....	16
1.8.1. Oleuropein kimyası	17
1.8.2. Oleuropein biyosentezi.....	17
1.8.3. Oleuropein'in antioksidan ve antikanser etkisi.....	19
1.9. Paklitaksel	19
1.9.1. Paklitaksel etki mekanizması.....	20
2. MATERYAL YÖNTEM	22
2.1. Materyaller	22
2.1.1. Kullanılan hücre hatları	22
2.1.2. Kullanılan bilgisayar programları.....	22
2.1.3. Kullanılan ekipmanlar	22
2.1.4. Kullanılan kimyasallar	23

2.1.5. Kullanılan ticari kitler	23
2.2. Yöntemler	23
2.2.1. Hücre kültürü uygulamaları	23
2.2.1.1. Hücrelerin stoklanması.....	23
2.2.1.2. Hücrelerin stoktan çıkarılması.....	24
2.2.1.3. Hücre hatlarının pasajlanması.....	24
2.2.2. Etken madde dozlarının hazırlanması	25
2.2.2.1. Oleuropein.....	25
2.2.2.2. Paklitaksel	25
2.2.3. Sitotoksikite testleri	25
2.2.3.1. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile Paklitaksel ve Oleuropein sitotoksik etkisinin belirlenmesi..	25
2.2.3.1.1. Yöntemin uygulanması	26
2.2.3.2. İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi	26
2.2.3.3. Kombinasyon dozları ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	27
2.2.3.4. Kombinasyon indeksinin (CI) belirlenmesi	27
2.2.4. TAS/TOS, SOD, GSH ve MDA yöntemleri için hücre lizatlarının hazırlanması.....	27
2.2.5. Hücrelerdeki oksidatif denge durumunun belirlenmesi.....	28
2.2.5.1. Total Oksidan Durum (TOS) yöntemi.....	28
2.2.5.1.1. Yöntemin uygulanması	28
2.2.5.2. Total Antioksidan Durum (TAS) yöntemi	29

2.2.5.2.1. Yöntemin uygulanması	29
2.2.5.3. Oksidatif stres indeksinin (OSI) belirlenmesi.....	29
2.2.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) ölçümü.....	30
2.2.6.1. Yöntemin uygulanması	30
2.2.7. Redükte Glutatyon (GSH) ölçümü	30
2.2.7.1. Yöntemin uygulanması	31
2.2.8. Malondialdehit (MDA) ölçümü.....	31
2.2.8.1. Yöntemin uygulanması	31
2.2.9. Akridin Oranj (AO) ve Ethidium Bromid (EB) boyama ile hücre ölüm şeklinin belirlenmesi.....	32
2.2.9.1. Yöntemin uygulanması	33
2.2.10. İstatistiksel analiz.....	33
3. BULGULAR.....	34
3.1. Sitotoksisite Bulguları	34
3.1.1. RTCA bulguları.....	34
3.1.1.1. RTCA sistemi ile Oleuropein'in sitotoksik etkisinin belirlenmesi	34
3.1.1.2. RTCA ile Paklitaksel'in sitotoksik etkisinin belirlenmesi	35
3.1.2. Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattında sitotoksik etkilerinin bulguları.....	37
3.1.3. Kombinasyon indeksinin (CI) belirlenmesi	39
3.2. Hücrelerin Oksidatif Denge Durumları	40

3.2.1. TOS ve TAS bulguları	40
3.2.2. OSI değerlerinin hesaplanması	41
3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Bulguları	42
3.4. Redükte Glutasyon (GSH) Bulguları	44
3.5. Malondialdehit (MDA) Bulguları.....	46
3.6. OLE ve PTX Kombinasyonlarının Hücre Morfolojisine Etkisi.....	48
3.7. Akridin Oranj (AO) ve Ethidium Bromid (EB) Boyama Bulguları	51
4. TARTIŞMA.....	53
KAYNAKÇA	60
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	7
Tablo 1.2. Endojen antioksidanlar	11
Tablo 1.3. Eksojen antioksidanlar	11
Tablo 2.1. Kullanılan bilgisayar programları.....	22
Tablo 2.2. Kullanılan ekipmanlar.....	22
Tablo 2.3. Kullanılan kimyasallar	23
Tablo 2.4. Kullanılan ticari kitler	23
Tablo 3.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattının farklı Oleuropein konsantrasyonları ile 24 saatlik muamelesi sonucunda RTCA yöntemi ile ölçülen antiproliferasyon oranları.....	34
Tablo 3.2. MCF-7 meme kanseri hücre hattının farklı Paklitaksel konsantrasyonları ile 24 saatlik muamelesi sonucunda RTCA yöntemi ile ölçülen antiproliferasyon oranları	36
Tablo 3.3. Paklitaksel ve Oleuropein IC ₅₀ dozlarının farklı yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyon dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonunda hesaplanan inhibisyon oranları	38
Tablo 3.4. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki sitotoksosite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri (CI)	39
Tablo 3.5. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki total oksidan (TOS) ve antioksidan (TAS) duruma etkileri	41

Tablo 3.6. TOS ve TAS değerleri kullanılarak hesaplanan oksitatif stres indeksi (OSI) değerleri	41
Tablo 3.7. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki SOD aktivasyon sonuçları	43
Tablo 3.8. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki GSH aktivasyon sonuçları	45
Tablo 3.9. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki MDA aktivasyon sonuçları	47
Tablo 3.10. Oleuropein ve Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile muamelesi sonucunda oluşan canlı ve apoptotik hücre yüzdeleri.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Dünya genelinde kadınlar ve erkeklerde ki kanser görülme ve ölüm oranları	2
Şekil 1.2. Dünya genelinde kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranları	3
Şekil 1.3. MCF-7 meme kanseri hücre hattı.....	6
Şekil 1.4. Normal ve kanserli hücrelerdeki ROS düzeyleri.....	8
Şekil 1.5. Süperoksit anyonu varlığı ile lipid peroksidasyon oluşumu	10
Şekil 1.6. Antioksidan savunma mekanizması	12
Şekil 1.7. Apoptoz mekanizmasının teşvik edilmesinde TNF ve ROS arasındaki etkileşim	15
Şekil 1.8. Oleuropein'in kimyasal yapısı.....	17
Şekil 1.9. Oleacea'da ki Oleuropein biyosentezi.....	18
Şekil 1.10. Paklitaksel'in kimyasal yapısı	21
Şekil 3.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattının 24 saat boyunca farklı Oleuropein konsantrasyon aralıkları ile muamelesinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen hücre indeksi grafiği	35
Şekil 3.2. MCF-7 meme kanseri hücre hattının 24 saat boyunca farklı Paklitaksel konsantrasyon aralıkları ile muamelesinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen hücre indeksi grafiği	36
Şekil 3.3. Paklitaksel ve Oleuropein IC ₅₀ dozlarının farklı yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyon dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonucunda RTCA sistemi ile elde edilen hücre indeksi grafiği	37

Şekil 3.4. Paklitaksel ve Oleuropein IC ₅₀ dozlarının farklı yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyon dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonunda hesaplanan inhibisyon oranlarının grafiksel gösterimi.....	38
Şekil 3.5. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının sitotoksitesite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri.....	39
Şekil 3.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) standart grafiği.....	43
Şekil 3.7. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki SOD aktivasyon sonuçları	44
Şekil 3.8. Redükte Glutatyon (GSH) Standart Grafiği	45
Şekil 3.9. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki GSH aktivasyon sonuçları	46
Şekil 3.10. Malondialdehit (MDA) Standart Grafiği.....	47
Şekil 3.11. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki MDA aktivasyon sonuçları.....	48
Şekil 3.12. Farklı büyütme oranlarında Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine morfolojik etkileri	49
Şekil 3.13. Farklı büyütme oranlarında (200 µm, 100 µm, 50 µm) Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine morfolojik etkisi.....	50
Şekil 3.14. Oleuropein, Paklitaksel IC ₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile muamelesinin AO/EB boyama sonuçları	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
AO	: Akridin oranj
ATP	: Adenozin trifosfat
CAT	: Katalaz
CI	: Kombinasyon indeksi
Cu	: Bakır
DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
EB	: Ethidium bromid
ER	: Östrojen reseptörü
ER α	: Östrojen reseptörü α
ER β	: Östrojen reseptörü β
FBS	: Fetal sığır serumu
FDA	: Gıda ve ilaç dairesi
Fe	: Demir
GLUT1	: Glikoz taşıyıcı 1
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü 2
HIF1 α	: Hipoksi ile indüklenen faktör 1 α
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
kDa	: Kilodalton
MCF-7	: Meme kanseri hücre hattı
MDA	: Malondialdehit
Mn	: Manganez
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NOX	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz
OLE	: Oleuropein
OSI	: Oksidatif stres indeksi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PR	: Progesteron reseptörü
PTX	: Paklitaksel
RCS	: Reaktif klorür türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RSS	: Reaktif kükürt türleri
RTCA	: xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Sec	: Selenosistein
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAS	: Total antioksidan durum
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TNB	: 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
TNF	: Tümör nekroz faktör
TOS	: Total oksidan durum
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
Zn	: Çinko

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en fazla ölüm oranına sahip olan hastalıktır, karışık yapısı ve görülme sıklığı ile günümüzde büyük bir sorun oluşturmaktadır (Futreal vd., 2001).

Vücuttaki normal hücrelerde meydana gelen anormal bozukluklar sonucunda normal hücrelerin farklılaşmasıyla yeni özellikler kazanarak oluşan hücrelere kanser hücresi denir. Bu farklılaşma mekanizması onkogenez ya da karsinogenez olarak adlandırılır. Normal hücrelerden farklılaşarak oluşan kanser hücreleri diğer doku ve organlara yayılma özelliğindedir ve bu yayılma özelliği metastaz olarak adlandırılır. Metastaz yeteneği kazanmış kanser hücreleri çevre dokulara yayılarak etki alanını genişletebilir (Mierke, 2019).

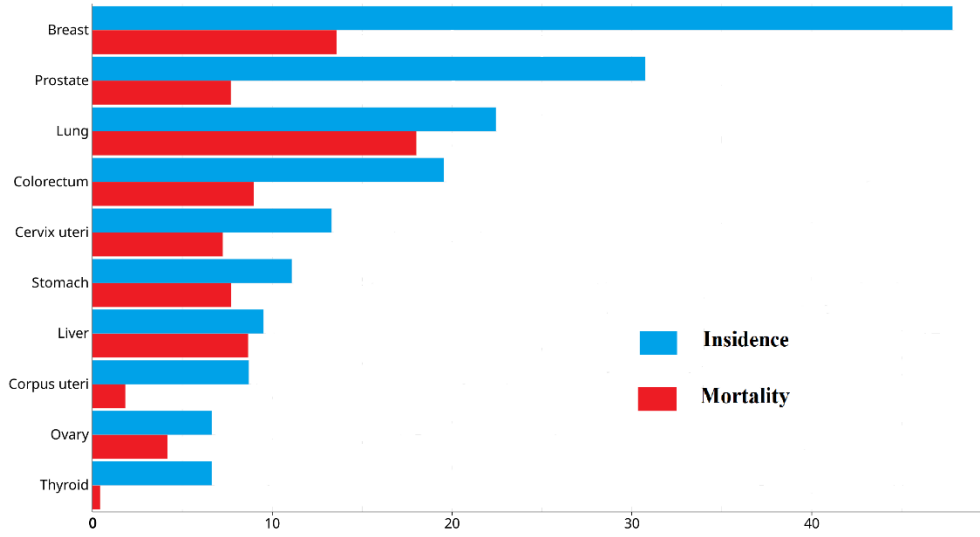
Kanser oluşum mekanizması başlama, ilerleme, anjiyogenez ve metastaz olarak sınıflandırılan oldukça karmaşık bir süreçtir (Nguyen, Goel ve Chung, 2020; Peters ve Gonzalez, 2018). Genel olarak deoksiribo nükleik asit (DNA) dizisinde meydana gelen anormal durumlar kanser oluşumunu tetiklemektedir. Ayrıca çeşitli virüsler de kanser oluşumuna etki edebilir. Bunun dışında radyasyon, beslenme, maruz kalınan kimyasallar da kanser oluşumunda etkili olmaktadır (Williams, 2001).

Kanser için tanımlanmış ayırt edici özellikler bulunmaktadır. Bunlar; proliferatif sinyallemeyi sürdürmek, apoptoz gibi hücre ölüm mekanizmalarına direnmek, damar sistemleri geliştirerek yayılmayı arttırmak, hücre metabolizmayı yeniden düzenlemek ve bağışıklık sistemlerinden kaçış olarak tanımlanabilir (Hanahan, 2022).

1.1.1. Kanser epidemiyolojisi

Kanser sebepli ölümler 1991-2017 arasında akciğer, kolorektal, meme ve prostat kanserindeki azalan ivmeye bağlı olarak düşüş göstermiştir, ancak son on yılda meme kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanseri oranlarında belirgin bir artış görülmektedir. Bu artış 2008-2017 arasında ölüm oranlarının da artmasına sebep olmuştur. Bu yıllar arasında en fazla ölüm akciğer kanseri sebebiyle yaşanmıştır (Siegel, Miller ve Jemal, 2020). 2004'ten sonra meme kanserinde yıllık yaklaşık olarak % 0,3 oranında bir artış olmuştur. Bu artışın sebebinin sağlıksız beslenme sonucu artan obezite ve doğurganlık oranında ki düşüşlerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Pfeiffer vd., 2018; Lortet-Tieulent vd., 2018).

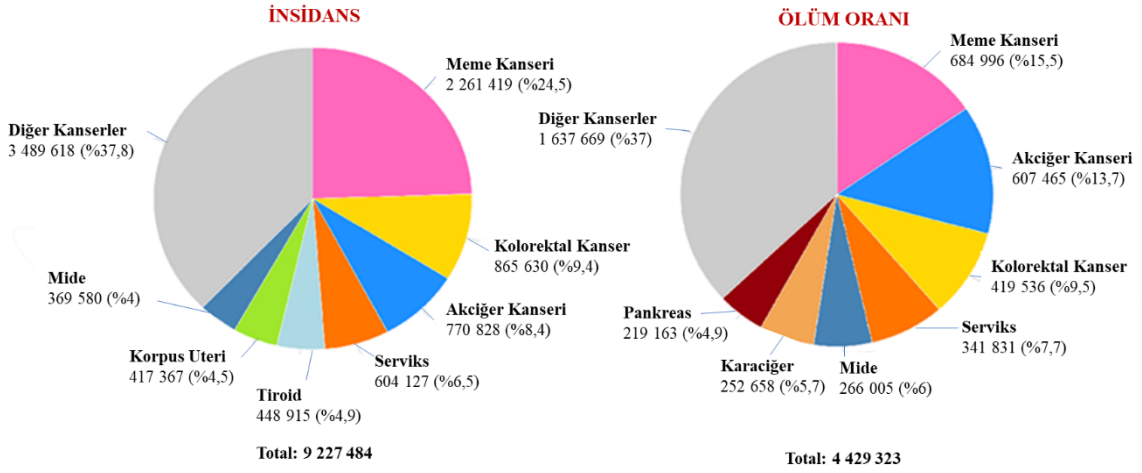
Kanser tüm dünyanın paylaştığı önemli bir sorundur (Şekil 1.1). Yapılan çalışmalara göre, 2040 yılında 2020'ye göre %47 oranında bir artış görüleceği ve bu artışa bağlı olarak 28.4 milyon kanser vakası olacağı tahmin edilmektedir. Artan yaşlı nüfusu ve ülkelerin gelişmişlik düzeyleri kanser insidansı ve mortalitesinde ki artış ile ilişkilidir. Gelişmişlik düzeyi düşük ülkelerde kanser vakaları ve kansere bağlı ölümler gelişmiş ülkelere göre daha yüksektir (Donepudi vd., 2014). Gelişmiş sağlık sistemleri, sağlık sistemlerine erişim ve erken teşhis imkanları hem kanser tespiti için hem de tedavi aşamasında çok önemli bir yere sahiptir.



Şekil 1.1. Dünya genelinde kadınlar ve erkeklerde ki kanser görülme ve ölüm oranları (<http-1>)

1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, yıkıcı etkileri ve görülme sıklığı göz önüne alındığında kadınlarda teşhis edilen en yaygın kanser türüdür. Meme kanseri kadınlar da görülen tüm kanserlerin yaklaşık %24,5'lik kısmını oluşturmaktadır ayrıca kanser sonucu ölümlerin %15,5'lik kısmı meme kanseri kaynaklıdır (Ferlay vd., 2019; Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Dünya genelinde kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranları (<http-2>)

Meme kanserinin gelişim bölgesi oldukça karmaşıktır. Bulunduğu yerde yayılım göstermeyen iyi huylu hücreler ve kötü huylu hücre tipine mekanik destek sağlayan bir hücre dışı matriks bulunur. Kanserli hücrenin bulunduğu bölge kanserin gelişim ve ilerlemesine yardım eder. Meme dokusu bağ, lenf, yağ dokusu ve süt üretiminde görevli lobüller ve lobüllerin meme ucuna bağlanmasını sağlayan kanallardan oluşmaktadır. Meme kanseri genellikle lobüllerde oluşan düzensiz hücre büyümesi ile ortaya çıkmaktadır (Winters vd., 2017). Teşhisi yapılan meme kanserlerinin yaklaşık dörtte üçünde memede kitle tespit edilmektedir. Ancak tespit edilen kitlelerin hepsi kötü huylu tümörler değildir. İyi huylu ve kötü huylu kitleler birbirine benzeyen fiziksel özelliklere sahiptir. Meme kanseri görülme sıklığı çok yüksek olmasına rağmen erken meme kanseri olarak adlandırılan yani sadece memede bulunan ya da sadece koltuk altı lenf düğümlerine yayılmış olan hastalık grubu ve metastatik olmayan hasta gruplarının yaklaşık olarak %70-80'i tedavi edilebilir durumdadır (Harbeck vd., 2019). Bu nedenle teşhis aşaması çok önemlidir.

1.2.1. Meme kanseri insidansı

Meme kanseri tüm dünyayı ilgilendiren bir sağlık sorunu haline gelmiştir. İlerlemiş meme kanseri kapsamlı ve pahalı tedavi gereksinimine sahiptir bu da ekonomik yük oluşmasına neden olmaktadır. Meme kanseri artış oranları dünyanın her bölgesinde aynı değildir. Daha yüksek gelişmişlik düzeyine sahip ülkelerde gelişmişlik düzeyi düşük ülkelere göre meme kanseri artış hızı daha yüksektir (Torre vd., 2016; Ginsburg vd., 2017). Artış hızı yüksek olsa bile, meme kanserine bağlı ölümler gelişmişlik düzeyi yüksek ülkelerde daha düşüktür. Sağlık sistemlerinin gelişmişliği ve ulaşılabilir olması kanserin daha erken aşamalarda teşhis edilebilmesine olanak sağlamakta ve gelişmişlik düzeyi yüksek ülkelerdeki ölüm oranları ile doğrudan ilişkilidir. Meme kanseri ölüm oranları, gelişen tarama teşhis imkanları ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine bağlı olarak düşüş göstermektedir, ancak insidans oranlarına göre hala en fazla teşhis edilen hastalık durumundadır (Berry vd., 2005).

1.2.2. Meme kanseri risk faktörleri

Meme kanserinin oluşumunu tetikleyen çok fazla risk faktörü tanımlanmıştır (Britt, Cuzick ve Phillips, 2020). Meme kanserlerinin çoğu hormona duyarlıdır. Hormon salgılanması, ergenlik, menstrüel döngü ve hamilelik sırasında gerçekleşen önemli bir olaydır ve bu dönemlerde hormonlar meme gelişimi uyarır. Meme kanserinin en önemli risk faktörü olarak östrojen gösterilmektedir. Östrojen ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür ve östrojen reseptörüne (ER) bağlanması ile meme kanseri promotörü olarak tanımlanır. Östrojen ve progesteron arasında oluşabilecek bir dengesizlik hücre proliferasyonunun artması ve DNA hasarı birikmesi ile sonuçlanabilir (Levin ve Pietras, 2008). ER ve progesteron reseptörü (PR) içeren meme kanseri, hormon reseptörü pozitif meme kanseri olarak sınıflandırılmaktadır. ER, PR ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) içermeyen meme kanseri üçlü negatif meme kanseri olarak sınıflandırılmaktadır (Perou vd., 2000).

Artan yaş, ırk, memenin morfolojik özellikleri, hormon kullanımı, alkol ve sigara kullanımı, diyet gibi faktörler meme kanseri için sayılabilecek risk faktörleridir (Key vd., 2002). Meme kanserinin sebepleri arasında ileri yaş çok önemli bir etkiye sahiptir. Meme kanseri vakalarının yaş grupları ile kıyaslanmasında yaşlı kadınların oranının önemli ölçüde farklı olduğu görülmüştür. Özellikle 35-39 yaş arasında insidans oranları yükselmektedir. Ayrıca meme kanseri gelişiminde genetik yatkınlıkta önemli bir yer

tutmaktadır. Ailesel meme kanseri öyküsü, meme kanserine yakalanma olasılığını daha da arttırmaktadır. Bu artışa rağmen teşhis edilen meme kanseri vakalarında dokuz kadından sekizinin ailesinde meme kanseri öyküsünün olmadığı bildirilmiştir (Wilkinson ve Gathani, 2022).

Her ne kadar meme kanserinin gelişmesinde hem çevresel hem de genetik faktörler fazla gibi görülsede, yaşam tarzında yapılacak küçük bir değişiklik hem hastalık oluşumunu hem de ilerlemesini etkileyebilmektedir. Meme kanseri riskini azaltmada fiziksel egzersizin önemi büyüktür. Yapılan çalışmalarda düşük tempolu sürekli egzersizlerin meme kanseri riskini %20 oranında düşürebildiği, daha kompleks yorucu egzersiz uygulamalarının 14-22 yaş aralığındaki kadınların meme kanseri riskini %50'ye kadar düşürebileceği bildirilmiştir (Monninkhof vd., 2007).

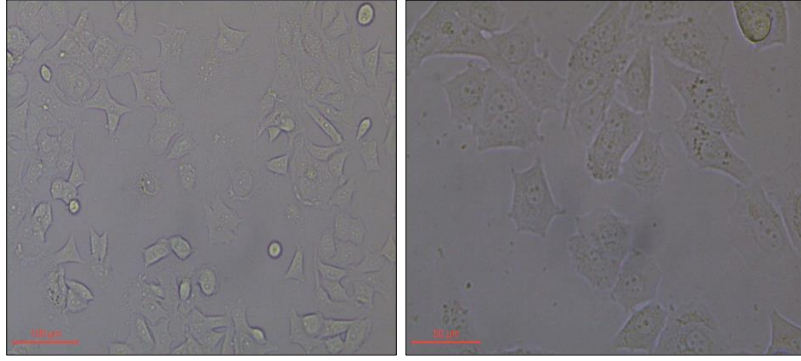
1.2.3. Erkeklerde meme kanseri

Meme kanseri geliştirme sıklığı bakımından akla ilk kadınlar gelse de düşük risk faktörlerine rağmen erkeklerde de görülebilmektedir. Erkek meme kanseri tüm meme kanseri vakalarının içinde %1' lik bir kısmı kapsar ve bunun %0,5' lik bir kısmı ölümlerle sonuçlanmaktadır. Erkek memesi karmaşık yapıya sahip olmayan bir organdır. Östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve androjen reseptörü ekspres eden kanallara sahiptir (Di Oto vd., 2018; Severson ve Zwart, 2017). Erkeklerdeki östrojen ve testosteron dengesizliği sonucu oluşan östrojen artışı erkek meme kanserinin sebebi olarak görülmektedir. Cinsiyet değiştiren erkeklerdeki hormon değişimi meme kanserini tetikleyebilmektedir. Ayrıca siroz, prostat kanseri, yaş, obezite, sigara ve alkol kullanımı da diğer sebepler arasında sıralanabilir. Genellikle erkek meme kanseri hasta grupları yaşlı insanlardan oluşmaktadır, bu da erkeklerde görülen meme kanserinde hayatta kalma oranının düşmesine sebep olmaktadır (Cardoso vd., 2018). Erkek meme kanserinin yaygın olmaması ve veri azlığı tedaviyi de kısıtlamaktadır (Gucalp vd., 2019).

1.2.4. MCF-7 meme kanseri hücre hattı

MCF-7 meme kanseri hücre hattı ilk kez 1970 yılında 69 yaşında olan bir kadından izole edilmiştir. İsmi Michigan Cancer Foundation-7'den almaktadır (Soule vd., 1973).

MCF-7 meme kanseri hücre hattı dünya çapında meme kanseri araştırmaları için yaygın olarak kullanılan bir hücre dizisidir. Lüminal A moleküler alt tipine aittir. Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitifdir (Gunduz ve Gunduz, 2011). Yüksek seviyelerde östrojen reseptörü α (ER α) ve düşük seviyelerde östrojen reseptörü β (ER β) eksprese eder (Buteau-Lozano vd., 2002; Şekil 1.3).



Şekil 1.3. MCF-7 meme kanseri hücre hattı (100 µm ve 50 µm büyütme oranı)

1.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller son yörüngesinde eşleşmemiş elektron ya da elektronlar bulunduran aşırı kararsız moleküllerdir (Bast, Haenen ve Doelman, 1991). Serbest radikaller oksijen, nitrojen, kükürt, klor kaynaklı olabilir. Kaynaklarına göre reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS), reaktif kükürt türleri (RSS) ve reaktif klorür türleri (RCS) olarak adlandırılırlar. Oluşan türler farklı reaktivite düzeylerine sahip olabilir ve radikal ya da radikal olmayan türler üretilebilir.

Reaktif türlerin düşük konsantrasyon seviyelerinin bağışıklık sistemine katkıda bulunma, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, hücrenin proliferasyonu, sinyal iletimine katılma gibi önemli işlevleri vardır (Demirci-Çekiç vd., 2022; Karabulut ve Gülay, 2016). Reaktif türlerin konsantrasyon seviyeleri arttıkça zararlı etkileri de artış göstermektedir (Young ve Woodside, 2001). Lipidler, proteinler, karbonhidratlar, DNA gibi makromoleküllerin hasarına, işlev bozukluğuna ve çeşitli hastalıkların oluşumlarının tetiklenmesine yol açmaktadır (Georgescu vd., 2018).

Serbest radikaller hücrel metabolizma tarafından üretilebileceği gibi kirlilik, alkol, sigara dumanı, radyasyon ve çeşitli ilaçlar gibi dışsal etkiler sonucunda da üretilebilmektedir.

1.3.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Oksijen yaşam için gerekli bir elementtir. Moleküler oksijen tarafından elektronların kademeli olarak alınması sonucu reaktif oksijen türleri oluşmaktadır ve bu durum normal metabolizmanın bir sonucudur. Reaktif oksijen türleri serbest radikaller ve radikal olmayan bir dizi reaktif oksijen içeren maddelerdir (Fang, Yang ve Wu, 2002; Tablo 1.1)

ROS hücrel metabolizma sırasında hücreler tarafından sürekli olarak üretilen yan ürünlerdir. Düşük ROS seviyeleri kinazlar ve fosfatazların translasyon sonrası modifikasyonları ile hücre proliferasyonunu artırır ve hücre ölümünü baskılayabilir (Giannoni vd., 2005). Düşük ROS üretimi nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NOX) tarafından yönlendirilebilir. Düşük ROS seviyeleri hücredeki sinyal olayları için gereklidir (Lambeth, 2004). Orta düzeylerdeki ROS hipoksi ile indüklenen faktör-1 α (HIF1 α) gibi strese duyarlı genlerin ekspresyonunu uyarır. HIF1 α 'nın uyarılması glikoz taşıyıcı 1 (GLUT1) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi proliferasyon artışı uyarıcı proteinlerin ekspresyonunu tetikler (Bell, Emerling ve Chandel, 2005; Gao vd., 2007). Yüksek düzeylerdeki ROS hücrel makromoleküllere zarar verebilir, yaşlanmayı tetikleyebilir ve mitokondrinin geçirgenliğini artırarak sitokrom c salınımına ve apoptoza sebep olabilir (Ramsey ve Sharpless, 2006).

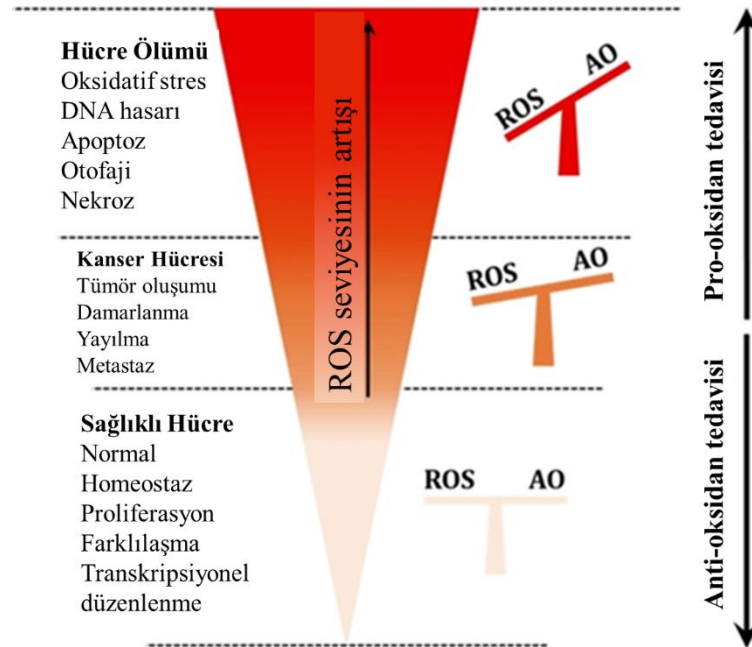
Tablo 1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Radikaller		Radikal olmayanlar	
Lipid peroksil	LOO \cdot	Singlet oksijen	¹ O ₂
Süperoksit	O ₂ ⁻	Hipobromöz asit	HOBr
Hidroksil	OH \cdot	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Hidroperoksil	HO ₂	Ozon	O ₃
Peroksil	ROO \cdot	Hipokloröz asit	HOCl
Alkoksil	RO \cdot		

1.3.1.1. ROS'un kanser hücrelerindeki rolü

Normal hücrelere göre daha yüksek seviyedeki ROS kanser hücrelerinin özelliklerinden birisidir. Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması daha fazla enerjiye ihtiyaç duymalarına sebep olur ve bu nedenle normal hücrelere göre daha yüksek ROS seviyelerine sahiptir. ROS seviyesinin değişmesi kanser hücrelerinin çoğalmasına, hayatta kalmasına ve hipoksiye adapte olmasına katkıda bulunmaktadır. Kanser hücrelerinde ROS seviyesi belirli bir düzeyde tutulmaya çalışılır ve bu denge antioksidanlar tarafından sağlanmaktadır. Antioksidan savunma sistemi normal hücrelerde ROS'ların zararlı etkilerine karşı koruma sağlarken tümör hücresinde büyümeye katkıda bulunma ve direnç mekanizmalarını artırma gibi roller üstlenir (He vd., 2017).

Normal hücrelerdeki artan ROS seviyeleri kanser başlangıcı için tetikleyici olabilir. Kanser hücrelerinde ROS seviyesinin artışı hücre ölümünü uyarabilir. ROS seviyesinin olması gereken miktarın üstüne çıkması mitokondriyal membran bozulması, lipid peroksidasyonu, ikincil protein yapılarında değişiklikler gibi hücre de önemli hasarlara neden olabilir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Normal ve kanserli hücrelerdeki ROS düzeyleri (Azmanova ve Pitto-Barry 2022).

1.4. Oksidatif Stres

Oksidatif stres terimi ilk olarak 1985 yılında hücrelere ve organlara verilen zarar anlamında kullanılmıştır. Oksijen metabolizmasının bir ürünü olan ROS aşırı üretildiği zaman vücutta içsel ve çeşitli yollarla dışsal olarak desteklenen antioksidanlar ile savunma sağlar (Pham-Huy, He ve Pham-huy, 2008). Antioksidan savunma mekanizması ROS seviyesini belirli bir düzeyde tutmaya çalışır. Antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki denge durumu redoks homeostazının korunabilmesi için önemlidir. Antioksidan savunmasının yetersiz kalması ve dengenin oksidanlar tarafına kayması oksidatif stres oluşumunu tetiklemektedir.

Oksidatif stresin artması sonucu proteinler, lipidler, DNA gibi makromoleküller zarar görmektedir. Hücrelere verilen hasar, hücre ölümü ve çeşitli hastalıkların başlamasına sebep olmaktadır. Oksidatif stres nörodejeneratif bozukluklar, yaşlanma, katarakt, diabetes mellitus, romatoid artrit, kardiyovasküler hastalıklar, solunum yolları hastalıkları ve çeşitli kanser türlerinin oluşumunda rol oynar (Peña-Oyarzun vd., 2018).

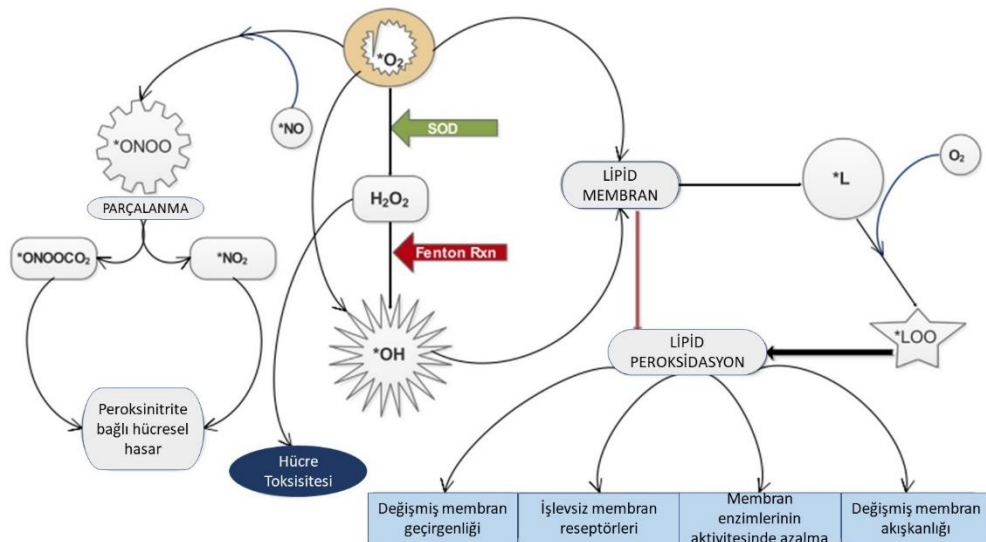
1.5. Lipid Peroksidasyonu

Lipitler hücrenin temel yapısal bileşenlerindedir. Hücre zarı lipidlerden oluşur ve hücrenin yapısal bütünlüğünü sağlar. Zarın yapısı ve akışkanlığı hücrenin fonksiyonlarını etkileyebildiği için önemlidir. Lipid peroksidasyonu hava kirliliği, sigara, alkol, radyasyon gibi dışsal ve içsel mekanizmalar ile üretilen serbest radikaller ile uyarılabilir (Niki, 2012). Serbest radikaller hücre zarındaki fosfolipidlerin peroksidasyonuna neden olur ve reaktif lipid hidroperoksitler, 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE), malondialdehit (MDA), akrolein, krotonaldehit, metilglioksal gibi ikincil karbonil bileşikler oluşur (Laher, 2014). Lipid peroksidasyonu başlama, yayılma ve sonlandırma olmak üzere üç adımda gerçekleşir (Yin, Xu ve Porter, 2011). Lipid peroksidasyonunun başlaması serbest radikaller tarafından çoklu doymamış yağ asidi yan zincirinin metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılmasıyla olur ve karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron kalır. Başka doymamış yağ asitleri ile bu işlem devam eder ve böylece yayılma aşaması gerçekleşmiş olur. Sonlandırma aşamasında oluşan radikal olmayan ürünler amino gruplarıyla Schiff bazı oluşturur, enzimleri inaktif eder, tiyol gruplarıyla etkileşime girerek hücre için zararlı özellikleri oluşturur (Rice-Evans ve Burdon, 1994). Lipid peroksidasyonu sonucunda hücrenin zar taşıma sistemi

etkilenir, hücre içi ve dışı arasındaki iyon dengesi bozulur ve zar geçirgenliği değişir (Şekil 1.5).

4-HNE ve MDA gibi aldehitler lipid peroksidasyonunun en yaygın bozunma ürünleridir. Metabolizmada serbest formda bulunabilirler, proteinler ve nükleik asitlere kovalent bağla bağlanabilirler (Gaschler ve Stockwell, 2017; Ito, Sono ve Ito, 2019). 4-HNE ve MDA oluşumu inflamasyon, apoptoz ve çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir.

MDA en az üç çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile peroksidasyonu ve prostoglandin sentezi sonucu oluşabilir (Guéraud vd., 2010). Lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres belirteci olarak kullanılmaktadır. MDA proteinlerin lizin kalıntıları ile reaksiyona girer. MDA sitotoksik bir bileşiktir ve diabetes mellitus, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanserlerin patogeneğinde rol oynar (Pandey vd., 2018).



Şekil 1.5. Süperoksit anyonu varlığı ile lipid peroksidasyon oluşumu (Ighodaro ve Akinloye, 2018)

1.6. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikalleri belli bir düzeyde tutarak etkisini engelleyen, geciktiren ve temizleyen vücudu oksidatif hasara karşı koruyan moleküllerdir. Antioksidanlar, serbest radikallerin üretim reaksiyonunun oluşumunu kırabilir, tehlikeli metabolik ve ksenobiyotik oksidanların etkilerini azaltabilir, vücudu akut ve kronik hastalıklardan koruyabilir, hücre ve doku hasarını onarabilir. Antioksidan savunma hem bitki hem de hayvansal hücre ve dokularda farklı konsantrasyonlarda bulunur ve serbest radikallere etki eder (Lobo vd., 2010). Ayrıca gıdalarda, gıda takviyeleri ve ilaçlarda

bulunan antioksidanlar raf ömrünü uzatma etkisine sahiptir (Shahidi ve Zhong, 2015; Şekil 1.6).

Savunmada görevli antioksidanlar üretilen radikal türleri ve hedef moleküle göre farklı işlevlere sahip olabilir. Antioksidanlar savunma mekanizmalarına göre toplayıcı, onarıcı, bastırıcı, zincir kırıcı olarak dört gruba ayrılır. Vücudun oksidatif hasara karşı savunma mekanizması iki şekilde çalışır. Birincisi; enzimatik antioksidanlar ile serbest radikallerin uzaklaştırılmasıdır. Demir ve bakır gibi pro-oksidan metal iyonlarının transferrin, metalloprotein, haptoglobin, seruloplazmin gibi spesifik metal bağlayıcı proteinlerle bağlanmasını içerir. İkincisi; enzimatik olmayan antioksidanların elektron verici olarak görev yapması ile serbest radikallerin temizlenmesidir (Aydemir ve Sarı, 2009).

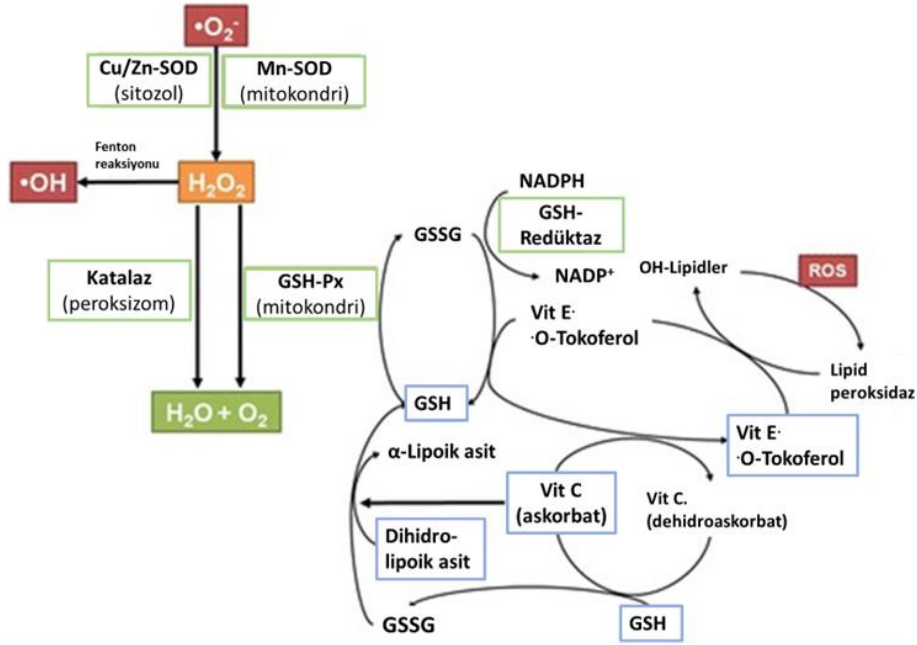
Antioksidanlar kaynaklarına göre eksojen ve endojen antioksidanlar olarak iki gruba ayrılmaktadır (Tablo 1.2; Tablo 1.3). Antioksidan savunmanın bazı üyeleri vücutta doğal olarak sentezlenirken eksojen kaynaklardan antioksidanların alınması da önemli olmaktadır. En iyi bilinen antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidazdır (GPx). ROS etki mekanizmaları çok yüksek oldukları için oksidatif strese karşı etkili koruma sağlarlar.

Tablo 1.2. *Endojen antioksidanlar*

ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR		
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutatyon	Laktoferrin
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutatyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	α -lipoik asit
Glutatyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
Glutatyon S-Transferaz (GST)	Albümin	Seruloplazmin

Tablo 1.3. *Eksojen antioksidanlar*

EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	
Vitamin Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Antioksidanlar
α – Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri
β – Karoten (Vitamin A)	Trolox- C
Askorbik asit (Vitamin C)	NADPH oksidaz inhibitörleri
Folik asit (Vitamin B9)	Nötrofil adezyon inhibitörleri
Koenzim Q10	Sitokinler



Şekil 1.6. Antioksidan savunma mekanizması (Kurutas, 2015)

1.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

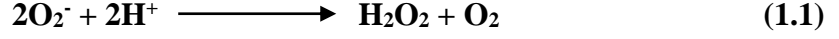
SOD ilk defa 1968 yılında Irvin Fridovich tarafından keşfedilmiştir (McCord ve Fridovich, 1988). SOD sitozol ve mitokondride bulunan bir metaloenzimdir ve en etkili enzimatik antioksidanlardan biridir. SOD yüksek ROS konsantrasyonlarına ve toksik etkilerine karşı ilk savunma hattını oluşturur. SOD zararlı süperoksit anyonunun hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizleyerek etkisini azaltır. SOD metaloenzim olduğu için aktivitesi için metal kofaktör gerekmektedir. Bunlar demir (Fe), çinko (Zn) bakır (Cu) ve manganezdır (Mn). Aktif merkezlerinde bulunan metal iyonlarına göre sitozolik CuZn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve Fe-SOD olarak üç gruba ayrılırlar (Fridovich, 1995).

1. CuZn-SOD çoğunlukla ökaryotik hücrelerin kloroplast ve sitozolünde bulunur. CuZn-SOD hücredeki oksijen toksisitesine karşı güçlü bir savunma sağlar (Peskin, Koen ve Zbarsky, 1981). CuZn-SOD kromozom 21 üzerinde SOD1 geni tarafından kodlanır. Hücre dışı CuZn-SOD kromozom 4 üzerinde SOD3 geni tarafından kodlanır (Rosen vd., 1993).

2. Mn-SOD bakterilerin mitokondri matriksinde ve sitozolde bulunur. MnSOD kromozom 6 üzerinde SOD2 geni tarafından kodlanır.

3. Fe-SOD prokaryotlar ve bazı bitkilerde bulunur (Duke ve Salin, 1985).

SOD hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyarak vasküler ve kardiyovasküler hastalıkların (nörolojik hastalıklar, akciğer hastalığı, ateroskleroz, diyabet, hipertansiyon, inflamatuvar durumlar ve iskemi-reperfüzyon) oluşumunu önler.

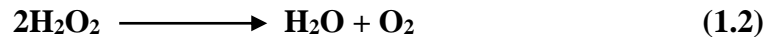


1.6.2. Katalaz (CAT)

CAT her biri aktif Hem grubu ve NADPH içeren dört benzer alt birimden oluşan 240 kilodalton (kDa) ağırlığında tetramerik bir proteindir. Esas olarak memeli hücrelerinde peroksizomlarda bulunur, ayrıca düşük konsantrasyonlarda mitokondri ve endoplazmik retikulumda da bulunmaktadır (Kirkman ve Gaetani, 1984; Martinez-Cayuela, 1995). H_2O_2 'i toksik olmayan su ve oksijene katalizler. H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak CAT iki enzimatik aktiviteye sahiptir. Birincisi; yüksek H_2O_2 konsantrasyonunda H_2O_2 'i katalizleyerek su ve oksijene ayrıştırır. İkincisi; düşük H_2O_2 konsantrasyonunda, etanol, metanol, fenol gibi uygun bir hidrojen donörü ile H_2O_2 uzaklaştırılır.

H_2O_2 bir radikal değildir, ancak Cu ve Fe iyonları varlığında bir Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşumuna sebep olabilir. Bu nedenle detoksifikasyonu hücre için önemlidir. Hidrojen peroksit düşük konsantrasyonlarda proliferasyon, hücre ölümü, sinyalleşme ve mitokondriyal fonksiyon gibi süreçlerde rol oynar. Yüksek konsantrasyonları hücre için zararlı olabilecek etkilerin oluşmasına sebep olur (Ercal, Gurer-Orhan ve Aykin-Burns, 2001).

CAT eksikliği ya da mutasyonu çeşitli hatalıkların başlamasına neden olabilir. Özellikle kanser gelişim riskinde artış, zihinsel gelişim bozuklukları, tip 2 diabetes mellitus gibi hastalıkların görülmesini tetikleyebilir (Góth, Rass ve Páy, 2004).



1.6.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Oksidatif strese karşı ikincil antioksidan görevi görür ve hücreyi sitotoksik ve kanserojen etkilere karşı korur. 21 kDa ağırlığında dört özdeş alt birimden oluşur ve her alt birim bir selenosistein (Sec) kalıntısı içerir. Hem sitozolde hem de mitokondride bulunur (Lubos, Loscalzo ve Handy, 2011). Organik ve inorganik H₂O₂'nin H₂O'ya indirgenmesini katalizleyerek serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemede önemli rol oynar (Birben vd., 2012; Pigeolet vd., 1990). GPx selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız olarak iki sınıfa ayrılır. Selenyuma bağımlı GPx, H₂O₂ ve organik hidroperoksitlere karşı etkilidir. Selenyuma bağımlı olmayan GPx daha çok organik hidroperoksitlere karşı etkilidir (Cnubben vd., 2001).

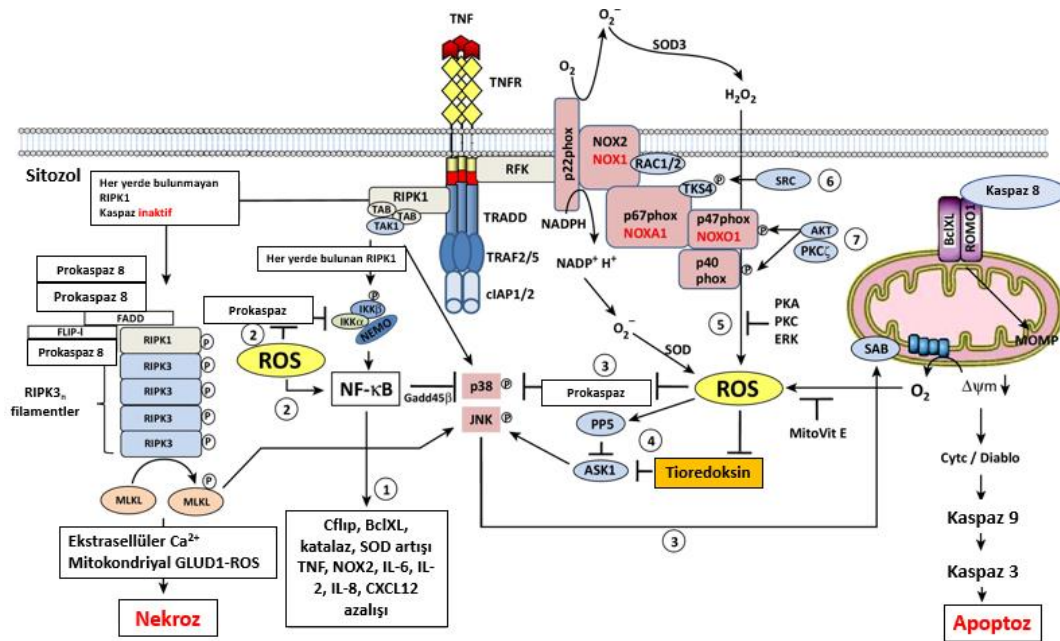
GPx substrat olarak glutatyon kullanan bir enzim grubudur. Yüksek glutatyon seviyesi serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı üretilen enzimleri uyarmak için gereklidir (Balasubramaniyan, Subramanian ve Govindasamy, 1994). GPx hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin korunması için önemli bir enzimdir lipid peroksidasyon sürecini inhibe etmede önemlidir. Lipit peroksitleri mitokondri ve sitozolde karşılık gelen alkollerine bağlar. Bu reaksiyonlar sırasında glutatyon hidrojen verici olarak görev yapar. H₂O₂ ve hidroperoksitler indirgenme reaksiyonunda glutatyon okside olur ve okside glutatyon (GSSG) olarak adlandırılır. Okside glutatyon, glutatyon redüktaz (GR) enzimi ile tekrar redükte glutatyon (GSH) haline indirgenir. Bu reaksiyonda GR NADPH'ı elektron vericisi olarak kullanır (Reiter vd., 1995).



1.7. Apoptoz

Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür ve hasarlı hücrelerin diğer hücelere zarar vermeden kendi kendini yok ettiği bir mekanizmadır (Elmore, 2007). Apoptoz mekanizması çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile karakterize edilmektedir. Apoptozun başladığı bir hücrede hacimsel azalma, kromatinlerin yoğunlaşması, hücre iskeletinin parçalanması, zar yüzeyinde kabarma, zara bağlanan apoptotik cisimlerin oluşması gibi olaylar meydana gelmektedir (D'Emilio vd., 2010).

Apoptoz içsel ya da dışsal yoldan aktive edilen kaspazlara bağımlı olarak ya da kaspazlardan bağımsız bir mekanizma ile oluşabilir. İçsel yol; mitokondriyal DNA hasarı, ısı şoku, hipoksi, büyüme faktörü yoksunluğu gibi uyarılar ile aktive olabilir. Mitokondriyal ROS; mitokondriyal DNA (mtDNA), mitokondriyal membran potansiyeli kaybı ve bozulmuş adenozin trifosfat (ATP) sentezi gibi hücre yapılarını etkileyebilir. H_2O_2 ve süperoksit mitokondriden sitokrom c salınmasına neden olur ve apoptozun başlamasını uyarır (Dumont vd., 1999). Dışsal yol; tümör nekroz faktör (TNF) gen ailesi içinde yer alan ölüm reseptörlerine bağlıdır. DNA hasarına ve hücrenin ölümüne neden olan yüksek ROS seviyeleri TNF sinyalleşmesi ve apoptoz mekanizmasının başlatılması için önemlidir (Blaser vd., 2016; Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Apoptoz mekanizmasının teşvik edilmesinde TNF ve ROS arasındaki etkileşim (Blaser vd., 2016)

1.8. Oleuropein

Geleneksel akdeniz diyeti, düşük kırmızı et tüketimi ve bitki kaynaklı gıdaların tüketimi ile karakterizedir. Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda Akdeniz ülkelerindeki kanser insidans oranlarının diğer ülkelere göre düşük olduğu saptanmıştır (de Lorgeril vd., 1998). Düşük kanser insidansı ve ölüm oranları Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak tüketilen zeytin ve zeytinyağı ile ilişkilendirilmiştir (Gotsis vd., 2015; Trichopoulou vd., 2000).

Tarihsel kayıtlara göre MÖ. 7000-5000 yıllarından beri zeytin ve zeytinyağı tüketilmektedir (Ghanbari vd., 2012). Eski Mısır'da firavunların mumyalanma işlemlerinde koruyucu olarak kullanılmıştır. Daha sonraki yüzyıllarda ateş düşürücü etkisi için ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1800'lü yıllarda İngilizler tarafından sıtma tedavisinde kullanılmıştır. Son yıllarda zeytin ağacından elde edilen ürünler kanser ve diğer birçok hastalık riski için koruyucu etkileri sayesinde dikkat çekmektedir (Soler-Rivas, Espin ve Wichers, 2000).

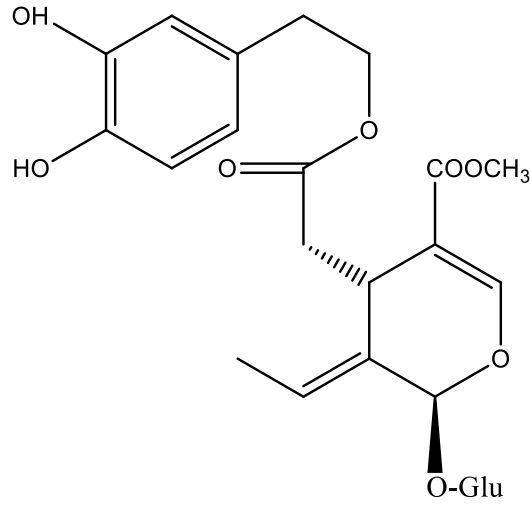
Oleaceae familyasına ait *Olea europea* olarak bilinen zeytin ağacı akdeniz bölgesine özgü bir türdür. *Olea europea*'dan elde edilen zeytinyağı, zeytin ve zeytin yaprağı ekstraktının sağlık için faydalı etkileri bulunmaktadır ve bu faydaları içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Casaburi vd., 2013). Özellikle zeytin yaprağı kanser ilerlemesini etkileyen polifenoller bakımından zengindir. Bu etkinin en büyük kaynağı zeytin ve zeytinyağında da bulunan ana sekoiridoit öncüsü olan Oleuropeindir. (Gikas, Bazoti ve Tsarbopoulos, 2007; Servili vd., 2009). Oleuropein'in antikanser, antioksidan, antidiyabetik, kardiyoprotektif, nöroprotektif gibi sağlık için faydalı etkileri bulunmaktadır (Cicerale, Lucas ve Keast, 2012; Piroddi vd., 2017). Oleuropein normal hücreler için düşük toksisiteye sahiptir ayrıca kanser hücrelerini farklı yollarla etkileyebilme yeteneği kanser tedavisi için ilgi çekici olmaktadır (Del Boccio vd., 2003; Kimura ve Sumiyoshi, 2009).

Oleuropein konsantrasyonu zeytinin kuru ağırlının %14'ünü oluşturmaktadır ve zeytinyağında 2.8 mg/kg, zeytin yaprağı ekstresinde 61,56 g/kg kadardır (Vinha vd., 2005). Oleuropein konsantrasyonunu zeytinin cinsi, olgunlaşma aşaması, yağ üretimi ve ekstraksiyon sırasındaki uygulamalar etkilemektedir (Goldsmith vd., 2014). Zeytinin olgunlaşma ve işlenmesi sırasında Oleuropein'in hidrolizi gerçekleşir ve hidroksitirozole dönüşür (Carrera-González vd., 2013).

Zeytin gelişimi üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşama büyüme aşamasıdır, bu aşamada Oleuropein birikimi gerçekleşmektedir. İkinci aşama; yeşil olgunlaşma aşamasıdır, bu aşamada Oleuropein konsantrasyonunda azalma meydana gelmektedir. Üçüncü aşama; zeytinin siyahlaşma aşamasıdır bu aşama antosiyaninlerin ortaya çıkmaya başladığı ve Oleuropein seviyesinin düştüğü aşamadır, bu aşamada Oleuropein konsantrasyonu en düşük seviyededir (Bianco ve Uccella, 2000; Donaire vd., 1975).

1.8.1. Oleuropein kimyası

Oleuropein'in molekül formülü $C_{25}H_{32}O_{13}$ ve molekül ağırlığı 540.518 g/mol dür. Oleuropein, 1960 yılında Panizzi tarafından izole edilerek sekoiridoid olarak karakterize edilmiştir. Oleuropein, bir oleosidik iskelet içeren 3-4-dihidroksifenil etanol ve hidroksitrosolden oluşan glikosile edilmiş bir esterdir (Bendini vd., 2007; Şekil 1.8). Oleosidik iskelet, Oleaceae familyasının sekoiridoid glukozitlerinin ortak özelliğidir. Karbon iskeletinin mevalonik asitten türetildiği bilinmektedir (Soler-Rivas, Espin ve Wichers, 2000).

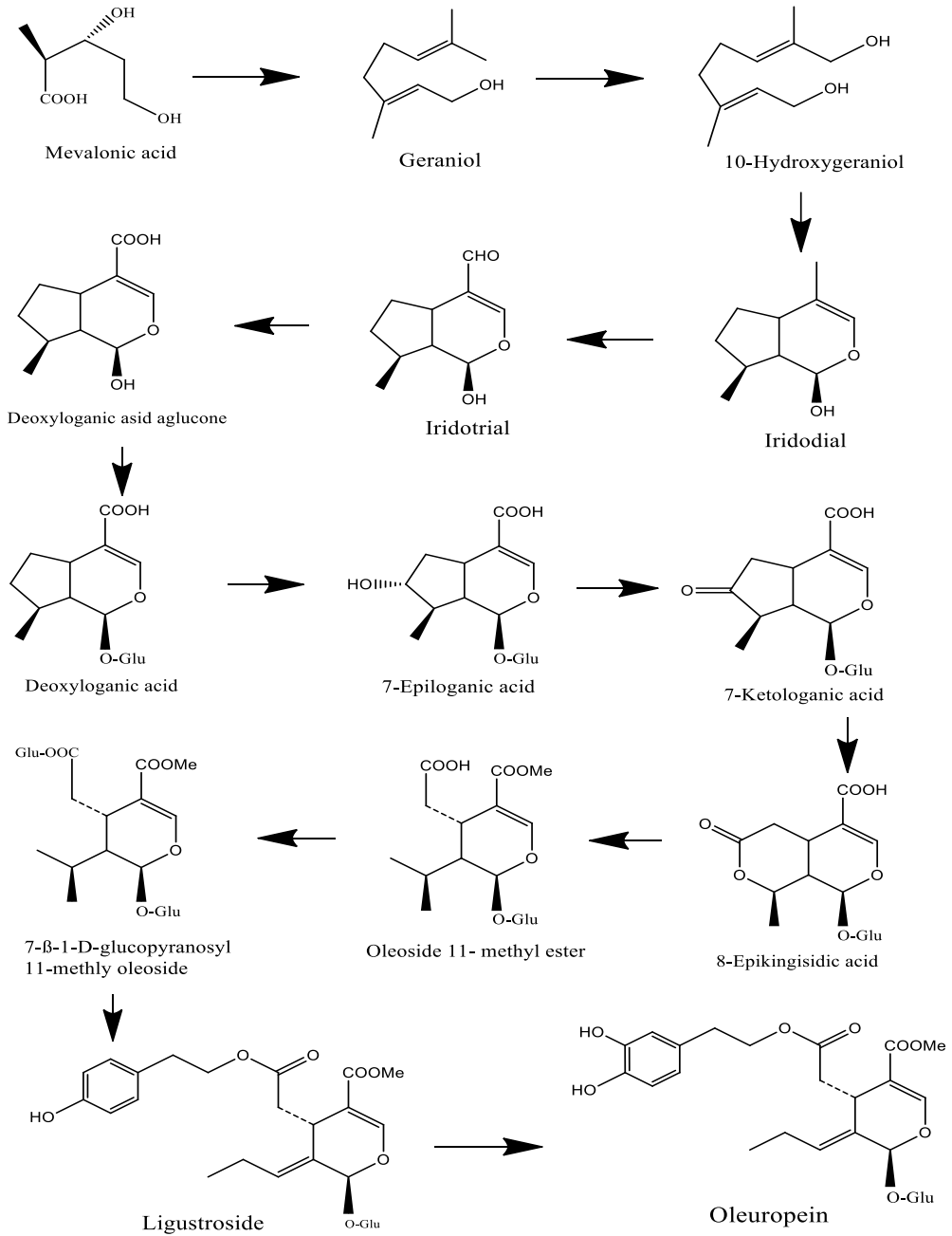


Şekil 1.8. Oleuropein'in kimyasal yapısı

1.8.2. Oleuropein biyosentezi

Oleaceae'daki Oleuropein'in biyosentezi ikincil metabolizmadan mevalonik asit yolunda bir dallanma yoluyla ilerler ve oleosidlerin oluşumuyla sonuçlanır ve bu bileşiklerden sekoiridoidler türetilir. Mevalonik asit yolundaki dallanma geraniol, 10-hidroksigeranoil, 10-hidroksinerol ve iridoidal biyosentezine yol açar. Loganin

iridoidalden biyosentezlenir ve deoksiloganik asit, 7-epiloganik asit ve loganik asit ligustroside dahil edilir. Ligustroside, 7-ketologanik asit yoluyla Oleuropein'in öncüsüdür (Damtoft, Franzky ve Jensen, 1992; Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Oleacea'daki Oleuropein biyosentezi

1.8.3. Oleuropein'in antioksidan ve antikanser etkisi

Oleuropein zeytin yaprakları, zeytin ve zeytinyağında farklı konsantrasyonlarda bulunan doğal bir polifenoldür. Polifenollerin kanser hücresinin oluşumunda rol oynayan birçok hedef genin aktivitesini ve ekspresyonunu kontrol etme yeteneği vardır ve aynı şekilde tümör hücrelerinin proliferasyonunu da etkileyebilirler (Mitra ve Dash, 2018). Doğal polifenoller normal metabolizma sırasında üretilen ya da dışsal kaynaklar nedeniyle artan ROS seviyelerini antioksidan etkileri sayesinde temizleyebilmektedir (Sznarkowska vd., 2017). Ayrıca polifenoller prooksidan etki gösterebilmektedir. Prooksidan etki sayesinde kanser hücrelerinde aşırı ROS üretimine sebep olarak sitotoksik etki oluştururlar ve oksidatif stresi arttırarak kanser hücresinin ölümünü uyarabilirler (Panieri ve Santoro, 2016). Oleuropein, düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunun inhibisyonu ve serbest radikal süpürme gibi güçlü antioksidan aktiviteler sergiler (Omar, 2010; Rizzo vd., 2017). Oleuropeinin lipid oksidasyonu üzerindeki koruyucu etkileri, tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin ve MDA ve 4-HNE gibi lipid peroksit yan ürünlerinin oluşumunun azalmasının değerlendirilmesiyle kanıtlanmıştır (Visioli vd., 1995). Oleuropein farklı mekanizmalar ile antioksidan yanıtın artmasını sağlar. Oleuropein'in antioksidan etkisi hidroksil grubunun serbest hidrojeni ile onun fenoksil radikalleri arasında molekül içi bir hidrojen bağı oluşturarak radikal stabilitesini geliştirme yeteneği ile ilgilidir (Visioli, Bellomo ve Galli, 1998).

1.9. Paklitaksel

Paklitaksel (PTX) tümör bağışıklığında etkin rol oynayan en yaygın kullanılan taksan sınıfına antikanser ajanlardan biridir (Wani vd., 1971). PTX ilk olarak Kuzey Amerika'nın Kuzeybatı Pasifik'ine özgü bir tür olan Batı Porsuğu olarak da bilinen Pasifik porsuk ağacının (*Taxus brevifolia*) kabuğundan elde edilmiştir (Heinig, Scholz ve Jennewein, 2013). PTX'in ham özü ve saf bileşiği ilk olarak, 1969 ve 1971 yılında elde edilmiştir. 1979 yılında klinik öncesi araştırmalar tamamlanmıştır ve 1983-1990 yılları arasında klinik çalışmaları yapılmıştır (Luo vd., 2012; Sofias vd., 2017). İlk olarak 1992 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yumurtalık kanseri tedavisi için onaylanmıştır. 1992'de Bristol-Myers Squibb tarafından Taxol™ olarak piyasaya sürülmüş ve tedavide kullanılmaya başlanmıştır. 1994 yılında meme kanseri

tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almıştır (Walsh ve Goodman, 2002). Meme kanseri, yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanserleri, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri ve kolorektal kanser gibi hastalıkların tedavisinde klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen ve Shi, 2016).

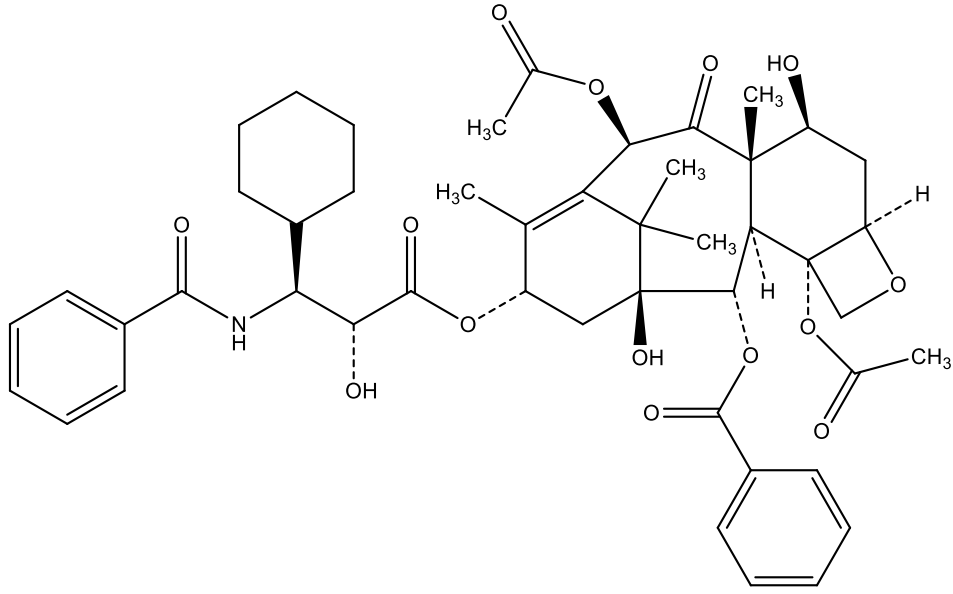
İlaca olan yüksek talep ve *Taxus brevifolia*'nın talepleri karşılayamaması alternatif üretim yöntemleri geliştirilmesine sebep olmuştur. PTX'in elde edildiği *Taxus brevifolia*'da ki düşük konsantrasyonu maliyetini yükseltmektedir. Bu nedenle kimyasal sentez, yarı sentez, biyolojik sentez ve modifiye edilmiş endofilik mantarlardan ekstraksiyonu gibi başka yollar geliştirilmiştir. PTX üretimi için kimyasal sentez etkili bir yoldur, fakat karmaşık sentetik yolu ve yüksek maliyeti üretimini sınırlandırmaktadır. Bitki hücre kültürü teknikleri ile elde edilmesi daha umut verici ve daha sürdürülebilir bir yoldur, ancak verimlilik daha düşük ve maliyeti daha fazladır. PTX etkili bir antikanser ilaçtır, ancak tedavide bazı yan etkiler oluşmasına sebep olmaktadır. Başlıca yan etkileri; aşırı duyarlılık ve periferik sinirler üzerinde hasara ve ağrılara sebep olmasıdır. Aşırı duyarlılık genellikle uygulamadan on dakika sonra görülmeye başlar. Nefes darlığı, kızarma, ürtiker, hipotansiyon, göğüs ağrısı, karın ağrısı, ateş başlıca etkileridir (Yamamoto, Kawano ve Iwase, 2011; Vishnu ve Roy, 2011).

1.9.1. Paklitaksel etki mekanizması

PTX'in moleküler yapısı asetil grubu tarafından sağlanır. PTX'in 20 karbonlu bileşiği (C20) doğal bileşiklerin diterpen sınıfına aittir. Antikanser aktivitesi A halkası, D halkası, C2 benzoli grubu ve C3' amid-açıl grubu ve yan zincirde C13'e bağlanan C2'deki OH grubu gibi bileşenlerine atfedilmektedir. Ayrıca C9 üzerindeki karbonil grubu ve C10 üzerindeki asetil grupları terapötik aktiviteyi destekler (Ezrahi, Aserin ve Garti, 2019; Zhang, Mei ve Feng, 2013; Şekil 1.10).

PTX tübülünün mikrotübüllere birleşmesini uyararak mikrotübüllerin ayrılmasını engeller. Hücre döngüsünün ilerlemesini durdurur ve mitozu önler. Mikrotübüller hücre şeklinin kontrol edilmesi, gıda alımı, hareket, hücre bölünmesi sırasında iğ ipliklerinin oluşumu gibi hücresel fonksiyonlara katılan silindirik yapılardır ve α/β -tübülün heterodimerlerinden oluşan tekrar eden alt birimlerden oluşmaktadırlar (Weaver, 2014; Horwitz, 1992). Profaz aşamasında kromozomların kutuplara çekilebilmesi için mikrotübüller iğ iplikleri oluşturur ve daha sonra ki aşamalarda bu iğ iplikleri

depolimerize olur ve kaybolur. Depolimerizasyon soğuk, sıcak, kalsiyum iyonları ile de tetiklenebilir. PTX ile muamele sonrasında PTX mikrotübüllere bağlanır ve mikrotübüllerin stabilizasyonunu artırır, böylece depolimerizasyona karşı direnç oluşturulur. PTX tübülün polimerizasyonunu destekler ve mitozu önler (Foley ve Kapoor, 2013). Guanin trifosfat (GTP) gibi mikrotübül birleşmesi için gerekli faktörler olmasa bile PTX tübülün dimerlerinin mikrotübül oluşturmak için polimerizasyonunu sağlar ve depolimerizasyonun önlenmesi için mikrotübülleri stabilize eder (Schiff ve Horwitz, 1980; Schiff, Fant ve Horwitz, 1979). PTX etkisi ile mikrotübüller işlevsiz hale gelir ve hücre ölümü tetiklenir. PTX'in G1 ve S fazlarında apoptozu uyardığı bilinmektedir. G2/M fazında hem apoptoz hem de nekrozu uyarmaktadır, ayrıca ROS oluşumunu tetiklemektedir ve mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirmektedir (Liao ve Lieu, 2005; Varbiro vd., 2001).



Şekil 1.10. Paklitaksel'in kimyasal yapısı

2. MATERYAL YÖNTEM

2.1. Materyaller

2.1.1. Kullanılan hücre hatları

MCF-7 meme kanseri hücre hattı Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nden (AÜBİBAM) temin edilmiştir. Tezin deneysel aşamaları Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

2.1.2. Kullanılan bilgisayar programları

Tablo 2.1. *Kullanılan bilgisayar programları*

İsim	Şirket
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software California
CompuSyn Software	ComboSyn Inc.
RTCA Software 2.0	ACEA Biosciences Inc.
ChemDraw Ultra 12.0	CambridgeSoft

2.1.3. Kullanılan ekipmanlar

Tablo 2.2. *Kullanılan ekipmanlar*

İsim	Şirket
Sıvı azot tankı	Taylor Wharton, Almanya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik No Frost, Türkiye
Ultra düşük sıcaklıklı dondurucu	Eppendorf U410, Almanya
Karbon dioksitli (CO ₂ 'li) inkübatör	Thermo Fisher Scientific Hera Cell 240, Almanya
Distile su cihazı	Nüve ND12, Türkiye
Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntem (ELISA) okuyucu	BioTek ELx800, US
UV-Vis spektrometre	Shimadzu UV-160A, Japonya
Etüv	Nüve FN500, Türkiye
Hassas terazi	Ohaus AV264C, İsviçre
İnverted mikroskop	Leica DM IL LED, Almanya
Floresan mikroskop	Leica, Almanya
Laminar kabin (Steril Kabin)	Thermo Fisher Scientific Heracell 150i, ABD
Otoklav	ALP CL32L, Japonya
Santrifüj	Thermo Fisher Scientific Heraeus Megafure 1.0R, ABD
Sterilizatör	Nüve FN500, Türkiye
Homojenizatör	MIULAB MT-30K, ABD
Su banyosu	Nüve BM 302, Türkiye
Vorteks	IKA Yellowline TTS2, Çin
Manyetik karıştırıcı	Sigma Aldrich Heidolph 3001, ABD
Buz makinesi	Simag, İtalya
pH Metre	Thermo Scientific, Singapore
Çalkalayıcı	Biometra WT17, Almanya
Xcelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA)	Roche, Almanya

2.1.4. Kullanılan kimyasallar

Tablo 2.3. Kullanılan kimyasallar

İsim	Şirket
Oleuropein	Sigma-Aldrich, ABD
Paklitaksel	Sigma-Aldrich, ABD
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, ABD
Disodyum fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Almanya
Etil alkol	Necm, Türkiye
Fetal bovine serum (FBS)	Sigma-Aldrich, ABD
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, ABD
MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)]	Appllichem, Almanya
Penisilin/Streptomisin solüsyonu	Thermo Fisher Scientific, ABD
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Almanya
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, Almanya
Sodyum klorür (NaCl)	Detsan, Türkiye
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich, ABD
Akridine orange	Sigma-Aldrich, Almanya
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich, ABD

2.1.5. Kullanılan ticari kitler

Tablo 2.4. Kullanılan ticari kitler

İsim	Şirket
Total Antioksidan Durum (TAS) Kiti	MEGA TIP Türkiye
Total Oksidan Durum (TOS) Kiti	MEGA TIP Türkiye
Glutathione Assay (GSH) Kit	Cayman, ABD
Süperoxide Dismutase Assay (SOD) Kit	Cayman, ABD
TBARS Assay Kit	Cayman, ABD

2.2. Yöntemler

2.2.1. Hücre kültürü uygulamaları

MCF-7 meme kanseri hücre hattı %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisinden oluşan sıvı Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri ortamında 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde çoğaltılmıştır.

2.2.1.1. Hücrelerin stoklanması

MCF-7 hücre hattı flask içinde %90 doluluğa ulaştıktan sonra eski besiyeri steril pipet yardımı ile çekilmiş ve hücreler 1×fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. PBS çekilip atılmış ve hücreler 1×Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask 5 dakika inkübatöre alınmıştır. Hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop ile kontrol edilmiştir. Flask tabanından ayrılan hücrelerin üzerine

tripsinin etkisini nötralize etmek için besiyeri eklenmiş ve falkon tüplere aktarılmıştır. 1200 rpm devirde oda ısısında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış ve hücre üzerine her bir karyotüpe stok işlemi için 1800 µl besiyeri ve 200 µl dimetilsülfoksit (DMSO) olacak şekilde eklenmiştir. 2 ml'lik karyotüplere alınarak -20 °C'de 2 saat bekletildikten sonra tüpler bir gece -80 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra sıvı azot (-196 °C) tankına alınıp stoklama işlemi tamamlanmıştır.

2.2.1.2. Hücrelerin stoktan çıkarılması

Çalışmaya başlamadan önce çalışılacak olan ortam ve malzemelerin steril olduğundan emin olunmuştur. Çalışmanın tüm aşamaları steril kabin içinde gerçekleştirilmiştir.

Azot tankından çıkarılan MCF-7 hücrelerinin oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen hücreler 15 ml'lik falkona aktarılmış ve üstüne 2 ml DMEM besiyeri eklenmiştir. Falkon 1200 rpm devirde 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice alınarak pellet üzerine 5 ml DMEM besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Daha sonra hücreler 25 cm²'lik flasklara aktarılmıştır. Hücrelerin homojen dağılıp dağılmadığı mikroskop altında kontrol edilmiştir. Flaskların %5 CO₂ ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 37 °C'de büyümeleri sağlanmıştır.

2.2.1.3. Hücre hatlarının pasajlanması

Flasktaki hücreler %80-90 doluluğa ulaştıktan sonra besiyeri steril pipetler yardımı ile çekilmiş ve hücreler 1×PBS ile yıkanmıştır. PBS çekilip atılmış ve hücreler 1×Tripsin-EDTA ile muamele edilmiş ve flask 5 dakika inkübatöre bırakılmıştır. Hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop ile kontrol edilmiştir. Flask tabanından ayrılan hücrelerin üzerine tripsinin etkisini nötralize etmek için besiyeri eklenmiş ve falkon tüplere aktarılmıştır. 1200 rpm devirde oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılmış ve dibe çöken hücrelere besiyeri eklenerek hücreler 75 cm²'lik flasklara alınmıştır. Pasajlama işleminin sonunda flasklar hücrelerin çoğalabilmesi için inkübatöre alınmıştır.

2.2.2. Etken madde dozlarının hazırlanması

2.2.2.1. Oleuropein

Deneyleerde kullanmak için 5 mg Oleuropein 100 µl DMSO içinde çözdürülerek 0,01 M konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Ana stok -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Ana stoktan deneyleerde kullanılmak üzere 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 µM konsantrasyonlarda besiyeri içinde seyreltmeler yapılmıştır. Konsantrasyonlar DMSO'nun %0,1'lik toksik dozu göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır.

2.2.2.2. Paklitaksel

Deneyleerde kullanmak için 5 mg Paklitaksel 100 µl DMSO içinde çözdürülerek 0,006 M konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Ana stok -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Ana stoktan deneyleerde kullanılmak üzere 5, 10, 15, 20, 25, 50, 80 µM konsantrasyonlarda besiyeri içinde seyreltmeler yapılmıştır. Konsantrasyonlar DMSO'nun %0,1'lik toksik dozu göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır.

2.2.3. Sitotoksisite testleri

Deneysel çalışmalarla hücelere olan etkisinin belirlenmeye çalışıldığı maddeler doza ve zamana bağlı olarak apoptoz, nekroz, morfolojik değişiklikler gibi etkilerle hücreye zarar verebilir. Bu zararın derecesini belirleyebilmek için çeşitli testler yapılmaktadır. Sitotoksisite çalışmaları hücre ile mumamele edilen toksik etkili maddenin canlılığa olan etkisini belirleyebilmek için yapılan çalışmalardır.

2.2.3.1. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile Paklitaksel ve Oleuropein sitotoksik etkisinin belirlenmesi

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) geleneksel sitotoksisite testlerine alternatif teknolojik bir yöntemdir (Vistejnova vd., 2009). RTCA sistemi ile hücelerdeki morfolojik değişiklikler, canlılık ve ölüm durumları hakkında detaylı ve yüksek doğruluk oranlarında bilgi edinilebilmektedir (Urcan vd., 2010). Yöntem ile hücre karakterizasyonu, proliferasyon, sitotoksisite, adezyon ve reseptör aracılı sinyal iletimi gibi analizler yapılabilmektedir.

Hücelerin canlılığını izlemek için altın elektrotlar içeren özel olarak tasarlanmış plakalar kullanılmaktadır. Bu sistemin temel prensibi alt yüzeyinde altın elektrotlar

bulunan E-plate yüzeyine yapışan hücre miktarının elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin belirlenmesine dayanmaktadır (Ke vd., 2011). Yöntem oldukça hassas ve doğru bir şekilde gerçek zamanlı ölçüm sağlamaktadır. Hücre miktarının artması akıma karşı oluşan direncinde artması anlamına gelmektedir. Hücre bağlanması ve yayılmasının oluşturduğu elektriksel akım Hücre İndeksi (Cell Index-CI) olarak belirtilir. Hücre indeksi E-plate kuyularına yapışan hücrelerin boyutu ve yoğunluğuna göre hesaplanan hücrenin durumu hakkında bilgi veren bir parametredir (Atienza vd., 2005).

2.2.3.1.1. Yöntemin uygulanması

RTCA sistemi ile hücre indeksi parametrelerinin değerlendirilebilmesi için 16 kuyucuklu E-plate kullanılmıştır. Öncelikle E-platelerin kuyucuklarına besiyeri eklenerek arka plan (background) ölçümü yapılmıştır. Daha sonra MCF-7 meme kanseri hücre hattının her kuyucukta 8×10^3 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Cihaz her 15 dakikada bir ölçüm alacak şekilde ayarlanmıştır. Hücre ekimi işleminin sonunda E-plate RTCA cihazına yerleştirilerek 37 °C'de %5 CO₂ ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat inkübasyon süresinin sonunda Paklitaksel ve Oleuropein'in hazırlanan stok solüsyonunda belirlenen konsantrasyonlarda besiyeri içinde seyreltmeleri yapılmıştır. Daha sonra E-plate kuyucuklarındaki besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler hazırlanan Paklitaksel (5, 10, 15, 20, 25, 50, 80 µM) ve Oleuropein (10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 µM) konsantrasyonları ile muamele edilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Cihazdan 24 saat boyunca 15 dakikalık ölçümler alınmaya devam edilmiştir. Konsantrasyona ve zamana bağlı hücre indeksi değerlerine ait grafikler RTCA Software 2.0 ile çizilmiştir. Elde edilen hücre indeksi verileri ile RTCA sistemi tarafından yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) otomatik olarak hesaplanmıştır.

2.2.3.2. İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi

xCELLigence RTCA ile elde edilen ölçümlerin sonucu kullanılarak inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. İlaç ile muamele edilmemiş olan kontrol grubunun canlılığı %100 olarak kabul edilerek hücrelerin IC₅₀ dozları belirlenmiştir.

2.2.3.3. Kombinasyon dozları ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Paklitaksel ve Oleuropein'in hesaplanan IC₅₀ dozları üzerinden %100, 75, 50, 40, 30, 20, 10 kombinasyon oranları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu kombinasyonların hücreler üzerindeki inhibe edici etkileri xCELLigence RTCA yöntemi ile belirlenmiştir.

2.2.3.4. Kombinasyon indeksinin (CI) belirlenmesi

xCELLigence RTCA cihazından elde edilen farklı kombinasyonların zamana bağlı hücre indeksi değerleri kullanılarak % inhibisyon oranı hesaplanmıştır. CompuSyn programı ile Paklitaksel ve Oleuropein kombinasyonlarının kombinasyon indeksi (CI) verileri hesaplanmıştır. Bu hesaplamayla ilaçların sinerjik ve antagonist etki durumları belirlenmiştir.

2.2.4. TAS/TOS, SOD, GSH ve MDA yöntemleri için hücre lizatlarının hazırlanması

MCF-7 meme kanseri hücre hattı 7×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve plakalar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki besiyeri tamamen çekilmiştir. Paklitaksel ve Oleuropein'in hazırlanan stok solüsyonundan besiyeri içinde seyreltmeler yapılarak RTCA yöntemi ile belirlenen OLE ve PTX IC₅₀ dozları ve CompuSyn programı kullanılarak belirlenen sitotoksik etkili kombinasyon oranları kuyucuklara uygulanmıştır ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyonun sonunda kuyucuklardaki besiyeri çekilmiş ve soğuk PBS ile yıkanıp kuyucuk tabanına yapışık olan hücreler kazıyıcı (cell scraper) ile alınarak falkon tüplere aktarılmıştır. +4 °C'de 1600 rpm devirde 6 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant atılmış ve oluşan pellet tampon çözelti ile ependorflara alınmıştır. Pellet homojenizatör ile parçalanmıştır. Parçalama işleminden sonra +4 °C'de 20 dakika 13000 rpm devirde santrifüjlenmiştir. Süpernatant başka bir ependorfa alınmış ve deneysel analizler için çalışılincaya kadar -20 °C' de saklanmıştır.

2.2.5. Hücrelerdeki oksidatif denge durumunun belirlenmesi

2.2.5.1. Total Oksidan Durum (TOS) yöntemi

Oksidatif stres antioksidanların ROS ve RNS karşısında yetersiz kalması sonucunda oluşan bir durumdur. Antioksidanların serbest radikallerle denge halinde bulunması önemlidir. Dengenin serbest radikaller yönüne kayması diyabet, koroner kalp hastalıkları, kanser gibi pek çok hastalığın oluşumu için zemin hazırlamaktadır.

Hücrelerdeki toplam oksidan miktarı hakkında genel bir bilgi veren TOS yönteminin temel prensibi, örneklerde bulunan oksidanların yöntemde kullanılan şelatör kompleksinin yapısında yer alan Fe^{2+} iyonunu Fe^{3+} iyonuna yükseltgenmesi esasına dayanmaktadır. Ferrik iyon asidik ortamda renk değişimi oluşturmaktadır. Oluşan renk reaksiyonu spektrofotometre ile ölçülerek numunelerdeki toplam oksidan miktarı belirlenebilmektedir (Erel, 2005).

2.2.5.1.1. Yöntemin uygulanması

TOS yöntemi KM211360 Rel Assay Diagnostics ticari kitinin kullanım talimatlarına göre uygulanmıştır.

Ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örneklerden 45 µl alınarak 300 µl Reagent 1 solüsyonu ile karıştırarak spektrofotometre küvetine aktarılmıştır.

Küvetler Reagent 1 eklendikten 30 saniye sonra spektrofotometre cihazında 530 nm dalga boyunda okutulmuş ve oluşan absorbans değeri (A1) elde edilmiştir.

A1 verileri alındıktan sonra her bir küvete 15 µl Reagent 2 eklenmiştir.

Küvetler 5 dakika boyunca 37 °C'de bekletildikten sonra spektrofotometre cihazında 530 nm dalga boyunda okutulmuş ve oluşan absorbans değeri (A2) elde edilmiştir.

Kit içinde yer alan standart çözeltisi ile bir standart küveti ve dH₂O küveti hazırlanmıştır.

Ölçüm sonuçları µmol H₂O₂ Equiv/L cinsinden hesaplanmıştır.

$$A2 - A1 = \Delta Abs \quad (2.1)$$

$$TOS (\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta Abs \text{ Örnek Absorbans}}{\Delta Abs \text{ Standart Absorbans}} \times 10 \quad (2.2)$$

2.2.5.2. Total Antioksidan Durum (TAS) yöntemi

Hücrede oluşan serbest radikallere karşı üretilen antioksidan miktarının belirlenmesi oksidatif denge durumu hakkında bilgi vermektedir. Bu nedenle toplam antioksidan miktarının belirlenmesi önemlidir. Antioksidan miktarının belirlenebilmesi için 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat) (ABTS⁺) temelli yöntemler kullanılmaktadır. Örneklerdeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil olan ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirgemektedir. Örneklerdeki antioksidanlar madde yoğunluğu ile ters orantılı bir şekilde beyazlaşma işlemini kısaltmaktadır. 660 nm dalga boyundaki absorbans değişimi toplam antioksidan durumu hakkında bilgi vermektedir (Erel, 2004).

2.2.5.2.1. Yöntemin uygulanması

TAS yöntemi KM21123A Rel Assay Diagnostics ticari kitinin kullanım talimatlarına göre uygulanmıştır.

Ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örneklerden 18 µl alınarak 300 µl Reagent 1 solüsyonu ile karıştırılarak spektrofotometre küvetine aktarılmıştır.

Küvetler Reagent 1 eklendikten 30 saniye sonra spektrofotometre cihazında 660 nm dalga boyunda okutulmuş ve absorbans değeri (A1) elde edilmiştir.

A1 verileri alındıktan sonra her bir küvete 45 µl Reagent 2 eklenmiştir.

Küvetler 5 dakika boyunca 37 °C'de bekletilip spektrofotometre cihazında 660 nm dalga boyunda okutulmuş ve absorbans değeri (A2) elde edilmiştir.

Ölçüm sonuçları µmol Trolox Equiv/L cinsinden hesaplanmıştır.

$$A2 - A1 = \Delta Abs \quad (2.3)$$

$$TAS \text{ (mmol/L)} = \frac{[(\Delta Abs \text{ dH}_2\text{O}) - (\Delta Abs \text{ Örnek})]}{[(\Delta Abs \text{ dH}_2\text{O}) - (\Delta Abs \text{ Standart})]} \quad (2.4)$$

2.2.5.3. Oksidatif stres indeksinin (OSI) belirlenmesi

Hücrelerin oksidatif denge durumlarının belirlenebilmesi için TOS ve TAS değerleri hesaplandıktan sonra OSI hesaplanmıştır. TAS değeri mmol/L cinsinden elde edildiği için OSI belirlenmeden önce µmol/L cinsine çevrilmiştir.

$$OSI = [TOS/TAS] \times 100 \quad (2.5)$$

2.2.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) ölçümü

SOD hücrel antioksidan metabolizması için çok önemli bir metaloenzimdir. Süperoksit anyonunun moleküler oksijen ve hidrojen peroksit dismutasyonunu katalizlemektedir. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon çok hızlı gerçekleşmektedir.

SOD ölçümü ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen süperoksit radikallerinin tayini için bir tetrazolyum tuzu kullanılarak ölçülmesi prensibine dayanır. SOD ölçümü hücrede bulunan toplam süperoksit dismutaz enzim miktarı hakkında bilgi vermektedir.

2.2.6.1. Yöntemin uygulanması

SOD analizi 706002 Cayman Süperoxide Dismutase Assay ticari kitinin talimatlarına göre uygulanmıştır.

Deney aşamasına geçilmeden önce kullanılacak olan reaktifler kit içeriğinde belirtilen talimatlara göre hazırlanmıştır.

SOD analizi için 96 kuyucuklu plakada standart ve numune için belirlenen kuyucukların her birine Radical Detector solüsyonundan 200 µl eklenmiştir.

Standart kuyucuklarının her birine SOD stok solüsyonu ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlardan 10 µl eklenmiştir.

Numune kuyucuklarının her birine ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örneklerden 10 µl eklenmiştir.

Kullanılan bütün kuyucuklara son olarak 20 µl ksantin oksidaz eklenmiştir.

30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

SOD standart grafiği çizilerek numunelerdeki SOD miktarı hesaplanmıştır.

2.2.7. Redükte Glutatyon (GSH) ölçümü

GSH miktarı hücredeki oksidatif denge durumu hakkında bilgi vermektedir. GSH ksenobiyotiklerin deteksifikasyonunda yardımcı substrat görevindedir.

Yöntem glutatyon redüktaz kullanarak GSH miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. DTNB (5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit) ile reaksiyona giren sülfidril grubu sarı bir renge sahip TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) oluşturur. Bu oluşan

reaksiyon glutatyon redüktaz ile indirgenir ve daha fazla TNB oluşturulur. TNB artışı ile GSH konsantrasyonu doğru orantılıdır. 405-414 nm dalga boyunda belirlenen TNB absorbansı numunede ki GSH miktarı hakkında bilgi vermektedir.

2.2.7.1. Yöntemin uygulanması

GSH analizi 703002 Cayman Glutathione Assay ticari kitinin talimatlarına göre uygulanmıştır.

Deney aşamasına geçilmeden önce kullanılacak olan reaktifler kit içeriğinde belirtilen talimatlara göre hazırlanmıştır ve oda sıcaklığına getirilmiştir.

Standart kuyucuklarının her birine GSH stok solüsyonu ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar 50 µl eklenmiştir.

Numune kuyucuklarının her birine ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örneklerden 50 µl eklenmiştir.

Kit içeriğinde belirtilen talimatlara göre hazırlanan Assay Cocktail numune ve standart kuyularının herbirine 150 µl eklenmiştir.

Karanlık ortamda 25 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

GSH standart grafiği çizilerek numunelerdeki GSH miktarı hesaplanmıştır.

2.2.8. Malondialdehit (MDA) ölçümü

Lipidler reaktif oksijen türlerine karşı duyarlıdır. Bu nedenle oksidatif stres belirteci olarak lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA konsantrasyonunun belirlenmesi çok önemlidir.

Yöntem MDA ve tiyobarbitürik asit'in (TBA) 90-100 °C gibi yüksek sıcaklıklarda ve asidik koşullarda oluşturduğu reaksiyonun 530-540 nm dalga boyunda ölçülmesi prensibine dayanır.

2.2.8.1. Yöntemin uygulanması

MDA analizi 10009055 Cayman TBARS Assay ticari kitinin talimatlarına göre uygulanmıştır.

Deney aşamasına geçilmeden önce kullanılacak olan reaktifler kit içeriğinde belirtilen talimatlara göre hazırlanmıştır.

5 ml'lik şişeler standart ve numuneler için hazırlanmıştır.

Standart stok solüsyonu farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak standart için belirlenen şişelere 100 µl eklenmiştir.

Ön işlem uygulanarak lizis edilmiş örneklerden 100 µl numune için belirlenen şişelere eklenmiştir.

Standart ve numune şişelerine 100 µl sodyum dodesil sülfat (SDS) solution eklenerek karıştırılmıştır.

Standart ve numune şişelerinin her birinin dibine 4 ml Color Reagent eklenerek 1 saat boyunca kaynayan suda bekletilmiştir.

1 saatin sonunda reaksiyonu durdurmak için şişeler hemen buz içine alınmıştır. 10 dakika boyunca buz içerisinde bekletilmiştir.

10 dakika sonra 1600 rpm devirde 4 °C' de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

96 kuyucuklu plakada standart ve numuneler için belirlenen kuyucukların herbirine standart ve numunelerden 150 µl eklenmiştir.

ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.9. Akridin Oranj (AO) ve Ethidium Bromid (EB) boyama ile hücre ölüm şeklinin belirlenmesi

AO/EB çift boyama yöntemi hücrelerdeki apoptoz oranını belirlemeye yönelik morfolojik boyama yöntemlerinden biridir. Bu morfolojik boyama yöntemi canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin floresan mikroskop sayesinde belirlenmesini sağlar (Gherghi vd., 2003). AO canlı hücrelerle birlikte apoptotik hücreleride boyayarak bütün hücrelerin yeşil renkli görünmesini sağlar. EB sitoplazmik zar bütünlüğü bozulmuş olan hücrelerin çekirdeğini kırmızı renge boyar. Boyama sonrasında canlı hücreler yeşil ve fragment içermeyen bir çekirdeğe sahiptir. Erken apoptotik hücreler canlı hücreler gibi yeşil renklidir ancak yoğun ve parçalanmış kromatinleri daha parlak bir yeşil görüntü oluşturmalarına sebep olur. Geç apoptotik hücreler yoğun ve parçalanmış kromatine sahiptir ve turuncu renkli görünmektedir. Nekroz sonucu ölen hücreler ise parçalanmayan normal bir kromatine sahiptir ve turuncu renkli görünmektedirler (Renvoize vd., 1998).

2.2.9.1. Yöntemin uygulanması

24 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde MCF-7 hücrelerinin ekimi yapılarak kültür kabı 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki besiyeri çekilerek OLE ve PTX IC₅₀ dozları ve CompuSyn programı kullanılarak belirlenen sitotoksik etkili kombinasyon oranları kuyucuklara uygulanmıştır ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda besiyeri çekilerek her kuyucuk $1 \times$ PBS ile yıkanmıştır.

PBS atılarak her bir kuyucuğa 1:1 oranında karıştırılan AO/EB karışımından 100 µl eklenmiştir ve karanlık ortamda 7 dakika boya ile inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin ardından $1 \times$ PBS ile yıkama yapılarak floresan mikroskopta görüntü alınmıştır.

Mikroskop görüntülerinden her bir deney grubu için 100 hücre sayılarak apoptoz yüzdesi hesaplanmıştır.

$$\% \text{Apoptosis} = \frac{(\text{erken apoptotik hücreler} + \text{apoptotik hücreler})}{\text{sayılan toplam hücre sayısı}} \times 100 \quad (2.6)$$

2.2.10. İstatistiksel analiz

Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak sunulmuştur.

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8.0.1 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrol ve muamele grupları arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve ardından Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ anlamlılık seviyeleri kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Sitotoksosite Bulguları

3.1.1. RTCA bulguları

E-plate yüzeyine yapışan hücre miktarının elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin gerçek zamanlı olarak ölçülmesi prensibine bağlı olan RTCA yöntemi ile Paklitaksel ve Oleuropein IC₅₀ dozları belirlenmiştir.

MCF-7 meme kanseri hücre hattı farklı konsantrasyonlarda 24 saat Paklitaksel ve Oleuropein ile muamele edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre indeksi verileri ile hücre canlılığı hesaplanmıştır. Konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı değerlerine ait grafikler RTCA Software 2.0 ile çizilmiştir.

3.1.1.1. RTCA sistemi ile Oleuropein'in sitotoksik etkisinin belirlenmesi

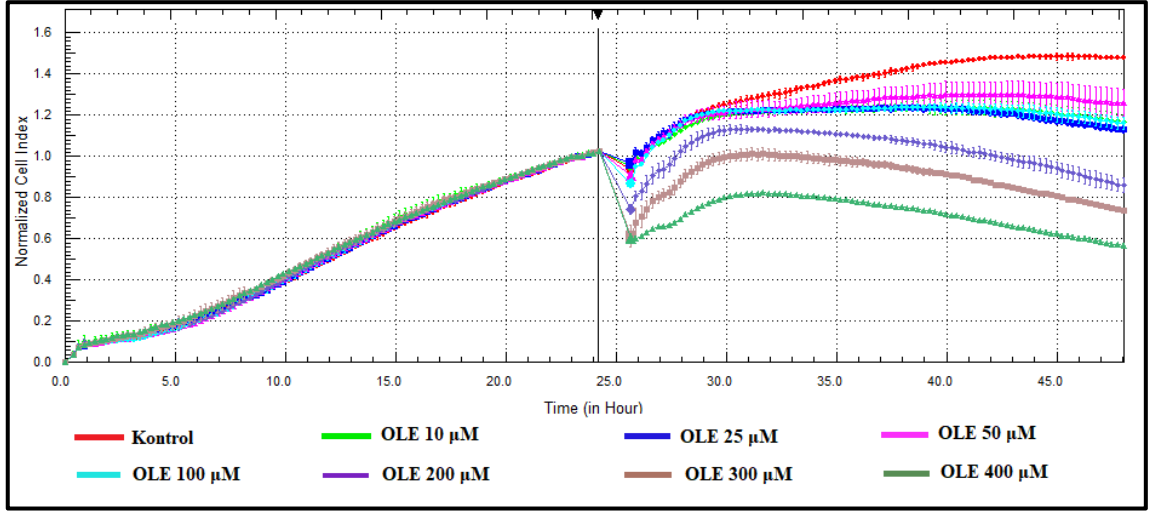
MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde Oleuropein'in sitotoksik etkisini belirleyebilmek için xCELLigence RTCA sistemi ile hücre indeksi parametreleri belirlenmiştir. Oleuropein 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 µM konsantrasyonlarda 24 saat boyunca MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile muamele edilmiştir.

Hücre indeksi değerlerine göre hesaplanan canlılık oranlarında 50 ve 100 µM Oleuropein konsantrasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattının canlılığını diğer konsantrasyonlara göre arttırıcı etki yaptığı saptanmıştır. 200, 300 ve 400 µM konsantrasyonlarda Oleuropein hücre canlılığını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe etmiştir (p<0,05; Tablo 3.1).

Tablo 3.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattının farklı Oleuropein konsantrasyonları ile 24 saatlik muamelesi sonucunda RTCA yöntemi ile ölçülen canlılık oranları (kontrole göre; *p < 0,05, ****p < 0,0001)

Oleuropein konsantrasyonu (µM)	Canlılık (%)
Kontrol (0 µM)	100
10 µM	80,39 ± 3,51**
25 µM	84,71 ± 6,41*
50 µM	98,06 ± 7,44
100 µM	92,59 ± 7,19
200 µM	54,59 ± 0,04****
300 µM	47,36 ± 3,67****
400 µM	32,03 ± 1,07****

RTCA Software 2.0 programında hücre indeksi verileri 24 saate göre normalize edilmiştir. Daha sonra hücre indeksi verilerine ait grafik çizilmiştir (Şekil 3.1). Elde edilen hücre indeksi verileri ile RTCA Software 2.0 programı kullanılarak IC₅₀ dozu hesaplanmıştır ve 24 saatlik muamele sonuçlarına göre Oleuropein IC₅₀ değeri 230 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1.MCF-7 meme kanseri hücre hattının 24 saat boyunca farklı Oleuropein konsantrasyon aralıkları ile muamelesinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen hücre indeksi grafiği

3.1.1.2. RTCA ile Paklitaksel'in sitotoksik etkisinin belirlenmesi

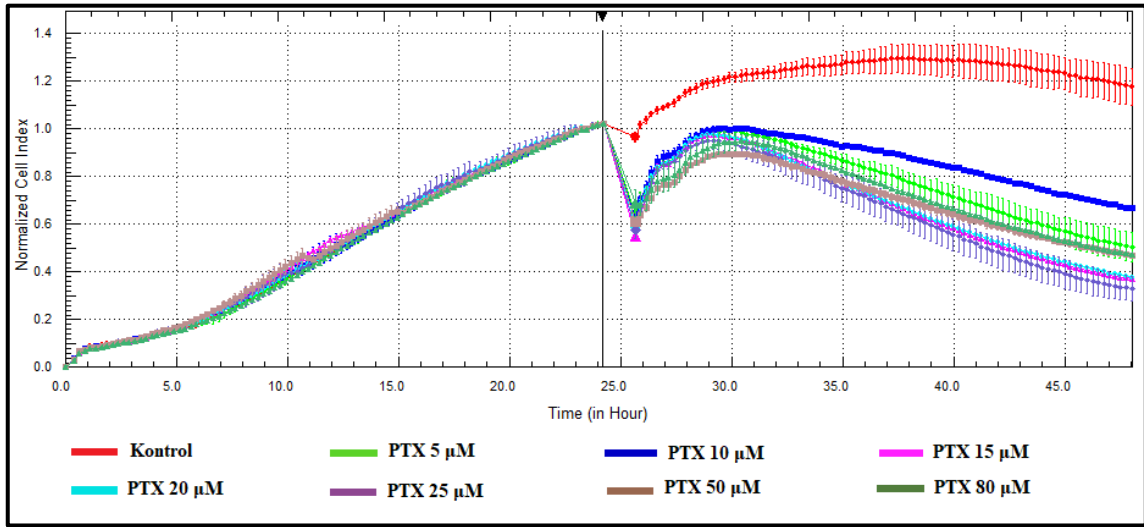
MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde Paklitaksel'in sitotoksik etkisini belirleyebilmek için xCELLigence RTCA sistemi ile hücre indeksi parametreleri belirlenmiştir. Paklitaksel 5, 10, 15, 20, 25, 50, 80 µM konsantrasyonlarda 24 saat boyunca MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile muamele edilmiştir.

5 µM Paklitaksel konsantrasyonunun MCF-7 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği gözlemlenmiştir. MCF-7 hücre hattının 10 µM Paklitaksel konsantrasyonu ile muamelesi sonrasında canlılık yüzdesinde tekrar bir artış olduğu gözlemlenmiştir, ancak uygulanan diğer konsantrasyonlarda canlılık değerlerinde tekrardan bir düşüş saptanmıştır ($p < 0,05$; Tablo 3.2).

Tablo 3.2. MCF-7 meme kanseri hücre hattının farklı Paklitaksel konsantrasyonları ile 24 saatlik muamelesi sonucunda RTCA yöntemi ile ölçülen canlılık oranları (kontrolle göre; **p < 0,01)

Paklitaksel konsantrasyonu (μM)	Canlılık (%)
Kontrol (0 μM)	100
5 μM	46,64 \pm 0,42**
10 μM	61,62 \pm 0,49**
15 μM	37,25 \pm 0,48**
20 μM	38,33 \pm 0,13**
25 μM	31,78 \pm 1,82**
50 μM	41,02 \pm 0,12**
80 μM	37,65 \pm 0,17**

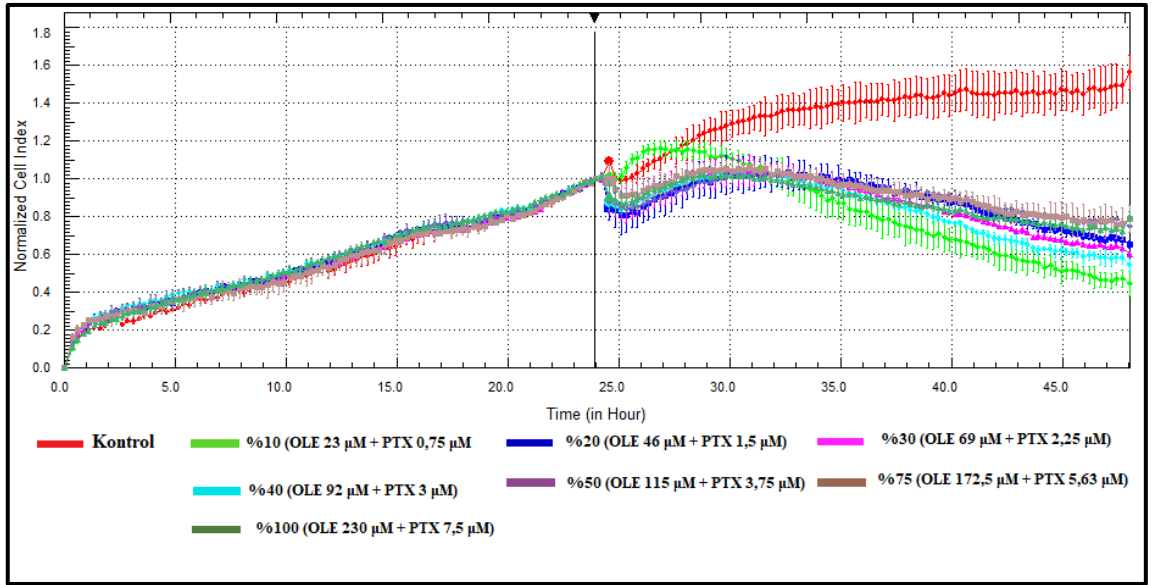
RTCA Software 2.0 programında hücre indeksi verileri 24 saate göre normalize edilmiştir daha sonra hücre indeksi verilerine ait grafik çizilmiştir (Şekil 3.2). Elde edilen hücre indeksi verileri ile RTCA Software 2.0 programı kullanılarak IC₅₀ dozu hesaplanmıştır ve 24 saatlik muamele sonuçlarına göre Paklitaksel IC₅₀ değeri 7,5 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. MCF-7 meme kanseri hücre hattının 24 saat boyunca farklı Paklitaksel konsantrasyon aralıkları ile muamelesinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen hücre indeksi grafiği

3.1.2. Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattında sitotoksik etkilerinin bulguları

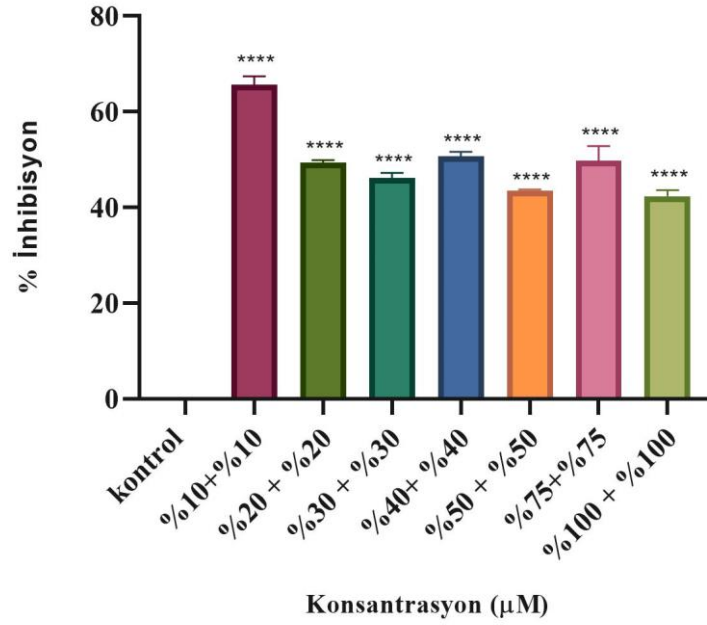
RTCA yöntemi ile Paklitaksel ve Oleuropein IC₅₀ dozları belirlendikten sonra kombinasyon deneylerine geçilmiştir. xCELLigence RTCA sistemi kullanılarak Paklitaksel ve Oleuropein'in IC₅₀ dozlarının farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 hücre hattına olan etkisi belirlenmiştir. RTCA Software 2.0 programında hücre indeksi verileri 24 saate göre normalize edilerek hücre indeksi verilerine ait grafik çizilmiştir (Şekil 3.3). Hücre indeksi verileri ile Paklitaksel ve Oleuropein kombinasyonlarının % inhibisyon oranları bulunmuştur (Tablo 3.3). Farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlara göre en yüksek inhibisyon %67.57 oranında %10 (23 µM OLE + 0,75 µM PTX) kombinasyon grubunda saptanmıştır. MCF-7 hücre hattına uygulanan kombinasyon oranlarının kontrol grubuna göre hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürdüğü saptanmıştır (p<0,05; Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Paklitaksel ve Oleuropein IC₅₀ dozlarının farklı yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyon dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonucunda RTCA sistemi ile elde edilen hücre indeksi grafiği

Tablo 3.3. Paklitaksel ve Oleuropein IC_{50} dozlarının farklı yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyon dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonunda hesaplanan inhibisyon oranları (kontrolle göre; **** $p < 0,0001$)

IC₅₀ Yüzdesi	Dozlar (OLE + PTX)	% İnhibisyon
%10	23 μ M + 0,75 μ M	65,57 \pm 3,19****
%20	46 μ M + 1,5 μ M	49,35 \pm 0,96****
%30	69 μ M + 2,25 μ M	46,18 \pm 1,85****
%40	92 μ M + 3 μ M	50,72 \pm 1,59****
%50	115 μ M + 3,75 μ M	43,56 \pm 0,39****
%75	172,5 μ M + 5,63 μ M	49,69 \pm 5,28****
%100	230 μ M + 7,5 μ M	42,43 \pm 2,17****



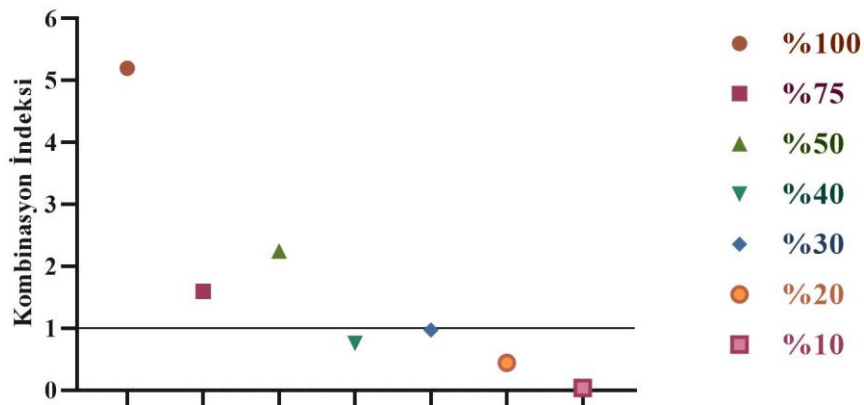
Şekil 3.4. Paklitaksel ve Oleuropein IC_{50} dozlarının farklı yüzdeleri üzerinden hesaplanan kombinasyon dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonunda hesaplanan inhibisyon oranlarının grafiksel gösterimi (kontrolle göre; **** $p < 0,0001$)

3.1.3. Kombinasyon indeksinin (CI) belirlenmesi

Paklitaksel, Oleuropein ve bu iki maddenin farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine sitotoksik etkilerinin RTCA sistemi ile elde edilen verilerine dayanarak kombinasyon indeksi hesaplanmıştır (Tablo 3.4). MCF-7 hücre hattındaki kombinasyonların oksidatif stres üzerine olan sinerjik ve antagonist etkisini belirleyebilmek için CompuSyn programı kullanılmıştır. Program verilerine göre %10 (23 μ M OLE + 0,75 μ M PTX), %20 (46 μ M OLE + 1,5 μ M PTX), %30 (69 μ M OLE + 2,25 μ M PTX) ve %40 (92 μ M OLE + 3 μ M PTX) kombinasyon oranlarının sinerjik etkili olduğu, %100 (230 μ M OLE + 7,5 μ M PTX), %75 (172,5 μ M OLE + 5,63 μ M PTX) ve %50 (115 μ M OLE + 3,75 μ M PTX) kombinasyon oranlarının antagonist etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 3.5). Yapılacak olan diğer deneysel süreçler için sinerjik etki gösteren kombinasyon oranları seçilmiştir.

Tablo 3.4. Oleuropein, Paklitaksel IC_{50} dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki sitotoksikite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri (CI)

IC_{50} Yüzdesi	Dozlar (OLE + PTX)	Kombinasyon indeksi (CI)
%10	23 μ M + 0,75 μ M	0,037
%20	46 μ M + 1,5 μ M	0,443
%30	69 μ M + 2,25 μ M	0,973
%40	92 μ M + 3 μ M	0,756
%50	115 μ M + 3,75 μ M	2,249
%75	172,5 μ M + 5,63 μ M	1,599
%100	230 μ M + 7,5 μ M	5,199



Şekil 3.5. Oleuropein, Paklitaksel IC_{50} dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının sitotoksikite verileri kullanılarak hesaplanan kombinasyon indeksleri ($CI < 1$ (Sinerjistik), $CI = 1$ (Aditif), $CI > 1$ (Antagonist))

3.2. Hücrelerin Oksidatif Denge Durumları

3.2.1. TOS ve TAS bulguları

Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonucu spektrofotometre verileri üzerinden TOS ve TAS değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen TAS verileri (mmol/L), $\mu\text{mol/L}$ cinsine çevrilmiştir (Tablo 3.5).

Oleuropein IC_{50} dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının $6,11\pm 1,11 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanan TOS değeri ile $33,33\pm 4,20 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanan kontrol grubunun TOS değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Paklitaksel IC_{50} dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının $10,00\pm 0,97 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanan TOS değeri ile kontrol grubunun TOS değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

%10, %20, %30 ve %40 kombinasyon oranları ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının sırasıyla $6,67\pm 0,96$, $5,56\pm 1,47$, $3,33\pm 0,96$, $13,33\pm 2,54 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanan TOS değerleri ile kontrol grubunun TOS değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Oleuropein IC_{50} dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının $2783,3\pm 16,67 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanan TAS değeri ile $650\pm 50 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanan kontrol grubunun TAS değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Paklitaksel IC_{50} dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının $1066,7\pm 101,4 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanan TAS değeri ile kontrol grubunun TAS değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

%10, %20, %30 ve %40 kombinasyon oranları ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının sırasıyla $1566,7\pm 120,2$, $2200\pm 115,5$, $2716,7\pm 60,09$, $2216,6\pm 116,7 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanan TAS değerleri ile kontrol grubunun TAS değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 3.5. *Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki total oksidan (TOS) ve antioksidan (TAS) durumuna etkileri (kontrolle göre; *** p < 0,001 , **** p < 0,0001)*

Gruplar	TOS (μmol/L)	TAS (μmol/L)
Kontrol	33,33 ± 4,20	650 ± 50
Ole IC ₅₀ [230 μM]	6,11 ± 1,11****	2783,3 ± 16,67****
PTX IC ₅₀ [7,5 μM]	10,00 ± 0,97****	1066,7 ± 101,4***
%10 KOMBİNE [23 μM OLE + 0,75 μM PTX]	6,67 ± 0,96****	1566,7 ± 120,2****
%20 KOMBİNE [46 μM OLE + 1,5 μM PTX]	5,56 ± 1,47****	2200 ± 115,5****
%30 KOMBİNE [69 μM OLE + 2,25 μM PTX]	3,33 ± 0,96****	2716,7 ± 60,09****
%40 KOMBİNE [92 μM OLE + 3 μM PTX]	13,33 ± 2,54***	2216,6 ± 116,7****

3.2.2. OSI değerlerinin hesaplanması

MCF-7 meme kanseri hücre hattına Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının uygulanması sonrası elde edilen TOS ve TAS değerleri kullanılarak OSI değerleri hesaplanmıştır (Tablo 3.6).

Oleuropein IC₅₀ dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının 0,22±0,04 μmol/L olarak hesaplanan OSI değeri ile 5,24±0,92 μmol/L olarak hesaplanan kontrol grubunun OSI değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır (p<0,05). Paklitaksel IC₅₀ dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının 0,94±0,09 μmol/L olarak hesaplanan OSI değeri ile kontrol grubunun OSI değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (p<0,05). %10, %20, %30 ve %40 kombinasyon oranları ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının sırasıyla 0,42±0,05, 0,26±0,07, 0,12±0,03, 0,62±0,15μmol/L olarak hesaplanan OSI değerleri ile kontrol grubunun OSI değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu saptanmıştır (p<0,05). (p<0,05).

Tablo 3.6. *TOS ve TAS değerleri kullanılarak hesaplanan oksitatif stres indeksi (OSI) değerleri (kontrolle göre; ****p < 0,0001)*

Gruplar	OSI ([TOS/TAS]x100)
Kontrol	5,24 ± 0,92
Ole IC ₅₀ [230 μM]	0,22 ± 0,04****
PTX IC ₅₀ [7,5 μM]	0,94 ± 0,09****
%10 KOMBİNE [23 μM OLE + 0,75 μM PTX]	0,42 ± 0,05****
%20 KOMBİNE [46 μM OLE + 1,5 μM PTX]	0,26 ± 0,07****
%30 KOMBİNE [69 μM OLE + 2,25 μM PTX]	0,12 ± 0,03****
%40 KOMBİNE [92 μM OLE + 3 μM PTX]	0,62 ± 0,15****

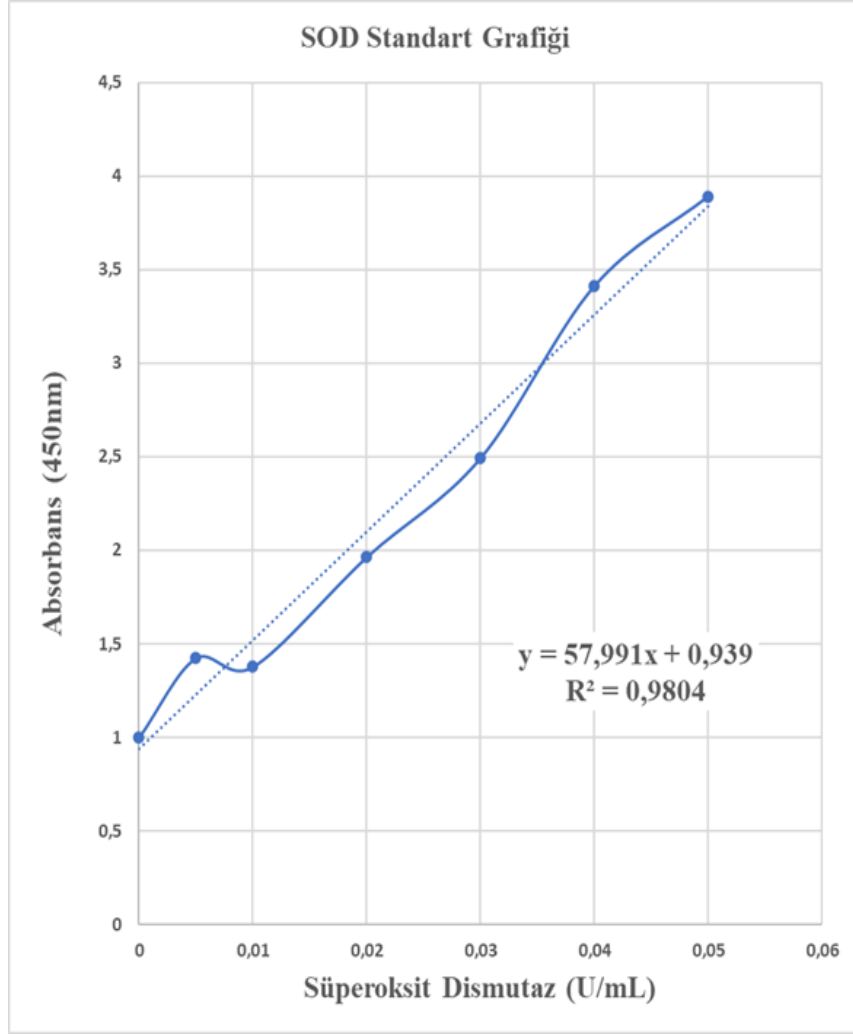
3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Bulguları

SOD aktivitesini hesaplayabilmek için SOD standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.6). Çizilen standart grafiğine göre Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonucu SOD aktivitesi hesaplanmıştır.

%20 (46 µM OLE + 1,5 µM PTX) ve %30 (69 µM OLE + 2,25 µM PTX) kombinasyon oranları ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının sırasıyla 1,542±0,29 ve 1,445±0,22 U/mL olarak hesaplanan SOD aktivitesinin, 0,733±0,09 U/mL olarak hesaplanan kontrol grubunun SOD aktivitesine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (p<0,05).

Oleuropein IC₅₀ dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının 0,436±0,05 U/mL olarak hesaplanan SOD aktivitesinin, kontrol grubunun SOD aktivitesine göre düştüğü saptanmıştır, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

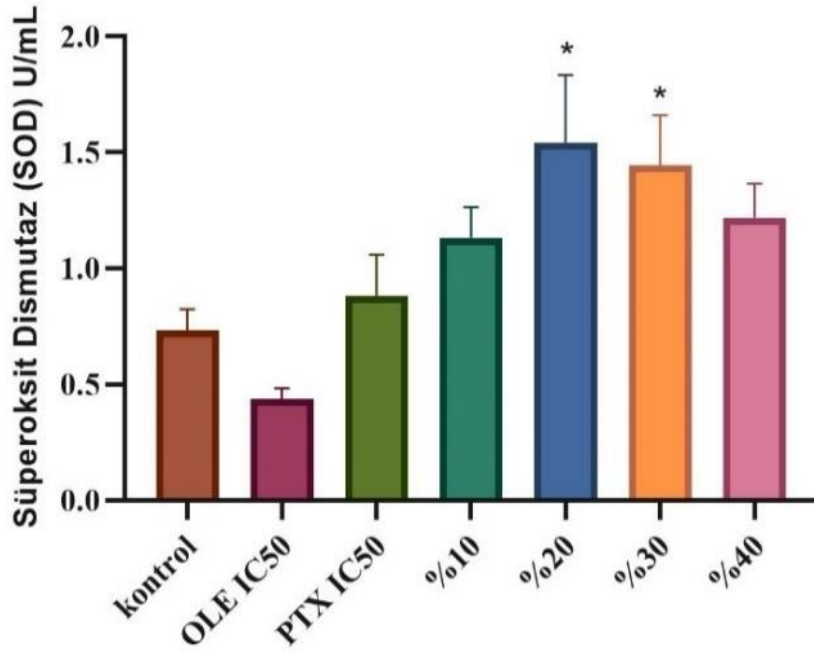
Paklitaksel IC₅₀ dozu, %10 (23 µM OLE + 0,75 µM PTX) ve %40 (92 µM OLE + 3 µM PTX) kombinasyon oranlarının sırasıyla 0,882±0,18, 1,132±0,13, ve 1,219±0,15 U/mL olarak hesaplanan SOD aktivitelerinin, kontrol grubunun SOD aktivitesine göre arttığı saptanmış, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05; Tablo 3.7; Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) standart grafiği

Tablo 3.7. Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki SOD aktivasyon sonuçları (kontrolle göre; *p < 0,05)

Gruplar	SOD (U/mL)
Kontrol	0,733 ± 0,09
Ole IC ₅₀ [230 µM]	0,436 ± 0,05
PTX IC ₅₀ [7,5 µM]	0,882 ± 0,18
%10 KOMBİNE [23 µM OLE + 0,75 µM PTX]	1,132 ± 0,13
%20 KOMBİNE [46 µM OLE + 1,5 µM PTX]	1,542 ± 0,29*
%30 KOMBİNE [69 µM OLE + 2,25 µM PTX]	1,445 ± 0,22*
%40 KOMBİNE [92 µM OLE + 3 µM PTX]	1,219 ± 0,15



Şekil 3.7. Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki SOD aktivasyon sonuçları (kontrolle göre; *p < 0,05)

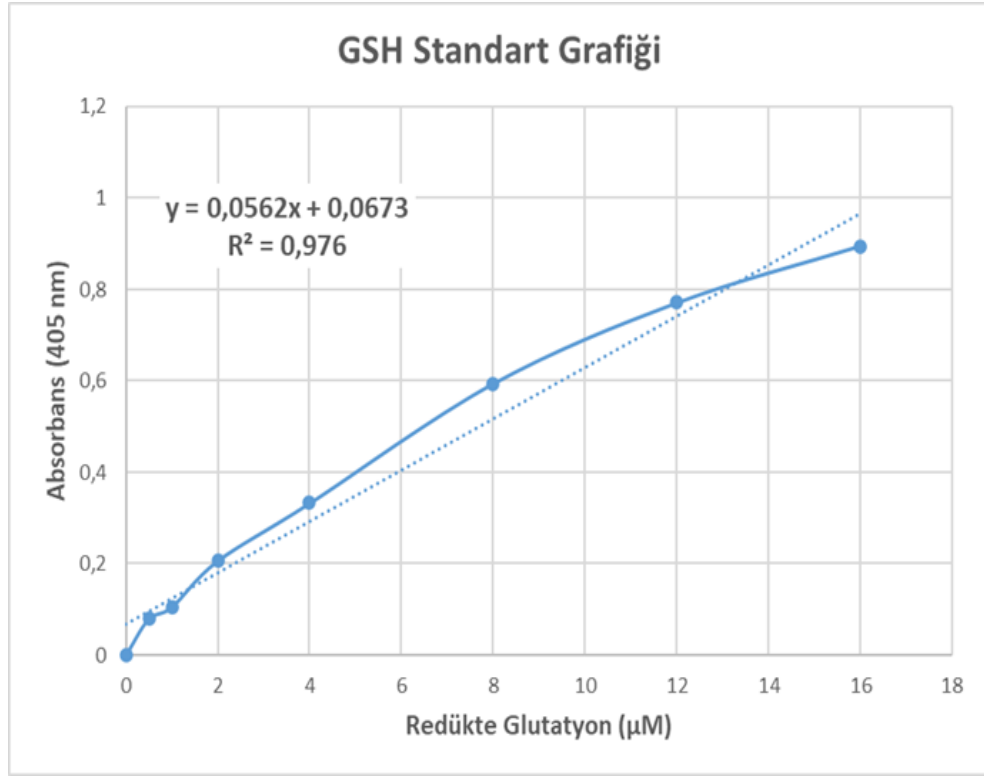
3.4. Redükte Glutasyon (GSH) Bulguları

GSH aktivitesini hesaplayabilmek için GSH standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.8). Çizilen standart grafiğine göre Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonucu GSH aktivitesi hesaplanmıştır.

Oleuropein IC₅₀ dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının 4,318±0,98 µM olarak hesaplanan GSH aktivitesinin, 10,413±1,43 µM olarak hesaplanan kontrol grubunun GSH aktivitesine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır (p<0,05).

%10 (23 µM OLE + 0,75 µM PTX) ve %30 (69 µM OLE + 2,25 µM PTX) kombinasyon oranları ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının sırasıyla 5,123±1,24 ve 6,255±1,71 µM olarak hesaplanan GSH aktivitesinin kontrol grubunun GSH aktivitesine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır (p<0,05).

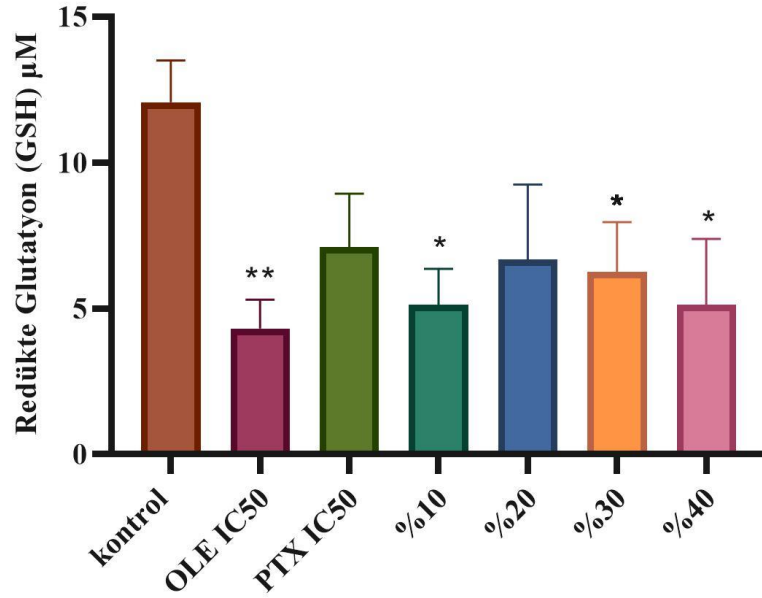
Paklitaksel IC₅₀ dozu, %20 (46 µM OLE + 1,5µM PTX) ve %40 (92 µM OLE + 3 µM PTX) kombinasyon oranlarının 7,097±1,84, 6,679±2,57 ve 5,128±2,26 µM olarak hesaplanan GSH aktivitelerinin kontrol grubunun GSH aktivitesine göre düştüğü saptanmıştır ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05; Tablo 3.8; Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Redükte Glutatyon (GSH) Standart Grafiği

Tablo 3.8. Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki GSH aktivasyon sonuçları (kontrolle göre; *p < 0,05 , ** p < 0,01)

Gruplar	GSH (µM)
Kontrol	10,413 ± 1,43
Ole IC ₅₀ [230 µM]	4,318 ± 0,98**
PTX IC ₅₀ [7,5 µM]	7,097 ± 1,84
%10 KOMBİNE [23 µM OLE + 0,75 µM PTX]	5,123 ± 1,24*
%20 KOMBİNE [46 µM OLE + 1,5 µM PTX]	6,679 ± 2,57
%30 KOMBİNE [69 µM OLE + 2,25 µM PTX]	6,255 ± 1,71*
%40 KOMBİNE [92 µM OLE + 3 µM PTX]	5,128 ± 2,26*



Şekil 3.9. Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki GSH aktivasyon sonuçları (kontrolle göre; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

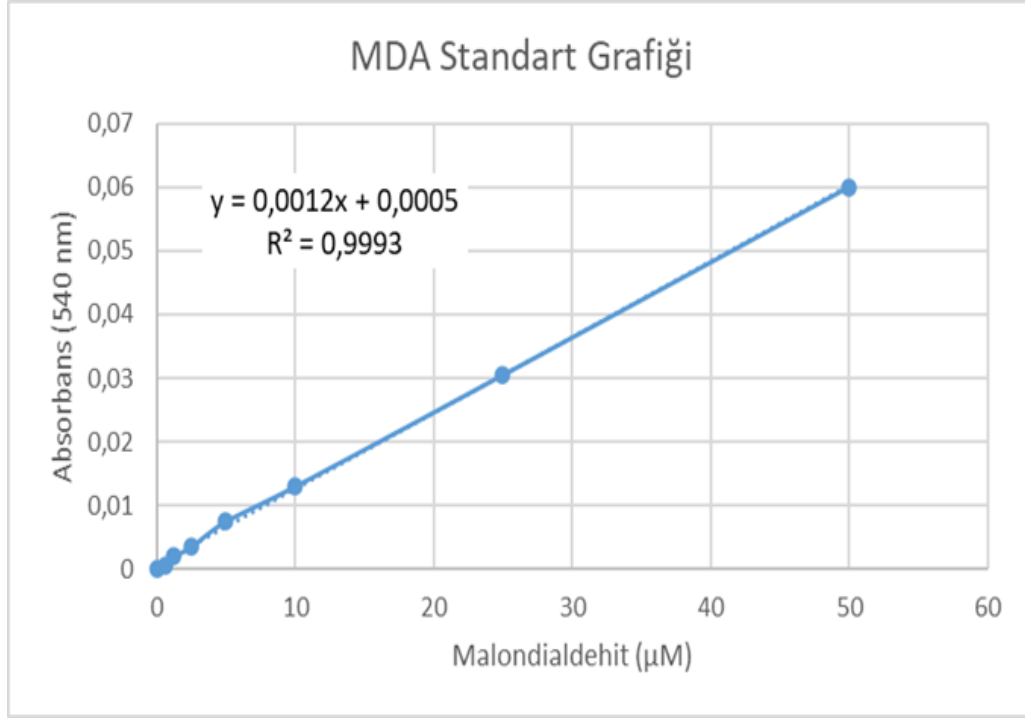
3.5. Malondialdehit (MDA) Bulguları

MDA aktivitesini hesaplayabilmek için MDA standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.10). Çizilen standart grafiğine göre Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonucu MDA aktivitesi hesaplanmıştır.

Paklitaksel IC₅₀ dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının 1,667±0,71 µM olarak hesaplanan MDA değeri ile 0,625±0,12 µM olarak hesaplanan kontrol grubunun MDA değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).

%10 (23 µM OLE + 0,75 µM PTX), %20 (46 µM OLE + 1,5 µM PTX), %30 (69 µM OLE + 2,25 µM PTX) ve %40 (92 µM OLE + 3 µM PTX) kombinasyon oranlarının sırasıyla 3,682±0,39, 2,708±0,45, 1,875±0,12 ve 3,165±0,20 µM olarak hesaplanan MDA değerleri ile kontrol grubunun MDA değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).

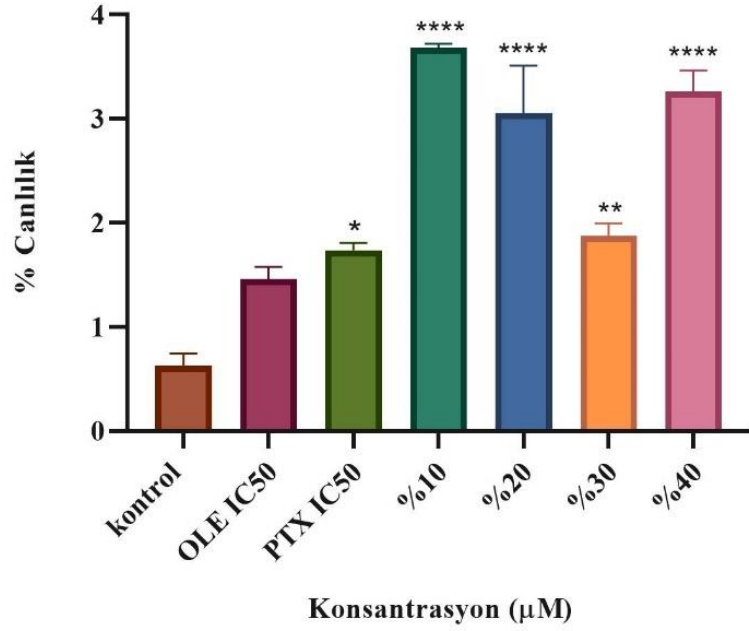
Oleuropein IC₅₀ dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattının 1,458±0,13 µM olarak hesaplanan MDA değeri ile kontrol grubunun MDA değeri arasında artış saptanmıştır, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05; Tablo 3.9; Şekil 3.11).



Şekil 3.10. Malondialdehit (MDA) Standart Grafiği

Tablo 3.9. Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki MDA aktivasyon sonuçları (kontrolle göre; *p < 0,05 , ** p < 0,01, **** p < 0,0001)

Gruplar	MDA (µM)
Kontrol	0,625 ± 0,12
Ole IC ₅₀ [230 µM]	1,458 ± 0,13
PTX IC ₅₀ [7,5 µM]	1,667 ± 0,71*
%10 KOMBİNE [23 µM OLE + 0,75 µM PTX]	3,682 ± 0,39****
%20 KOMBİNE [46 µM OLE + 1,5 µM PTX]	2,708 ± 0,45****
%30 KOMBİNE [69 µM OLE + 2,25 µM PTX]	1,875 ± 0,12**
%40 KOMBİNE [92 µM OLE + 3 µM PTX]	3,165 ± 0,20****



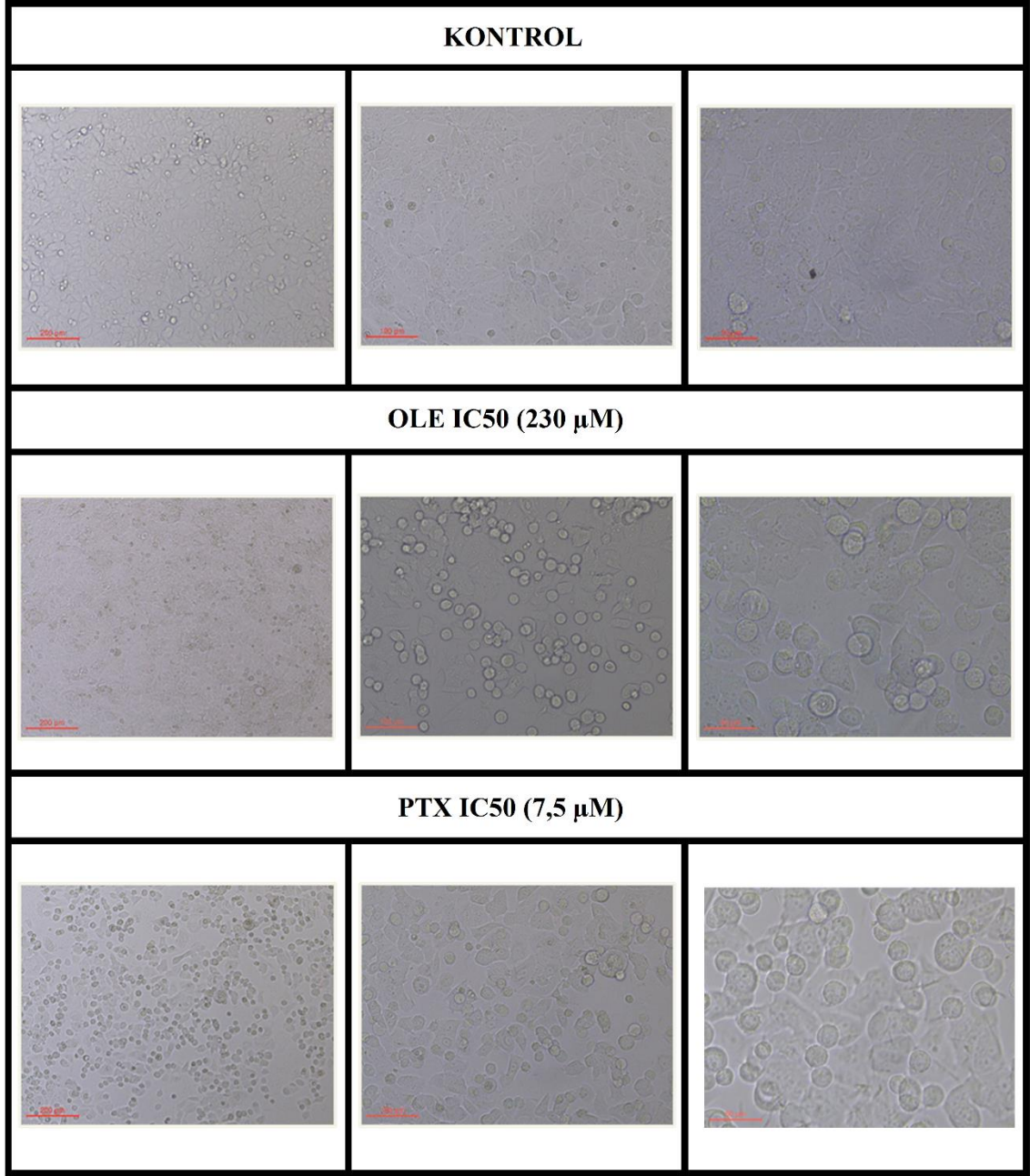
Şekil 3.11. Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki MDA aktivasyon sonuçları (kontrole göre; **p* < 0,05 , ** *p* < 0,01, **** *p* < 0,0001)

3.6. OLE ve PTX Kombinasyonlarının Hücre Morfolojisine Etkisi

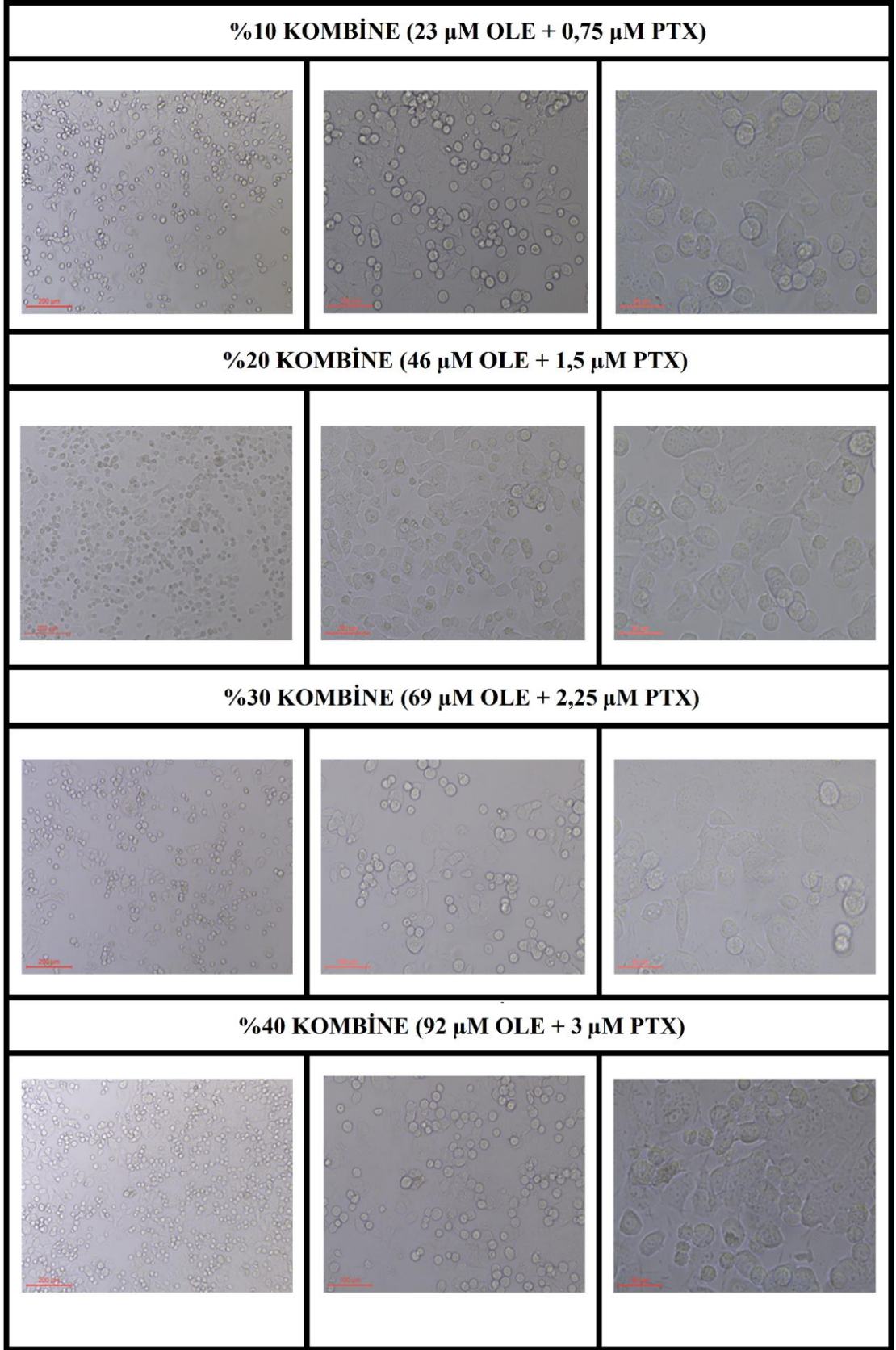
Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonunda ışık mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır.

200, 100 ve 50 µm büyütme oranlarında gösterilen görüntülerde tek başına Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının kontrol grubu MCF-7 hücrelerine göre morfolojik değişimleri görülmektedir (Şekil 3.12; Şekil 3.13).

Kontrol grubu MCF-7 meme kanseri hücre hattına göre Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları uygulanan hücrelerin birbirleri ile olan bağlantısının azaldığı, plakaya tutunan hücrelerin azaldığı ve hücrelerin şeklinin yuvarlaklaştığı gözlemlenmiştir bu etki Oleuropein ve Paklitaksel IC₅₀ dozlarının farklı yüzdeleri ile oluşturulan %10, %20, %30 ve %40 kombinasyon gruplarında da devam etmiştir.



Şekil 3.12. Farklı büyütme oranlarında (200 µm, 100 µm, 50 µm) Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine morfolojik etkileri



Şekil 3.13. Farklı büyütme oranlarında (200 μ m, 100 μ m, 50 μ m) Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine morfolojik etkisi

3.7. Akridin Oranj (AO) ve Ethidium Bromid (EB) Boyama Bulguları

Oleuropein ve Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının 24 saatlik MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile muamelesi sonucunda apoptoza bağlı gelişen morfolojik etkisini belirlemek amacıyla, AO/EB çift boyama yöntemi yapılmıştır. Floresan mikroskopta 200 µm büyütme de 100 hücre sayılarak canlı hücreler ve apoptotik hücrelerin oranları belirlenmiştir (Tablo 3.10).

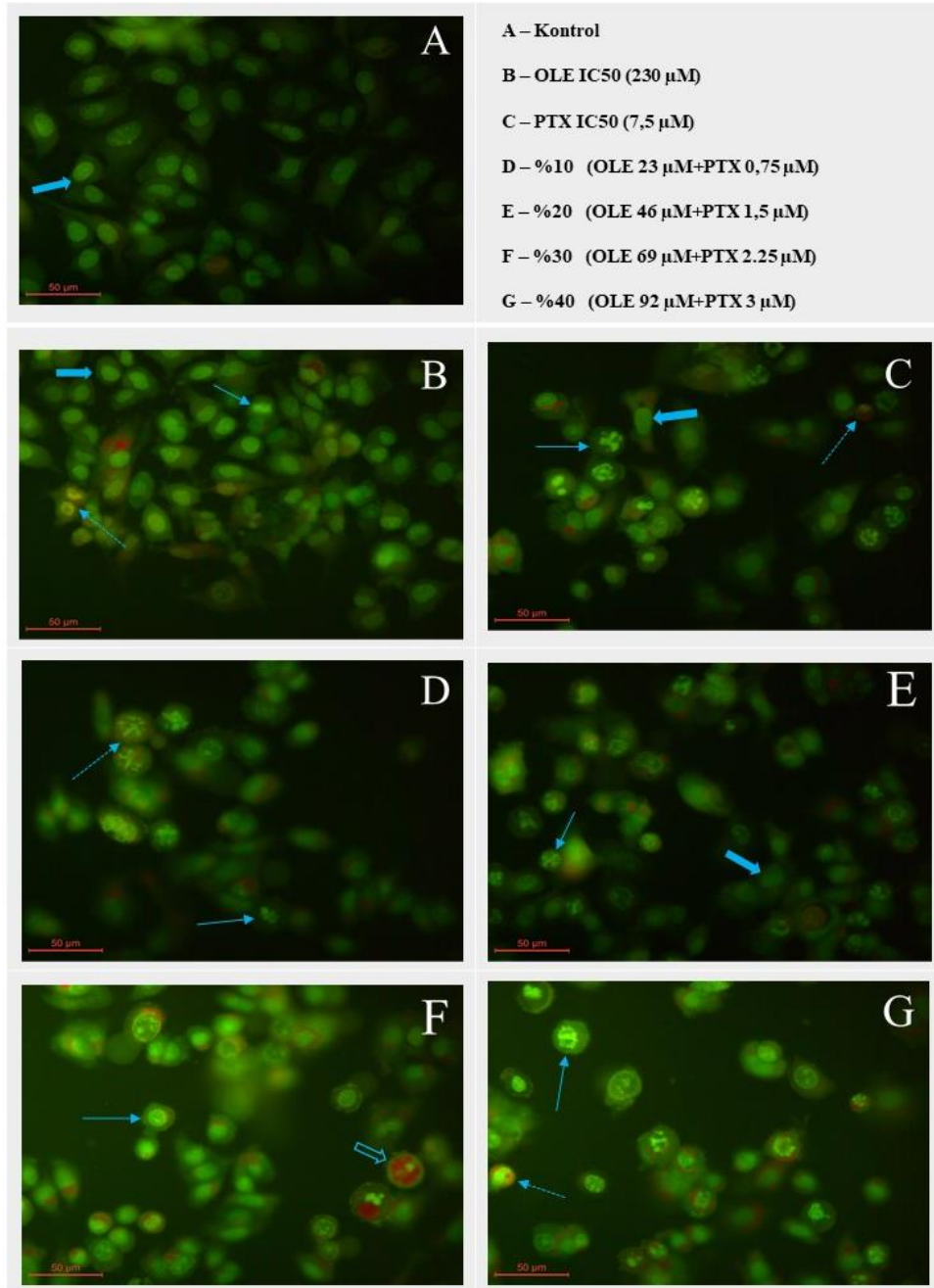
Yeşil renge sahip homojen dağılan hücreler canlı, parlak yeşil renge sahip yoğunlaşmış kromatine sahip fragmentli hücreler erken apoptotik, turuncu renge sahip parçalanmış kromatinli ve fragmentli olan hücreler geç apoptotik ve parçalanmamış normal kromatinli fragmentsiz parlak turuncu ve kırmızı renkte görülen hücreler nekrotik olarak değerlendirilmiştir.

Oleuropein IC₅₀ dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattında turuncu renkte geç apoptotik hücrelerin oluştuğu ve yeşil fragmentli parlak renge sahip olan erken apoptotik hücrelerin oluştuğu kontrol grubuna göre hücre yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir. Paklitaksel IC₅₀ dozu ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattında kromozomların belirgin şekilde parçalı bir yapıda olduğu ve canlı hücrelere göre daha parlak oldukları gözlemlenmiştir.

Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyon gruplarında erken ve geç apoptotik hücrelerin sayılarının belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre yoğunluğu ve hücrelerin birbiri ile olan bağlantılarının azaldığı ve hücrelerin yuvarlak yapı kazandığı gözlemlenmiştir. Kombinasyon gruplarında apoptotik ve nekrotik hücrelerin plakadan ayrıldığı ve birbirleri ile olan bağlantının kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.14).

Tablo 3.10. *Oleuropein ve Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile muamelesi sonucunda oluşan canlı ve apoptotik hücre yüzdeleri*

Gruplar	Canlı hücre (%)	Apoptotik hücre (%)
Kontrol	95,5	4,5
Ole IC ₅₀ [230 µM]	55	45
PTX IC ₅₀ [7,5 µM]	49,5	50,5
%10 KOMBİNE [23 µM OLE + 0,75 µM PTX]	48	52
%20 KOMBİNE [46 µM OLE + 1,5 µM PTX]	45,5	54,5
%30 KOMBİNE [69 µM OLE + 2,25 µM PTX]	40	60
%40 KOMBİNE [92 µM OLE + 3 µM PTX]	44	56



Şekil 3.14. Oleuropein, Paklitaksel IC₅₀ dozları ve farklı yüzdelerde oluşturulan kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile muamelesinin AO/EB boyama sonuçları (Canlı hücreler \rightarrow , erken apoptoz \rightarrow , geç apoptoz $-\ - - \rightarrow$, nekroz \Rightarrow ile gösterilmiştir).

4. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınları etkileyen diğer kanser türleri arasında %24'lük bir kısmı oluşturmaktadır. Dünya çapında yaklaşık iki milyon kadını etkilemektedir ve yılda 620.000' den fazla kadının kanserden ölümü ile sonuçlanmaktadır (Ferlay vd., 2019). İnsidans ve ölüm oranlarına göre meme kanseri kadınlarda görülen en yaygın kanser türü olmaktadır. Sürekli artan meme kanseri vakaları ve ölüm oranları daha etkili olan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini tetiklemektedir. Kanser tedavisinde kullanılan etkili yaklaşım kemoterapi ve radyoterapi ile kombine edilen cerrahidir, ancak kanserli hücrelerin ilaç hedeflerini değiştirme, antiapoptotik proteinlerin üretimini artırma ve karsinogenezde yer alan farklı iletim yollarını modüle etme yetenekleri bu tedavi yöntemlerine karşı kanserli hücrelerin dirençli hale gelmesine sebep olmaktadır (Nabekura, 2010; Fantini vd., 2015). Meme kanseri tedavisinde kullanılan etkisi kanıtlanmış çok sayıda kemoterapötik ajan vardır ve mevcut kemoterapötik ajanlardan beklenen en önemli etki kanserli hücrelerin büyüme, hayatta kalma ve farklılaşma gibi temel süreçlerini içeren sinyal yollarını tahrip etmesidir (Altmann ve Gertsch, 2007). Bu kemoterapötik ajanlardan birisi olan Paklitaksel meme kanseri, yumurtalık kanseri, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri gibi birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajandır (Haddad vd., 2022). Paklitaksel mikrotübüllere etki ederek mikrotübül içindeki dengeyi bozmaktadır ve hücreyi G2/M fazında durdurarak apoptoz mekanizmalarının tetiklenmesi ile ölüme götürmektedir (Rowinsky, Cazenave ve Donehower, 1990). Tümör hücrelerini öldürme amacı olan kemoterapi ajanlarının kanser hücresi üzerinde ki bu öldürücü etkilerinin yanında normal hücrelere verdikleri hasar çok fazladır (Yue, Liu ve Guo, 2010; Li vd., 2015). Kanserli hücreler ile birlikte vücuttaki normal hücrelerin etkilenmesi ile kalpte, akciğerlerde ve üreme sisteminde kalıcı hasarlar meydana gelebilir. Paklitaksel'in klinik alanda kullanımıyla ilişkili bazı tutarsızlıklar mevcuttur ve bu yüzden kanser hücresi direncinin azaltılmasıyla ilişkili özelliklerinin iyileştirilmesi, kanser tedavisindeki etkinliğinin artırılması ve kullanımdan dolayı oluşan yan etkilerin azaltılması son derece önemlidir (Abu Samaan vd., 2019) Bu nedenle normal hücrelere verilen hasarın en aza indirildiği toksik olmayan kolayca ulaşılabilen daha etkili bileşikler ile birlikte yeni tedavilere ihtiyaç vardır. Çeşitli *in vitro* çalışmalar, doğal polifenollerin kemoterapötiklerle kombinasyon halinde kullanılmasının antikanser etkinliği arttırabileceğini, kemoterapinin yan etkilerini azaltabileceğini ve kanser hücrelerinin

kemoterapi ve radyoterapiye karşı gösterdiği direnci aşabileceğini bildirmiştir (Fantini vd., 2015; Nurgali, Jagoe ve Abalo, 2018). Son yıllarda yapılan çalışmalar zeytin ağacından elde edilen meyve ve yaprakların antikanser etkileri olduğunu ve bu etkinin içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerle ilişkili olduğunu göstermektedir (Casaburi vd., 2013; Serra-Majem vd., 2003). Ayrıca zeytin polifenolleri, gıda, diyet takviyeleri, fonksiyonel gıdalar ve doğal kozmetiklerin yanı sıra farmasötik endüstriler için potansiyel antioksidan katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır (Obied vd., 2007). Oleuropein, zeytin yaprağı ve meyvesinde bol miktarda bulunan ve zeytinin acı tadından sorumlu olan doğal fenolik bir bileşiktir (Vaughan vd., 2004; Somova vd., 2003). Oleuropein'in antikanser, antioksidan, antidiyabetik, kardiyoprotektif, nöroprotektif gibi sağlık için faydalı etkileri bulunmaktadır (Gorzynik-Debicka vd., 2018; Cicerale, Lucas ve Keast, 2012). Birçok çalışma, Oleuropein'in kanser hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozunu ve farklılaşmasını kontrol eden genlerin ekspresyonu üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (Di Francesco vd., 2015; Hassan vd., 2012). Ayrıca yapılan çalışmalar, Oleuropein' in antioksidan cevabın artmasına yol açtığını ve peroksidasyona karşı yeterli bir koruma sağlayabildiğini ve serbest radikal türlerini temizleyerek oksidatif stresi önleyebildiğini göstermiştir (Žukovec Topalović vd., 2015; Visioli ve Galli 2002).

Güçlü antioksidan ve antikanser özelliklere sahip Oleuropein'in uygulanarak Paklitaksel'in sitotoksik etki dozunu aşağı çekip çekmediğini incelemeyi amaçladığımız çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde Paklitaksel ve Oleuropein'in ayrı ayrı ve kombine uygulamalarının oksidatif stres üzerine olan etkileri incelenmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre hattında Oleuropein ve Paklitaksel'in sitotoksik etkileri ve IC₅₀ dozları belirlenmiştir. MCF-7 hücre hattına 24 saatlik Oleuropein, Paklitaksel ve kombine uygulamalarının TOS ve TAS düzeylerine etkisine bakılmıştır. Belirlenen TAS ve TOS değerleri ile OSI hesaplanmıştır ve oksidatif stres belirteçleri olan SOD, GSH, MDA aktivitelerine olan etkisi ölçülmüştür.

Oleuropein, Paklitaksel ve kombinasyonlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattına olan sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla xCELLigence RTCA yöntemi kullanılmıştır. RTCA yöntemi ile farklı konsantrasyon uygulamalarının hücre canlılığına olan etkisi belirlenmiştir. Paklitaksel meme kanseri tedavisinde kullanılan etkinliği kanıtlanmış taksan sınıfına ait kemoterapötik ajandır. Daha önceki çalışmalarda MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkili olduğu bildirilmiştir (Wang vd.,

2007). Yapmış olduğumuz çalışmada, Paklitaksel'in MCF-7 meme kanseri hücre hattına olan sitotoksik etkisini belirleyebilmek için 5, 10, 15, 20, 25, 50 ve 80 μM konsantrasyon aralıkları 24 saat boyunca hücreler ile muamele edilmiştir. RTCA yöntemi ile ölçülen hücre indeksi verileri kullanılarak konsantrasyon aralıklarının yüzde canlılıkları hesaplanmıştır. Paklitakselin 24 saat sonundaki IC_{50} değerinin 7,5 μM olduğu saptanmıştır.

Oleuropein antikanser ve antioksidan özellikleri olan doğal bir fenolik bileşiktir (Nenadis, Papoti ve Tsimidou, 2021; Piroddi vd., 2017). Arı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Oleuropein ve D vitamini kombinasyonlarının MCF-7 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif, antiapoptotik ve antioksidan etkisi incelenmiştir. WST-1 yöntemi ile yapılan sitotoksikite çalışması sonucunda Oleuropein'in 24. saatteki IC_{50} değeri 256,1 μM , 48. saatteki IC_{50} değeri 247,5 μM olarak bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada Oleuropein'in antiproliferatif ve apoptotik etkileri incelenmiştir ve MCF-7 meme kanseri hücre hattında hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu uyardığı bildirilmiştir. MTT testi ile yapılan sitotoksikite çalışması ile Oleuropein IC_{50} dozu sırasıyla 200 $\mu\text{g/ml}$ (370 μM) olarak bulunmuştur. (Han vd., 2009). Yapmış olduğumuz çalışmada Oleuropein'in MCF-7 meme kanseri hücre hattına olan sitotoksik etkisini belirleyebilmek için 10, 25, 50, 100, 200, 300 ve 400 μM konsantrasyon aralıkları 24 saat boyunca hücreler ile muamele edilmiştir. RTCA yöntemi ile ölçülen hücre indeksi verileri kullanılarak konsantrasyon aralıklarının yüzde canlılıkları hesaplanmıştır. Oleuropein'in 24 saat sonundaki IC_{50} değerinin 230 μM olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz verilere göre Oleuropein'in sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır.

Hücreler üzerine sinerjik etkilerinin belirlenebilmesi için Oleuropein ve Paklitaksel'in IC_{50} dozlarından farklı yüzdelerde kombinasyonlar oluşturulmuştur. Oleuropein ve Paklitaksel'in %100 (230 μM OLE + 7,5 μM PTX), %75 (172,5 μM OLE + 5,63 μM PTX) ve %50 (115 μM OLE + 3,75 μM PTX) kombinasyon oranlarının MCF-7 hücreleri üzerinde sırasıyla %42,43, %49,69, %43,56 sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. %40 (92 μM OLE + 3 μM PTX), %30 (69 μM OLE + 2,25 μM PTX), %20 (46 μM OLE + 1,5 μM PTX) ve %10 (23 μM OLE + 0,75 μM PTX) kombinasyon oranlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri sırasıyla %50,72, %46,18, %49,35, %65,57 olarak bulunmuştur. Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyonlarının oksidatif stres üzerine olan etkilerini belirlemek için CompuSyn programı ile hesaplanan sonuçlara göre sinerjik etki gösteren %10, %20, %30 ve

%40'lık kombinasyon oranları seçilmiştir. Hesaplanan kombinasyon indeksi bulgularına göre %65,57 oranında sinerjik etki gösterdiği saptanan %10'luk kombinasyon grubundaki Paklitaksel (0,75 μ M) dozu Paklitaksel'in tek başına MCF-7 hücre hattı üzerindeki IC₅₀ (7,5 μ M) dozuna göre oldukça düşüktür ve bunun deneysel çalışmamız sonucunda Oleuropein ile kombinasyon halinde uygulanmasının bir sonucu olduğunu düşündürmüştür. Kemoterapotik ajan olarak kullanılan Paklitaksel'in normal vücut hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve tedavi sonucunda ciddi yan etkileri olabildiği göz önüne alındığında Paklitaksel dozunun düşmesi toksik etkisini sınırlayabilir. Daha önceki çalışmalar Oleuropein'in normal hücreler üzerine önemli bir sitotoksik etkilerinin olmadığını bildirmiştir (Elamin vd., 2013; Cao, Zhu, ve Du, 2017).

ROS normalde hücreler tarafından üretilir ve antioksidan savunma ile dengede tutulur ancak bu dengenin bozulması ve aşırı ROS birikmesi oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres hücreler için zararlı bir durumdur ve kanser gibi birçok hastalığın oluşmasında tetikleyici olabilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının tedavi stratejilerinin oksidatif stresi artırıcı etkili olabildiği bildirilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Paklitaksel gibi taksan grubu ilaçlar ROS üretimini artırarak hücrelerde sitokrom C salınımını tetikleyerek geri dönüşü olmayan oksidatif hasarın oluşmasını ve apoptoz mekanizmasının başlatılmasını sağlar (Kaufmann ve Earnshaw, 2000). Yapılan *in vitro* çalışmalarda, Paklitaksel'in meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu etkilerken aynı zamanda oksidatif stresi arttırdığı bildirilmiştir (Schrijvers, 2003; Alexandre vd., 2007; Hadzic vd., 2010). Kanser tedavisi sırasında kemoterapötik ajanların bu etkisi normal hücrelerin de etkilenmesine ve hastada olumsuz durumların oluşmasına neden olabilmektedir. Özellikle etkili bir kanser tedavisi geliştirilirken normal hücrelere verilen hasarın en aza indirilmesi ve yan etkilerin sınırlandırılması önemlidir ve bu nedenle alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu sebeple doğal bileşiklerle kombinasyon tedavileri önem kazanmaktadır (Telang, Nair ve Wong, 2019). Yapmış olduğumuz çalışmaya göre, Paklitaksel IC₅₀ dozu uygulanan MCF-7 hücre grubunda OSI değeri 0,94±0,09 olarak bulunmuştur ve Oleuropein IC₅₀ dozu uygulanan MCF-7 hücre grubunda OSI değeri 0,22±0,04 olarak bulunmuştur. Oleuropein'in OSI üzerindeki bu etkisi serbest radikalleri temizleyerek ROS düzeylerini düşürebilme yeteneğinden kaynaklanıyor olabilir (Pourkhodadad vd., 2016). Ayrıca hücrenin serbest radikallere karşı ürettiği antioksidanların seviyesini belirlemek için TAS seviyesini ölçtüğümüz çalışmamızda,

Oleuropein IC₅₀ dozu hücrelerde ki TAS seviyesini kontrole göre anlamlı oranda arttırmıştır. Oleuropein'in TAS seviyesi üzerindeki bu etkisi güçlü antioksidan özelliğinden kaynaklanıyor olabilir. Oleuropein antioksidan etkisi ile hücrel makromoleküllerin oksidatif hasardan korunmasını sağlayabilir (Barbaro vd., 2014). Yapmış olduğumuz çalışmaya göre, Oleuropein ve Paklitaksel %10, %20, %30 ve %40 kombinasyon oranlarının TAS seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. El-Azem ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada zeytinde bulunan fenolik bileşiklerden biri ve Oleuropein'in hidroliz ürünü olan Hidroksitrozol ve Paklitaksel kombinasyonu meme kanseri oluşturulan sıçanlara uygulanmıştır ve bu kombinasyon tedavisinin antioksidan kapasiteyi arttırdığı gösterilmiştir. Elde edilen bu deneysel sonucun yapmış olduğumuz çalışma ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (El-Azem vd., 2019). Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmada, kombinasyon gruplarında OSI değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Oleuropein'in antioksidan etkisi ile serbest radikallere karşı oluşturduğu savunma mekanizması sonucu artan TAS seviyesi OSI değerlerinin düşmesine neden olmuş olabilir. Yapılan bir çalışmaya göre, Oleuropein'in MCF-7 hücre hattında TOS seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (Arı, Karul ve Sakarya, 2018). Hücrenin toplam oksidan düzeyi hakkında bilgi veren TOS seviyesini ölçtüğümüz çalışmamızın sonuçları yapılan çalışma ile benzer şekilde Oleuropein'in kontrol grubuna göre TOS düzeyini anlamlı derecede düşürdüğünü göstermektedir.

SOD zararlı süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizleyen hücrenin ROS'a karşı ilk savunma hattını oluşturan enzimatik bir antioksidandır. Yapmış olduğumuz çalışmada Oleuropein ve Paklitaksel IC₅₀ dozları ile kombinasyon uygulamalarının SOD aktivitesine olan etkisi test edilmiştir. Paklitaksel ve Oleuropein kombine uygulamasının SOD enzim aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir. %20 ve %30 kombinasyon uygulamaları sırasıyla 1,542±0,29 ve 1,445±0,22 artış miktarı ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Serbest radikallere karşı üretilen birincil antioksidan olduğu için hücredeki SOD miktarının artması DNA hasarının, kanser başlangıç ve ilerleme mekanizmalarının bir göstergesidir. Rahim ağzı kanserinde sağlıklı kontrol grubu ve serviks kanseri hastalarının oksidatif stres belirteçlerinin ölçüldüğü bir çalışmada kontrol grubuna göre hastalarda MDA, SOD ve 8-OH-dG, düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. SOD

artışının oksidatif stresin belirlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir bulunan sonuçlar çalışmamızla uyumludur (Zahra vd., 2020).

GSH, hücrel sinyalleşme, ksenobiyotiklerin metabolizması, tiyol disülfid değişim reaksiyonları gibi çeşitli reaksiyonlar ve hücrenin hayatta kalması için gerekli olan önemli bir sistein deposudur (Dalton vd., 2004). Kanseri hücrelerinin özelliklerinden biriside yüksek GSH konsantrasyonuna sahip olmalarıdır kanser hücrelerinin bu özelliği kemoterapinin neden olduğu apoptoza karşı bir direnç oluşturulmasını sağlamaktadır (Estrela, Ortega ve Obrador, 2006; Franco ve Cidlowski, 2009). Oleuropein ve Paklitaksel'in kombine uygulamasının GSH aktivitesi üzerine olan etkisine baktığımız çalışmamızda kombinasyon dozlarının kontrol grubuna göre GSH aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Oleuropein IC₅₀ dozu uygulanan MCF-7 hücrelerinin GSH aktivitesi 4,318±0,98 µM olarak ölçülmüştür ve bu etkinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (p<0,05). %10, %30 ve %40 kombinasyon oranları sırasıyla 5,123±1,24, 6,255±1,71 ve 5,128±2,26 olarak ölçülmüştür bu etkinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (p<0,05). Glasauer ve Chandel'e göre GSH miktarında ki azalma ROS'ta ki artışın ve hücre ölümünün bir göstergesi olabilir (Glasauer ve Chandel, 2014). Yapılan bir çalışmaya göre Hela hücre hattında oksidatif stresin uyarılması ile GSH tükenmesi ve bunun sonucunda apoptoz ve nekroz mekanizmalarının oluştuğu bildirilmiştir (You vd., 2015).

Lipid peroksidasyonu normalde tüm hücre ve dokularda gerçekleşen serbest radikaller tarafından uyarılan biyolojik bir süreçtir (Niki, 2012). Lipid peroksidasyon belirteci olarak ölçülen MDA serbest radikallerin artışı ile sonuçlanan oksidatif stresin en iyi belirtecidir. Kanseri hasta grupları ve sağlıklı kontrol gruplarının karşılaştırıldığı çalışmalarda, MDA seviyesinin kanser hastalarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ve bu da kanser hücrelerindeki artmış ROS ve oksidatif stresin bir göstergesidir (Wang vd., 2014; de Oliveira vd., 2022). Ayrıca *in vitro* çalışmalarda da çalışmamızla uyumlu olarak oksidatif stresin artmış MDA düzeyi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Celep, Yılmaz ve Coruh, 2012; Timur, Akbas ve Ozben, 2005).Yapmış olduğumuz çalışmaya göre, Oleuropein ve Paklitaksel kombinasyon uygulamasının kontrol grubuna göre MDA seviyesini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı saptanmıştır. MDA artışı ROS artışına bağlı olarak oluşan oksidatif stresin bir sonucu olarak artmış olabilir.

Yapmış olduğumuz çalışmada hem ışık mikroskobu hem de AO/EB çift boyama yöntemi ile OLE ve PTX kombinasyonlarının MCF-7 hücre hattına morfolojik etkisi incelenmiştir. Sonuçlarımıza göre kombinasyon uygulanmasının sonucunda hücrelerin şekillerinin yuvarlaklaştığı, birbirleri ve flask tabanına tutunmalarının azaldığı gözlemlenmiştir. AO/EB boyama yöntemine göre, kombinasyon gruplarında geç apoptoz ve erken apoptoz mekanizmalarının olduğu kromozomların belirgin şekilde parçalı olduğu saptanmıştır. Çalışmamızla uyumlu olarak OLE'nin invazyon, migrasyon ve koloni oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Seçme vd., 2016).

Sonuç olarak elde edilen veriler ışığında, yüksek dozlarda oluşturulan OLE+PTX kombinasyonlarının (%100, %75, %50) MCF-7 hücre hattında antagonist etkili olduğu ancak düşük dozlarda uygulanan kombinasyonların (%10, %20, %30, %40) sinerjik etkili olduğu belirlenmiştir. Sinerjik etkili olduğu saptanan kombinasyon gruplarındaki Paklitaksel dozunun Paklitaksel'in tek başına MCF-7 hücre hattı üzerindeki IC₅₀ (7,5 µM) dozundan düşük olduğu gözlemlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmamızda, Oleuropein ile Paklitaksel kombine uygulamasının Paklitaksel'in toksik dozunu düşürdüğü saptanmıştır. Oleuropein ile Paklitaksel'in kombine kullanımının oksidatif stres üzerine olan etkilerini incelediğimiz çalışmamızda, antioksidan savunmanın arttığı ve OSI seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir ancak oksidatif stres hakkında daha net bir sonuca ulaşmak için bu çalışmanın farklı zaman aralıklarında da incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. OLE ve PTX IC₅₀ dozu uygulamalarına göre kombinasyon gruplarındaki SOD seviyesinin arttığı saptanmıştır. PTX IC₅₀ dozu uygulanmasına göre kombinasyon gruplarının GSH seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca kombinasyon gruplarının MDA seviyesini arttırdığı saptanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada, OLE ve PTX kombinasyonlarının MCF-7 hücre hattının morfolojisini etkilediği gösterilmiştir. Kombinasyonların MCF-7 hücre hattında gösterdikleri bu etkilerin hangi spesifik yollar üzerinden nasıl ve ne şekilde gerçekleştiği ve kombinasyonların *in vivo* ortamda etkili olup olmadığı gibi sorulara cevap üretilebilmesi amacı ile daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abu Samaan, T. M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*, 9 (12), 789.
- Alexandre, J., Hu, Y., Lu, W., Pelicano, H., & Huang, P. (2007). Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer research*, 67 (8), 3512-3517.
- Altmann, K. H., & Gertsch, J. (2007). Anticancer drugs from nature--natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Natural product reports*, 24 (2), 327-357.
- Arı, M., Karul, A., & Sakarya, S. (2018). Investigation of antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects of oleuropein and vitamin D on breast cancer cell lines (MCF-7). *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 2 (25), 1534.
- Atienza, J. M., Zhu, J., Wang, X., Xu, X., & Abassi, Y. (2005). Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *Journal of biomolecular screening*, 10 (8), 795-805.
- Aydemir, B., & Sarı, E. K. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2 (2), 56-60.
- Azmanova, M., & Pitto-Barry, A. (2022). Oxidative Stress in Cancer Therapy: Friend or Enemy?. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 23 (10), e202100641.
- Balasubramanian, N., Subramanian, S., & Govindasamy, S. (1994). Status of antioxidant systems in human carcinoma of uterine cervix. *Cancer letters*, 87 (2), 187-192.
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., & Balsano, C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *International journal of molecular sciences*, 15 (10), 18508-18524.
- Bast, A., Haenen, G. R., & Doelman, C. J. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American journal of medicine*, 91 (3), S2-S13.
- Bell, E. L., Emerling, B. M., & Chandel, N. S. (2005). Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Mitochondrion*, 5 (5), 322-332.

- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade
Alessandra. *Molecules*, 12 (8), 1679-1719.
- Berry, D. A., Cronin, K. A., Plevritis, S. K., Fryback, D. G., Clarke, L., Zelen, M., ... & Feuer, E. J. (2005). Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353 (17), 1784-1792.
- Bianco, A., & Uccella, N. (2000). Biophenolic components of olives. *Food Research International*, 33 (6), 475-485.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5 (1), 9-19.
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T. W., & Brenner, D. (2016). TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends in cell biology*, 26 (4), 249-261.
- Britt, K. L., Cuzick, J., & Phillips, K. A. (2020). Key steps for effective breast cancer prevention. *Nature Reviews Cancer*, 20 (8), 417-436.
- Buteau-Lozano, H., Ancelin, M., Lardeux, B., Milanini, J., & Perrot-Applanat, M. (2002). Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors α and β . *Cancer Research*, 62 (17), 4977-4984.
- Cao, S., Zhu, X., & Du, L. (2017). P38 MAP kinase is involved in oleuropein-induced apoptosis in A549 cells by a mitochondrial apoptotic cascade. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1425-1435.
- Cardoso, F., Bartlett, J. M. S., Slaets, L., Van Deurzen, C. H. M., van Leeuwen-Stok, E., Porter, P., ... & Giordano, S. (2018). Characterization of male breast cancer: results of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program. *Annals of Oncology*, 29 (2), 405-417.
- Carrera-González, M. P., Ramírez-Expósito, M. J., Mayas, M. D., & Martínez-Martos, J. M. (2013). Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends in food science & technology*, 31 (2), 92-99.
- Casaburi, I., Puoci, F., Chimento, A., Sirianni, R., Ruggiero, C., Avena, P., & Pezzi, V. (2013). Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents

- against cancer: a review of in vitro studies. *Molecular nutrition & food research*, 57 (1), 71-83.
- Celep, A. G. S., Yilmaz, S., & Coruh, N. (2012). Antioxidant capacity and cytotoxicity of *Aesculus hippocastanum* on breast cancer MCF-7 cells. *J Food Drug Anal*, 20, 692-698.
- Chen, K., & Shi, W. (2016). Autophagy regulates resistance of non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Tumor Biology*, 37 (8), 10539-10544.
- Cicerale, S., Lucas, L. J., & Keast, R. S. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current opinion in biotechnology*, 23 (2), 129–135.
- Cnubben, N. H., Rietjens, I. M., Wortelboer, H., van Zanden, J., & van Bladeren, P. J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental toxicology and pharmacology*, 10 (4), 141-152.
- Dalton, T. P., Chen, Y., Schneider, S. N., Nebert, D. W., & Shertzer, H. G. (2004). Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 37 (10), 1511-1526.
- Damtoft, S., Franzyk, H., & Jensen, S. R. (1992). Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior*. *Phytochemistry*, 31 (12), 4197-4201.
- de Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J. L., Monjaud, I., Boucher, P., & Mamelle, N. (1998). Mediterranean dietary pattern in a randomized trial: prolonged survival and possible reduced cancer rate. *Archives of Internal Medicine*, 158 (11), 1181-1187.
- de Oliveira, S. T., Bessani, M. P., Scandolara, T. B., Silva, J. C., Kawassaki, A. C. B., Fagotti, P. A. F., ... & Panis, C. (2022). Systemic lipid peroxidation profile from patients with breast cancer changes according to the lymph nodal metastasis status. *Oncoscience*, 9, 1.
- Del Boccio, P., Di Deo, A., De Curtis, A., Celli, N., Iacoviello, L., & Rotilio, D. (2003). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration. *Journal of Chromatography B*, 785 (1), 47-56.
- D'Emilio, A., Biagiotti, L., Burattini, S., Battistelli, M., Canonico, B., Evangelisti, C., Ferri, P., Papa, S., Martelli, A. M., & Falcieri, E. (2010). Morphological and

- biochemical patterns in skeletal muscle apoptosis. *Histology and histopathology*, 25 (1), 21–32.
- Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 209, 114477.
- Di Francesco, A., Falconi, A., Di Germanio, C., Di Bonaventura, M. V. M., Costa, A., Caramuta, S., ... & D'Addario, C. (2015). Extravirgin olive oil up-regulates CB1 tumor suppressor gene in human colon cancer cells and in rat colon via epigenetic mechanisms. *The Journal of nutritional biochemistry*, 26 (3), 250-258.
- Di Oto, E., Biserni, G. B., Varga, Z., Morandi, L., Cucchi, M. C., Masetti, R., & Foschini, M. P. (2018). X chromosome gain is related to increased androgen receptor expression in male breast cancer. *Virchows Archiv*, 473 (2), 155-163.
- Donaire, J. P., Sanchez, A. J., Lopez-Gorge, J., & Recalde, L. (1975). Metabolic changes in fruit and leaf during ripening in the olive. *Phytochemistry*, 14 (5-6), 1167-1169.
- Donepudi, M. S., Kondapalli, K., Amos, S. J., and Venkanteshan, P. (2014). Breast cancer statistics and markers. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10 (3), 506–511.
- Duke, M. V., & Salin, M. L. (1985). Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 243 (1), 305-314.
- Dumont, A., Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Ueffing, M., Droëge, W., & Schmitz, M. L. (1999). Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-κB. *Oncogene*, 18 (3), 747-757.
- Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Elobeid, M. A., Virk, P., Al-Olayan, E. M., Hassan, Z. K., Mohammed, O. B., & Aboussekhra, A. (2013). Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 53, 310–316.
- El-Azem, N., Pulido-Moran, M., Ramirez-Tortosa, C. L., Quiles, J. L., Cara, F. E., Sanchez-Rovira, P., ... & Ramirez-Tortosa, M. (2019). Modulation by

- hydroxytyrosol of oxidative stress and antitumor activities of paclitaxel in breast cancer. *European journal of nutrition*, 58 (3), 1203-1211.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35 (4), 495-516.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, 1 (6), 529-539.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37 (4), 277–285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38 (12), 1103–1111.
- Estrela, J. M., Ortega, A., & Obrador, E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 43 (2), 143-181.
- Ezrahi, S., Aserin, A., & Garti, N. (2019). Basic principles of drug delivery systems—the case of paclitaxel. *Advances in colloid and interface science*, 263, 95-130.
- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18 (10), 872-879.
- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G. V., Tresoldi, I., Modesti, A., & Bei, R. (2015). *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. *International journal of molecular sciences*, 16 (5), 9236–9282.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., and Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, 144 (8), 1941–1953.
- Foley, E. A., & Kapoor, T. M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14 (1), 25-37.
- Franco, R., & Cidlowski, J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death & Differentiation*, 16 (10), 1303-1314.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 64 (1), 97-112.

- Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton M. (2001). Cancer and genomics. *Nature* 6822: 850-2
- Gao, P., Zhang, H., Dinavahi, R., Li, F., Xiang, Y., Raman, V., ... & Dang, C. V. (2007). HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer cell*, 12 (3), 230-238.
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482 (3), 419-425.
- Georgescu, S. R., Mitran, C. I., Mitran, M. I., Caruntu, C., Sarbu, M. I., Matei, C., Nicolae, I., Tocut, S. M., Popa, M. I., & Tampa, M. (2018). New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *Journal of immunology research*, 2018, 5315816.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., & Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review. *International journal of molecular sciences*, 13 (3), 3291-3340.
- Gherghi, I. C., Girousi, S. T., Voulgaropoulos, A. N., & Tzimou-Tsitouridou, R. (2003). Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE). *Talanta*, 61 (2), 103-112.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Raugei, G., Ramponi, G., & Chiarugi, P. (2005). Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Molecular and cellular biology*, 25 (15), 6391-6403.
- Gikas, E., Bazoti, F. N., & Tsarbopoulos, A. (2007). Conformation of oleuropein, the major bioactive compound of *Olea europaea*. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 821 (1-3), 125-132.
- Ginsburg, O., Bray, F., Coleman, M. P., Vanderpuye, V., Eniu, A., Kotha, S. R., ... & Conteh, L. (2017). The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *The Lancet*, 389 (10071), 847-860.
- Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical pharmacology*, 92 (1), 90-101.

- Goldsmith, C. D., Stathopoulos, C. E., Golding, J. B., & Roach, P. D. (2014). Fate of the phenolic compounds during olive oil production with the traditional press method. *International Food Research Journal*, 21 (1).
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., ... & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *International journal of molecular sciences*, 19 (3), 686.
- Góth, L., Rass, P., & Páy, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*, 8 (3), 141-149.
- Gotsis, E., Anagnostis, P., Mariolis, A., Vlachou, A., Katsiki, N., & Karagiannis, A. (2015). Health benefits of the Mediterranean diet: an update of research over the last 5 years. *Angiology*, 66 (4), 304-318.
- Gucalp, A., Traina, T. A., Eisner, J. R., Parker, J. S., Selitsky, S. R., Park, B. H., ... & Cardoso, F. (2019). Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 173 (1), 37-48.
- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., ... & Uchida, K. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free radical research*, 44 (10), 1098-1124.
- Gunduz, M., & Gunduz, E. (Eds.). (2011). *Breast Cancer: Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways*. BoD—Books on Demand.
- Haddad, R., Alrabadi, N., Altaani, B., & Li, T. (2022). Paclitaxel Drug Delivery Systems: Focus on Nanocrystals' Surface Modifications. *Polymers*, 14 (4), 658.
- Hadzic, T., Aykin-Burns, N., Zhu, Y., Coleman, M. C., Leick, K., Jacobson, G. M., & Spitz, D. R. (2010). Paclitaxel combined with inhibitors of glucose and hydroperoxide metabolism enhances breast cancer cell killing via H₂O₂-mediated oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 48 (8), 1024-1033.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Han, J., Talorete, T. P., Yamada, P., & Isoda, H. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 59 (1), 45–53.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12 (1), 31-46.

- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J. and Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 5, 66
- Hassan, Z. K., Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Al-Olayan, E. M., Elobeid, M. A., ... & Mohammed, O. B. (2012). Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 13 (9), 4555-4559.
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44 (2), 532-553.
- Heinig, U., Scholz, S., & Jennewein, S. (2013). Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. *Fungal diversity*, 60 (1), 161-170.
- Horwitz, S. B. (1992). Mechanism of action of taxol. *Trends in pharmacological sciences*, 13, 134-136.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54 (4), 287-293.
- Ito, F., Sono, Y., & Ito, T. (2019). Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*, 8 (3), 72.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute*, 4 (1).
- Kaufmann, S. H., & Earnshaw, W. C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental cell research*, 256 (1), 42-49.
- Ke, N., Wang, X., Xu, X., & Abassi, Y. A. (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 740, 33-43.
- Key, T., Appleby, P., Barnes, I., & Reeves, G. (2002). Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst*, 94 (8), 606-616.

- Kimura, Y., & Sumiyoshi, M. (2009). Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *The journal of nutrition*, 139 (11), 2079-2086.
- Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (1984). Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the national academy of sciences*, 81 (14), 4343-4347.
- Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, 15 (1), 1-22.
- Laher, I. (Ed.). (2014). *Systems biology of free radicals and antioxidants* (p. 4178). Berlin/Heidelberg, Germany: Springer.
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4 (3), 181-189.
- Levin, E. R., & Pietras, R. J. (2008). Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 108 (3), 351-361.
- Li, W. B., Li, Y., Yu, C., & He, Y. M. (2015). Reversal of Multidrug Resistance by the Chinese Medicine Yiqi Jianpi Huaji Decoction and the Mechanism of Action in Human Gastric Cancer SGC7901/VCR Cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2015, 390812.
- Liao, P. C., & Lieu, C. H. (2005). Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. *Life sciences*, 76 (14), 1623-1639.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4 (8), 118.
- Lortet-Tieulent, J., Ferlay, J., Bray, F., & Jemal, A. (2018). International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence, 1978-2013. *Journal of the National Cancer Institute*, 110 (4), 354–361.
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 15 (7), 1957–1997.
- Luo, C., Wang, Y., Chen, Q., Han, X., Liu, X., Sun, J., & He, Z. (2012). Advances of paclitaxel formulations based on nanosystem delivery technology. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12 (5), 434-444.

- Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77 (3), 147-161.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radical Biology and Medicine*, 5 (5-6), 363-369.
- Mierke C. T. (2019). The matrix environmental and cell mechanical properties regulate cell migration and contribute to the invasive phenotype of cancer cells. *Reports on progress in physics. Physical Society (Great Britain)*, 82 (6), 064602.
- Mitra, S., & Dash, R. (2018). Natural products for the management and prevention of breast cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- Monninkhof, E. M., Elias, S. G., Vlems, F. A., van der Tweel, I., Schuit, A. J., Voskuil, D. W., & van Leeuwen, F. E. (2007). Physical activity and breast cancer: a systematic review. *epidemiology*, 137-157.
- Nabekura T. (2010). Overcoming multidrug resistance in human cancer cells by natural compounds. *Toxins*, 2 (6), 1207–1224.
- Nenadis, N., Papoti, V. T., & Tsimidou, M. Z. (2021). Bioactive ingredients in olive leaves. In *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 65-78). Academic Press.
- Nguyen, L. H., Goel, A., & Chung, D. C. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158 (2), 291–302.
- Niki, E. (2012). Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products?. *FEBS letters*, 586 (21), 3767-3770.
- Nurgali, K., Jagoe, R. T., & Abalo, R. (2018). Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 245.
- Obied, H. K., Karuso, P., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (8), 2848-2853.
- Omar, S. H. (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18 (3), 111-121.
- Pandey, S., Singh, B., Yadav, S. K., & Mahdi, A. A. (2018). Novel biomarker for neurodegenerative diseases-motor neuron disease (MND), cerebellar ataxia (CA) and Parkinson's disease (PD). *Clinica Chimica Acta*, 485, 258-261.

- Panieri, E., & Santoro, M. M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell death & disease*, 7 (6), e2253-e2253.
- Peña-Oyarzun, D., Bravo-Sagua, R., Diaz-Vega, A., Aleman, L., Chiong, M., Garcia, L., Bambs, C., Troncoso, R., Cifuentes, M., Morselli, E., Ferreccio, C., Quest, A., Criollo, A., & Lavandero, S. (2018). Autophagy and oxidative stress in non-communicable diseases: A matter of the inflammatory state?. *Free radical biology & medicine*, 124, 61–78.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *nature*, 406 (6797), 747-752.
- Peskin, A. V., Koen, Y. M., & Zbarsky, I. B. (1981). Some features of nucleocytoplasmic RNA transport from isolated nuclei. *Molecular Biology Reports*, 7 (1), 25-30.
- Peters, J. M., & Gonzalez, F. J. (2018). The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 165 (2), 272–276.
- Pfeiffer, R. M., Webb-Vargas, Y., Wheeler, W., & Gail, M. H. (2018). Proportion of U.S. Trends in Breast Cancer Incidence Attributable to Long-term Changes in Risk Factor Distributions. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 27 (10), 1214–1222.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4 (2), 89.
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., ... & Remacle, J. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of ageing and development*, 51 (3), 283-297.
- Piroddi, M., Albini, A., Fabiani, R., Giovannelli, L., Luceri, C., Natella, F., ... & Galli, F. (2017). Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review. *Biofactors*, 43 (1), 17-41.
- Pourkhodadad, S., Alirezaei, M., Moghaddasi, M., Ahmadvand, H., Karami, M., Delfan, B., & Khanipour, Z. (2016). Neuroprotective effects of oleuropein against cognitive dysfunction induced by colchicine in hippocampal CA1 area in rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 66 (5), 397-405.

- Ramsey, M. R., & Sharpless, N. E. (2006). ROS as a tumour suppressor?. *Nature cell biology*, 8 (11), 1213-1215.
- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., ... & AcuñaCastroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*, 18 (1), 1-11.
- Renvoize, C., Biola, A., Pallardy, M., & Breard, J. (1998). Apoptosis: identification of dying cells. *Cell biology and toxicology*, 14 (2), 111-120.
- Rice-Evans, C. A., & Burdon, R. H. (1994). normal biochemical processes and pathological states. *Free radical damage and its control*, 131.
- Rizzo, M., Ventrice, D., Giannetto, F., Cirinnà, S., Santagati, N. A., Procopio, A., ... & Muscoli, C. (2017). Antioxidant activity of oleuropein and semisynthetic acetyl-derivatives determined by measuring malondialdehyde in rat brain. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69 (11), 1502-1512.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., ... & Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362 (6415), 59-62.
- Rowinsky, E. K., Cazenave, L. A., & Donehower, R. C. (1990). Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82 (15), 1247-1259.
- Schiff, P. B., & Horwitz, S. B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77 (3), 1561-1565.
- Schiff, P. B., Fant, J., & Horwitz, S. B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277 (5698), 665-667.
- Schrijvers, D. (2003). Role of red blood cells in pharmacokinetics of chemotherapeutic agents. *Clinical pharmacokinetics*, 42 (9), 779-791.
- Seçme, M., Eroğlu, C., Dodurga, Y., & Bağcı, G. (2016). Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene*, 585 (1), 93-99.
- Serra-Majem, L., Ngo De La Cruz, J., Ribas, L., & Tur, J. A. (2003). Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57 (1), S2-S7.
- Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., ... & Montedoro, G. F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: Antioxidant, health

- and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17 (2), 76-84.
- Severson, T. M., & Zwart, W. (2017). A review of estrogen receptor/androgen receptor genomics in male breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 24 (3), R27-R34.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2020). Cancer Statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(1), 7–30.
- Sofias, A. M., Dunne, M., Storm, G., & Allen, C. (2017). The battle of “nano” paclitaxel. *Advanced drug delivery reviews*, 122, 20-30.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., & Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 1013-1023.
- Somova, L. I., Shode, F. O., Ramnanan, P., & Nadar, A. (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 84 (2-3), 299-305.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the national cancer institute*, 51 (5), 1409-1416.
- Sznarkowska, A., Kostecka, A., Meller, K., & Bielawski, K. P. (2017). Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget*, 8 (9), 15996.
- Telang, N. T., Nair, H. B., & Wong, G. Y. (2019). Growth inhibitory efficacy of *Cornus officinalis* in a cell culture model for triple-negative breast cancer. *Oncology letters*, 17 (6), 5261-5266.
- Timur, M., Akbas, S. H., & Ozben, T. (2005). The effect of Topotecan on oxidative stress in MCF-7 human breast cancer cell line. *Acta biochimica Polonica*, 52 (4), 897–902.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 25 (1), 16-27.
- Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H., & Trichopoulos, D. (2000). Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 9 (9), 869-873.

- Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H., & Reichl, F. X. (2010). Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental materials*, 26 (1), 51-58.
- Varbiro, G., Veres, B., Gallyas Jr, F., & Sumegi, B. (2001). Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (4), 548-558.
- Vaughan, E. D., Marion, D., Poppas, D. P., & Felsen, D. (2004). Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York. *The Journal of urology*, 172 (6 Part 2), 2563-2569.
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentao, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., ... & Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food chemistry*, 89 (4), 561-568.
- Vishnu, P., & Roy, V. (2011). Safety and efficacy of nab-paclitaxel in the treatment of patients with breast cancer. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 5, BCBCR-S5857.
- Visioli, F., & Galli, C. (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Critical reviews in food science and nutrition*, 42 (3), 209-221.
- Visioli, F., Bellomo, G., & Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and biophysical research communications*, 247 (1), 60-64.
- Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G., & Galli, C. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, 117 (1), 25-32.
- Vistejnova, L., Dvorakova, J., Hasova, M., Muthny, T., Velebny, V., Soucek, K., & Kubala, L. (2009). The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques. *Neuroendocrinology Letters*, 30 (1), 121.
- Walsh, V., & Goodman, J. (2002). From taxol to taxol®: The changing identities and ownership of an anti-cancer drug. *Medical anthropology*, 21 (3-4), 307-336.

- Wang, C., Yu, J., Wang, H., Zhang, J., & Wu, N. (2014). Lipid peroxidation and altered anti-oxidant status in breast adenocarcinoma patients. *Drug research*, 64 (12), 690-692.
- Wang, Z., Butt, K., Wang, L., & Liu, H. (2007). The effect of seal oil on paclitaxel induced cytotoxicity and apoptosis in breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Nutrition and cancer*, 58 (2), 230–238.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93 (9), 2325–2327.
- Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 25 (18), 2677-2681.
- Wilkinson, L., & Gathani, T. (2022). Understanding breast cancer as a global health concern. *The British Journal of Radiology*, 95 (1130), 20211033.
- Williams, G. M. (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*, 166 (1-2), 3-10.
- Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. *Progress in molecular biology and translational science*, 151, 1-32.
- Yamamoto, Y., Kawano, I., & Iwase, H. (2011). Nab-paclitaxel for the treatment of breast cancer: efficacy, safety, and approval. *Oncotargets and therapy*, 4, 123.
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, 111 (10), 5944-5972.
- You, B. R., Shin, H. R., Han, B. R., Kim, S. H., & Park, W. H. (2015). Auranofin induces apoptosis and necrosis in HeLa cells via oxidative stress and glutathione depletion. *Molecular medicine reports*, 11 (2), 1428-1434.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54 (3), 176-186.
- Yue, Q. X., Liu, X., & Guo, D. A. (2010). Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta medica*, 76 (11), 1037–1043.
- Zahra, K., Patel, S., Dey, T., Pandey, U., & Mishra, S. P. (2020). A study of oxidative stress in cervical cancer- an institutional study. *Biochemistry and biophysics reports*, 25, 100881.

Zhang, Z., Mei, L., & Feng, S. S. (2013). Paclitaxel drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, 10 (3), 325-340.

Žukovec Topalović, D., Živković, L., Čabarkapa, A., Djelić, N., Bajić, V., Dekanski, D., & Spremo-Potparević, B. (2015). Dry olive leaf extract counteracts L-thyroxine-induced genotoxicity in human peripheral blood leukocytes in vitro. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.

http-1: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars> Global Cancer Observatory
(Erişim Tarihi: 07.03.2022)

http-2: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers> Global Cancer Observatory
(Erişim Tarihi: 07.03.2022)