

T.C.

AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MELANOMDA SİSPLATİN TEDAVİSİNE BUĞDAY RUŞEYİMİ
AGLUTİNİNİ (WGA) İLAVESİNİN BİYOKİMYASAL
MEKANİZMALAR VE İLAÇ DİRENCİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan

Arş. Gör. Dr. Ayşe CİRİZ

Danışman

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

2024-AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

MELANOMDA SİSPLATİN TEDAVİSİNE BUĞDAY RUŞEYİMİ
AGLUTİNİNİ (WGA) İLAVESİNİN BİYOKİMYASAL MEKANİZMALAR
VE İLAÇ DİRENCİ ÜZERİNE ETKİSİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
ARAŞTIRILMASI

Ayşe CİRİZ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 24.TUS.001 kodlu proje ile desteklenmiştir.

2024-AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Tezi Hazırlayanın

Danışmanın

Adı Soyadı: Ayşe CİRİZ

Adı Soyadı: Prof. Dr. Sefa ÇELİK

İmza:

İmza:

**AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tez Başlığı: Melanomda Sisplatin Tedavisine Buğday Ruşeymi Aglutinini (WGA) İlavesinin Biyokimyasal Mekanizmalar ve İlaç Direnci Üzerine Etkisinin Hücre Kültüründe Araştırılması

Tez Hazırlayan: Arş. Gör. Dr. Ayşe CİRİZ

Tez Kabul Tarihi: 25.11.2024

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sefa ÇELİK

İş bu çalışma jürimiz tarafından TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI'NDATIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ:

Başkan

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

Üye

Prof. Dr. Tülay KÖKEN

Üye

Doç. Dr. Soycan MIZRAK

ONAY

DEKAN

Prof. Dr. Necip BECİT

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve uzmanlık eğitimim boyunca bilgisi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, karşılaştığım her soru/sorunda maddi ve manevi destek olup yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur duyduğum danışmanım Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e;

Biyokimya uzmanı olma yolunda mesleki donanımını, akademik bilgi ve tecrübelerini cömertçe bizimle paylaşarak rol model olan, beni bu mesleğe ait hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Tülay KÖKEN'e; asistanlık eğitimim süresince bana kattıkları değerli bilgiler ve öğretiler için Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a, Prof. Dr. Halit Buğra KOCA'ya, Doç. Dr. Ayhan VURMAZ'a, Doç. Dr. Müjgan Ercan KARADAĞ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Özge FENERCİOĞLU'na;

Hücre kültürü ile ilgili projelerde ve tez çalışmamın en başından sonuna kadar tüm adımlarda bütün bilgisi, sabrı ve ilgisi ile desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Serkan ŞEN'e; ilaç direnci ile ilgili çalışmalarımda destek sağlayan Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a;

Hayatımın her döneminde sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla destek olan, her koşulda yanımda duran, üzerimde paha biçilemez emekleri olan ve her zaman cesaretlendirerek yol gösteren canım aileme;

Uzmanlık eğitimimin ilk gününden son gününe kadar yolumun kesiştiği ve beraber çalıştığım, bilgi ve tecrübelerinden yararlanıp desteklerini hissettiğim bütün asistan arkadaşlarıma ve laboratuvar ekibine tüm kalbimle teşekkür ederim.

Ayşe Ciriz

Afyonkarahisar, Kasım 2024

**MELANOMDA SİSPLATİN TEDAVİSİNE BUĞDAY RUŞEYİMİ
AGLUTİNİNİ (WGA) İLAVESİNİN BİYOKİMYASAL MEKANİZMALAR
VE İLAÇ DİRENCİ ÜZERİNE ETKİSİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
ARAŞTIRILMASI**

Ayşe CİRİZ

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi

Kasım 2024

Danışman: Prof. Dr. Sefa ÇELİK

ÖZET

Amaç: Melanom, tüm deri tümörlerinin yalnızca %1,7'sini oluşturmakla birlikte en agresif cilt kanseridir. Normal dokular için sınırlı toksisiteye rağmen WGA'nın düşük dozlarda pankreas, karaciğer, kemik (osteosarkom) ve cilt (melanom) kanseri için toksik olduğu gösterilmiştir. Sisplatin, DNA hasarını ve apoptozu indüklemeye yeteneği ile bilinen bir kemoterapötik ajan olmakla birlikte melanom tedavisinde çok etkili değildir. Melanom hücrelerini Sisplatine duyarlı hale getirebilecek yeni kombinasyonların geliştirilmesi ilaç etkinliğini arttırmanın bir yoludur. Bu çalışmadaki amacımız sitotoksik etki gösteren Sisplatin ve WGA'nın tekli ve kombine dozlarının melanomdaki oksitadif stres, apoptoz ve ilaç direnci üzerine olan etkilerini in vitro değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda G361 melanom hücre hattında MTT testi ile Sisplatin ve WGA'nın IC₅₀ dozları bulunduğundan sonra 4 çalışma grubu (Kontrol, WGA, CP, WGA+CP) oluşturuldu ve 24 saat bu dozlarda uygulama yapıldı. Tekli ve kombine dozların oksidatif sürece etkisi TAS ve TOS seviyelerini ölçüp OSI hesaplanarak incelendi. Apoptoz için ELISA, Western Blot ve RT-qPCR ile Bax, Bcl-2, Sit-c, Kasp-3 ve Kasp-9 analizi; ilaç direnci için RT-qPCR ile ABCB1, ABCC1 ve ABCG2 analizleri yapıldı.

Bulgular: WGA'nın kontrol grubuna kıyasla TOS ve OSI değerlerini yükseltip TAS değerini düşürerek oksidatif stresi indüklediği bulundu. CP tek başına ve WGA ile kombine edildiğinde kontrol grubuna kıyasla TAS, TOS ve OSI değerlerini düşürdü. WGA ve WGA+CP grupları, ELISA analizi ile değerlendirilen Bax, Bcl-2 ve Sit-c düzeyini kontrol grubuna göre arttırdı ve hesaplanan apoptotik indeks değerinin en fazla WGA+CP grubunda olduğu bulundu. Sisplatin uygulanan grupta ilaç direnci ilişkili genlerden ABCC1'in, WGA uygulanan grupta ABCG2'nin ve kombinasyonlarının da ABCB1 ve ABCC1 mRNA ekspresyonlarını anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edildi.

Sonuç: Bulgular WGA'nın tek başına ve Sisplatin ile kombinasyonun melanomdaki antiproliferatif ve apoptotik etkinliğini desteklemektedir. WGA-

Sisplatin kombinasyonunun sağladığı yüksek apoptotik indeks, bu tedavi şeklinin önemli bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan Sisplatin kemoterapisinde sitotoksisitenin artırılması ve yan etkinin azaltılması amacıyla yapılacak yeni araştırmalar için bu çalışma yol gösterici olabilir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Melanom, Sisplatin, WGA.



**INVESTIGATION IN CELL CULTURE OF THE EFFECT OF ADDING
WHEAT GERM AGLUTIN (WGA) TO CISPLATIN TREATMENT IN
MELANOMA ON BIOCHEMICAL MECHANISMS AND DRUG
RESISTANCE**

Ayşe CİRİZ

Afyonkarahisar Health Sciences University

Faculty of Medicine Department of Medical Biochemistry Thesis

November 2024

Supervisor: Prof. Dr. Sefa CELİK

ABSTRACT

Objective: Melanoma is the most aggressive skin cancer, accounting for only 1,7% of all skin tumours. Despite limited toxicity to normal tissues, WGA has been shown to be toxic at low doses to pancreatic, liver, bone (osteosarcoma) and skin (melanoma) cancer. Cisplatin is a chemotherapeutic agent known for its ability to induce DNA damage and apoptosis, but is not very effective in the treatment of melanoma. The development of new combinations that can sensitise melanoma cells to Cisplatin is one way to increase drug efficacy. The aim of this study was to evaluate the effects of single and combined doses of Cisplatin and WGA on oxidative stress, apoptosis and drug resistance in melanoma cells in vitro.

Materials and Methods: In our study, after the IC₅₀ doses of Cisplatin and WGA were found by MTT test in G361 melanoma cell line, 4 study groups (Control, WGA, CP, WGA+CP) were formed and 24 hours of treatment was performed at these doses. The effect of single and combined doses on oxidative process was analysed by measuring TAS and TOS levels and calculating OSI. Bax, Bcl-2, Sit-c, Casp-3 and Casp-9 were analysed by ELISA, Western Blot and RT-qPCR for apoptosis; ABCB1, ABCC1 and ABCG2 were analysed by RT-qPCR for drug resistance.

Results: WGA was found to induce oxidative stress by increasing TOS and OSI values and decreasing TAS values compared to the control group. CP alone and in combination with WGA decreased TAS, TOS and OSI values compared to the control group. WGA and WGA+CP groups increased Bax, Bcl-2 and Cyt-c levels evaluated by ELISA analysis compared to the control group, and the calculated apoptotic index value was found to be highest in the WGA+CP group. The mRNA expressions of ABCC1, one of the drug resistance-related genes, in the Cisplatin-treated group, ABCG2 in the WGA-treated group and their combinations significantly increased ABCB1 and ABCC1 mRNA expressions.

Conclusion: The findings support the antiproliferative and apoptotic activity of WGA alone and in combination with Cisplatin in melanoma. The high apoptotic index provided by WGA-Cisplatin combination suggests that this treatment modality may be an important option. On the other hand, this study may be a guide for new studies to be conducted to increase cytotoxicity and reduce side effects in Cisplatin chemotherapy.

Keywords: Apoptosis, Melanoma, Cisplatin, WGA.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kanser.....	3
2.2.Melanom.....	3
2.2.1.Tanım ve Etiyoloji	3
2.2.2.Epidemiyoloji.....	5
2.2.3.Tanı ve Tedavi	7
2.3.Sisplatin	9
2.4.Buğday Ruşeymi Aglutinini (WGA).....	11
2.5.Apoptoz	12
2.5.1.İntrensek Apoptoz.....	13
2.5.2.Ekstrensek Apoptoz	15
2.6.Çoklu İlaç Direnci (MDR) ve ATP Bağlayıcı Kaset Ailesi (ABC)	16
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER	19
3.1.Hücre Kültürü.....	19
3.1.1.Çalışmada Kullanılan Malzeme, Kit ve Cihaz Listesi	19
3.1.2.Komple Medium Hazırlanışı	21
3.1.3.Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması	22
3.1.4.Thoma Lamında Hücre Sayımı.....	23
3.2.MTT Hücre Canlılık Testi ve IC ₅₀ Doz Belirleme Çalışmaları	24

3.3.Hücre Lizatları ve Lizis Tamponu Hazırlanması	26
3.4.Total Protein Ölçümü	27
3.5.Total Antioksidan Kapasite (TAS) Analizi	28
3.6.Total Oksidan Kapasite (TOS) Analizi	29
3.7.Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	30
3.8.Apoptoz Belirteç Düzeylerinin Belirlenmesi	30
3.8.1.ELISA Analizleri	30
3.8.2.Western Blot Analizi	32
3.8.2.1.Western Blot Analizinde Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı	32
3.8.2.2.Western Blot Analizi İçin Protein Örneklerinin Denatürasyonu	33
3.8.2.3.Örneklerin Jele Yüklenmesi ve SDS PAGE Elektroforez	33
3.8.2.4.Blotlama	34
3.8.2.5.Bloklama	36
3.8.2.6.Primer Antikor Uygulanması	36
3.8.2.7.Sekonder Antikor Uygulanması	37
3.8.2.8.Bantların Görüntülenmesi ve Analizi	38
3.8.3.mRNA Ekspresyon Analizleri	39
3.8.3.1.RNA İzolasyonu	39
3.8.3.2.Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	40
3.8.3.3.RT-qPCR Analizi	41
3.9.İstatistiksel Analizler	42
4.BULGULAR	43
4.1.IC ₅₀ Dozları	43
4.2.TOS, TAS VE OSI Bulguları	43
4.3.ELISA Sonuçları	45
4.4.Western Blot Analiz Sonuçları	47
4.5.RT-qPCR Bulguları	50
4.5.1.Apoptotik Belirteçlere Ait RT-qPCR Bulguları	50
4.5.2.İlaç Direnci Genlerine Ait RT-qPCR Bulguları	53
5.TARTIŞMA	56
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	63
7.KAYNAKLAR	64

EK-1.....	70
-----------	----



KISALTMALAR

ABC: Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset
ABCB1: Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset B1
ABCC1: Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset C1
ABCC2: Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset C2
ABCG2: Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset G2
ABD: Amerika Birleşik Devletleri
ABTS: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ATCC: Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu
BCA: Bisinkoninik Asit
Bcl-2: B Hücreli Lenfoma-2
BRAF: V-Raf Mürin Sarkomu Viral Onkogen Homolog B1
BSA: Sığır Serum Albümini
CSD: Kümülatif Güneş Hasarı
cDNA: Komplementer DNA
CP: Sisplatin
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
FADD: Fas İlişkili Ölüm Domaini
FBS: Fetal Sığır Serum
FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GlcNAc: N -asetil-D-glukozamin
GPx: Glutasyon Peroksidaz

GSH: İndirgenmiş Glutasyon Formu
GSSG: Oksitlenmiş Glutasyon Formu
HEPES: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
MDR: Çoklu İlaç Direnci
MT: Metallotiyonin
MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)
NF-1: Nörofibromatozis 1
OD: Optik Dansite
OSI: Oksidatif Stres İndeksi
PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS: Fosfat Tamponlu Salin
PBST: Fosfat Tamponlu Salin, %0,1 Tween 20
RAS: Rat Sarkom Virüsü
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
RT-qPCR: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SOD: Süperoksit Dismutaz
TAS: Total Antioksidan Kapasite
TNF-a: Tümör Nekroz Faktör-alfa
TNFR-1: TNF Tip 1 Reseptörü
TOS: Total Oksidan Kapasite
TRAIL: TNF İlişkili Apoptozu İndükleyen Ligand
UV: Ultraviyole
WGA: Buğday Ruşeymi Aglütinini

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1: Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler.....	19
Tablo 3.2: Çalışmada Kullanılan Analiz Kitleri.	20
Tablo 3.3: Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Aletler Listesi.....	21
Tablo 3.4: Komple Medyum Bileşenleri.....	21
Tablo 3.5: Western blot analizinde kullanılan primer antikorlar.	37
Tablo 3.6: Western blot analizinde kullanılan sekonder antikor.....	37
Tablo 3.7. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri.....	40
Tablo 3.8: RT-qPCR reaksiyon bileşenleri ve hacimleri.	41
Tablo 3.9: RT-qPCR programı ve çalışılan genler.	42
Tablo 4.1: TOS, TAS ve OSI analizi sonuçları.....	43
Tablo 4.2: Çalışma gruplarının karşılaştırmalı TOS sonuçları.	44
Tablo 4.3: Çalışma gruplarının karşılaştırmalı TAS sonuçları.	45
Tablo 4.4: Çalışma gruplarının karşılaştırmalı OSI sonuçları.	45
Tablo 4.5: ELISA analiz sonuçları.....	46
Tablo 4.6: ELISA analizlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.....	46
Tablo 4.7: Çalışma gruplarının Western blot sonuçları.	47
Tablo 4.8: Western blot analizlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.	48
Tablo 4.9: WGA grubu RT-qPCR analizi sonuçları.	50
Tablo 4.10: CP grubu RT-qPCR analizi sonuçları.....	51
Tablo 4.11: WGA+CP grubu RT-qPCR analizi sonuçları.....	52
Tablo 4.12: WGA grubu ilaç direnci ilişkili genlerin RT-qPCR analizi sonuçları... 53	
Tablo 4.13: CP grubu ilaç direnci ilişkili genlerin RT-qPCR analizi sonuçları.....	54
Tablo 4.14: WGA+CP grubu ilaç direnci ilişkili genlerin RT-qPCR analizi sonuçları	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Melanom patogenezinde anahtar rol oynayan gen ve protein kaskadını hedefleyen tedavi ajanları (25).....	5
Şekil 2.2: DSÖ 2018 yılı kutanöz melanom sınıflandırması (1).....	6
Şekil 2.3: Sisplatin kaynaklı DNA hasarı, oksidatif stres ve apoptoz (46).....	11
Şekil 2.4: İntrensek Apoptoz Yolağı (62).....	14
Şekil 2.5: Ekstrensek Apoptoz Yolağı (62).....	15
Şekil 2.6: İlaça duyarlı kanser hücrelerinde kemoterapötik ilacın etki mekanizması ve kemoterapiye dirençli kanser hücresinde antikanser ilaç direnci mekanizması (89).....	17
Şekil 3.1: Hemositometre (Thoma lamı).....	24
Şekil 3.2: MTT ve ürünü formazanın yapısı (91).....	25
Şekil 3.3: BCA yöntemiyle total protein ölçümü.....	27
Şekil 3.4: TAS ölçüm prensibi (93).....	28
Şekil 3.5: Bax, Bcl-2 ve Sit-c belirteçlerinin ELISA çalışması.....	32
Şekil 3.6: RT-qPCR cihazında protein denatürasyon protokolü.....	33
Şekil 3.7: Blotlama işeminde kullanılan iBLOT Gel Transfer sistemi.....	34
Şekil 3.8: SDS PAGE Jelindeki marker bantlarının nitroselüloz membrana transferi.....	35
Şekil 3.9: Ponceau S Staining solüsyonu ile nitroselüloz membranda görünür hale getirilen protein bantları.....	36
Şekil 3.10: Sekonder antikor uygulaması sonrası yıkama işlemi.....	38
Şekil 3.11: ImageJ programı ile Western blot bantlarının kantitasyonu.....	38
Şekil 3.12: cDNA sentezi termal profili.....	41
Şekil 4.1: MTT analiz sonuçları.....	43
Şekil 4.2: Gruplar arası TOS, TAS ve OSI sonuçlarının karşılaştırması (*: $p<0,05$).....	44
Şekil 4.3: Gruplar arası Bax, Bcl-2 ve Sit-c sonuçlarının karşılaştırması (*: $p<0,05$).....	47
Şekil 4.4: Western blot analiz sonucu.....	48
Şekil 4.5: Gruplar arası Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 sonuçları (*: $p<0,05$).....	49
Şekil 4.6: Gruplar arası Bölünmüş Kaspaz 9 karşılaştırma sonuçları (*: $p<0,05$).....	50
Şekil 4.7: WGA grubu mRNA ekspresyon sonuçları (*: $p<0,05$; **: $p<0,005$).....	51
Şekil 4.8: CP grubu mRNA ekspresyon sonuçları (**: $p<0,005$).....	52
Şekil 4.9: WGA+CP grubu mRNA ekspresyon sonuçları (*: $p<0,05$; **: $p<0,005$).....	53

Şekil 4.10: WGA uygulanmış grubun ilaç direnci genleri analiz sonuçları (*: p<0,05).	53
Şekil 4.11: CP uygulanmış grubun ilaç direnci genleri analiz sonuçları (*: p<0,05). 54	
Şekil 4.12: WGA+CP uygulanmış grubun ilaç direnci genleri analiz sonuçları (*: p<0,05).	55



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Melanositlerdeki mutasyonlardan kaynaklanan bir malignite olan melanom, cilt kanserleri arasında en az görüleni olmasına rağmen mortalitesi en yüksek cilt kanseridir (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, melanom insidansı küresel olarak artmaya devam etmekte ve ileri evredeki hastalar için sadece 5 yıllık sağkalım ve yüksek oranda mortalite söz konusudur (2). Melanomun kötü prognozu, melanom hücrelerinin Sisplatin (CP) gibi platin bazlı ilaçlar da dahil olmak üzere geleneksel kemoterapötik ilaçlara güçlü direncinden kaynaklanmaktadır (3).

Sisplatin, DNA (Deoksiribo nükleik asit) hasarını ve apoptozu indüklemeye yeteneği ile bilinen bir kemoterapötik ajan olmakla birlikte melanom tedavisinde çok etkili değildir. İn vitro çalışmalar, Sisplatin direncine neden olan hücresel mekanizmaların metallerin tarafından artmış detoksifikasyon, glutatyon seviyesinin yanı sıra glutatyon-S-transferazların artmış aktivitesi, DNA onarımının artması, DNA uyumsuzluk onarım sisteminin aktivitesinin azalması, apoptotik yanıtın azalması ve ABCC2 (Adenozin trifosfat bağlayıcı kaset C2) taşıyıcısının artmış ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Ancak tüm bu çalışmalar melanom kaynaklı hücreler yerine çeşitli non-ektodermal karsinoma hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (4-9). Buna göre, ABCC2'nin biyolojik aktivitesinin inhibisyonu, melanomda platin içeren ilaçlara karşı direncin aşılmasında ana hedef olabilir ve de ABCC2 klinikte Sisplatin direncinin tanısında iyi bir aday olarak görünmektedir (10).

Apoptotik yoldaki bozukluklar, CP'ye karşı melanom direncinden sorumlu anahtar faktörlerden biri olarak öne sürülmüştür (11). Bazı çalışmalar, bu ilacın diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte veya hedefe yönelik tedaviden sonra kullanıldığında melanom hastalarına klinik olarak faydalı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, tümör hücrelerini Sisplatine karşı daha duyarlı hale getirebilecek yeni moleküllerin tanımlanması, melanom tedavisinde gerçek ilaç etkinliğini artırmanın alternatif bir yoludur (12).

Buğday tohumundan türetilen bir lektin türevidir olan buğday ruşeymi aglutininini (WGA), spesifik olarak N -asetil-D-glukozamin'e (GlcNAc) ve N -asetil-nöraminik (siyalik) aside bağlanmaktadır ancak daha yakın zamanlarda glikonjugatlar ve oligosakkaritler üzerindeki siyalik asit kalıntılarıyla etkileşime girmesiyle karakterize

edilmiştir. Normal dokular için sınırlı toksisiteye rağmen, WGA'nın düşük dozlarda pankreas, karaciğer, kemik (osteosarkom) ve cilt (melanom) kanseri için toksik olduğu gösterilmiştir. WGA, melanom ve insan monoblastik lösemisinde apoptoz ve hücre döngüsü durması yoluyla öldürmeye neden olur. Ayrıca Fas, Kaspaz-3, Bax ve Bak'tan bağımsız yeni bir apoptotik tarzda da çalışabilir. WGA'nın servikal karsinom hücrelerinde paraptoza benzer hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Hedef hücrelere bağlı olan bu farklı öldürme modları, WGA'yı üzerinde çalışılması gereken ilgi çekici bir protein haline getirmektedir (13-18).

Sonuç olarak sunulan bu çalışmada amaç; melanom hücreleri üzerindeki etkileri daha önce yapılan değişik çalışmalarla ortaya konulmuş olan WGA ve CP'nin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde G361 melanom hücre hattında oksidatif stres, apoptoz ve ilaç direnci sürecine etkilerinin biyokimyasal ve moleküler analizlerle ortaya konularak değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, 21. yüzyılda önemli bir halk sağlığı ve ekonomi sorunu olup dünya çapında yaklaşık altı ölümün birinden (%16,8) ve bulaşıcı olmayan hastalık kaynaklı ölümlerin yaklaşık dörtte birinden (%22,8) sorumludur. Dünya çapında bulaşıcı olmayan hastalık kaynaklı erken ölümlerin neredeyse 10'da üçüne (30-69 yaş arasındakilerde %30,3) neden olur ve 183 ülkenin 177'sinde bu yaş grubundaki önde gelen üç ölüm nedeninden biridir (19).

Kanser, çok sayıda moleküler ve hücreyel yolağın aracılık ettiği karmaşık bir hastalıktır. Karsinogenezin kimyasallara maruz kalma, proto-onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde eksojen ve endojen etiyolojilere bağlı oluşan mutasyonlar ve normal hücreyel homeostaz için gerekli birçok kritik sinyal yolunun uygunsuz düzenlenmesi gibi çok sayıda faktörü içerdği kabul edilmektedir. Proliferasyonu arttıran ve/veya apoptozu azaltan kronik sinyalizasyon nedeniyle hücreler klonal olarak genişleyerek tümörlere dönüşür (20).

Kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve yayılmasını sağlayan edinilmiş işlevsel yetenekleri normal hücrelerden ayırt edici özellikleri olup farklı tümör tiplerinde farklı mekanizmalarla ve çok aşamalı tümör oluşumunun çeşitli aşamalarında edinilir (3). Bu ayırt edici özellikler proliferatif sinyali sürdürme, büyüme baskılayıcılarından kaçma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezi indüklemeye, invazyon ve metastazı aktive etme şeklinde olup bir dizi karmaşık süreç sonucunda oluşurlar. Bu ayırt edici özelliklerin altında genetik çeşitliliği oluşturan genomik kararsızlık ve inflamasyon yatmaktadır. Bu özelliklerin tanınması, kanser tedavisi için yeni araçların geliştirilmesini giderek daha fazla etkileyecektir (21).

2.2. Melanom

2.2.1. Tanım ve Etiyoloji

Melanositler epidermin bazal tabakasında, saç, uvea mukozal epiteli ve meninkslerde bulunan hücrelerdir. Melanositlerin birincil görevi melanozomlar içinde melaninin sentezlenip dendritik süreçler yoluyla komşu keratinositlere aktarılmasıdır

(22). Melanik pigmentler, eumelanin ve feomelanin, L-tirozin amino asidinden başlayan karmaşık biyokimyasal reaksiyonların son ürünüdür. Melanin, ultraviyole (UV) radyasyonun zararlı etkilerine karşı sağladığı foto koruma sayesinde cilt homeostazında önemli bir role sahiptir. Melanin UV radyasyonu emer ve/veya yansıtır ancak aynı zamanda serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) nötralize edilmesi sürecine de katılır. Pigmentogenez oksijene bağlı bir süreçtir ve intrinsek faktörlerin (genetik ve hormonal) yanı sıra ekstrinsek faktörler (ultraviyole radyasyon) tarafından da kontrol edilir. Melanogenez, α -melanosit uyarıcı hormon, adrenokortikotropin hormon, östrojen ve progesteron tarafından uyarılır (23).

Melanom, melanositlerin malign transformasyonu ile ortaya çıkan bir neoplazidir. Melanositler, nöral krestten köken alırlar. Bu nedenle melanomlar deriden gelişebildiği gibi, nöral krest hücrelerinin göç ettiği gastrointestinal sistem ve beyin gibi diğer yerlerden de gelişebilir (24).

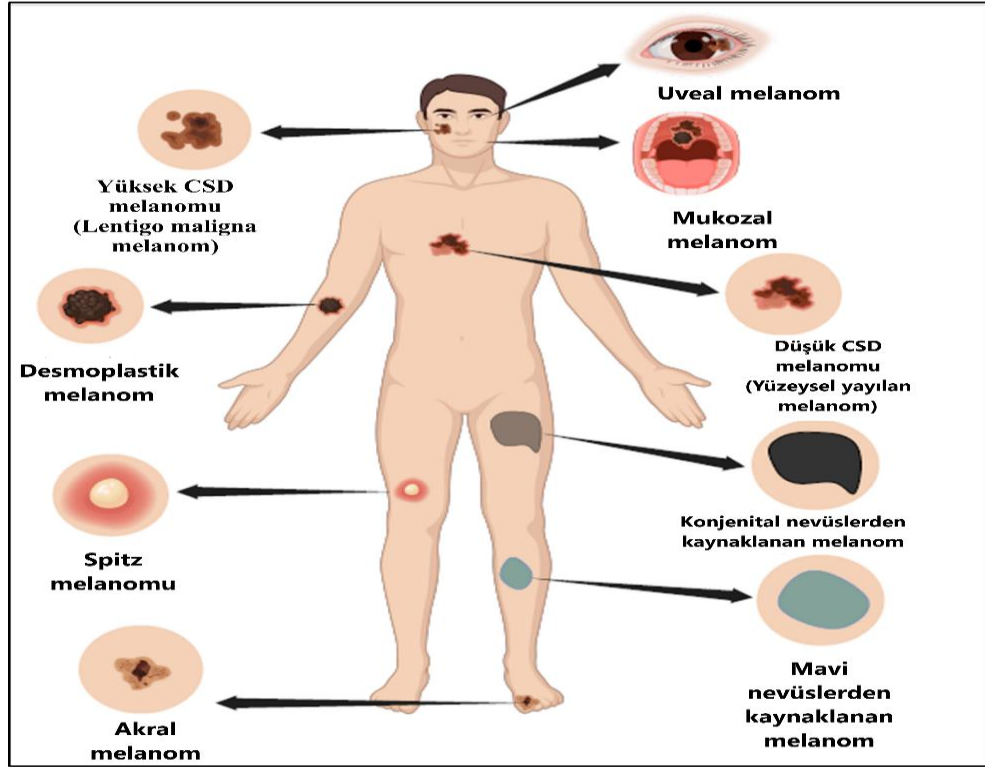
Kutanöz melanom, diğer deri hastalıklarıyla karşılaştırıldığında tüm deri malign tümörlerinin yalnızca %1,7'sini oluşturmaktadır. Terapötik yaklaşımlardaki son gelişmelere rağmen melanom hala en agresif cilt kanseridir ve beş yıllık sağkalım oranı sadece %15-20'dir (25).

Kutanöz melanom çeşitli çevresel faktörler ve genetik değişiklikler arasındaki dinamik etkileşim sonucu ortaya çıkar. UV-B ve UV-A radyasyon maruziyeti, güneş yanığı öyküsü, solaryum ile bronzlaşma (özellikle 35 yaşından önce), fototerapi tedavisi, çok sayıda melanositik veya displastik nevüs varlığı, dev konjenital nevüs varlığı, kendisinde veya ailesinde kutanöz melanom öyküsü, kişisel fenotipik özellikler (mavi gözler, açık veya kıvrık saçlar, soluk ten rengi ve çillenmeye eğilim), immünsuprese durum (örneğin; transplantasyon sonrası hastalar, hematolojik maligniteli hastalar) ve düşük sosyoekonomik düzey kutanöz melanom için tanımlanmış risk faktörleridir (24, 25).

Kanser Genom Atlası, melanomları dört moleküler alt tipte sınıflandırmıştır: V-raf mürin sarkomu viral onkogen homolog B1 (BRAF) mutasyonlu, rat sarkom virüsü (RAS) mutasyonlu, nörofibromatozis 1 (NF1) mutasyonlu ve üçlü vahşi tip (üç gende de mutasyon olmaması) (26). Yeni nesil dizileme çalışmaları, iyi bilinen genler (PTEN, MAP2K1-2, RB1) ve yakın zamanda tanımlanan genler

Ülkemizde melanomla ilişkili epidemiyolojik çalışmalar sınırlı sayıdadır. Türkiye Kanser Kayıt Merkezleri verilerine göre 2018 yılında kutanöz melanom tanısı alan olgu sayısı erkeklerde 823, kadınlarda 654 olmakla birlikte 2021 yılındaki tahmini vaka sayısı sırasıyla 849 ve 676'dır. Ülkemiz 2018 yılı kutanöz melanom insidansının erkeklerde 1,8/100.000 kişi-yıl, kadınlarda 1,2/100.000 kişi-yıl olduğu saptanmıştır (29).

Kutanöz melanomun mevcut sınıflandırması köken bölgesinden (epitel ilişkili veya epitel ilişkisiz), kümülatif güneş hasarının rolünden (CSD; yüksek CSD ile ilişkili, düşük CSD ile ilişkili veya CSD ile ilişkili olmayan), nevüs fenotipi (nevüs sayısının az/çok olması) ve BRAF, NRAS ve diğer ilgili mutasyonların sıklığından etkilenir (Şekil 2.2) (30).



Şekil 2.2: DSÖ 2018 yılı kutanöz melanom sınıflandırması (1).

Kutanöz melanomun klinik ve histopatolojik olarak klasik 4 alt tipi tanımlanmaktadır. En sık yüzeysel yayılan melanom görülür, intraepidermal yatay veya radyal büyüme paterni gösterir, sırt ve bacaklara yerleşir. İkinci sıklıkta nodüler melanom görülür, agresif bir dikey faz ile karakterizedir, gövde ve ekstremitelere yerleşir ve en kötü prognozlu olan tipidir. Lentigo malign melanom ise baş ve boyun bölgesine yerleşim gösteren çoğunlukla yaşlı bireylerin güneşten zarar görmüş yüz

bölgesinde lentigo malignadan (melanoma in situ) yıllar sonra ortaya çıkar. Bunlar dışında akrall lentiginöz melanom alt tipi de bulunmaktadır ve tipik olarak palmoplantar veya subungual yerleşimlidir (Şekil 2.2) (31, 32).

2.2.3. Tanı ve Tedavi

Tüm vücut cilt muayenesi melanomu teşhis etmede ihtiyaç duyulan en temel ve en önemli değerlendirmedir ve optimum aydınlatma varlığında yapılmalıdır. Cilt muayenesi genellikle şüpheli lezyonların dermatoskopik bakışı ile ABCDE kriterlerinin (Asimetri, Sınır düzensizliği, Renk heterojenliği, Çap ≥ 6 mm ve Değişim)) değerlendirmesiyle tamamlanır. Klinik olarak daha agresif seyirli olan nodüler melanomda klinik değerlendirme için EFG (Deride kabarıklık, Palpasyonda sertlik, Lezyonun son 1 aydır büyümeye devam etmesi) kriterleri de önerilmektedir. Şüpheli bir cilt lezyonu tanımlandıktan sonra melanom tanısını doğrulamak için biyopsi yapılmalıdır. Melanom tümör evrelemesi invazyon derinliğine dayandığından tam veya eksizyonel biyopsi alınması tercih edilir; ancak özellikle subungual, avuç içi veya ayak tabanındaki lezyonlar ve büyük lezyonlar gibi belirli durumlarda insizyonel biyopsi kabul edilebilir (24, 33).

Teşhis konulduktan sonra melanom, tedaviyi yönlendiren ve prognozu belirleyen Amerikan Ortak Kanseri Komitesi kılavuzları kullanılarak “primer tümör, lenf nodu ve uzak metastaz (TNM)” evreleme sistemine göre evrelendirilir. Buna göre T sınıflaması tümörün Breslow kalınlığı ve ülserasyon durumunu, N sınıflaması metastatik lenf nodu sayısını, M sınıflaması ise uzak metastazın yeri ve serum laktat dehidrogenaz seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (34).

Melanom tedavisinde şu anda mevcut olan cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedavi stratejileri tek başına veya kombine olarak uygulanmaktadır. En uygun tedavi stratejisinin seçimi tümörün anatomik konumuna, evresine, genetik profiline, hastanın yaşı ve genel sağlık durumuna bağlıdır. Mümkün olduğunda yeterli sınırlarla cerrahi eksizyon melanomun birinci basamak tedavisidir ve kemoterapi, immünoterapi, radyoterapi veya hedefli tedavi genellikle adjuvan tedaviler olarak kullanılır. Cerrahi eksizyon esas olarak evre I hastalarında küratif potansiyele sahipken evre II-IV grubundaki hastalarda tek başına sınırlı bir etkiye sahip olup adjuvan tedavilere ihtiyaç duyulur (35).

Melanom, radyasyonun neden olduğu DNA hasarını etkili bir şekilde onarma yeteneğine sahip olduğu için nispeten radyoterapiye dirençli bir tümördür. Bu nedenle istisnai durumlarda (örneğin cerrahinin mümkün olmaması veya nüks riskinin yüksek olması) tamamlayıcı olarak uygulanmaktadır (36).

Melanom tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı alan ilk kemoterapötik ilaç dakarbazin devamında da temozolomid, nitrozoüreler, paklitaksel, dosetaksel ve sis/karboplatin gibi birçok başka kemoterapötik ajan kullanılmıştır; ancak bu ilaçların tümör hücrelerine spesifik olmaması sebebiyle tümör mikroçevresinde birikimleri az olmaktadır. Bu durum kemoterapinin terapötik etkinliğini sınırlarken yan etkilerini de ciddi bir sorun haline getirmektedir (28). Kemoterapi özellikle metastaz veya nüks durumlarında diğerk terapötik sınıflarla kombinasyon şeklinde uygulanmaya ve de araştırılmaya devam etmektedir (37).

Vücudun bağışıklık sistemine karşı duyarlı bir tümör olan melanomda immünoterapi önemli bir rol oynar. Melanom tedavisi için onaylanmış dört sınıf immünolojik kontrol noktası inhibitörü monoklonal antikor vardır. Bunlar sitotoksik T lenfosit antijeni-4'ün bir antagonisti olan ipilimumab; programlanmış hücre ölümü proteini-1'in antagonistleri olan nivolumab ve pembrolizumab; programlanmış hücre ölümü ligandı-1'in antagonisti olan atezolizumab ve lenfosit aktivasyon geni-3'ün bir antagonisti olan relatlimab-rmbw'dir. Doğuştan gelen veya edinilmiş bağışıklık sebebiyle immünoterapiye yanıt vermeyen önemli oranda hasta varlığı ve bağışıklık sistemini uyaran etki mekanizmaları nedeniyle deri döküntüsü, kaşıntı, vitiligo, ishal, kolit, hipo/hipertiroidizm gibi yan etkilere neden olmaları immünoterapi kullanımını sınırlayan faktörlerdir (35, 38).

Melanomlardaki hedefe yönelik tedavinin amacı ana sinyal yollarında mutasyona uğrayan genlerin inhibisyonuyla malign hücrelerin kontrolsüz proliferasyonunun inhibe edilmesidir. Mitojenle aktive olan protein kinaz kaskadı, bir tirozin kinaz reseptörünün yanı sıra RAF, RAS, MEK ve ERK proteinlerinden de oluştuğu için melanomda en sık mutasyona uğrayan kaskattır. En sık mutasyona uğrayan genler ise BRAF, NRAS ve NF1'dir ve sırasıyla melanom vakalarının yaklaşık %50, %25 ve %14'ünde görülürler. Melanomda hedefe yönelik tedavi modalitesinde kullanımda olan ilaçlara vemurafenib, dabrafenib ve encorafenib (BRAF inhibitörleri) ve trametinib, kobimetinib ve binimetinib (MEK inhibitörleri)

örnek verilebilir (Şekil 2.1). Hedefe yönelik tedavi gruplarındaki farklılıklara rağmen kullanımlarını sınırlandıran ortak sebepler eklem ağrısı, yorgunluk, ishal, ateş, fotosensitivite; cilt, kardiyovasküler ve oküler toksisite gibi yan etkiler ve de direnç gelişimidir (35, 39, 40).

Son yıllarda melanom tedavisinin geliştirilmesine yönelik muazzam bir çaba gösterilmekte ancak melanomun oldukça agresif ve heterojen doğasının sonucu olarak mevcut tedaviler hala sınırlı kalmaktadır (41). Bu nedenle daha fazla ve daha iyi tedavi seçenekleri için yeni ilaçlar ve/veya kombinasyonlar test edilmektedir. Yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi araştırmacılar için bir öncelik olmaya devam etmekte ve bu durum devam eden çok sayıda prelinik ve klinik çalışmayla desteklenmektedir (35).

2.3. Sisplatin

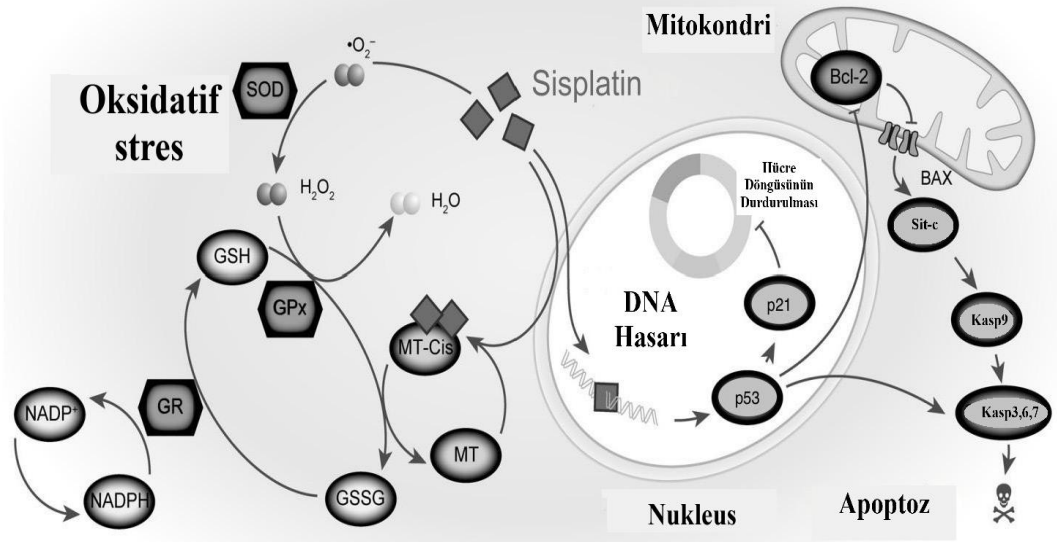
Sisplatin, formülü $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ olan aynı zamanda cis-diamin dikloro platin II olarak da adlandırılan metalik bir koordinasyon bileşiğidir. Oda sıcaklığında rengi beyazdan sarıya kadar değişebilen kristal bir tozudur. Suda çözünürlüğü kısıtlıdır ve dimetilprimanid ve N, N -dimetilformamidde çözünür (42).

Sisplatin ilk olarak 1844 yılında Michel Peyrone tarafından sentezlenmiş ve kimyasal yapısı 1893 yılında Alfred Werner tarafından açıklanmıştır. Antibakteriyel ve antineoplastik etkileri 1965'te sıvı ortamda platin elektrotlar ile oluşturulan elektriksel alanın *Escherichia Coli*'nin çoğalması üzerindeki etkisini incelemek üzere yapılan çalışmalar sırasında tesadüfen keşfedilmiş ve platin elektrotlarından ortaya çıkan elektroliz ürünlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Sisplatinin sarkom ve lösemi hücre hatlarındaki antitümör aktivitesi 1969 yılında test edilmiş ve 1978 yılında kanser tedavisi için kullanımı FDA tarafından onaylanan ilk platin bileşiği olmuştur (43).

Sisplatin hücreye girdiğinde aktif hale gelir. Sitoplazmada CP üzerindeki klorür atomlarının su molekülleriyle yer değiştirmesi sonucu oluşan hidrolize ürün, nükleofilik bölgesi olan herhangi bir makromolekül (DNA, RNA, proteinler, membran fosfolipitleri, hücre iskeleti elemanları ve tiyol grubu içeren moleküller) ile reaksiyona girebilen güçlü bir elektrofildir. Sisplatin, pürin kalıntılarındaki N7 reaktif merkezine bağlanarak DNA'da sarmal içi ve sarmallar arası çapraz bağlar oluşturarak hücre

bölünmesini engelleyebilir ve apoptotik hücre ölümünü gerçekleştirebilir (44).

Oksidatif stres, doz ve uygulanma süresi ile doğru orantılı olmak üzere CP'nin toksisitesinde rol oynayan en önemli mekanizmalardan biridir. Sisplatin kemoterapisi hepatotoksik, nefrotoksik, kardiyotoksik, nörotoksik ve/veya hematotoksik hasar gibi önemli yan etkilerle de ilişkilidir. İlaç direncine ek olarak yan etki gelişimi kemoterapi başarısını sınırlayan bir diğer önemli parametredir. Normal fizyolojik koşullar altında hücreler ROS seviyelerini oluşmaları ile atılmaları arasındaki dengeyi sağlayarak kontrol eder. Tiyoil grubu içeren antioksidanlar, hücrelerde serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesinde görev almaktadır. Sisplatin, tiyoil grupları ile etkileşime girerek tiyoil radikali oluşumuna neden olmaktadır. Mitokondri, CP ile indüklenen oksidatif stresin birincil hedefidir ve hücre ölümüyle sonuçlanan bir dizi değişikliğe yol açabilmektedir. Sisplatin-hücre etkileşimi DNA hasarına yol açarak p53 aktivasyonuna neden olur. DNA onarım mekanizmasına p21 modülasyonlu hücre döngüsünün durdurulması nedeniyle izin verilir. Hasar onarılamaz olduğunda, p53 antiapoptik B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2)'nin inhibisyonu ve buna bağlı kaspaz aktivasyonu ile apoptozu teşvik eder. Sisplatin, metalotiyonin (MT) ve glutatyonla bağlanır ve böylece bu bileşikler okside eder (GSH, indirgenmiş glutatyon formu; GSSG, oksitlenmiş glutatyon formu). Sisplatin süperoksit radikali ($\cdot\text{O}_2^-$) üretir, bu radikal süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülür, ardından glutatyon peroksidaz (GPx) ile GSH varlığında su molekülüne indirgenir. GSSG, glutatyon redüktaz (GR) tarafından NADPH varlığında indirgenir. Sisplatin kaynaklı toksisitede mitokondri hasarının merkezi rolü gösterilmiş ve bunun muhtemelen artmış reaktif oksijen türleri üretimi bunun sonucunda mitokondriyal yapı ve fonksiyonun bozulması, mitokondriyal antioksidan savunma sisteminin temel bileşenlerinin (GSH ve NADPH) tükenmesi ve apoptoz yoluyla hücre ölümünün gelişmesi sorumlu tutulmaktadır (Şekil 2.3) (44-46).



Şekil 2.3: Sisplatin kaynaklı DNA hasarı, oksidatif stres ve apoptoz (46).

2.4. Buğday Ruşeymi Aglutinini (WGA)

Lektinler spesifik karbonhidratlara geri dönüşümlü ve nonenzimatik olarak bağlanan, birçok mikro/makro organizmanın hücre yüzeyinde doğal olarak bulunan glikoproteinlerdir. Lektinler tanıma molekülleri olarak görev yapar ve diğer hücrelerdeki tamamlayıcı glikanlara (monosakkaritler, disakkaritler ve polisakkaritler dahil) bağlanarak hem hücreden hücreye hem de hücreden moleküle etkileşimlere aracılık ederler (47).

Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak atipik glikan yapılarına sahip yüzey glikokonjugatları eksprese eder. Glikan dallanma ve bileşenlerindeki varyasyonlar kanser hücrelerindeki yaygın glikozilasyon değişiklikleridir ve tümör hücresi invazyonu, migrasyonu ve proliferasyonuna katkıda bulunur. Kanser hücrelerindeki aberran glikozilasyon lektinler için potansiyel bir terapötik hedef olabilir (48).

Lektinlerin mikroorganizmalar ve hayvanlardaki biyolojik işlevleri çok çeşitli olup enfeksiyon savunması, doğuştan gelen bağışıklık, glikoprotein sentezi ve hücre döngüsünün düzenlenmesi rollerini içerir. Bitkilerdeki lektinler viral, bakteriyel ve fungal patojenlerin yanı sıra avcılara (böcekler gibi) karşı savunmada yer alan çok çeşitli moleküler yapılara sahip çeşitli proteinlerden oluşur (49).

Buğday, spesifik bir lektin olan buğday ruşeymi aglütinini (WGA) içerir. İşlenmemiş buğday tohumunda en yüksek; işlenmiş buğday tohumu, beyaz ve kepekli

unlarda en düşük miktarlarda bulunur (50). *Triticum aestivum*'dan izole edilen ve yapısı 1970'li yıllarda tanımlanan WGA, saflaştırılan ilk lektinlerden biridir. WGA1, WGA2 ve en belirgin form olan WGA3 izoformlarının karışımı olup 36.0 kDa boyutundadır. WGA polipeptit zinciri yüksek sıcaklık maruziyetinde stabil olup WGA monomerleri de asiditeye oldukça dirençlidir (51-53).

Lektin sitotoksitesi hücre yüzeyindeki glikokonjugat afinitesi, etkileşim süresi ve doz bağımlıdır. WGA, normal ve malign hücrelerin yüzeyindeki N-asetilnöraminik (siyalik) asit ve N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) ile etkileşimlere bağlı olarak klattrin-bağımsız endositoz mekanizmasıyla hücrelere alınır. WGA'nın, GlcNAc'e karşı yüksek özgülük göstermesiyle birlikte kanser hücrelerinde artmış olan siyalik asit içeren glikokonjugatlar ve oligosakkaritlerle olan etkileşimi sitotoksik aktivitesi için önemlidir (54).

WGA çalışılmakta olan hücre hattına bağlı olarak değişen düzeylerde ve farklı mekanizmalarla sitotoksik etki göstermektedir. WGA, L929 fare fibroblast hücre hattında paraptosisi indükleyerek hücre mimarisinin kaybına, vakuolleşmeye ve apoptozla ilişkili proteinler olan Bax ve Kaspaz-3 düzeylerinde artışa neden olmuştur (18). İnsan pankreas karsinomu hücre hatlarında WGA uygulaması apoptozla tutarlı olarak kromatin yoğunlaşmasına, nükleer parçalanmaya ve DNA salınımına neden olmuştur (55). Jurkat hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada WGA aracılı apoptozun mitokondriyal yol ile ilişkili olup mitokondri iç zar kardiyolipininde değişikliğe, zar geçirgenliğinde artışa, transmembran potansiyelinde kayba, Sitokrom c salınımına ve Kaspaz-9 aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (17). Bu bulgular WGA sitotoksitesinin karmaşık bir süreç olduğunu ve tümör hücrelerindeki glikozilasyon değişikliklerinin lektinlerin uygun hücre zarı glikan yapılarına bağlanmasını etkileyerek sonuçlardaki bu farklılıklara neden olduğunu göstermektedir (56).

2.5. Apoptoz

Apoptoz, embriyogenez ve yetişkin doku homeostazı gibi normal fizyolojik süreçlerde önemli rolü olan, sıkı bir şekilde düzenlenmiş ve evrimsel olarak korunan programlanmış bir hücre ölüm çeşididir. Radyoterapi ve sitotoksik ilaç alımı sonrası gelişen onarılamaz DNA hasarı, yanlış katlanmış proteinlerin birikimi, viral enfeksiyon, görevi tamamlanan T lenfositlerin yok edilmesi, hücre yaşlanması gibi

hem fizyolojik hem de patolojik sebeplerle başlayabilen apoptoz süreci enerjiye bağımlı olup doku homeostazı için proliferasyon süreci ile dinamik bir denge halindedir (56).

Apoptoz terimi ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında yayınlanan makalede kullanılmış olup morfolojik özelliklerinden hareketle aktif ve programlanmış bir fenomen olduğu vurgulanmıştır (57).

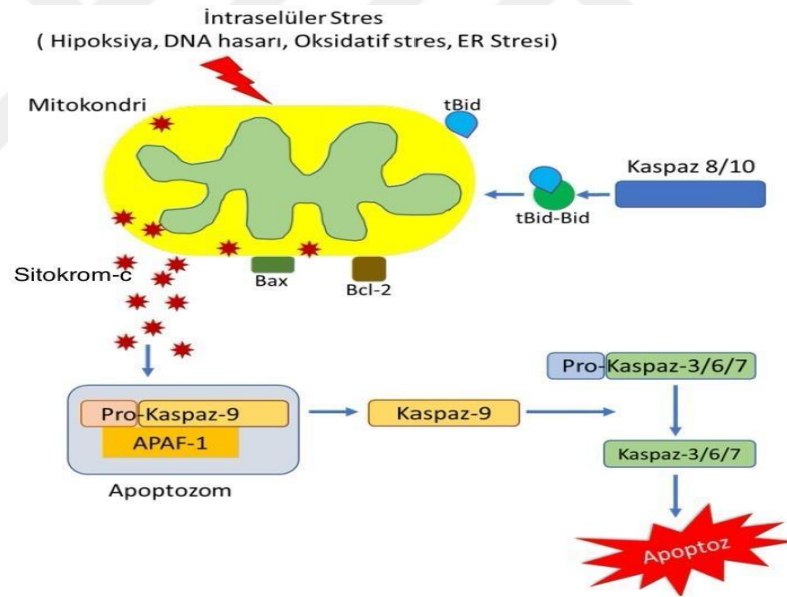
Apoptotik hücrelerde büzüşme ve küçülme ilk morfolojik bulgudur. Daha sonra apoptozun en karakteristik bulgusu olan kromatinin nükleer membran etrafında toplanarak yoğunlaşması gerçekleşir. Hücre membranı intakttır fakat membranda tomurcuklar oluşur ve sürecin sonunda hücre organelleri membran ile kaplı küçük apoptotik cisimlere dönüşür. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dışına göç eder. Fagositik hücre reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositoz uyarılır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosit edilirler (58, 59).

Apoptozun biyokimyasal süreci, kaspazlar (aspartat spesifik sistein proteazlar) olarak bilinen özel bir proteaz ailesinden bir dizi enzimin aktivasyonu ile gerçekleşir. Kaspazlar, apoptoz başlatıcıları (Kaspaz-2/8/9/10) ve hücre ölümünün yürütücüleri (efektör) (Kaspaz-3/6/7) olarak ikiye ayrılırlar. Kaspazların aktivasyonu dimerizasyon veya oligomerizasyona uğrayan prokaspaz adı verilen aktif olmayan zimojenlerin dönüşümü ile gerçekleşmektedir (60).

2.5.1. İntrensek Apoptoz

Apoptozun mitokondriyal yolu olarak da bilinen bu apoptoz formu, mitokondriden salınan faktörlere bağlıdır ve pozitif veya negatif sinyallerle başlatılır. Negatif sinyaller, hücrenin yakın çevresinde sitokinlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin bulunmamasından kaynaklanır. Bu sağkalım sinyalleri olmadığında, normalde inhibe edilen Puma, Noxa ve Bax gibi hücre içindeki pro-apoptotik moleküller aktif hale gelir ve apoptozu başlatır. Apoptozu başlatan diğer faktörler doğası gereği pozitifdir ve hipoksi, toksinler, radyasyon, ROS, virüsler ve çeşitli toksik ajanlara maruz kalmayı içerir (61).

İntrensek apoptoz yolağının en önemli üyeleri Bcl-2 ailesi proteinleridir ve etkileşimleri hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirler. Bu ailede apoptozu indükleyen Bcl-2 ilişkili X apoptoz regülatörü (Bax), BCL-2 ile ilişkili hücre ölüm proteini agonisti (Bad), Bcl-2 antagonist katili (Bak), BH3 etkileşim alan ölüm agonisti (Bid), Bcl-xs ve apoptozu inhibe eden Bcl-2, E1B-19K, Ced-9 ve Bcl-x1 proteinleri bulunur. Pro veya antiapoptotik proteinler olarak bilinen Bcl ailesi proteinleri mitokondriyal membranda bulunan, intrinsek apoptotik yolağın anahtar araçlarıdır. Proapoptotik aktiviteye sahip proteinlerin aktivasyonu mitokondri dış zar geçirgenliğinin artmasına, ardından intermembranöz alanda bulunan Sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesine neden olur. Sitoplazmaya salınan Sitokrom-c, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) ve prokaspaz 9 ile apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur ve kaspaz kaskadı başlatılmış olur. Bu kompleks, prokaspaz-9'u Kaspaz 9'a dönüştürür ve daha sonra Kaspaz-3/6/7 öldürücü kaspazları aktive ederek hücre apoptozunu indükler (Şekil 2.4) (62-64).

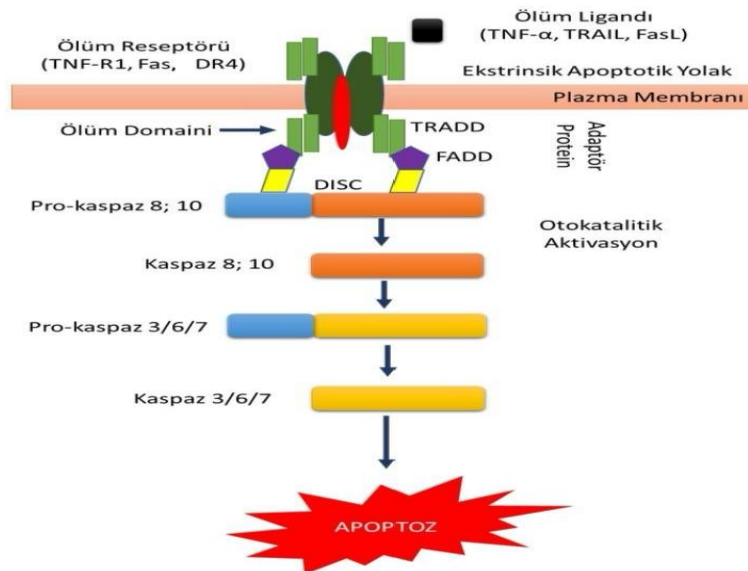


Şekil 2.4: İntrensek Apoptoz Yolağı (62).

2.5.2. Ekstresek Apoptoz

Ekstresek apoptoz yolu aktive edilmiş T lenfositler, doğal öldürücü (NK) hücreler ve makrofajların hedef hücre zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlatılır ve ölüm reseptörleri ile ölüm ligandlarının etkileşimiyle indüklenir (65).

Ölüm ligandları arasında; FasL, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), TNF ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ve APO-3/APO-2 sayılabilir. En iyi bilinen ölüm reseptörleri TNF tip 1 reseptörü (TNF-R1) ve Fas (CD95) integral proteinlerdir. Ölüm reseptörlerinin ölüm domaini denilen ve adaptör proteinlerle bağlanan hücre içi kısımları vardır. Sitotoksik T lenfositlerde FasL mevcuttur. Bu ligand yardımıyla virüsle enfekte hücreler, self-reaktif T lenfositler ve tümör hücrelerindeki Fas reseptörüne bağlanır ve apoptoz başlatılır. Bağlanma sonrası Fas İlişkili Ölüm Domaini (FADD) aktivasyonu gerçekleşir ve sonrasında kaspaz kaskadı aktivasyonu başlatılır (66). Ligandı ile bağlanmış ölüm reseptörünün adaptör protein ile etkileşimi ekstresek yolağın başlatıcı kaspazları olan Kaspaz-8/10'un aktivasyonunu sağlar. Aktive olan Kaspaz-8/10, efektör kaspazlar olan Kaspaz-3/6/7'yi aktive eder. Bu aktivasyon ile hücre ölümüne yol açan DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu, proteinlerin ve hücre iskeletinin imhası başlar (Şekil 2.5) (62,67).



Şekil 2.5: Ekstresek Apoptoz Yolağı (62).

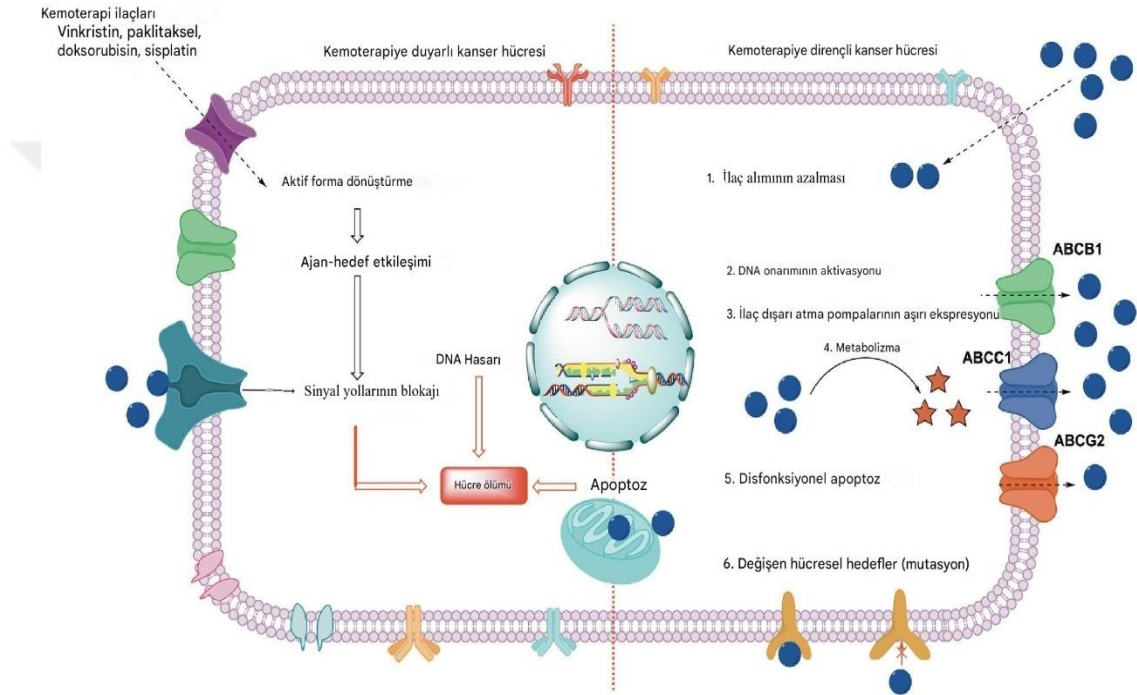
2.6. Çoklu İlaç Direnci (MDR) ve ATP Bağlayıcı Kaset Ailesi (ABC)

Kemoterapi tek başına veya cerrahi, immünoterapi ve radyoterapi gibi diğer tedavi modaliteleriyle birlikte uygulanan önde gelen kanser tedavisi yöntemlerinden biridir. Kemoterapi, özellikle dissemine kanserler olmak üzere birçok malign tümör türünün tedavisinde en etkili yaklaşımlardan biridir, ancak metastatik melanomlar bu tedaviye zayıf yanıt verir. Kemoterapi sırasında ilaç direncinin ortaya çıkması, klinikte sıkça karşılaşılan bir sorun olup nükslere ve ölümlere neden olmaktadır. Kemoterapinin etkinliği kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncine (MDR) neden olan çeşitli mekanizmalarla sınırlıdır. Anti-kanser ilaçların artan dozlarıyla in vitro kültüre edilen model hücreler üzerinde yapılan kapsamlı araştırmalar, ilaç direncinin çeşitli hücresel mekanizmalarını ortaya çıkarmıştır. Terapötik dirençte rol oynayan yaygın moleküler mekanizmalar arasında ilaç inaktivasyonu, ilaç hedefi değişikliği, ilaç dışarı atımı, DNA hasarı onarımı, hücre ölümü inhibisyonu, büyüme ve sağ kalım sinyal yollarının aşırı aktivasyonu ve genetik mutasyonların çoğalması yer alır ancak melanom hücrelerindeki ilaç direncinin kesin mekanizması büyük ölçüde bilinmemektedir (Şekil 2.6). Kanserlerde MDR'nin en yaygın nedeni, antikanser ilaçları hücreden dışarı atan bir veya daha fazla enerjiye bağımlı çoklu ilaç taşıyıcısının ekspresyonudur (68-70).

ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı ailesi üyeleri, yalnızca insan hücrelerinde değil, tüm canlılarda bulunan ve hücre zarları boyunca çeşitli ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin taşınmasını sağlayan transmembran proteinlerdir. Belirli bir substrat transmembran alanına bağlandığında nükleotid bağlanma bölgesindeki ATP'nin hidrolizi substratı hücrenin dışına iten konformasyonel bir değişikliğine neden olur. ABC taşıyıcıları kan-beyin bariyeri, plasenta ve kan-testis bariyerinde mevcut olmakla birlikte baskın olarak ilaç emilimi, metabolizması ve atılımından sorumlu karaciğer, böbrek ve bağırsak epitelinde eksprese edilmektedir. İnsan ABC taşıyıcıları toplamda 49 aile üyesiyle yedi sınıfa (A-G) ayrılmıştır (71-74).

ABC taşıyıcıları yoluyla dışarı atılma normal fizyolojik bir süreç olsa da aynı zamanda kanser hücrelerinde ilaç direncinin bilinen bir mekanizmasıdır. Melanom hücreleri çok çeşitli antikanser ilaçlara ve / veya melanositlerin toksik melanin ara ürünlerine ve metabolitlerine karşı direnciyle ilişkili olabilecek bir grup ABC taşıyıcısını (ABCA9, ABCB1, ABCB5, ABCB8, ABCC1, ABCC2, ABCD1 ve

ABCG2 gibi) eksprese eder. Bu taşıyıcılar arasında, MDR ilişkili protein1 (MRP1/ABCC1), meme kanseri direnç proteini (MXR veya BCRP/ABCG2) ve p-glikoprotein (MDR1/ABCB1) kanser hücrelerinde MDR'den sorumludur. Bu taşıyıcıların in vitro ve in vivo MDR fenotipi verme kapasiteleri çok çeşitli insan kanserlerinde iyi karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, bu taşıyıcıların çoğunun melanom hücrelerindeki işlevleri açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu taşıyıcı proteinlerin melanom ilaç direncindeki rollerinin aydınlatılması melanomlarda MDR'nin moleküler müdahalesi için yol gösterici olacaktır (75, 76).



Şekil 2.6: İlaça duyarlı kanser hücrelerinde kemoterapötik ilacın etki mekanizması ve kemoterapiye dirençli kanser hücresinde antikanser ilaç direnci mekanizması (89).

ABCB1 (P-glikoprotein), memeli ABC protein ailesinin tanımlanan ilk üyesidir ve 170 kDa ağırlığındadır (77). Vinka alkaloidleri, etoposid, teniposid, kamptotesinler, metotreksat, kolşisinler, aktinomisin D, antrasiklinler ve mitoksantron dahil olmak üzere çok sayıda klasik antikanser ajan ABCB1'in iyi bilinen ilaç substratlarıdır (78). ABCB1 bağırsak mukoza zarı, böbrek proksimal tübül epiteli, karaciğer, plasenta ve kan-beyin bariyerinde bulunan apikal membran taşıyıcısıdır. Geniş doku dağılımı ve substrat özgüllüğü göz önüne alındığında, ABCB1'in antikanser ilaçların oral biyoyararlanımını sınırlamada, ilaç dağılımını ve kan-beyin bariyerini geçmesini önlemede ve hastalarda terapötik sonucu etkilemede önemli bir rol oynaması şaşırtıcı değildir (79, 80). Melanomlar açısından, endojen ABCB1 mRNA ekspresyonu SK-MEL-28, SK-MEL-5 ve M16 melanom hücre hatlarında ve

kutanöz olmayan melanomlarda tespit edilmiştir (81).

ABCC1, ABCC süper ailesine ait 1531 amino asit içeren 190 kDa'lık bir transmembran proteindir. ABCC1'in birincil işlevi, glutatyon (GSH) ile konjuge olan amfipatik organik anyonları ve hidrofobik ilaçları taşımaktır. Ayrıca arsenit ve üç değerlikli antimon gibi organik olmayan ağır metal oksianyonlarını da taşır. ABCC1'in substratları arasında doksorubisin, daunorubisin, epirubisin, idarubisin, mitoksantron, epipodofilotoksinler, metotreksat, ZD1694, paklitaksel, sisplatin, irinotekan, SN-38, vinkristin, vinblastin, flutamid ve hidroksiflutamid gibi ilaçlar bulunur (82-86).

ABCG2, ABCG süper ailesine ait 655 amino asitten oluşan 72 kDa'lık bir proteindir. ABCG2 imatinib, gefitinib, mitoksantron, bisantren, etoposid, teniposit, topotekan, irinotekan, flavopiridol ve antrasiklinler gibi çok çeşitli ilaçların atılmasından sorumludur (86-89).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

“Melanomda Sisplatin Tedavisine Buğday Ruşeymi Aglutinini (WGA) İlavesinin Biyokimyasal Mekanizmalar ve İlaç Direnci Üzerine Etkisinin Hücre Kültüründe Araştırılması” başlıklı çalışma için Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı’ndan 10.10.2023 tarihli, 2023/10 toplantı numaralı ve 2011 -KAEEK-2 sayılı kararı ile onay alınmıştır (EK-1).

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) (Kat. No: CRL-1424, Manassas, ABD) ‘den temin edilen G361 melanom hücre hattı kullanıldı.

Sitotoksite analizi sonrası CP ve WGA’ya ait IC₅₀ dozları belirlendikten sonra (CP, WGA, WGA+CP) grupları oluşturularak belirlenen IC₅₀ dozlarında uygulama yapıldı. Herhangi bir ajan uygulanmayan Kontrol grubu da son grup olarak belirlenerek tüm biyokimyasal ve moleküler analizlerde bu grupların her biri diğeriyle karşılaştırılarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı değerlendirildi.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme, Kit ve Cihaz Listesi

Tablo 3.1: Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler.

Adı	Üretici Firma
Pipet ucu (10µl)	Vwr, ABD
Filtreli pipet ucu (100µl ve 1000µl)	Kırgen, Türkiye
Falkon tüpü (15 mL)	Vwr, ABD
Falkon tüpü (50 mL)	SPL life sciences, Kore
Flask (25 cm ² ve 75 cm ²)	Vwr, ABD
5 ve 10 mL’lik steril enjektör	Setecoject, Türkiye
5, 10 ve 25 mL’lik tek kullanımlık serolojik pipet	Costar, ABD
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	Wuxi NEST biotechnology, Çin
Petri kapları (100 mL)	Vwr, ABD
Vakum pompası	Vwr, ABD
Cam pastör pipeti	Isolab, Almanya
Filtre	Vwr, ABD
Kriyotüp (1.8 mL)	SPL life sciences, Kore
Parafilm	Bemis, Türkiye
Thoma lamı	Isotherm, Türkiye
Sisplatin	Sigma-Aldrich, Almanya
Biyotinile süksinile WGA	Vector laboratories, ABD

MTT (Tiazolil mavi tetrazolyum bromür %98)	Sigma–Aldrich, Almanya
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma–Aldrich, Almanya
Fetal sığır serumu (FBS)	Capricorn scientific, Almanya
Penisilin-streptomisin solüsyonu	Capricorn scientific, Almanya
L-Glutamin solüsyonu	Biological Industries, İsrail
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Almanya
Trypan blue solüsyonu	Biological Industries, İsrail
Tripsin-EDTA solüsyonu	Biological Industries, İsrail
Etil alkol	Sigma–Aldrich, ABD,
Proteaz inhibitör kokteyli	Roche Complete, Cat. No: 11 697 498 001
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	MERCK
HEPES Tampon	Biological Industries, İsrail
Triton X-100	BioShop, Kanada
EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)	SERVA
PBS tablet	Sigma, Kat. No: P4417-100TAB
2-Merkaptoetanol	Merck, Almanya
Tween 20	Sigma-Aldrich, Almanya
MES SDS-PAGE running buffer 10X.	Biolegend, Kat. No: 426307
SDS PAGE sample loading buffer	ABP Biosciences, Kat.No: P013
Sample reducing agent	Novex Bolt, Ref: B0009
Bis-Tris gradient jeli	Invitrogen NuPAGE 4-12% Bis Tris Gel, Kat. No: NP0323BOX
Protein ladder	BLUeye Prestained Protein Ladder, Kat. No: PM007-0500)
Western blot jel bıçağı	Gel Knife Each, Thermo: EI9010
iBLOT2 gel transfer sistemi	Invitrogen iBlot 2 NC Regular Top &Bottom Stack, Ref. No: IB23001
Ponceau S staining solution	Thermo Scientific, Cat. No: A40000279
ECL solüsyonu	Advansta WesternBright ECL, Cat. No: K-12045-D50
Hücre kazıyıcı	VWR, Kat. No: 734-0386)
%96-100 Etanol	Merck, Almanya
8’li PCR stripleri	Axygen, Kat. No: 12667212

Tablo 3.2: Çalışmada Kullanılan Analiz Kitleri.

Adı	Üretici Firma
Protein İzolasyonu Kiti	GeneAll ProteinEx, Kore, Kat. No: 701-001
Protein Ölçüm Kiti	TaKaRa Bio Inc, Japonya, Kat. No: T9300A
TAS ticari analiz kiti	Elabscience Bio Inc, ABD, Kat.No: E-BC-K801-M
TOS ticari analiz kiti	Elabscience Bio Inc, ABD, Kat.No: E-BC-K802-M
Bcl-2 ELISA kiti	Elabscience Bio Inc, ABD, Kat.No: E-EL-H0114
Bax ELISA kiti	Elabscience Bio Inc, ABD, Kat.No: E-EL-H0562
Sit-C ELISA kiti	Elabscience Bio Inc, ABD, Kat.No: E-EL-H0056
Western Blot kiti	Invitrogen Blot2 NC Regular Stack, Ref. No: IB23001
Total RNA izolasyon kiti	EURX, GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Kat. No: E3598
cDNA sentez kiti	OneScript Plus, Kat. No: G236, Kanada

Tablo 3.3: Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Aletler Listesi.

Adı	Üretici Firma
Işık mikroskobu	Leica, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Nüve Nf 400, Türkiye
Laminar flow kabini	JSCB-1200SB, Kore
No-frost buzdolabı	Arçelik, Türkiye
CO ₂ inkübatörü	Thermo Scientific, Almanya
Su banyosu	GFL Technologies, Almanya
Şarjlı pipetör	Brand, Almanya
Farklı hacimlerde otomatik mikropipetler	Proline Plus, Eppendorf, Japonya
Hassas terazi	Ohaus, ABD
-152°C derin dondurucu	PHC Cooperation, MDF-1156-PE, Japonya
Vorteks	VELP Scientifica, İtalya
Manyetik karıştırıcı	VELP Scientifica, İtalya
Strip santrifüj	PicoFuge PMC-060, ABD
ELISA plaka okuyucusu	RT-2100C, Rayto, Çin
ELISA mikrolate yıkayıcı	RT-3100, Rayto, Çin
RT-qPCR cihazı	Biorad, ABD
Orbital çalkalayıcı	Allsheng OS-200, Çin
Western blot görüntüleme cihazı	GeneGnome, İngiltere
Dikey elektroforez sistemi	Invitrogen Novex Mini-Cell, Kanada
Western blot roller	Thermo, Kat. No: 84747, Almanya
İBLOT2 western blot transfer sistemi	Invitrogen

3.1.2. Komple Medium Hazırlanışı

500 mL'lik komple medium hazırlamak için bileşenler ve miktarları Tablo 3.4'te belirtildiği şekilde vakum pompası aracılığı ile 0,22 µm por çaplarına sahip membran filtreden geçirilerek steril bir şekilde laminar flow kabin içinde hazırlandı.

Tablo 3.4: Komple Medyum Bileşenleri.

1.	50 mL ısı ile inaktive edilmiş Fetal Sığır Serum (FBS)
2.	5 mL penisilin-streptomisin solüsyonu
3.	440 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
4.	5 mL Glutamin

Hazırlanmış olan komple medium steril bir şişeye alınarak +4°C'ye kaldırıldı. İlerleyen aşamalarda hücrelerin çözündürülmesi, çoğaltılması ve pasajlanması gibi işlemlerde kullanılmadan önce 37°C'deki su banyosunda 20-30 dakika kadar ısıtıldı.

3.1.3. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması

- (1) -152°C derin dondurucuda karyotüpler içinde saklanan hücreler 37°C'deki sıcak su banyosunda 3 dakikayı geçmeyecek şekilde ısıtılarak kontrollü bir şekilde çözdürüldü.
- (2) 15 mL'lik bir falkon tüpüne önceden hazırlanmış ve su banyosunda 37°C'ye getirilmiş komple mediumdan 12 mL konuldu, çözünen hücreler falkon tüpüne eklendi, homojenizasyonu için nazıkçe pipetaj yapıldıktan sonra 25°C, 400xg devirde 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve santrifüj sonunda falkon tabanında biriken hücrelere temas edilmeden üstteki medium pastör pipetle çekildi.
- (3) Falkon tüpü tabanında kalan hücre peleti üzerine tekrar 2 mL medium eklenip homojenizasyonu için nazıkçe pipetaj yapılarak tekrar yıkama işlemi yapıldı ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tekrar hücrelerin üzerinde kalan medium çekilerek pellet ayrımı yapıldı. Bu basamak 2 kez tekrarlandı.
- (4) Toplamda 3 kez yıkama işlemi ile hücrelerin dondurma işlemi sırasında kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO)'dan arındırılan G361 hücreleri flaska ekilmek üzere 1 mL medium içinde süspanse edildi ve ekim için hazırlanan 25cm²'lik flaska son hacmi 5 mL olacak şekilde ekildi.
- (5) Hücreler invert ışık mikroskobu altında kontrol edildikten sonra 37°C ve %5 CO₂ koşullarındaki inkübatöre kaldırıldı.
- (6) Düzenli takibi yapılan hücrelerin yaklaşık 2. gününde flask tabanında %80-90 oranında konflüye olduğu görüldüğünde üzerindeki medium steril pipet ile çekildi. Hücrelerin üzerine 1 mL %0,25 Tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletilerek hücrelerin Tripsin-EDTA solüsyonu içerisinde süspanse olmaları sağlandı. Bütün hücrelerin flask tabanından tamamen ayrılabilmesi için flaska hafifçe vurularak ayrılımları sağlandı.
- (7) Flaskın içine 3-5 mL medium eklenerek süspanse edilen hücre ortamındaki bir proteaz grubu enzimi olan tripsin dilüe hale getirilip hücrelere verebileceği zarar en az düzeye indirildi.
- (8) Tripsinize hücre ve medium karışımı steril bir falkon tüpüne alındı ve

detripsinizasyon için santrifüj (25°C, 400xg devirde 5 dakika süreyle) edilerek elde edilen süpernatant atıldı.

- (9) Falkon tüpünde kalan hücre pelleti üzerine 1 mL komple medium eklenerek nazikçe pipetajla homojen hale getirildi ve ardından içerisinde 10 mL medium bulunan 75 cm²'lik flaska pasajlandı.
- (10) Hücreler 37°C ve %5 CO₂ koşullarında yaklaşık 3 günlük inkübasyonun ardından 75 cm²'lik flask tabanını %80-90 doldurduğu görüldüğünde tekrar tripsinizasyon/detripsinizasyon işlemi uygulandı.
- (11) Tekrar ekilebilecek duruma gelen G361 melanom hücre hattı daha fazla sayıda flaska pasajlanmak üzere 8 ve 9. adımlarda belirtildiği şekilde tekrar işleme alındı.
- (12) Elde edilen peletteki hücrelerin bir kısmı cm²'de 4x10⁴ hücre yoğunluğu olacak şekilde 10 mL komple medium içeren 75 cm²'lik flaslara 3x10⁶ hücre pasajlandı, bir kısmı da yedeklemek amacıyla donduruldu.
- (13) Dondurma protokolü öncesinde hücreler thoma lamı kullanılarak invert ışık mikroskobu altında sayıldı.

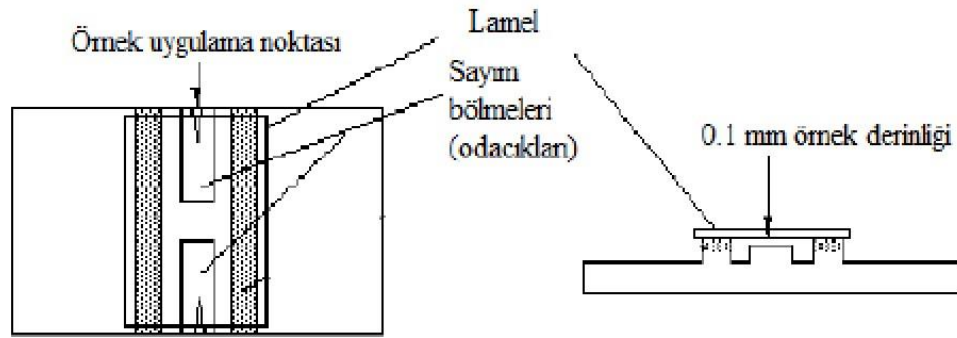
3.1.4. Thoma Lamında Hücre Sayımı

- (1) Flask tabanından %0,25 Tripsin-EDTA uygulamasıyla kaldırılmış olan hücreleri içeren süspansiyon içeriği santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılarak elde edilen pelet ile 100 µL'lik DMEM karışımı hazırlandı.
- (2) Hazırlanan süspansiyonun üzerine 100 µL tripan blue solüsyonu eklenip homojenizasyon için nazikçe pipetaj yapılarak süspansiyon 2 kat dilüe hale getirildi.
- (3) Hücrelerin sayımında kullanılacak olan lamel öncelikle steril distile su ile nemlendirilerek thoma lamının üzerine kapatıldı. Hazırlanan tripan blue-hücre süspansiyonundan thoma lamı ile lamelin kesiştiği noktaya sayma kamarası tamamen dolana kadar otomatik pipet ile uygun şekilde konuldu. Süspansiyon içeriği sayma kamarasına homojen bir şekilde dağıldıktan sonra invert ışık mikroskobu altında thoma lamında tam ortada gözlemlenen büyük kare içindeki

parlak görüntü veren hücreler canlı kabul edilerek sayıldı. Sayımın yaklaşık 50-100 arasında olması hedeflendi.

- (4) Hücre süspansiyonunun mL'sinde kaç hücre olduğu [mL'deki canlı hücre sayısı = (Ortalama Hücre Sayısı) x (10⁴) x (Dilüsyon Faktörü)] formülü ile hesaplandı. (Thoma lamı ile lamel arasında kalan mesafe 0.1 mm ve sayım yapılan büyük karenin kenar uzunluğu 1 mm olduğu için sayım alanı 1x1x0.1=0,1 mm³ hacme karşılık gelmekte (Şekil 3.1), mL'deki hücre sayısına ulaşmak için 10⁴ çarpma işlemi formülde bulunmaktadır. Dilüsyon faktörü 2 alındı.)

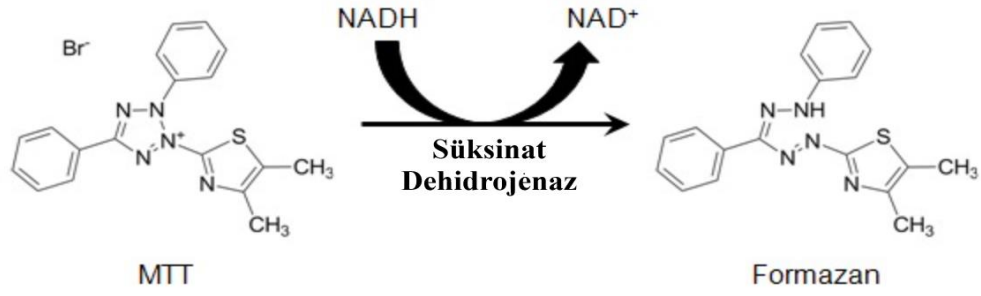
Analizlerde olması gereken hücre sayısı için hücre süspansiyonundan kaç mL alınması gerektiği hesaplanarak, hücrelerle yapılacak diğer işlemlere geçildi.



Şekil 3.1: Hemositometre (Thoma lamı).

3.2. MTT Hücre Canlılık Testi ve IC₅₀ Doz Belirleme Çalışmaları

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tetrazolyum indirgeme testi, 96 kuyucuklu well plateler için geliştirilen ilk hücre canlılığı testidir ve sitotoksosite çalışmalarında yaygın kullanıma sahiptir. Test prensibi olarak sarı renkli MTT çözeltisi well platelerdeki aktif metabolizmaya sahip canlı hücrelerdeki mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimi ile suda çözünmeyen mavi-mor renkli formazan ürününe dönüştürülür (Şekil 3.2). Hücreler canlılığını kaybettiğinde, MTT'yi formazana dönüştürme yeteneğini kaybederler. Oluşan ürün rengi ve dolayısıyla ölçülen absorbans değeri hücrelerin canlılık oranlarıyla doğru orantılıdır ve canlılık testi analizine olanak sağlar (90, 91).



Şekil 3.2: MTT ve ürünü formazanın yapısı (91).

- (1) 96 kuyucuklu well plateler kullanılarak her bir kuyucukta yaklaşık 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve well plate inkübatöre kaldırıldı.
- (2) Hücrelerin %75 oranında konflue olmasıyla Sisplatin (1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ve 500 μM) ve WGA (1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ve 500 $\mu\text{g/mL}$) konsantrasyonlarında 4 tekrar olacak şekilde 24 saat uygulandı.
- (3) Sisplatin ve WGA ajanları DMSO'da çözdürüldüğü için kontrol grubundaki hücrelere de %0,05'lik DMSO uygulaması yapıldı.
- (4) 37°C 'de %5 CO_2 şartlarında 24 saatlik inkübasyonun sonunda ajan uygulamasının yapıldığı kuyucukların mediumu yeni ve FBS'siz mediumla değiştirildi. Ardından her bir kuyucuğa 10 μL MTT çözeltisi (5mg/mL, PBS içerisinde) eklenerek tekrar 37°C 'de %5 CO_2 şartlarında yaklaşık 4 saat inkübe edildi.
- (5) İnkübasyonun tamamlanmasının ardından kuyucuklardan MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 μL DMSO eklendi. Yaklaşık 5 dakikalık inkübasyonun ardından oluşan formazan kristallerine ait optik dansite değerleri ELISA plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda belirlendi.

Herhangi bir ajan uygulaması yapılmayan kontrol grubu hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmesi prensibiyle, uygulama yapılan ajanlara ait konsantrasyon ve ölçüm sonucu elde edilen optik dansite değerleri GraphPad Prism Version 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) programında kullanılarak analiz edildi ve IC_{50} dozları hesaplandı.

MTT uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığını %50

oranında azaltan Sisplatin ve WGA konsantrasyonları IC_{50} dozu olarak kabul edildi. Biyokimyasal ve moleküler analizler için IC_{50} dozu olarak kullanıldı.

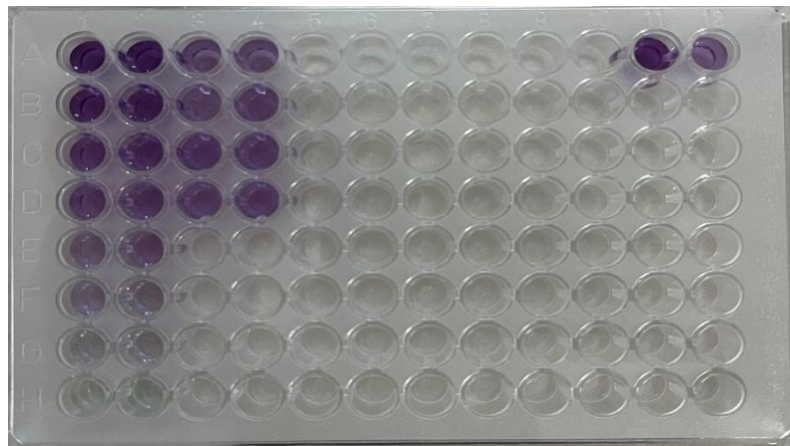
3.3. Hücre Lizatları ve Lizis Tamponu Hazırlanması

- (1) Sisplatin, WGA ve Sisplatin+WGA ajanları belirlenen IC_{50} dozlarında flask tabanını yaklaşık %75 oranında kaplayan G361 melanom hücre hatlarına uygulanarak 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.
- (2) İnkübasyon sürecinin sonuna doğru lizis tampon çözelti hazırlığına geçildi.
- (3) Öncelikle 500 mL'lik bir balon jojeye bir miktar distile su alındı ve üzerine hassas terazide tartılan 7.8 gr ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) eklenerek manyetik karıştırıcıda orta hızda homojen bir şekilde çözününceye kadar karıştırıldı.
- (4) Daha sonra üzerine 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (HEPES) tamponundan 25 mL, 40 mL proteaz inhibitör kokteyli (1 tablet 50 mL distile su içinde çözüldü, bu çözeltiden 40 mL kullanıldı), 5 mL Triton-X 100, 10 mL 0.5M EDTA eklendi. İyice karıştırılan çözeltinin son hacmi distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- (5) İnkübasyonun tamamlanmasıyla hücrelerin flask tabanından ayrılması için 1 mL %0,25 tripsin-EDTA eklendi ve kısa bir süre sonra da hafif vurma hareketleri ile hücreler flask tabanından kaldırıldı.
- (6) Elde edilen süspansiyon halindeki hücreler otomatik pipet ile toplanarak $25^{\circ}C$, 400xg devirde 5 dakika santrifüj edilmek üzere falkon tüpe aktarıldı.
- (7) Santrifüj sonrası tüpteki süpernatant çekilerek atıldı ve tabanda kalan pellet 10 mL soğuk PBS ile 2 kez yıkanarak tekrar santrifüj edildi.
- (8) Her bir çalışma grubuna ait flasktan elde edilen pellet üzerine daha önce hazırlanmış olan hücre lizis tamponundan 100 μL eklenerek buz üzerinde yavaşça pipetaj yapıldı ve sonrasında buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi.
- (9) İnkübasyonun tamamlanmasıyla 16000xg, $4^{\circ}C$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde elde edilen süpernatantlar sonraki analizlerde kullanılmak üzere ependorf godelere alınarak buzdolabındaki $-20^{\circ}C$ bölümüne kaldırıldı.

3.4. Total Protein Ölçümü

Hücre lizatlarında total protein ölçümü TaKaRa Protein Ölçüm kiti ile aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapıldı. Çalışmada kullanılan kit bisinkoninik asit (BCA) yöntemi prensibiyle çalışmaktadır. BCA yöntemi 2 basamaklı bir reaksiyondur. İlk adımda alkali bir ortamda Cu^{+2} iyonları peptit bağı azot atomlarına bağlanır ve Cu^{+1} iyonlarına indirgenir. İkinci adımda indirgenmiş Cu^{+1} iyonları BCA ile mor-mavi renkli bir kompleks oluştururlar ve bu rengin şiddeti protein yoğunluğu ile doğru orantılıdır.

- (1) Kit içerisinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de tutulan BCA reaktif A ve reaktif B oda ısısına getirildi ve sonrasında 100:1 oranında karıştırılarak bir çalışma solüsyonu hazırlandı.
- (2) Her bir çalışma grubundan elde edilen hücre lizatı ve protokole göre hazırlanmış BSA standartları (0, 125, 250, 500, 750, 1500, 2000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda) 96'lık well plateteki kuyucuklara 10 μL ve iki tekrarlı olacak şekilde koyuldu.
- (3) Sonra her bir kuyucuğa 200 μL çalışma solüsyonu eklenerek hemen karıştırıldı ve 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi.
- (4) İnkübasyonun tamamlanmasıyla oda sıcaklığına getirilen plaka (Şekil 3.3) ELISA mikroparka okuyucusunda 562 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okundu.

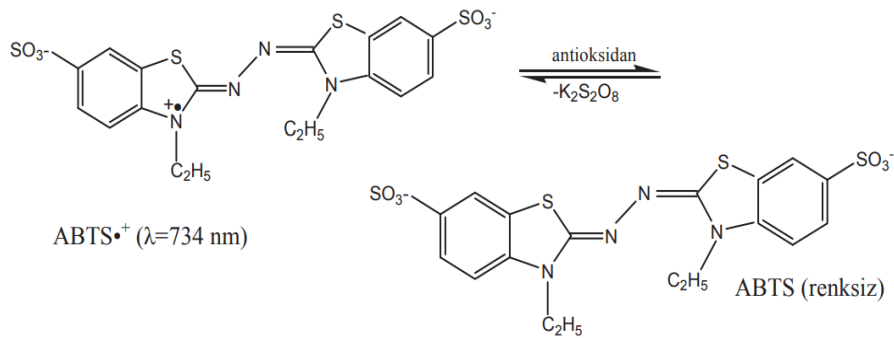


Şekil 3.3: BCA yöntemiyle total protein ölçümü.

Çalışma gruplarına ait total protein düzeyleri sonraki biyokimyasal analizlerde (oksidatif stres parametreleri ve apoptoz parametreleri düzeyleri) elde edilen verilerin normalize edilmesinde kullanıldı.

3.5. Total Antioksidan Kapasite (TAS) Analizi

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi ilk olarak Miller ve ark. tarafından 1993 yılında geliştirilmiş ve sonrasındaki değişimlerle özellikle gıda örneklerinde antioksidan kapasitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. 2,2-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)' in persülfatla oksidasyonu sonucu yeşil renkli (ABTS^{•+}) radikali oluşturulur. (ABTS^{•+}) radikali antioksidan bileşikler varlığında renksiz ABTS formuna dönüşür ve bu prensip bileşiklerin total antioksidan kapasite belirlenmesinin temelini oluşturur (Şekil 3.4). Ölçüm vitamin E'nin suda çözünebilen bir analogu olan Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) içeren standart antioksidan solüsyonu kullanılarak kalibre edildi ve ölçüm sonuçları (mmol Trolox Equivalent/mg protein) olarak ifade edildi (92-94).



Şekil 3.4: TAS ölçüm prensibi (93).

TAS analizi Elabscience TAS Kolorimetrik ölçüm kiti kullanılarak aşağıdaki adımlar izlenerek yapıldı.

- (1) Her bir çalışma grubundan elde edilen hücre lizatı ve protokole göre hazırlanmış standartlar (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 mmol/L konsantrasyonunda) 96'lık well plateteki ilgili kuyucuklara 10 µL ve iki tekrarlı olacak şekilde koyuldu.
- (2) Daha sonra her bir kuyucuğa 200 µL reaktif 1 (tampon solüsyonu) eklenerek mikropłaka okuyucuda 660 nm dalga boyundaki absorbans okutuldu ve Abs₁ olarak kaydedildi.
- (3) Daha sonra her bir kuyucuğa 20 µL reaktif 2 (kromojenik ajan) eklenerek pipetaj yapıldı ve plate nazikçe 5-6 kez sallandı.

- (4) 37°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra mikrolaka okuyucuda 660 nm dalga boyunda tekrar absorbands okutuldu ve Abs₂ olarak kaydedildi.
- (5) $\Delta Abs = Abs_2 - Abs_1$ eşitliğini kullanarak her bir numune, standart ve kör için ΔAbs değeri hesaplandı.
- (6) $TAS = (\Delta Abs_{Skör} - \Delta Abs_{numune} - 0,0342) / 0,4056$ formülü ile hesaplandı.

3.6. Total Oksidan Kapasite (TOS) Analizi

Oksidatif stres parametresi olarak TOS analizi Erel’in geliştirdiği metoda göre kolorimetrik yöntemle gerçekleştirildi. TOS analizinde örnekte bulunan oksidanlar ile orantılı olarak reaktifteki ferröz iyonu (Fe⁺²) ferrik iyon (Fe⁺³) oksitlenir. Ferrik iyon, asidik bir ortamda ksilenol turuncusu ile mavi-mor renkli bir kompleks oluşturur. Kolorimetrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, örnekte bulunan toplam oksidan molekül miktarıyla orantılıdır. TOS analizi, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar mg protein başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv. /mg protein) olarak ifade edildi (95). TOS analizi Elabscience TOS Kolorimetrik ölçüm kiti protokolüne göre aşağıdaki adımlar izlenerek yapıldı.

- (1) Her bir çalışma grubundan elde edilen hücre lizatı ve protokole göre hazırlanmış standartlar (0, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100 $\mu\text{mol /L}$ konsantrasyonunda) 96’lık well plateteki belirlenmiş kuyucuklara 20 μL ve iki tekrarlı olacak şekilde koyuldu.
- (2) Daha sonra her bir kuyucuğa 200 μL reaktif 1(kromojenik ajan) eklenerek iyice karıştırıldı ve mikrolaka okuyucuda 590 nm dalga boyunda absorbands okutuldu ve Abs₁ olarak kaydedildi.
- (3) Daha sonra her bir kuyucuğa 50 μL reaktif 2 (substrat) eklenerek iyice karıştırıldı ve 37°C’de 5 dakika inkübe edildi.
- (4) İnkübasyonun tamamlanmasıyla mikrolaka okuyucuda 590 nm dalga boyunda tekrar absorbands okutuldu ve Abs₂ olarak kaydedildi.
- (5) $\Delta Abs = Abs_2 - Abs_1$ eşitliğini kullanarak her bir numune, standart ve kör için ΔAbs değeri hesaplandı.
- (6) $TOS = (\Delta Abs_{numune} - \Delta Abs_{Skör} + 0,0146) / 0,007$ formülü ile hesaplandı.

3.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

TAS ve TOS ölçümleri yapıldıktan sonra, oksidatif stresi etkileyen tüm oksidan ve antioksidanların etkilerine ilişkin daha net yorum yapabilmemizi sağlayan oksidatif stres indeksi (OSI) aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı (95-98).

$$OSI = [(TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. /mg protein}) / (TAS (\text{mmol Trolox Equiv. /mg protein}) \times 100]$$

3.8. Apoptoz Belirteç Düzeylerinin Belirlenmesi

3.8.1. ELISA Analizleri

Sisplatin, WGA ve kombinasyonun G361 melanom hücre hattında apoptoz sürecine etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla Sandviç-ELISA test prensibiyle çalışan Sit-c, Bax ve Bcl-2 proteinlerine spesifik Elabscience ticari kitleri kullanılarak aşağıda listelenmiş adımlara göre 96'lık well platelerde analizler yapıldı (Şekil 3.5). Çalışmada kullanılan standartlar kullanılarak her bir analiz için ayrı bir kalibrasyon grafiği oluşturuldu ve sonrasında çalışma gruplarına ait hücre lizatlarındaki protein düzeyleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar her bir grubun daha önce belirlenmiş olan total protein düzeylerine bölünerek normalize edildi ve herhangi bir ajan uygulanmayan kontrol grubu da dahil olmak üzere 4 grubun arasında anlamlı bir fark olup olmadığı incelendi. Sit-c, Bax ve Bcl-2 düzeyleri ng/mg protein olarak ifade edildi.

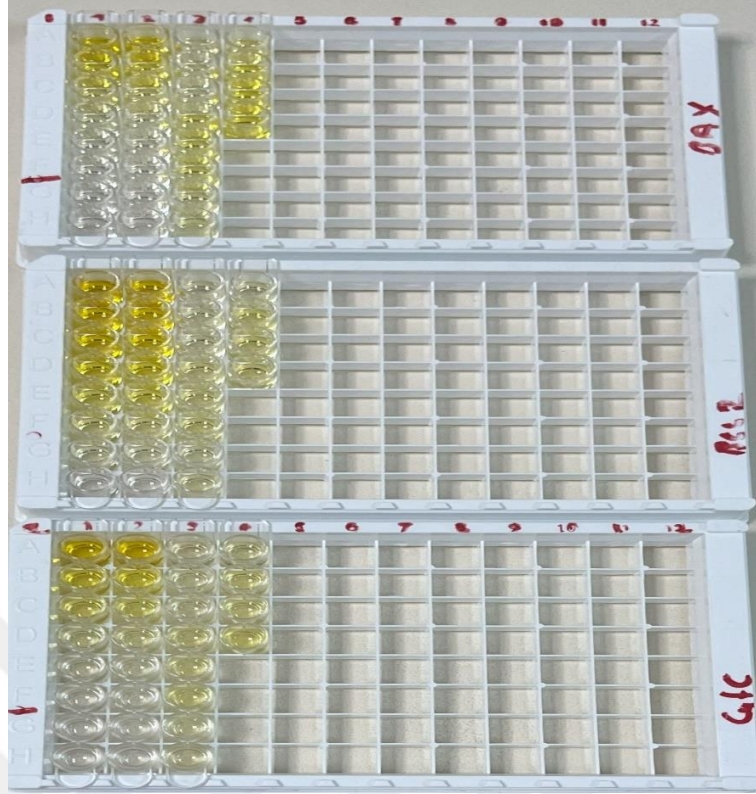
- (1) Hazırlık aşamasında önce tüm reaktifler ve hücre lizatları kullanımdan önce dondurucudan çıkarılarak oda ısısına getirildi ve çözündükten sonra köpürtmeden iyice karıştırıldı.
- (2) Kit içerisinde mevcut olan yıkama tamponu konsantresi (30 mL) 720 mL distile su ile seyreltilerek 750 mL yıkama tamponu elde edildi.
- (3) Standart çalışma solüsyonları kit prosedürlerinde belirtildiği gibi referans standardın seri dilüsyonuyla istenen konsantrasyonlarda hazırlandı:

Bax Standart Konsantrasyon (ng/mL): 50/ 25/ 12,5/ 6,25/ 3,13/ 1,57/ 0,78/ 0

Bcl-2 Standart Konsantrasyon (ng/mL): 10/ 5/ 2,5/ 1,25/ 0,63/ 0,31/ 0,16/ 0

Sit-c Standart Konsantrasyon (ng/mL): 5/ 2,5/ 1,25/ 0,63/ 0,31/ 0,16/ 0,08/ 0

- (4) Tüm çalışma gruplarına ait hücre lizatları 3 tekrarlı ve standart çözeltileri 2 tekrarlı olacak şekilde 96'lık well plateteki ilgili kuyucuklara 100 µL koyularak 37°C'de 90 dakika inkübasyona kaldırıldı.
- (5) İnkübasyonun tamamlanmasından 15-20 dakika önce kit içerisinde mevcut olan biyotinlenmiş antikor konsantresi dilüenti ile 1:99 oranında karıştırılarak biyotinlenmiş antikor çalışma solüsyonu hazırlandı.
- (6) İnkübasyonun tamamlanmasıyla plateteki sıvı uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş antikor eklenerek tekrar 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- (7) İnkübasyonun tamamlanmasından 15-20 dakika önce kit içerisinde mevcut olan HRP konjugat konsantresi dilüenti ile 1:99 oranında karıştırılarak HRP konjugat çalışma solüsyonu hazırlandı.
- (8) İnkübasyonun tamamlanmasıyla kuyucukların içeriği aspire edildi ve 3 kez otomatik yıkama cihazıyla yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µL HRP konjugatı eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- (9) İnkübasyonun tamamlanmasıyla kuyucukların içeriği aspire edildi ve 5 kez otomatik yıkama cihazıyla yıkandı.
- (10) Her bir kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktif eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda her bir kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklendi ve hemen 450 nm'de mikropilaka okuyucu kullanarak optik dansite değeri ölçüldü.



Şekil 3.5: Bax, Bcl-2 ve Sit-c belirteçlerinin ELISA çalışması.

3.8.2. Western Blot Analizi

İmmünoablottlama olarak da adlandırılan Western blot tekniği, hücrelerden ekstrakte edilmiş protein karışımından istenen spesifik proteinlerin özgün, yüksek hassasiyetli ve yarı kantitatif analiz edilmesini sağlayan moleküler bir tekniktir. Western blot işlemi; jel elektroforez ile proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması, ayrılan proteinlerin membrana aktarımı, bloklama, görünür hale getirmek için primer ve sekonder antikor uygulaması ve görüntüleme olmak üzere temel olarak beş adımdan oluşur. Spesifik bir proteinin kimliğini hem büyüklüğüne göre hem de antikor bağlanması yoluyla açıkça tespit edebilme özelliği sayesinde, hücrelerde hedef proteinin ekspresyon düzeyi değerlendirilebilir ve protein saflaştırma sırasında fraksiyonları izlenebilir (99).

3.8.2.1. Western Blot Analizinde Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı

a) Fosfat Tamponlu Salin (PBS) ve %0,1 Tween 20 (1X PBST)

1 adet PBS tablet, 20 mL distile su ile bir süre manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözdürüldü. Daha sonra 0,2 mL Tween 20; 179,8 mL distile su ile karıştırılarak son hacmi 200 mL olan PBST hazırlandı.

b) Sığır Serum Albümini (BSA) Solüsyonu

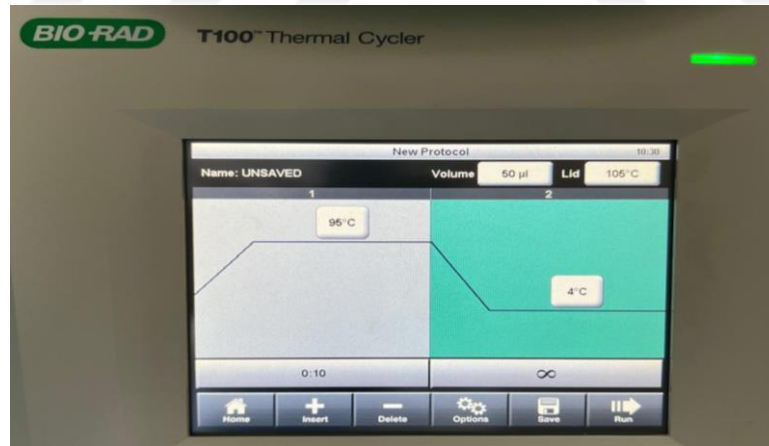
Bloklama işleminde kullanılmak üzere 10 g BSA tartılıp hazırlanmış olan %0,1 Tween-20 içeren PBST solüsyonu içerisinde çözdürüldü ve böylelikle 200 mL %5'lik BSA-PBST hazırlandı.

c) 2- N -morfolinoetansülfonik asit (MES) Running Buffer Solüsyonu

10X MES Running Buffer solüsyonundan 100 mL alınıp 900 mL distile su ile 1 litreye tamamlanarak 1X MES Running Buffer solüsyonu hazırlandı.

3.8.2.2. Western Blot Analizi İçin Protein Örneklerinin Denatürasyonu

Her bir çalışma grubundan elde edilen protein izolatından her grupta 30 µg total protein olacak şekilde uygun hacimde örnek alındı ve üzerine 5X sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE) Sample Loading Buffer, 10X Sample Reducing Agent ve son hacim 20 µL olacak şekilde distile su eklendi. Bu karışım konvansiyonel PCR cihazında 95 °C'de 10 dakika inkübe edilip ardından +4°C'ye ineceği bir protokol kullanılarak yüksek sıcaklıkta denatüre olan proteinlerin renatüre olması engellendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: RT-qPCR cihazında protein denatürasyon protokolü.

3.8.2.3. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve SDS PAGE Elektroforez

Dikey elektroforez sistemi kendi tankı içerisine yerleştirildi. %4-12'lik Bis-Tris gradient jeli dikey elektroforez sisteminin jel tutucu klipsleri arasına sıkıştırıldı ve dikkatlice jel tarakları çıkarıldı. Önceden hazırlanmış ve +4°C'de soğutulmuş olan 1X MES Running Buffer elektroforez tankına eklendi ve tankın kasetleri arasından sızıp sızmadığı kontrol edildi. Tankın core bölümüne 200 mL, tankın core dışı bölgesine ise

600 mL soğuk 1X MES Runnig Buffer eklendi. Tankın core bölgesine ilave olarak 500 μ L NuPAGE™ Antioxidant eklendi ve homojen karışması sağlandı. Örnekler jeldeki kuyucuklara yüklenmeden önce 200 μ L'lik bir otomatik pipete 1X MES Runnig Bufferdan çekilerek kuyucuklar hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilerek yıkandı. Jel kasetinde yer alan kuyucukların en başına ve en sonuna dublike şekilde 5 μ L protein ladder yüklemesi yapıldı. Diğer kuyucuklara ise her bir çalışma grubundan elde edilen denatüre protein örneklerinden 20 μ L iki tekrarlı olarak yüklendi. Dikey elektroforez sisteminin güç kaynağı bağlantı elektrotları takıldı ve elektroforez sisteminden 5 dakika 180 volt ve ardından 120 volt elektrik akımı geçirildi. Protein ladderın tamamen açıldığından emin olunduktan sonra 120 voltluk akım da tamamen kesilerek elektroforez işlemi tamamlandı.

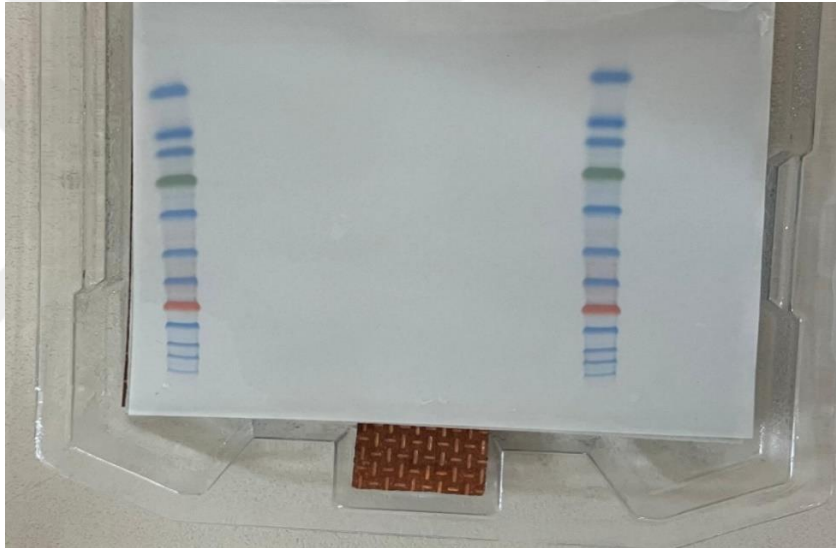
3.8.2.4. Blotlama

Dikey elektroforez sisteminde proteinler yürütüldükten sonra elektrot kabloları güç kaynağından çıkarıldı ve tankın kapağı açıldı. Jel sıkıştırma aparatı gevşetilerek jel kaseti tankın içerisinden çıkarıldı. Jel kaseti, jel bıçağı ile kenarlarındaki boşlukların ayrılması ile açıldı. Jelin tarak kısımları ve jel kasetinin bitim bölgesinde yer alan görece daha kalın olan jel bölgeleri jel bıçağı ile kesilerek distile sulu bir kabın içerisine alındı. SDS PAGE jelindeki proteinlerin nitroselüloz membrana transferi aşamasında (blotlama) iBLOT2 Gel Transfer Sistemi paketi kullanıldı. Paketin içerisinden çıkan anot stack içine oturtulduğu plastik kısım ile beraber iBLOT2 Jel Transfer Sistemine yerleştirildi (Şekil 3.7).



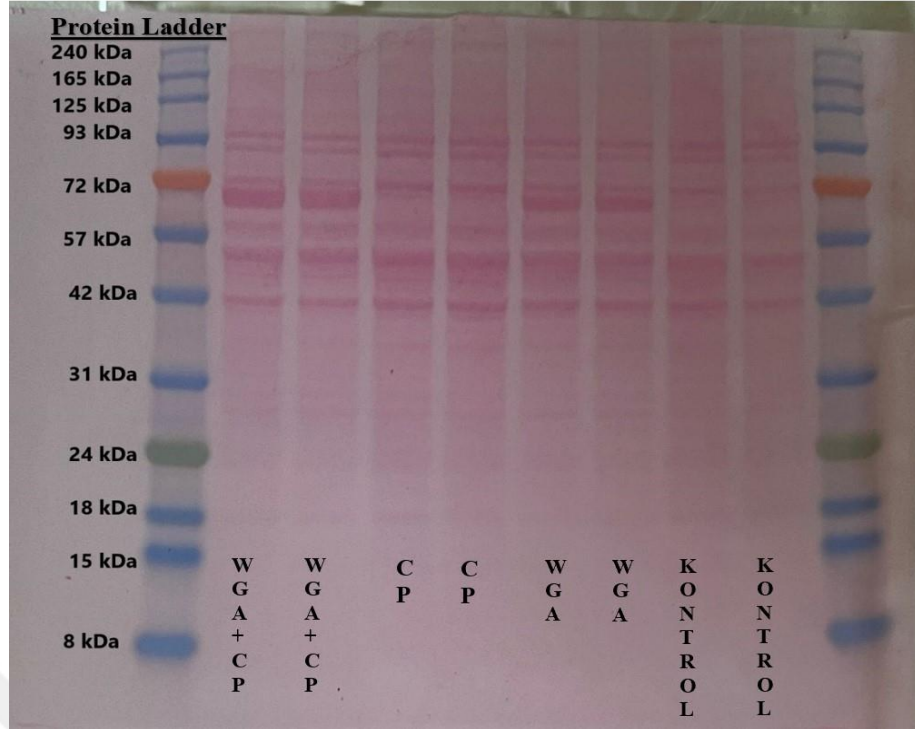
Şekil 3.7: Blotlama işeminde kullanılan iBLOT Gel Transfer sistemi.

Daha sonra anot stack üzerine SDS PAGE jeli yerleştirildi ve hava kabarcığı olmaması için western blot roller yardımıyla jel ve anot stack ikilisinin üzerinden nazikçe birkaç kez geçildi. Kit içerisinde yer alan filtre kâğıdı distile su ile ıslatıldıktan sonra jelin üzerine yerleştirildi ve yine hava kabarcıklarının oluşmaması için roller ile nazikçe üzerinden birkaç kez daha geçildi. Katot stack bakır yüzey yukarı bakacak şekilde filtre kâğıdının üzerine yerleştirildi ve yine roller yardımıyla iyice yerleşmesi sağlandı. Sonra üzerine alüminyum uzantıları olan sünger yerleştirildi. Alüminyum uzantıların iBLOT2 cihazının metal elektrotları ile aynı hizada yer aldığı doğrulandıktan sonra cihazın kapağı kapatıldı. Cihazın dijital ekranından P3 programı seçildi ve 7 dakika sonra SDS PAGE jeli üzerinde yer alan marker bantlarının nitroselüloz membrana geçtiği gözlemlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: SDS PAGE Jelindeki marker bantlarının nitroselüloz membrana transferi.

Nitroselüloz membran anot ve katot stacklar arasından çıkarılarak içerisinde distile su bulunan kabın içerisine alındı. Nitroselüloz membran üzerindeki örneklere ait muhtemel protein bantları kitle bulunan Ponceau S boyama solüsyonu kullanılarak boyandı (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Ponceau S Staining solüsyonu ile nitroselüloz membranda görünür hale getirilen protein bantları.

3.8.2.5. Bloklama

Western blot yönteminde bloklama adımı amaç membrana transfer edilen proteinler, deneyde kullanılan sonraki reaktifler ve membran arasındaki spesifik olmayan etkileşimlerin önlenmesidir. Bloklama solüsyonu analizi yapılmak istenen proteini tespit etmek ve görselleştirmek için kullanılan antikolarla etkileşime girebilecek membran üzerindeki tüm bölgeleri doyurulmasını sağlar ve arka plandaki sinyal-gürültü oranını iyileştirerek Western blot yönteminin sensitivitesinin artmasını sağlar (100).

Bloklama işleminde kullanılmak üzere hazırlanmış olan %5'lik BSA-PBST solüsyonundan 10 mL alındı, temiz bir kaba koyuldu ve üzerine iBLOT2 sisteminden çıkarılan nitroselüloz membran yerleştirilerek orbital karıştırıcının üzerine alınıp hafif hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

3.8.2.6. Primer Antikor Uygulanması

Primer antikolar Tablo 3.5'te belirtilen dilüsyon oranlarında %5'lik BSA-PBST bloklama solüsyonundan gerekli hacimde alınarak 10 mL hazırlandı.

Tablo 3.5: Western blot analizinde kullanılan primer antikorlar.

Primer Antikor	Molekül Ağırlığı	Dilüsyon Oranı	Kaynak	Üretici Firma	Katalog Numarası
Kaspaz 9	46 kDa	1:1000	Tavşan	Proteintech, ABD	10380-1-AP
Kaspaz 3	32 kDa	1:2000	Tavşan	Proteintech, ABD	19677-1-AP
Beta aktin	42 kDa	1:5000	Tavşan	Proteintech, ABD	20536-1-AP

Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membran primer antikor çözeltisiyle bir gece boyunca +4°C’de inkübasyona bırakıldı. Sabahında orbital çalkalayıcı üzerinde oda ısısında 60 rpm hızda 2 saat daha inkübasyona devam ettirildi.

Primer antikor ile inkübasyon tamamlandıktan sonra nitroselüloz membran üzerindeki solüsyon yavaşça döküldü ve sonrasında PBST solüsyonu içinde 3 kez 5’er dakika boyunca 60 rpm hızda orbital karıştırıcı üzerinde bekletilerek yıkandı.

3.8.2.7. Sekonder Antikor Uygulanması

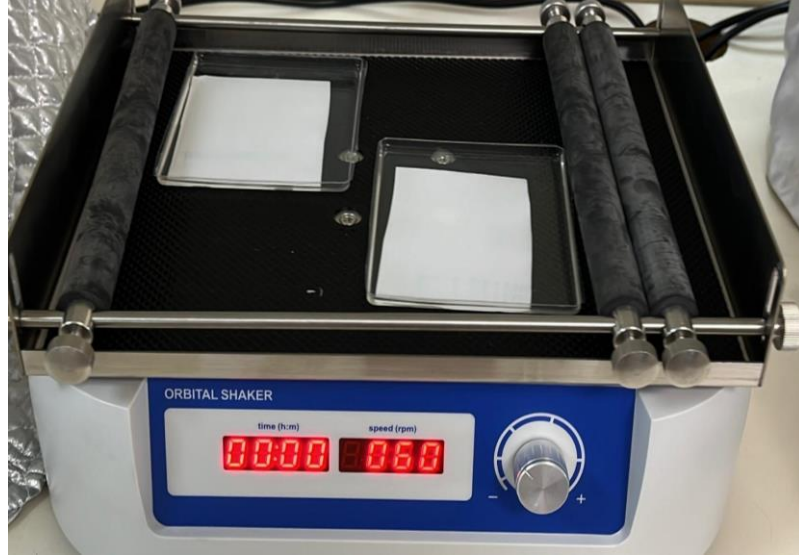
Sekonder antikor Tablo 3.6’da belirtilen dilüsyon oranında %5’lik BSA-PBST bloklama solüsyonundan gerekli hacimde alınarak 10 mL hazırlandı.

Tablo 3.6: Western blot analizinde kullanılan sekonder antikor.

Sekonder Antikor	Dilüsyon Oranı	Üretici Firma	Katalog Numarası
HRP-konjuge IgG(H+L)	1:10.000	Proteintech, ABD	SA00001-2

Yıkama işlemini takiben nitroselüloz membran üzerine hazırlanmış 10 mL sekonder antikor solüsyonu eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında orbital karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.

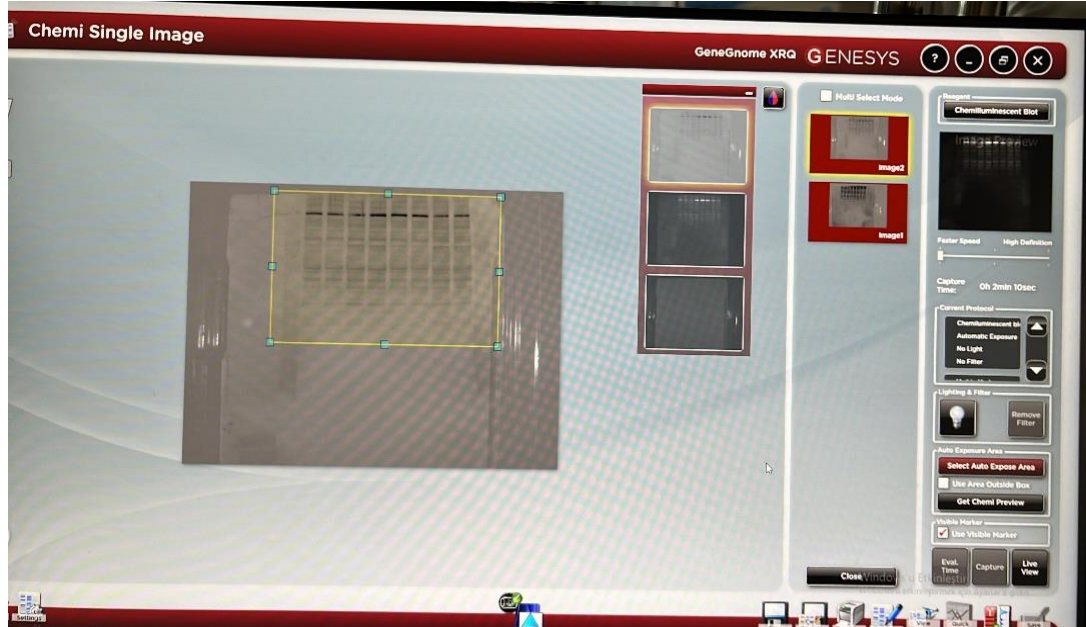
Sekonder antikor ile inkübasyon tamamlandıktan sonra nitroselüloz membran üzerindeki solüsyon yavaşça döküldü ve sonrasında PBST solüsyonu içinde 3 kez 5’er dakika boyunca 60 rpm hızda orbital karıştırıcı üzerinde bekletilerek yıkandı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Sekonder antikor uygulaması sonrası yıkama işlemi.

3.8.2.8. Bantların Görüntülenmesi ve Analizi

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membran üzerine çalışma kitinde bulunan Gelişmiş Kemilüminesans (ECL) solüsyonundan 6 mL eklenerek görüntüleme cihazına yerleştirildi ve bir dakikalık inkübasyonun ardından görüntüleme yapıldı. Kemilüminesans görüntüleyiciden alınan görüntülerdeki bantların tespiti ve kantitasyonu Image J programı kullanılarak yapıldı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: ImageJ programı ile Western blot bantlarının kantitasyonu.

3.8.3. mRNA Ekspresyon Analizleri

3.8.3.1. RNA İzolasyonu

Gerçek Zamanlı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemiyle yapılan transkripsiyon analizi için gerekli total RNA, GeneMATRIX Evrensel RNA Saflaştırma hazır ticari kiti ile aşağıdaki adımlar izlenerek yapıldı:

- (1) 100 mm'lik steril petri kaplarında üretilen Sisplatin, WGA, Sisplatin+WGA için önceden belirlenmiş IC₅₀ dozları ile 24 saat inkübe edilen çalışma grupları ve herhangi bir ajan uygulanmayan Kontrol grubu G361 melanom hücre hatları kullanılarak thoma lamında yapılan hücre sayımı sonucunda yaklaşık 5X10⁶ hücre içeriğine göre çalışma protokolü oluşturuldu.
- (2) Öncelikle her 1 mL RNA Lizis Tamponu için 10 µL beta merkaptotanol eklenerek lizis tamponu hazırlandı.
- (3) Her bir petrideki hücreler 10 mL soğuk PBS ile 3 kez yıkandı ve 400 µL lizis tamponu eklenerek hücre kazıyıcısıyla hücreler petri tabanından kaldırılarak steril ependorf tüplere alındı.
- (4) Ependorfta lizis tamponuyla süspansiyon halindeki hücrelerin parçalanmasını hızlandırmak için buz üstünde nazıkçe pipetaj yapılarak süspansiyon jel haline getirildi.
- (5) Oluşan jelimsi lizat spin kolona alınarak +4°C'de 11.000 g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra spin kolonlar buz kaşesi üzerine alındı ve üzerlerine %96-100'lük etanolden 250 µL eklenerek süzölmeye bırakıldı.
- (6) Süzölme tamamlanınca spin kolonlar atılarak alttaki toplama tüpünde biriken süzüntü RNA bağlayıcı spin kolona aktarıldı ve +4°C'de 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- (7) Santrifüj sonrasında toplama tüpünde biriken süzüntü dökülerek spin kolona 400 µL Wash DN1 eklendi ve +4°C'de 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edildi.
- (8) Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpü içeriği tekrar boşaltılarak spin kolona 600 µL

Wash RBW Buffer eklendi ve +4°C'de 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

- (9) Santrifüj sonrası toplama tüpü içeriği tekrar boşaltılarak spin kolona 300 µL Wash RBW Buffer eklendi ve +4°C'de 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek toplama tüpü içeriğiyle beraber atıldı.
- (10) Spin kolon steril bir ependorf godeye oturtulup üzerine 50 µL RNase içermeyen su eklendi ve +4°C'de 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- (11) Son santrifüjün de tamamlanmasıyla steril ependorf godenin içinde saf RNA elde edildi. Nanodrop spektrofotometre işlevi olan Epoch Biotek Take3 pleyt kullanılarak RNA konsantrasyonu (µg/ µL) ve saflık tayini yapıldı.
- (12) Spektrofotometrik ölçümle belirlenen optik dansite değerlerinden hareketle OD_{260nm}/OD_{280nm} oranı 1,7 ve üzeri olan izolatlarda RNA'nın saf olduğu kabul edildi ve uygun olan RNA izolatları cDNA sentezinde kullanılmak üzere çalışmaya alındı.

3.8.3.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden ticari hazır OneScript Plus cDNA sentez kiti kullanılarak Tablo 3.7'de listelenen bileşenlerle aşağıda belirtilen adımlar kullanılarak cDNA sentezlendi.

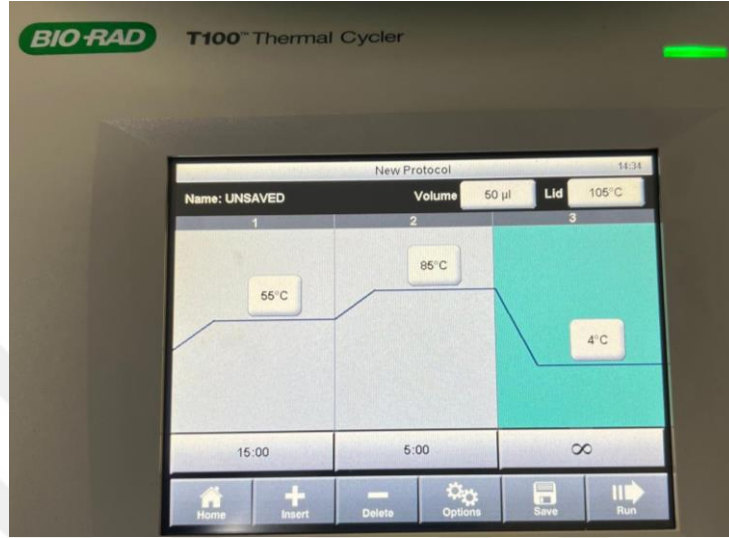
Tablo 3.7. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar
1)OneScript Plus RTaz	1 µL
2)5X RT tampon	4 µL
3)Primers (10 µM)	1 µL
4)dNTP (10 mM)	1 µL
5)Total RNA	1 µg/ reaksiyon
6)Nükleaz içermeyen su	RNA miktarına göre değişken

- (1) Öncelikle -20°C'de saklanan kit bileşenleri çözündürüldü ve kullanılmadan önce iyice karışması sağlanarak işlemler buz üzerinde yapıldı.
- (2) 0,2 mL hacmindeki 8'li PCR striplerine her bir çalışma grubunda eşit miktarda kalıp RNA olması için hazırlanmış RNA izolatından 1 µg RNA olacak şekilde koyuldu ve üzerine Tablo 3.7'de belirtilen ilk 4 bileşen eklendi. Nükleaz içermeyen

su ile son hacim 20 µL'ye tamamlanarak 5-10 saniye kadar strip santrifüjde çevrildi.

- (3) Konvansiyonel PCR cihazında “55°C’de 15 dakika, 85°C’de 5 dakika, 4°C’de ∞” termal profili kullanılarak cDNA sentezi tamamlandı (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: cDNA sentezi termal profili.

3.8.3.3. RT-qPCR Analizi

Her bir çalışma grubundan 4 tekrarlı olacak şekilde 0,2 mL hacmindeki 8’li PCR striplerine çalışılacak olan her bir gen için Tablo 3.8’de belirtilen miktarlarda bileşenler soğuk zincir ve steril koşullar altında eklendi ve strip santrifüjde 5-10 saniye kadar çevrildi.

Tablo 3.8: RT-qPCR reaksiyon bileşenleri ve hacimleri.

Bileşen	Hacim (20 µL PCR reaksiyonu için)
2X qPCR SYBR-Green MasterMix	10 µL
Forward Primer	1 µL
Reverse Primer	1 µL
Kalıp cDNA	1 µL
RNAaz içermeyen su	7 µL

Hazırlanmış PCR stripleri konvansiyonel PCR cihazındaki reaksiyon plakasına yüklendi. Tablo 3.9’da belirtilen her bir gene uygun termal profil ile RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirilerek mRNA sentezi tamamlandı.

Tablo 3.9: RT-qPCR programı ve çalışılan genler.

Gen	Primer Dizisi	Termal Profil	Döngü
Beta Aktin	F-5' CTCCATCCTGGCCTCGCTGT'3 R-5' GCTGTCACCTTCACCGTTCC'3	95°C 3 dk/95 °C 30 sn/ 60°C 1 dk/ 72 °C 30 sn	35
Sit-c	F-5'TCACAAAGATGGTGAGTGCCA'3 R-5'GGCAAAAGCACCATTCCAAA'3	95°C 3 dk/95 °C 30 sn/ 56°C 1 dk/ 72 °C 30 sn	35
Bax	F-5'CTGCAGAGGATGATTGCCG'3 R-5'TGCCACTCGGAAAAAGACCT'3	95°C 3 dk/95 °C 30 sn/ 56°C 1 dk/ 72 °C 30 sn	35
Bcl-2	F-5'GTGTGGAGAGCGTCAACCG'3 R-5'CCTCTGTTTGATTTCTCCTGGCT'3	95°C 3 dk/95 °C 30 sn/ 59°C 1 dk/ 72 °C 30 sn	35
Kasp-3	F-5'GTGCTACAATGCCCCTGGAT'3 R-5'GCTGGATGCCPTCTAGAGTC'3	95°C 3 dk/95 °C 30 sn/ 58°C 1 dk/ 72 °C 30 sn	35
ABCB1	F: 5'-GGCAAAGAAATAAAGCGACTGAA-3' R: 5'-GGCTGTTGTCTCCATAGGCAAT-3'	95°C 5 dk/95 °C 15 sn/ 60°C 1 dk/ 72 °C 30 sn	35
ABCC1	F: 5'-CTACCTCCTGTGGCTGAATCTG-3' R: 5'-CATCAGCTTGATCCGATTGTCT-3'	95°C 5 dk/95 °C 15 sn/ 60°C 1 dk/ 72 °C 30 sn	35
ABCG2	F: 5'-TGACGGTGAGAGAAAACTTAC-3' R: 5'-TGCCACTTTATCCAGACCT-3'	95°C 5 dk/95 °C 15 sn/ 60°C 1 dk/ 72 °C 30 sn	35

Gen ekspresyon değerleri REST2009 programı ile $\Delta\Delta C_t$ yöntemine dayalı olarak $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ denklemi kullanılarak hesaplandı. Hedef genlerin ekspresyon değerleri house-keeping gen olan beta aktin ekspresyon seviyesi kullanılarak normalize edildi (101).

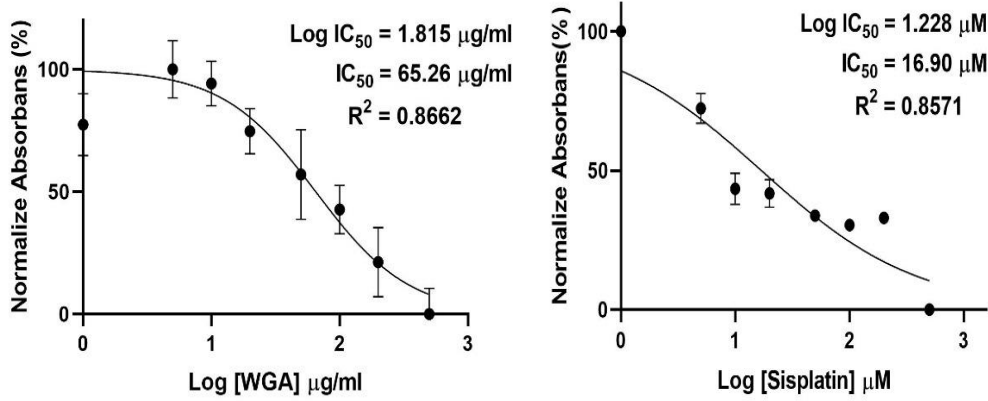
3.9. İstatistiksel Analizler

Çalışma kapsamında elde edilen veriler GraphPad Prism version 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) programı kullanılarak analiz edildi. Verilerin Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılım gösterip göstermedikleri analiz edildi. Veriler normal dağılım gösterdiği için üç ya da daha fazla grubun kıyası maksadıyla parametrik testlerden One Way ANOVA testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunuldu. Değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesi için Tukey's çoklu karşılaştırma analizleri yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. IC₅₀ Dozları

MTT analizi sonrasında WGA IC₅₀ dozu 65,26 µg/mL; Sisplatin IC₅₀ dozu 16,90 µM olarak bulundu (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: MTT analiz sonuçları.

4.2. TOS, TAS VE OSI Bulguları

WGA uygulanan grupta total oksidan kapasite 81,44 µmol H₂O₂ Equiv/mg protein olarak bulunurken total antioksidan kapasite 0,25 mmol Trolox Equiv/mg protein olarak ölçülmüş ve oksidatif stres indeksi 32603 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Sisplatin uygulanan grupta total oksidan kapasite 16,94 µmol H₂O₂ Equiv/mg protein, total antioksidan kapasite 0,46 mmol Trolox Equiv/mg protein ve oksidatif stres indeksi 3738 olarak hesaplanmıştır (Tablo 10).

Tablo 4.1: TOS, TAS ve OSI analizi sonuçları.

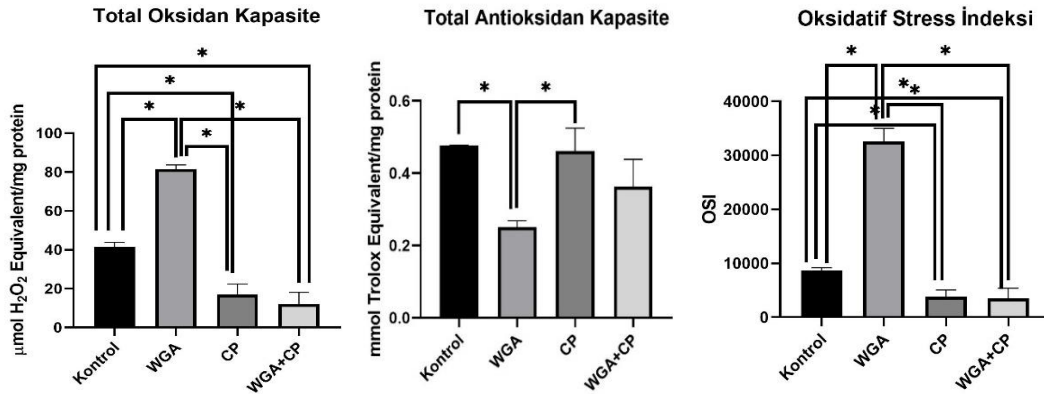
Parametre	Kontrol (ort. ± SD)	WGA (ort. ± SD)	CP (ort. ± SD)	WGA+CP (ort. ± SD)
TOS (µmol H ₂ O ₂ Equiv/ mg protein)	41,44 ± 2,36	81,44 ± 2,21	16,94 ± 5,43	12,09 ± 6,0
TAS (mmol Trolox Equiv/ mg protein)	0,48 ± 0,001	0,25 ± 0,02	0,46 ± 0,06	0,36 ± 0,08
OSI	8685 ± 505,5	32603 ± 2412	3738 ± 1312	3477 ± 1904

Bu 2 ajanın kombine olarak uygulandığı grupta total oksidan kapasite 12,09 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/mg protein, total antioksidan kapasite 0,36 mmol Trolox Equiv/mg protein ve oksidatif stres indeksi 3477 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

TOS analizi sonuçlarından hareketle yapılan istatistiki analizlerde sadece CP ile WGA+CP grupları ($p: 0,55$) birbiriyle benzer bulunmuş ve diğer tüm gruplar arası karşılaştırmada anlamlı fark bulunmuştur. Kontrol grubuna göre TOS düzeyini WGA'nın ($p<0,0001$) arttırdığını fakat CP ($p: 0,0006$) ve WGA+CP'nin ($p: 0,0002$) ise azalttığı bulunmuştur (Tablo 4.2) (Şekil 4.2).

Tablo 4.2: Çalışma gruplarının karşılaştırmalı TOS sonuçları.

Karşılaştırma Grupları	Ortalama Fark	%95 Güven Aralığı	p Değeri
Kontrol/ WGA	-40	(-51,39) -(-28,61)	<0,0001
Kontrol/ CP	24,5	(13,11) -(35,89)	0,0006
Kontrol/ WGA+CP	29,36	(17,97) -(40,75)	0,0002
WGA/ CP	64,5	(53,11) -(75,89)	<0,0001
WGA/ WGA+CP	69,36	(57,97) -(80,75)	<0,0001
CP/ WGA+CP	4,86	(-6,54) -(16,25)	0,5517



Şekil 4.2: Gruplar arası TOS, TAS ve OSI sonuçlarının karşılaştırması (*: $p<0,05$).

TAS analizi sonuçlarından hareketle yapılan istatistiki analizlerde sadece Kontrol ile WGA arasında ($p: 0,0024$) ve WGA ile CP arasında ($p: 0,0037$) anlamlı fark bulunmuştur. WGA'nın hem kontrol hem de CP gruplarına göre TAS düzeyini azalttığı bulunmuştur (Tablo 4.3) (Şekil 4.2).

Tablo 4.3: Çalışma gruplarının karşılaştırmalı TAS sonuçları.

Karşılaştırma Grupları	Ortalama Fark	%95 Güven Aralığı	p Değeri
Kontrol/ WGA	0,23	(0,09)- (0,36)	0,0024
Kontrol/ CP	0,01	(-0,12)- (0,14)	0,9823
Kontrol/ WGA+CP	0,11	(-0,02)- (0,24)	0,0893
WGA/ CP	-0,21	(-0,34) -(-0,08)	0,0037
WGA/ WGA+CP	-0,11	(-0,24)- (0,02)	0,0933
CP/ WGA+CP	0,09	(-0,03)- (0,22)	0,1487

Hesaplanan OSI değerlerinden hareketle yapılan istatistiki analizlerde sadece CP ile WGA+CP grupları (p: 0,9946) birbiriyle benzer bulunmuştur. OSI değerleri bakımından WGA tüm gruplara göre istatistik olarak anlamlı derecede artış; CP ve WGA+CP grupları ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüş göstermiştir (Tablo 4.4) (Şekil 4.2).

Tablo 4.4: Çalışma gruplarının karşılaştırmalı OSI sonuçları.

Karşılaştırma Grupları	Ortalama Fark	%95 Güven Aralığı	p Değeri
Kontrol/ WGA	-23918	(-26975)- (-20861)	<0,0001
Kontrol/ CP	4947	(1890)- (8004)	0,0014
Kontrol/ WGA+CP	5208	(2151)- (8265)	0,0009
WGA/ CP	28865	(25808)- (31922)	<0,0001
WGA/ WGA+CP	29126	(26069)- (32183)	<0,0001
CP/ WGA+CP	261.3	(-2796)- (3318)	0,9946

4.3. ELISA Sonuçları

Bax protein düzeyi sonuçlarından hareketle yapılan istatistiki analizlerde tüm gruplar arası yapılan karşılaştırmada anlamlı fark bulunmuştur. Üç çalışma grubunun da kontrol grubuna göre Bax protein düzeyini arttırdığı (p<0,001), en fazla artışın da WGA+CP grubunda (p<0,001) olduğu analiz edildi (Tablo 4.5-4.6) (Şekil 4.3).

Bcl-2 protein düzeyi sonuçlarından hareketle yapılan istatistiki analizlerde Kontrol ile CP grubu (p: 0,4737) ve de WGA ile WGA+CP grubu (p: 0,0735) birbirleriyle benzer bulundu. Diğer bütün grup karşılaştırmaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bcl-2 düzeyinde kontrol grubuna göre WGA (p <0,0001) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışına sebep olmuştur (Tablo 4.5-4.6) (Şekil 4.3).

Bcl-2 analiz sonuçlarına benzer şekilde ELISA yöntemiyle çalışılan Sit-c protein düzeyi sonuçlarından hareketle yapılan istatistiki analizlerde Kontrol ile CP grubu (p: 0,9678) ve de WGA ile WGA+CP grubu (p: 0,5187) birbirleriyle benzer bulundu. Diğer bütün grup karşılaştırmaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sit-c

düzeyinde kontrol grubuna göre WGA (p: 0,0049) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışına sebep olmuştur (Tablo 4.5-4.6) (Şekil 4.3).

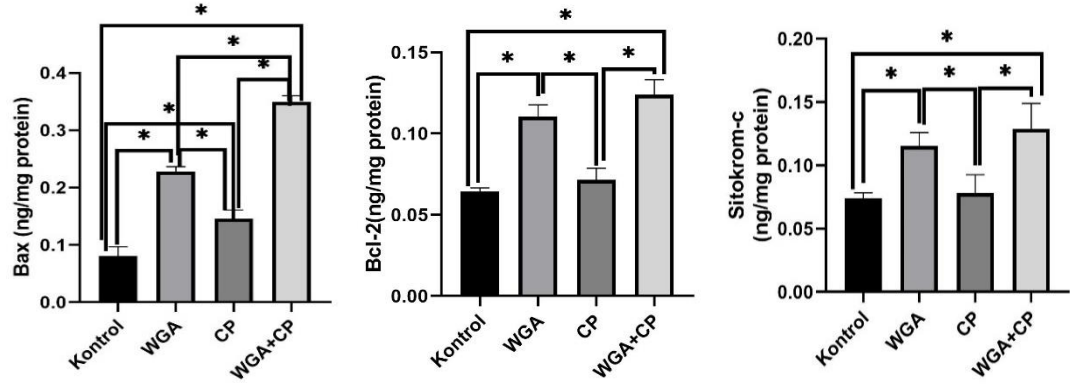
Tablo 4.5: ELISA analiz sonuçları.

Parametre	Kontrol (ort. $\pm$ SD)	WGA (ort. $\pm$ SD)	CP (ort. $\pm$ SD)	WGA+CP (ort. $\pm$ SD)
Bax (ng/mg protein)	0,08 $\pm$ 0,02 ^a	0,23 $\pm$ 0,01 ^b	0,15 $\pm$ 0,02 ^c	0,35 $\pm$ 0,01 ^d
Bcl-2 (ng/mg protein)	0,06 $\pm$ 0,002 ^a	0,11 $\pm$ 0,01 ^b	0,07 $\pm$ 0,01 ^a	0,12 $\pm$ 0,01 ^b
Sit- c (ng/mg protein)	0,07 $\pm$ 0,01 ^a	0,12 $\pm$ 0,01 ^b	0,08 $\pm$ 0,01 ^a	0,13 $\pm$ 0,02 ^b
Apoptotik indeks: (Bax / Bcl-2) x100	133,3	209,09	214,29	291,67

a, b, c, d: Her satırda farklı üssü ifadelerin olduğu gruplar arasında istatistiki olarak fark vardır. p<0,05 istatistiki anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.6: ELISA analizlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

Çalışma Grupları	Bax	Bcl-2	Sit-c
	Ortalama Fark (%95 Güven Aralığı) p değeri	Ortalama Fark (%95 Güven Aralığı) p değeri	Ortalama Fark (%95 Güven Aralığı) p değeri
Kontrol/ WGA	-0,15 (-0,17)- (-0,12) <0,0001	-0,05 (-0,06)- (-0,03) <0,0001	-0,04 (-0,07)- (-0,01) 0,0049
Kontrol/ CP	-0,06 (-0,09)- (-0,04) <0,0001	-0,01 (-0,02)- (-0,01) 0,4737	-0,004 (-0,03)- (0,02) 0,9678
Kontrol/ WGA+CP	-0,27 (-0,3) -(-0,24) <0,0001	-0,06 (-0,07)- (-0,04) <0,0001	-0,05 (-0,08)- (-0,03) 0,0005
WGA/ CP	0,08 (0,06)- (0,1) <0,0001	0,04 (0,02)- (0,05) <0,0001	0,04 (0,01)- (0,07) 0,0106
WGA/ WGA+CP	-0,12 (-0,15)- (0,09) <0,0001	-0,01 (-0,03)- (0,001) 0,0735	-0,01 (-0,04)- (0,02) 0,5187
CP/ WGA+CP	-0,20 (-0,23)- (-0,18) <0,0001	-0,05 (-0,07)- (-0,04) <0,0001	-0,05 (-0,08)- (-0,02) 0,001



Şekil 4.3: Gruplar arası Bax, Bcl-2 ve Sit-c sonuçlarının karşılaştırması (*: $p < 0,05$).

4.4. Western Blot Analiz Sonuçları

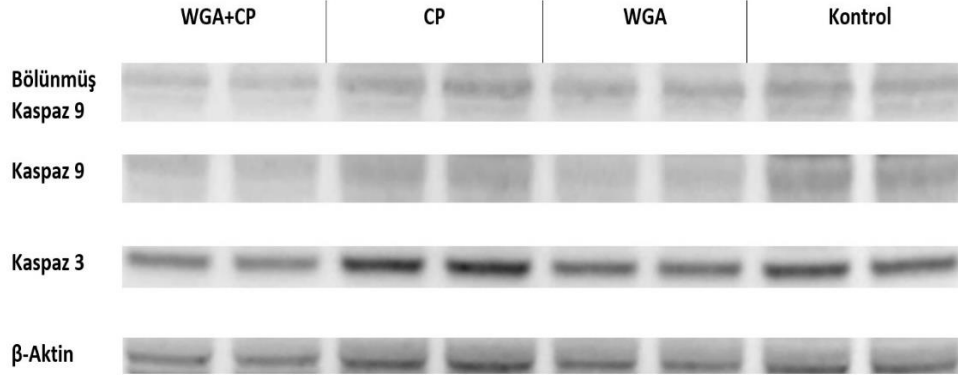
Western blot analizi sonrası çalışma parametrelerine ait elde edilen sonuçların beta-aktin değeri kullanılarak normalize edilmesiyle Kaspaz 3/beta aktin oranı ortalama olarak kontrol grubunda 1,0; WGA grubunda 1,26; CP grubunda 2,14 ve WGA+CP grubunda 1,2 bulundu (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Çalışma gruplarının Western blot sonuçları.

Parametre	Kontrol (ort. $\pm$ SD)	WGA (ort. $\pm$ SD)	CP (ort. $\pm$ SD)	WGA+CP (ort. $\pm$ SD)
Kaspaz 3	1,0 $\pm$ 0,04 ^a	1,26 $\pm$ 0,17 ^a	2,14 $\pm$ 0,16 ^b	1,2 $\pm$ 0,01 ^a
Kaspaz 9	1,0 $\pm$ 0,28 ^a	0,45 $\pm$ 0,12 ^b	0,35 $\pm$ 0,001 ^b	0,44 $\pm$ 0,13 ^b
Bölünmüş Kaspaz 9 (37 kDa)	1,0 $\pm$ 0,05 ^a	1,68 $\pm$ 0,12 ^b	1,74 $\pm$ 0,35 ^b	1,37 $\pm$ 0,02 ^{a,b}
Bölünmüş Kaspaz 9 (35 kDa)	1,0 $\pm$ 0,02 ^{a,c}	0,1 $\pm$ 0,01 ^c	1,52 $\pm$ 0,18 ^{a,b}	2,39 $\pm$ 0,84 ^b

a, b, c, d: Her satırda farklı üssü ifadelerin olduğu gruplar arasında istatistiki olarak fark vardır. $p < 0,05$ istatistiki anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

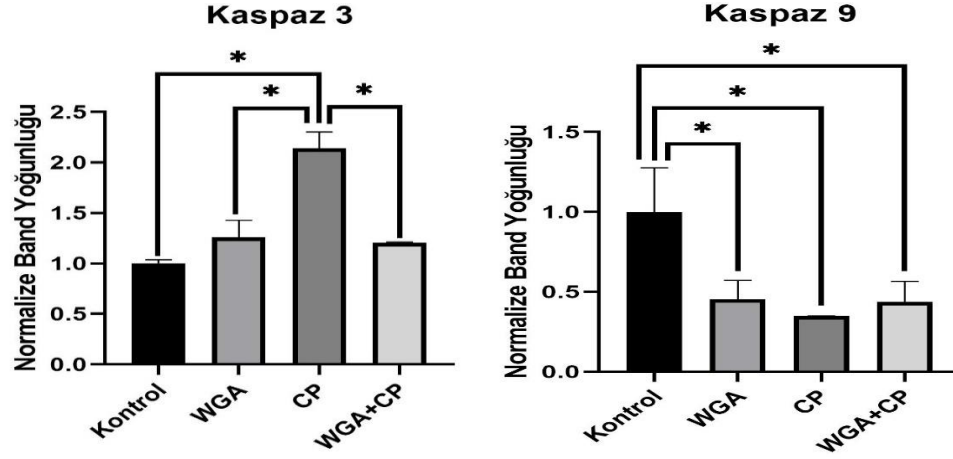
Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde CP grubunda Kaspaz 3 protein düzeylerinde kontrol ($p < 0,0001$), WGA ($p < 0,0001$) ve WGA+CP ($p < 0,0001$) gruplarına kıyasla istatistiki olarak anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla WGA (p : 0,11) ve WGA+CP (p : 0,23) gruplarında olan artış istatistiksel olarak benzer bulundu (Tablo 4.8) (Şekil 4.4, 4.5).



Şekil 4.4: Western blot analiz sonucu.

Tablo 4.8: Western blot analizlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

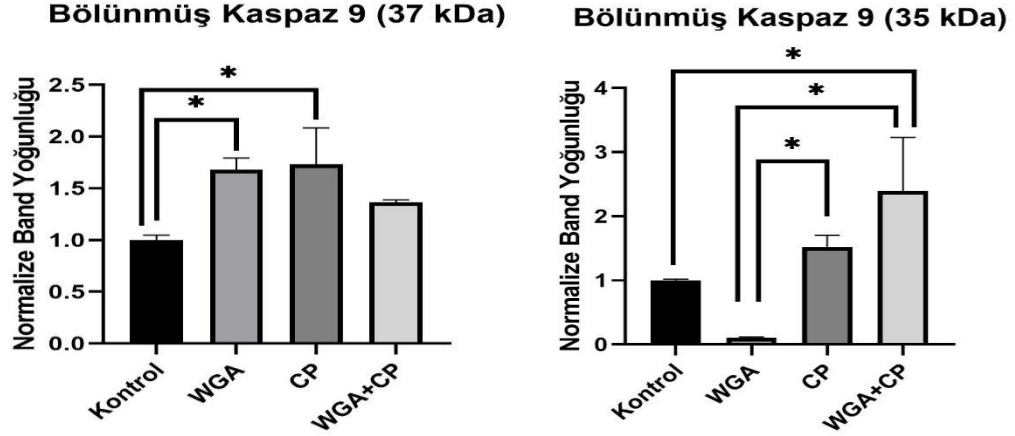
Çalışma Grupları	Kaspaz 3	Kaspaz 9	Bölünmüş Kaspaz 9 (37 kDa)	Bölünmüş Kaspaz 9 (35 kDa)
	Ortalama Fark (%95 Güven Aralığı) p Değeri	Ortalama Fark (%95 Güven Aralığı) p Değeri	Ortalama Fark (%95 Güven Aralığı) p Değeri	Ortalama Fark (%95 Güven Aralığı) p Değeri
Kontrol/ WGA	-0,26 (-0,57)- (0,05) 0,1093	0,55 (0,12)- (0,97) 0,0147	-0,68 (-1,16)- (-0,2) 0,009	0,90 (-0,22-2,01) 0,1225
Kontrol/ CP	-1,14 (-1,45)- (-0,83) <0,0001	0,65 (0,22)- (1,08) 0,0053	-0,74 (-1,22)- (-0,25) 0,0056	-0,52 (-1,64)- (0,60) 0,4825
Kontrol/ WGA+CP	-0,20 (-0,51)- (0,11) 0,2331	0,56 (0,14)- (0,99) 0,0125	-0,37 (-0,85)- (0,12) 0,1506	-1,39 (-2,51)- (-0,28) 0,0169
WGA/ CP	-0,89 (-1,20)- (-0,57) <0,0001	0,11 (-0,32)- (0,53) 0,8547	-0,06 (-0,54)- (0,43) 0,9806	-1,42 (-2,53)- (-0,30) 0,0153
WGA/ WGA+CP	0,05 (-0,26)- (0,36) 0,9434	0,02 (-0,41)- (0,44) 0,9993	0,31 (-0,17)- (0,80) 0,2466	-2,29 (-3,41)- (-1,17) 0,0008
CP/ WGA+CP	0,94 (0,63)- (1,26) <0,0001	-0,09 (-0,52)- (0,34) 0,905	0,37 (-0,12)- (0,85) 0,1483	-0,87 (-1,99)- (0,25) 0,1353



Şekil 4.5: Gruplar arası Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 sonuçları (*: $p < 0,05$).

Western blot analizi sonrası çalışma parametrelerine ait elde edilen sonuçların beta-aktin değeri kullanılarak normalize edilmesiyle bölünmüş Kaspaz 9 (37 kDa) /beta aktin oranı ortalama olarak kontrol grubunda 1,0; WGA grubunda 1,68; CP grubunda 1,74 ve WGA+CP grubunda 1,37 bulundu (Tablo 4.7). Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde kontrol grubuna göre WGA ($p:0,009$) ve CP ($p:0,006$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre WGA ve CP gruplarında anlamlı bir artışa sebep olmakla birlikte kombine WGA+CP uygulaması hem kontrol ($p:0,151$) hem de WGA ($p:0,247$) ve CP ($p:0,148$) gruplarıyla istatistiksel olarak benzer bulundu (Tablo 4.8) (Şekil 4.4, 4.6).

Western blot analizi sonrası çalışma parametrelerine ait elde edilen sonuçların beta-aktin değeri kullanılarak normalize edilmesiyle bölünmüş Kaspaz 9 (35 kDa) /beta aktin oranı ortalama olarak kontrol grubunda 1,0; WGA grubunda 0,10; CP grubunda 1,52 ve WGA+CP grubunda 2,39 olarak bulundu (Tablo 4.7). Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde kontrol grubuna göre WGA+CP grubunda ($p:0,017$) istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. En fazla artışın olduğu WGA+CP grubu WGA grubuyla kıyaslandığında ($p:0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken CP grubuna göre ($p:0,135$) istatistiksel olarak benzer bulundu (Tablo 4.8) (Şekil 4.4, 4.6).



Şekil 4.6: Gruplar arası Bölünmüş Kaspaz 9 karşılaştırma sonuçları (*: $p < 0,05$).

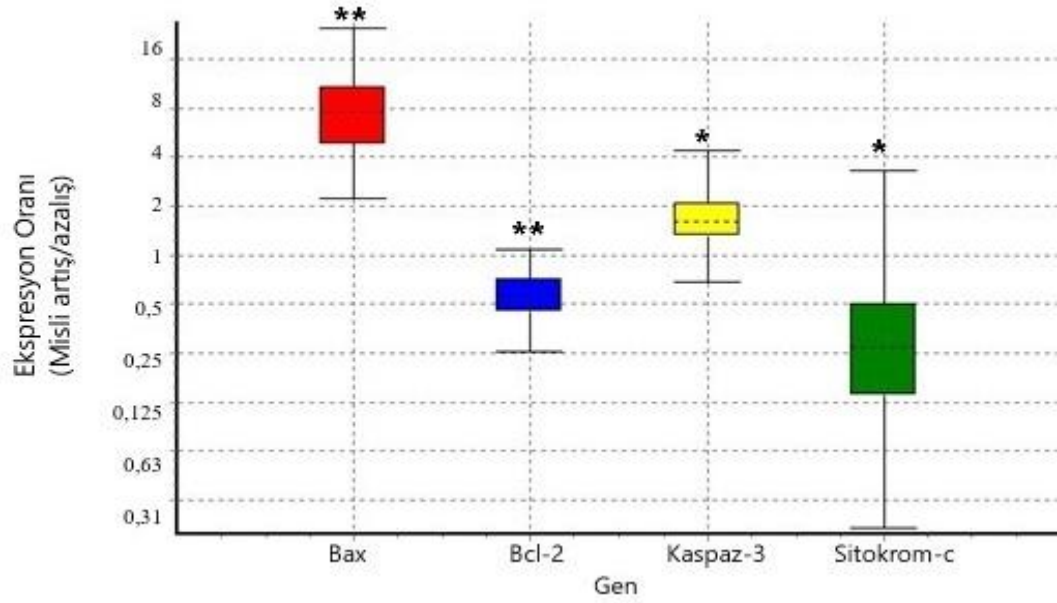
4.5. RT-qPCR Bulguları

4.5.1. Apoptotik Belirteçlere Ait RT-qPCR Bulguları

RT-qPCR analizi neticesinde mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla WGA uygulanmış grupta Sit-c ($p:0,018$) ve Bcl-2 ($p:0,002$) düzeylerinin baskılandığı ve sırasıyla 0,26 ve 0,56 kat azalmış olduğu bulundu. Kaspaz-3 mRNA ekspresyon düzeyinin ise 1,62 ($p:0,006$) kat, Bax mRNA ekspresyon düzeyinin 7,36 kat ($p:<0,001$) artarak uyarılmış olduğu bulundu (Tablo 4.9) (Şekil 4.7).

Tablo 4.9: WGA grubu RT-qPCR analizi sonuçları.

Genler	WGA				
	mRNA Ekspresyon Düzeyi	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	p Değeri	Sonuç
Sit-c	0,26	0,07 – 0,87	0,03- 2,87	0,018	Baskılanma
Bax	7,36	4,17–13,64	2,31- 19,93	<0,001	Uyarılma
Bcl-2	0,56	0,38- 0,81	0,29- 1,03	0,002	Baskılanma
Kaspaz-3	1,62	1,11- 2,30	0,78- 3,58	0,006	Uyarılma
Apoptotik indeks $[100 \times (Bax/Bcl-2)] = 1314,29$					

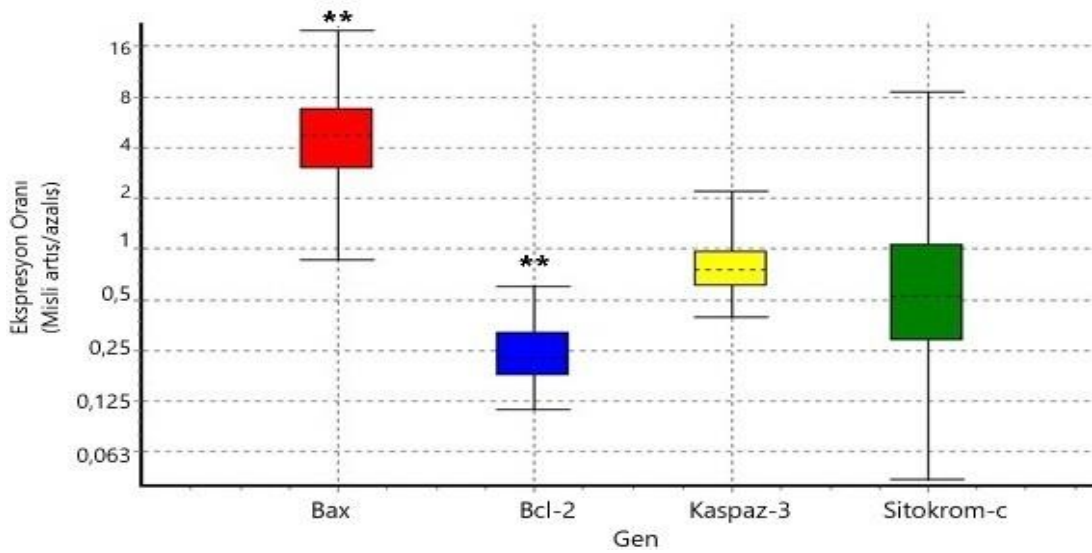


Şekil 4.7: WGA grubu mRNA ekspresyon sonuçları (*: p<0,05; **: p<0,005).

RT-qPCR analizi neticesinde kontrol grubuna kıyasla CP uygulanmış grupta Bax (p:0,001) mRNA ekspresyon düzeyinin 4,52 kat uyarılmış olduğu ve Bcl-2 (p<0,001) mRNA ekspresyon düzeylerinin 0,25 kat baskılanmış olduğu bulundu. Kaspaz-3 düzeyinin 0,79 (p:0,096) kat, Sit-c düzeyinin 0,56 (p:0,232) kat azaldığı ancak istatistiksel olarak kontrol grubuyla benzer olduğu görüldü (Tablo 4.10) (Şekil 4.8).

Tablo 4.10: CP grubu RT-qPCR analizi sonuçları.

Genler	CP				
	mRNA Ekspresyon Düzeyi	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	p Değeri	Sonuç
Sit-c	0,56	0,18 – 1,69	0,05 – 6,44	0,23	Benzer
Bax	4,52	2,32 – 8.69	1.1– 14.36	0,001	Uyarılma
Bcl-2	0,25	0,16 – 0,44	0,13 – 0,57	<0,001	Baskılanma
Kaspaz-3	0,79	0,54- 1,14	0,43– 1,76	0,096	Benzer
Apoptotik indeks [100 x (Bax/Bcl-2)] = 1808					

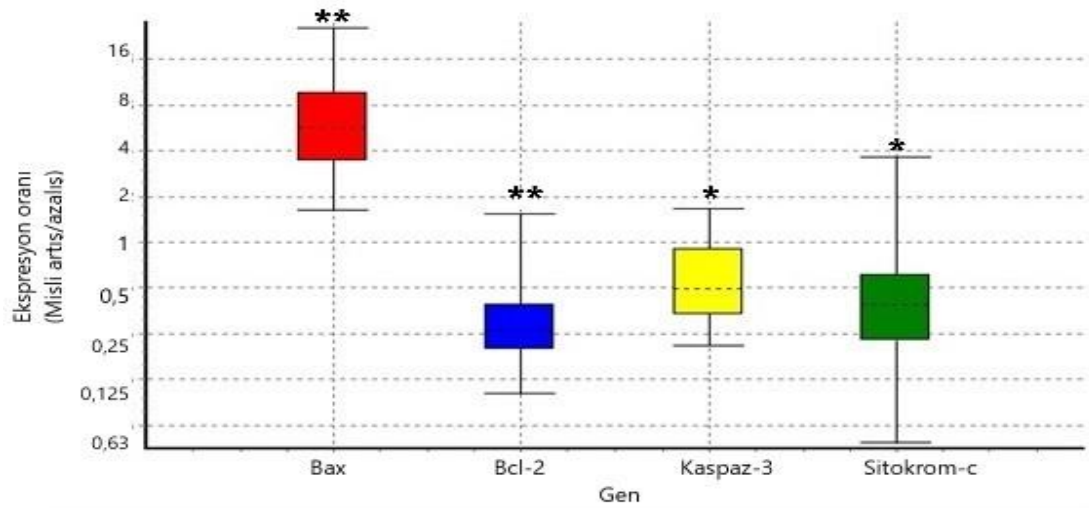


Şekil 4.8: CP grubu mRNA ekspresyon sonuçları (**: p<0,005).

RT-qPCR analizi neticesinde kontrol grubuna kıyasla WGA+CP uygulanmış grupta Bax (p:0,001) mRNA ekspresyon düzeyinin 5,88 kat uyarılmış olduğu; Bcl-2 (p:0,002), Kaspaz-3 (p:0,02) ve Sit-c (p:0,048) mRNA ekspresyon düzeylerinin baskılanmış olduğu ve sırasıyla 0,3; 0,54; 0,42 kat azalmış olduğu bulundu (Tablo 4.11) (Şekil 4.9).

Tablo 4.11: WGA+CP grubu RT-qPCR analizi sonuçları.

Genler	WGA+CP				
	mRNA Ekspresyon Düzeyi	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	p Değeri	Sonuç
Sit-c	0,42	0,18 – 1,40	0,06 – 3,23	0,048	Baskılanma
Bax	5,88	2,93 – 12,04	1,78 – 21	0,001	Uyarılma
Bcl-2	0,30	0,17 – 0,49	0,12 – 1,45	0,002	Baskılanma
Kaspaz-3	0,54	0,27- 1,08	0,22 – 1,44	0,02	Baskılanma
Apoptotik indeks [100 x (Bax/Bcl-2)] = 1960					



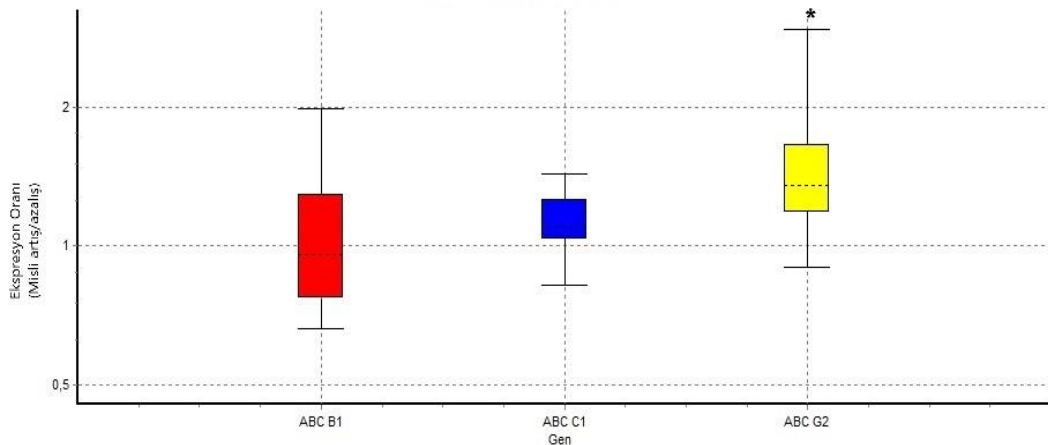
Şekil 4.9: WGA+CP grubu mRNA ekspresyon sonuçları (*: $p<0,05$; **: $p<0,005$).

4.5.2. İlaç Direnci Genlerine Ait RT-qPCR Bulguları

RT-qPCR analizi neticesinde kontrol grubuna kıyasla WGA uygulanmış grupta ABCG2 mRNA ekspresyon düzeyinin 1,503 ($p:0,027$) kat artarak uyarılmış olduğu bulundu (Tablo 4.12) (Şekil 4.10).

Tablo 4.12: WGA grubu ilaç direnci ilişkili genlerin RT-qPCR analizi sonuçları.

Genler	WGA				
	mRNA Ekspresyon Düzeyi	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	p Değeri	Sonuç
ABCB1	0,998	0,725-1,423	0,671-1,834	0,999	Benzer
ABCC1	1,125	0,995-1,307	0,843-1,430	0,166	Benzer
ABCG2	1,503	1,131-2,582	0,944-2,926	0,027	Uyarılma

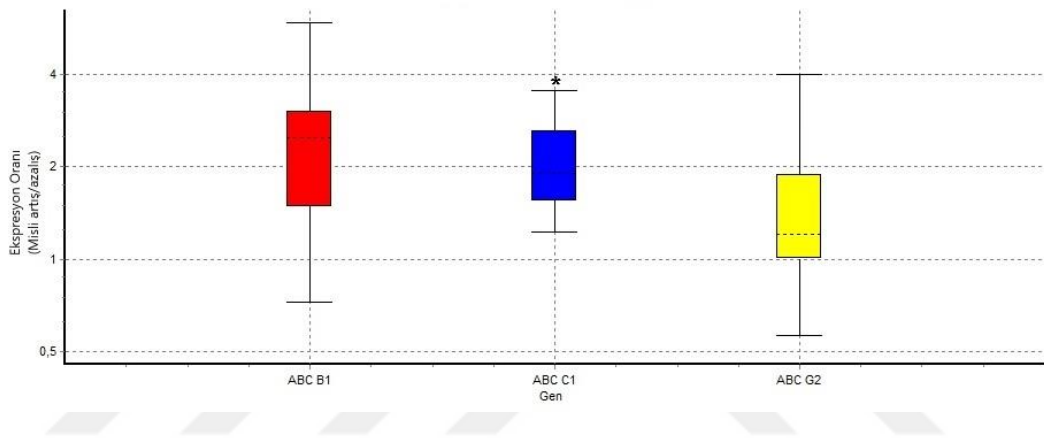


Şekil 4.10: WGA uygulanmış grubun ilaç direnci genleri analiz sonuçları (*: $p<0,05$).

RT-qPCR analizi neticesinde kontrol grubuna kıyasla CP uygulanmış grupta ABCC1 mRNA ekspresyon düzeyinin 2,035 (p:0,009) kat artarak uyarılmış olduğu bulundu (Tablo 4.13) (Şekil 4.11).

Tablo 4.13: CP grubu ilaç direnci ilişkili genlerin RT-qPCR analizi sonuçları.

Genler	CP				
	mRNA Ekspresyon Düzeyi	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	p Değeri	Sonuç
ABCB1	2,144	1,158-3,594	0,735-5,571	0,091	Benzer
ABCC1	2,035	1,488-2,977	1,257-3,417	0,009	Uyarılma
ABCG2	1,315	0,788-2,184	0,589-3,430	0,327	Benzer

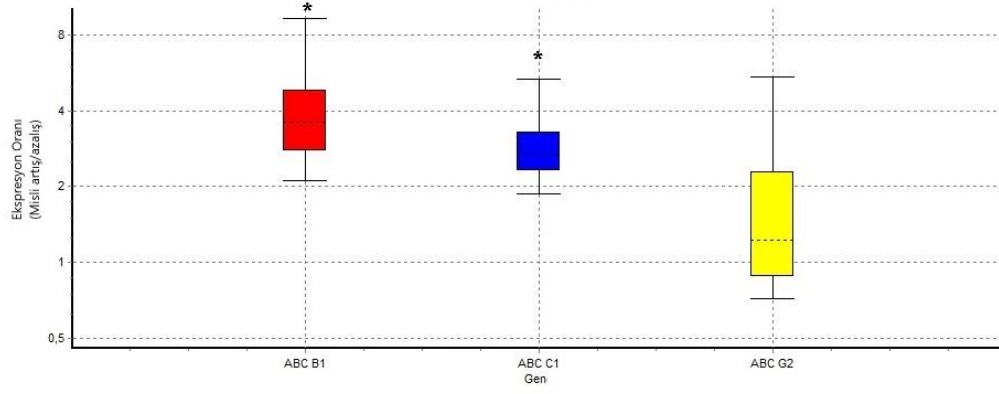


Şekil 4.11: CP uygulanmış grubun ilaç direnci genleri analiz sonuçları (*: p<0,05).

RT-qPCR analizi neticesinde kontrol grubuna kıyasla WGA+CP uygulanmış grupta ABCB1 mRNA ekspresyon düzeyinin 3,745 (p:0,007) kat, ABCC1 mRNA ekspresyon düzeyinin 2,913 (p:0,018) artarak uyarılmış olduğu bulundu (Tablo 4.14) (Şekil 4.12).

Tablo 4.14: WGA+CP grubu ilaç direnci ilişkili genlerin RT-qPCR analizi sonuçları

Genler	WGA+CP				
	mRNA Ekspresyon Düzeyi	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	p Değeri	Sonuç
ABCB1	3,745	2,705- 5,583	2,136- 8,026	0,007	Uyarılma
ABCC1	2,913	2,249- 4,374	1,970- 5,143	0,018	Uyarılma
ABCG2	1,436	0,824- 2,525	0,732- 4,454	0,416	Benzer



Şekil 4.12: WGA+CP uygulanmış grubun ilaç direnci genleri analiz sonuçları (*: $p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Hücre sitotoksitesitesi ve proliferasyon deneyleri temel olarak hücrenin bir ilaca veya herhangi bir kimyasal ajana karşı hayatta kalması veya ölümü için bir gösterge olarak kullanılır. Özellikle ilaç endüstrisi, geliştirilen ajanların hücreler üzerindeki etkilerini belirlemek için sitotoksite deneylerini yaygın olarak kullanmaktadır (96). Bu testlerden biri olan MTT testinin en yaygın kullanım şekli, kontrol grubu ile ilaç/ajan uygulanan grubun canlılığını karşılaştırarak farklı konsantrasyonlarda uygulanan ilaç/ajanın IC₅₀ değerinin tespit edilmesidir. MTT testi, potansiyel ilaçların in vitro ilaç etkilerinin belirlenmesine ve ilaç direncinin incelenerek klinik uygulamalar için öngöründe bulunulmasına yardımcı olur (97).

Lorea ve ark. (14) in vitro olarak 3 insan melanom modeli (SK-MEL-28, HT-144 ve C-32) üzerinde 0,5; 0,05 ve 50 µg/mL dozlarında WGA uygulaması sonrasında WGA'nın 3 melanom modelinde de zaman ve doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunda belirgin bir inhibisyona neden olduğunu ve ayrıca SK-MEL-28 ve HT-144 melanom hücre hatlarında 20 µg/mL WGA uygulamasının MTT testi ile ölçülen global hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda WGA'nın G361 melanom hücre hattında sitotoksik etkisini incelemek ve IC₅₀ dozunu belirlemek amacı ile ilk olarak MTT analizi yapıldı. 1- 500 µg/mL arası değişen 8 farklı konsantrasyonda 24 saat WGA uygulaması sonrası yapılan MTT analizinde literatür ile uyumlu olarak doza bağımlı sitotoksik etkinin arttığı tespit edildi ve IC₅₀ dozu 65.26 µg/mL olarak hesaplandı (Şekil 4.1).

Oksidatif stres ve antioksidan durumun değerlendirilmesi için kullanılan pek çok parametre vardır. Malondialdehit, glutatyon, glutatyon peroksidaz, Glutatyon S-transferaz aktivitesi, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesi gibi çok sayıda parametrenin aynı anda ölçülmesi ve değerlendirilmesi zor, zaman alıcı ve ekonomik olmayan bir yöntemdir. Bu nedenle genel durum göstergesi olarak kullanılabilecek TOS/TAS gibi toplam oksidan/antioksidan denge hakkında bilgi sağlayan ölçümler daha pratik ve ekonomiktir. Ayrıca bu iki analizden yola çıkarak hesaplanan OSI, oksidatif stres ve antioksidan durumun genel dengesinin değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır (95,98).

Signorello ve ark. (102) sağlıklı gönüllülerden alınmış taze venöz kandan elde ettikleri yıkanmış trombositlerin WGA dahil 3 lektin türeviyle uyarılması sonrasında trombositlerin oksidatif durumunu gösteren ROS, süperoksit anyonu, lipid peroksidasyonu, NADPH oksidaz aktivitesi, GSH ve membran SH grupları gibi çeşitli parametreler üzerindeki etkisini incelemişlerdir. WGA ile uyarılan trombositlerde GSH içeriği ve membran SH gruplarının azaldığı ancak kalan tüm parametrelerin arttığı dolayısıyla da trombosit oksidatif stresinin indüklendiği ve antioksidan savunmanın azaldığı bulunmuştur.

Başka bir çalışmada Liu ve ark. (103) fare bağ dokusu L929 fibroblast hücre hattına 0,250 μ M WGA uygulanması sonrasında plazma membranında lipid peroksidasyonunun ve ürünü olan malondialdehitin 2 kat arttığını göstermişlerdir.

Karlsson (104) in vivo eksüdattan izole edilen nötrofillerdeki glikokonjugatlara WGA (2 μ g/mL) bağlanmasının yoğun bir oksidatif yanıtı neden olarak hem hücre içi hem hücre dışı süperoksit anyon üretimine yol açtığını göstermiştir.

Sunulan bu tez çalışması kapsamında yapılan oksidatif stres ve antioksidan durum analizlerinde yukarıda bahsedilen literatür verilerine benzer şekilde WGA uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla TOS ve OSI değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu ve TAS değerinin de yine kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Wozniak ve ark. (105) intraperitoneal B16 melanom hücre nakledilen farelerden elde edilen beyin, akciğer ve karaciğer doku homojenatlarında ve kan eritrositlerinde analiz edilen süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz aktivitesi ve malondialdehit konsantrasyonunda artış meydana geldiğini göstermişlerdir. Melanom hücrelerindeki özellikle oksidatif stres savunmasında yer alan enzimlerin seviyesindeki artışlar hem oksidatif stres ile mücadele edilebilmesi hem de reaktif oksijen türü üreticisi olan bazı kemoterapötik ilaçlara direnç gelişmesi ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle melanom tedavisinde alkilleyici gruptaki platin grubu bileşiklere kemoterapi direncinden sorumlu tutulan melanom hücrelerindeki GSH seviyeleri gibi antioksidan savunmaların azaltılması umut vadeden bir strateji olarak görünmektedir (106).

Campagna ve ark. (107) melanom hücre hattında aşırı eksprese edilen mitokondri iç membranındaki koenzim Q10'a yüksek afinite ile bağlanıp süperoksit anyon salınımını dolayısıyla reaktif oksijen üretiminin azaltılmasını sağlayan paraoksanaz enzimini baskıladıklarında A375 melanom hücre hatlarına Sisplatin (4 ve 8 μ M) uygulanması sonrası hem reaktif oksijen üretiminin arttığını hem de MTT testi ile tespit edilen hücre canlılığının belirgin şekilde azaldığını göstermişlerdir.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen bulgulara göre, TAS analizinde, Kontrol grubu ile CP grubunun istatistiksel olarak benzer bulunması melanom tedavisindeki platin grubu kemoterapötiklere gelişen direnç mekanizmasında sorumlu tutan yukarıdaki literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur. WGA+CP kombinasyonun TOS, TAS ve OSI analizlerinde CP grubuna göre anlamlı bir fark oluşturmadığı ve dolayısıyla CP etkinliğini değiştirmede bulunmuştur (Tablo 4.2, 4.3, 4.4).

Gastman ve ark. (17) WGA'nın apoptotik etkilerini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada Jurkat-S hücrelerini 10 μ g/mL WGA ile 30 dakika ve 3 saat inkübe edip yıkadıktan sonra yaptıkları flow sitometri analizinde annexin V pozitifliğini 30 dakikalık inkübasyonda %39; 3 saatlik inkübasyonda %52 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada WGA'nın apoptotik mekanizmasını belirlemek için Jurkat hücrelerinden WGA ile 30 dakika ve 3 saat inkübe ederek elde ettikleri lizatlardan çalışılan Western blot analizinde Kaspaz-2, -3, -7 ve -8 aktivasyonunun indüklenmediğini ancak Kaspaz-9 aktivasyonunun indüklendiğini hem de 30 dakikalık uygulamadan sonra meydana gelen apoptozis indüksiyonuyla aynı zamana denk geldiğini tespit etmişlerdir. Western blot analiziyle 30 dakikalık WGA inkübasyonunun Sitokrom-c' nin hızlı bir şekilde salınmasına da yol açtığı dolayısıyla WGA aracılı apoptoziste mitokondriyal yolun dahil olduğu sonucuna ulaşılmıştır. WGA ile 5 saatlik inkübasyon sonrasında Kaspaz-3, -6, -8 aktivasyonunun tespit edilmesi ve 10-12 saatlik inkübasyondan sonra da daha da artmış olması Sitokrom c salınımının ve Kaspaz-9 aktivasyonunun apoptotik süreci arttırması olarak yorumlanmıştır.

Liu ve ark. (103) fare bağ dokusu L929 fibroblast hücre hattına 24 saat boyunca 0,3-0,5 μ M WGA uygulaması sonrası immunblotlama analizinde Bax ve Kaspaz-3 protein ekspresyonlarının arttığını; Bcl-2 protein ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir. Bununla birlikte 24 saat boyunca 50-800 μ M WGA uygulaması

sonrası hem floresan hem de transmisyon elektron mikroskopisi ile apoptotik cisimler gözlenmemiştir ve bu durum atipik apoptoz olarak belirlenmiştir.

Srinivasula ve ark. (108), Apaf-1 tarafından prokaspaz-9'un aktivasyon mekanizmasını açıklamak için rekombinant bileşenler ile bir in vitro Apaf-1-prokaspaz-9 aktivasyon sistemi tasarlayarak yaptıkları çalışmada prokaspaz-9'un Apaf-1 aracılı işlenmesinin, prokaspaz-9'un kendi içsel oto-katalitik aktivitesi ile Asp-315'te gerçekleşerek 35 kDa'lık(p35) bir parça oluşturmasını indüklediğini, sürecin devamında da prokaspaz-3'ün Kaspaz-9 tarafından aktive edildiğinde, kalan prokaspaz-9'a geri besleme yaparak daha aktif kaspaz-9 oluşturmak için onu Asp-330'da kesip 37 kDa'lık (p37) bir parça oluşturarak kaspaz kaskadının çoğalmasını sağladığını göstermişlerdir.

Yapılan bu çalışmada WGA'nın 24 saat IC₅₀ dozunda uygulandığı grupta ELISA analiziyle değerlendirdiğimiz Bax, Bcl-2 ve Sit-c düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu tespit edildi (Şekil 4.3). Apoptozu indükleyen Bax protein düzeyinin apoptozu baskılayan Bcl-2 protein düzeyine bölünmesi ile bulunan apoptotik indeks değeri Kontrol grubunda 133,3 iken WGA grubunda artarak 209,09'a yükseldiği ve sonuçta WGA'nın melanom hücreleri üzerinde Sit-c aracılı apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Western blot analiziyle değerlendirdiğimiz Kaspaz 3 düzeyi artmış olmakla birlikte istatistiksel açıdan kontrol grubuna benzer bulunmuştur. Kaspaz 9'un ise aktivasyonu ile oluşan bölünmüş Kaspaz 9 (37 kDa) ve (35 kDa) formlarının aktif formu olan p37'nin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.8). RT-qPCR analiziyle değerlendirilen Kaspaz 3 ve Bax mRNA ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış bulunmuştur. Sitokrom-c ve antiapoptotik protein olan Bcl-2 mRNA ekspresyonlarının ise baskılandığı tespit edildi. Apoptotik bir belirteç olan Bax/Bcl-2 oranının kontrol grubuna kıyasla %1314,29 arttığı bulundu (Tablo 4.9). Tez kapsamında yapılan tüm analizler birlikte değerlendirildiğinde WGA'nın melanom hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkinin total oksidatif stresin artırılıp total antioksidan kapasitenin de azaltılması sonucunda intrensek apoptoz yolunun aktive olarak hücre ölümünün gerçekleşmesinden kaynakladığını göstermektedir. ELISA yöntemiyle değerlendirdiğimiz Sitokrom-c ve Bcl-2 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre artmış bulunmasına rağmen mRNA ekspresyon düzeyinin azalmış bulunması 24

saatlik inkübasyonu takiben analizler gerçekleştirildiği için bu esnada negatif feedback mekanizmasıyla artmış protein düzeyinin mRNA ekspresyonunu baskılamış olabileceğini düşündürmektedir.

Sisplatinin sitotoksik etkisinin, ilacın hücreye girişinden apoptozisin son aşamalarına kadar uzanan karmaşık bir sürece bağlı olması nedeniyle (Şekil 2.3) ve bu sürecin herhangi bir aşamasında değişiklik oluşturan hücre içi olayların apoptozu engelleyerek ilaç direncine neden olması mümkündür (109). Çok sayıda solid tümörün tedavisinde tek başına ya da kombinasyon olarak kullanılan Sisplatin, metastatik hastalıktan etkilenen hastaların %15'inde 3 aylık ortalama süreyle genel bir yanıt oranı oluşturarak ileri evre melanom tedavisinde sistemik sitotoksik kemoterapide benimsenen anti-neoplastik ilaçlar arasında yer almakla birlikte melanom hücrelerinin direnci nedeniyle etkili uzun vadeli sonuçları olmadığı da açıktır (107). Sisplatin kombinasyon kemoterapisi birçok kanserin tedavisinin temelini oluşturur. Yan etkileri ve direnci azaltmak için Sisplatin genellikle over, safra yolu, akciğer, prostat, melanom ve serviks kanserleri gibi malignitelerin tedavisinde kombinasyon halinde kullanılmaktadır ancak daha etkili anti-tümör ilaç tedavi rejimlerinin gelişebilmesi için daha fazla doğal/kimyasal kanser ilaçlarıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (110).

Tez kapsamında yapılan ELISA analizinde kontrol grubuna göre hem proapoptotik protein olan Bax düzeyinin hem de (Bax / Bcl-2) oranıyla hesaplanan apoptotik indeksin WGA+CP grubunda en fazla artış gösterdiği dolayısıyla Sisplatinin sitotoksik etkisinin WGA uygulanması ile arttırılabileceği ve apoptozun uyarılabileceği düşünülmüştür (Şekil 4.3). ELISA analizindeki verilerle hesaplanan apoptotik indeksin RT-qPCR analiziyle elde edilen mRNA ekspresyon verilerinden elde edilen apoptotik indeksle uyumlu olarak en fazla WGA+CP grubuna ait olduğu bulundu (Tablo 4.11). WGA+CP kombinasyonun ELISA analiziyle ölçülen Sitokrom-c düzeyini hem kontrol hem de CP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak arttırmış olması WGA'nın mevcut melanom tedavisindeki CP' nin sitotoksik etkisini arttırabileceğini düşündürmüştür.

Liedert ve ark. (10) Sisplatin direncinde ABCC2'nin rolünü aydınlatmak için sürekli Sisplatine maruz bırakılarak dirençli hale getirilmesiyle oluşturulan MeWo CIS 1 melanom hücre hattında bu proteinin ekspresyonunu analiz ettiklerinde ABCC2'nin Northern blot ile belirlenen mRNA ve Western Blot ile belirlenen protein düzeyinde

belirgin bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Sisplatine dirençli melanoma hücrelerinde ABCC2'nin aşırı ekspresyonunun, immünohistolojik analizle ölçülen nükleer DNA'da platinle indüklenen zincir içi çapraz bağların oluşumunun azalması ile birlikte olduğu ve DNA platinasyonundaki azalmanın Sisplatin ile indüklenen apoptoza uğrama direncine de eşlik ettiği ve gösterilmiştir. MeWo CIS 1'de ABCB1, ABCC1 veya ABCG2 gibi alternatif ilaç direnciyle ilişkili ABC taşıyıcılarının ne RT-PCR ve northern blot ile ölçülen mRNA düzeyinde ne de western blot ile belirlenen protein düzeyinde ekspresyonu bulunamamıştır.

Ichihashi ve Kitajima (111) sekiz melanom hastasından alınan 18 örneğin formalinle sabitlenmiş, parafine gömülmüş kesitlerini kullanarak RT-PCR analiziyle kemoterapiden önce ve sonra ABCB1 ve ABCC1 genlerinin ekspresyonundaki değişiklikleri mRNA düzeyinde inceledikleri çalışmada yedi primer melanomdan beşinin kemoterapiden önce bile belli bir ölçüde ABCC1 genini eksprese ettiğini ancak birinci ve ikinci kemoterapi kürlerinden sonra altı hastada ABCC1 mRNA/b-aktin mRNA oranının aynı hastalardaki kemoterapi öncesi seviyelere kıyasla arttığını ancak melanom vakalarının hiçbirinde ABCB1 ekspresyonunun bulunmadığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar, ABCC1 gen ekspresyonunun malign melanomda kemoterapi ilaçlarına maruz kalmadan önce bile içsel olarak mevcut olup kemoterapiden sonra artması dolayısıyla malign melanomda ABCC1'in kemoterapi direncini artırmada rol oynuyor olması olarak yorumlanmıştır.

İlaç direnci ilişkili genlerin (ABCB1, ABCC1 ve ABCG2) mRNA düzeyinde ekspresyonlarının incelendiği bu çalışmada literatür ile uyumlu olarak 24 saat IC₅₀ dozunda CP uygulanan grupta kontrol grubuna göre ABCC1 gen ekspresyonunun 2,035 kat artmış olduğu tespit edildi (Tablo 4.13). WGA'nın herhangi bir hücre hattında in vitro ya da in vivo olarak ABC taşıyıcıları üzerindeki etkisini gösteren henüz bir çalışma olmadığı gözlenmiştir. WGA'nın G361 melanom hücreleri üzerindeki çoklu ilaç direnci ilişkili glikoproteinlerin mRNA ekspresyonları üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada ABCG2 ekspresyonunun kontrol grubuna göre 1,503 kat arttığı tespit ve elde edilen bu bulguların literatüre önemli katkı sağlayacağı (Tablo 4.12). WGA+CP kombinasyonunun ise ABCB1 gen ekspresyonunu 3,745 kat; ABCC1 gen ekspresyonunu ise 2,913 kat arttırdığı bulundu (Tablo 4.14). Kombinasyon uygulamasının ABCB1 gen ekspresyonunu CP uygulamasına göre daha fazla arttırmış olması ilaç etkinliğinin önünde bir engel oluşturabileceği ve ilaç direnci oluşmasına

neden olabileceğini düşündürmektedir. İlaç direncinin giderek önem kazandığı melanomda bu genlerdeki değişikliklerin tespiti çok önemli olduğu düşünülmektedir. Olası hedefe yönelik tedavi aşamalarının oluşturulabilmesi için bu bulgular aydınlatıcı olacak ve terapötik stratejilerin geliştirilmesinde yol gösterici olacaktır.

Tez çalışması kapsamında WGA ve Sisplatinin melanom hücre hattı üzerinde apoptoza neden olabileceğini düşündüren yollar deneysel olarak test edilmiş ve intrinsek apoptoz yolağı haricindeki hücre ölüm mekanizmaları için finansal zorluklar nedeniyle moleküler düzeyde ayrıntılı analizler yapılamamıştır. Bu durum tez çalışmasının en önemli kısıtlılığı olarak değerlendirilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde melanom ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Moleküler karmaşıklığı ve heterojenliği ile karakterize olan melanom, patogenezinin anlaşılması ve etkili bir şekilde tedavi edilmesi konusunda önemli zorluklar teşkil etmektedir. Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanımda olan kemoterapötik ilaçların sınırlı etkinlikleri ve kullanımını kısıtlayan ciddi yan etkileri alternatif yeni tedavi yöntemleri/ajanları arayışının en önemli sebepleridir.

Tez çalışması bulguları G361 melanom hücrelerinde in vitro etkisi test edilen WGA'nın total oksidan kapasiteyi arttırıp, total antioksidan kapasiteyi de azaltarak oksidatif strese bağlı apoptozu indüklediğini ve dolayısıyla melanom tedavisinde potansiyel bir ajan olduğunu göstermektedir.

İleri evre melanom tedavisinde sistemik kemoterapi protokollerinde yan etki ve direnci azaltmak için kombinasyon halinde kullanılan Sisplatinin çalışmamızda WGA ile kombinasyonun ELISA yöntemiyle test edilen apoptotik belirteçlerin (Bax ve Sit-c) ve hesaplanan apoptotik indeks değerinin hem kontrol hem de CP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmış olması ve ayrıca RT-qPCR verilerinden hareketle hesaplanan apoptotik indeks değerinin en fazla WGA+CP grubuna ait olması mevcut kombinasyonla Sisplatin sitotoksitesinin arttırılarak daha etkili anti-tümör tedavi protokolü geliştirilebilmesi için umut vadetmektedir.

Tez kapsamında in vitro etkisi ortaya konan WGA+CP uygulamasının biyokimyasal ve moleküler etki mekanizmalarının daha derinlemesine in vitro ve in vivo çalışmalarla ortaya konulması melanom tedavisindeki etkinliğinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Kolathur KK, Nag R, Shenoy PV, Malik Y, Varanasi SM, Angom RS, et al. Molecular Susceptibility and Treatment Challenges in Melanoma. *Cells*. 2024 Aug 20;13(16):1383.
2. Sandru A, Voinea S, Panaitescu E, Blidaru A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life*. 2014;7(4):572-576.
3. Ascierto PA, Streicher HZ, Sznol M. Melanoma: a model for testing new agents in combination therapies. *J Transl Med* 2010; 8: 1-7.
4. Kelley SL, Basu A, Teicher BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science*. 1988;241(4874):1813-1815.
5. Zhang K, Mack P, Wong KP. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int J Oncol*. 1998;12(4):871-882.
6. Masuda H, Ozols RF, Lai GM, Fojo A, Rothenberg M, Hamilton TC. Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*. 1988;48(20):5713-5716.
7. Lage H, Helmbach H, Grottke C, Dietel M, Schadendorf D. DFNA5 (ICERE-1) contributes to acquired etoposide resistance in melanoma cells. *FEBS Lett*. 2001;494(1-2):54-59.
8. Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, et al. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res*. 1996 Feb 1;56(3):556-62.
9. Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, et al. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res*. 1996 Sep 15;56(18):4124-9.
10. Liedert B, Materna V, Schadendorf D, Thomale J, Lage H. Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *J Invest Dermatol*. 2003;121(1):172-176.
11. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2014; 5, e1257.
12. Hsan KM, Chen CC, Shyur, LF. Current research and development of chemotherapeutic agents for melanoma. *Cancers*. 2010; 2(2): 397-419.
13. Van Damme EJM, Peumans W J, Pusztai A, Bardocz S. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. John Wiley & Sons, New York, 1998: 452
14. Lorea P, Goldschmidt D, Darro F, Salmon I, Bovin N, Gabius HJ, et al. In vitro characterization of lectin-induced alterations on the proliferative activity of three human melanoma cell lines. *Melanoma research* 1997; 7(5): 353-363.
15. Wang H, Ng TB, Ooi VE, Liu WK. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000 Mar;32(3):365-72.
16. Miyoshi N, Koyama Y, Katsuno Y, Hayakawa S, Mita T, Ohta T, et al. Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin. *J Biochem*. 2001 Dec;130(6):799-805.
17. Gastman B, Wang K, Han J, Zhu ZY, Huang X, Wang GQ, et al. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochem Biophys Res Commun*.

- 2004 Mar 26;316(1):263-71.
18. Tsai TL, Wang HC, Hung CH, Lin PC, Lee YS, Chen HHW, et al. Wheat germ agglutinin-induced paraptosis-like cell death and protective autophagy is mediated by autophagy-linked FYVE inhibition. *Oncotarget*. 2017 Oct 31;8(53):91209-22
 19. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2024 April 04; 74(3): 229-263.
 20. Patterson AD, Gonzalez FJ, Perdew GH, Peters JM. Molecular regulation of carcinogenesis: friend and foe. *Toxicological Sciences*. 2018 Oct 1;165(2):277-83.
 21. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
 22. Protá G, Mascagna D. Melanogenesis as a targeting strategy against metastatic melanoma: a reassessment. *Melanoma Research*. 1994 Dec 1;4(6):351-8.
 23. Maranduca MA, Branisteanu D, Serban DN, Branisteanu DC, Stoleriu G, Manolache N, et al. Synthesis and physiological implications of melanic pigments. *Oncology Letters*. 2019 May 1;17(5):4183-7.
 24. Heistein JB, Acharya U, Mukkamalla SK. Continuing Education Activity.
 25. Dimitriou F, Krattinger R, Ramelyte E, Barysch MJ, Micalletto S, Dummer R, et al. The world of melanoma: epidemiologic, genetic, and anatomic differences of melanoma across the globe. *Current oncology reports*. 2018 Nov; 20:1-9.
 26. Ferrara G, Argenziano G. The WHO 2018 classification of cutaneous melanocytic neoplasms: suggestions from routine practice. *Frontiers in oncology*. 2021 Jul 2; 11:675296.
 27. Palmieri G, Ombra M, Colombino M, Casula M, Sini M, Manca A, et al. Multiple molecular pathways in melanomagenesis: characterization of therapeutic targets. *Frontiers in oncology*. 2015 Aug 10; 5:183.
 28. Arnold M, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Vaccarella S, Meheus F, et al. Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040. *JAMA dermatology*. 2022 May 1;158(5):495-503.
 29. Türkyılmaz M, Oruç Hamavioğlu E, Dündar S, Kavak Ergün A, Sevinç A, Tütüncü S. Türkiye kanser istatistikleri 2018, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara, 2022.
 30. Long GV, Swetter SM, Menzies AM, Gershenwald JE, Scolyer RA. Cutaneous melanoma. *The Lancet*. 2023 Aug 5;402(10400):485-502.
 31. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In vivo*. 2014 Nov 1;28(6):1005-11.
 32. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline—Update 2016. *European journal of cancer*. 2016 Aug 1;63:201-17.
 33. Kalkhoran S, Milne O, Zalaudek I, Puig S, Malvehy J, Kelly JW, Marghoob AA. Historical, clinical, and dermoscopic characteristics of thin nodular melanoma. *Archives of dermatology*. 2010 Mar 1;146(3):311-8.
 34. Edition S, Edge S, Byrd D. *AJCC cancer staging manual*. AJCC cancer staging manual. 2017.
 35. Lopes J, Rodrigues CM, Gaspar MM, Reis CP. Melanoma management: from epidemiology to treatment and latest advances. *Cancers*. 2022 Sep 24;14(19):4652.
 36. Oliveira Pinho J, Matias M, Gaspar MM. Emergent nanotechnological strategies for systemic chemotherapy against melanoma. *Nanomaterials*. 2019 Oct

- 13;9(10):1455.
37. Wilson MA, Schuchter LM. Chemotherapy for melanoma. *Melanoma*. 2016;209-29.
 38. Eddy K, Chen S. Overcoming immune evasion in melanoma. *International journal of molecular sciences*. 2020 Nov 26;21(23):8984.
 39. Mackiewicz J, Mackiewicz A. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*. 2018 Mar 5;2018(1):68-72.
 40. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I—activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European journal of cancer*. 2017 Mar 1; 73:85-92.
 41. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer biology & therapy*. 2019 Nov 2;20(11):1366-79.
 42. IARC I. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Monograph Supplement. 1982;4.
 43. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2007 Aug;7(8):573-84.
 44. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*. 2014 Oct 5;740:364-78.
 45. Saad SY, Najjar TA, Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2004 Dec;31(12):862-7.
 46. Gumulec J, Balvan J, Sztalmachova M, Raudenska M, Dvorakova V, Knopfova L, et al. Cisplatin-resistant prostate cancer model: Differences in antioxidant system, apoptosis and cell cycle. *Int J Oncol*. 2014 Mar;44(3):923-33.
 47. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004 Nov 1;14(11):53R-62R.
 48. Bhutia SK, Panda PK, Sinha N, Praharaj PP, Bhol CS, Panigrahi DP, et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. *Pharmacol Res*. 2019 Jun; 144:8-18.
 49. Lannoo N, Van Damme EJ. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Frontiers in plant science*. 2014 Aug 13; 5:397.
 50. De Punder K, Pruimboom L. The dietary intake of wheat and other cereal grains and their role in inflammation. *Nutrients*. 2013 Mar;5(3):771-87.
 51. Smith JJ, Raikhel NV. Nucleotide sequences of cDNA clones encoding wheat germ agglutinin isolectins A and D.
 52. Matucci A, Veneri G, Dalla Pellegrina C, Zoccatelli G, Vincenzi S, Chignola R, et al. Temperature-dependent decay of wheat germ agglutinin activity and its implications for food processing and analysis. *Food Control*. 2004 Jul 1;15(5):391-5.
 53. del Carmen Portillo-Téllez M, Bello M, Salcedo G, Gutiérrez G, Gómez-Vidales V, García-Hernández E. Folding and homodimerization of wheat germ agglutinin. *Biophysical journal*. 2011 Sep 21;101(6):1423-31.
 54. Ryva B, Zhang K, Asthana A, Wong D, Vicioso Y, Parameswaran R. Wheat germ agglutinin as a potential therapeutic agent for leukemia. *Frontiers in oncology*. 2019 Feb 21;9:100.
 55. Schwarz RE, Wojciechowicz DC, Picon AI, Schwarz MA, Paty PB. Wheatgerm agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. *British journal of cancer*.

- 1999 Aug;80(11):1754-62.
56. Morana O, Wood W, Gregory CD. The apoptosis paradox in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2022 Jan 25;23(3):1328.
 57. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
 58. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*. 2007 Jan;87(1):99-163.
 59. D'arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*. 2019 Jun;43(6):582-92.
 60. Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell death and differentiation*. 2002 Mar;9(4):358-61.
 61. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Current opinion in cell biology*. 2009 Dec 1;21(6):871-7.
 62. Okuyan D. Apoptozis. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*. 2023;49(1):1-10
 63. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010 Sep;11(9):621-32.
 64. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013 Apr 1;5(4):a008714.
 65. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*. 2020 Oct 23;81(4):1133-43.
 66. Turgut B, Demir T, Celiker Ü. Oftalmolojide apoptoz. *Fırat Tıp Dergisi*. 2006;11(1):6-11.
 67. Yoon JH, Gores GJ. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *Journal of hepatology*. 2002 Sep 1;37(3):400-10.
 68. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014 Sep 5;6(3):1769-92.
 69. Erdogan S, Turkekul K, Dibirdik I, Doganlar O, Doganlar ZB, Bilir A, et al. Midkine downregulation increases the efficacy of quercetin on prostate cancer stem cell survival and migration through PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018 Nov; 107:793-805.
 70. Chen KG, Gottesman MM. How Melanoma Cells Evade Chemotherapy. *Humana Press eBooks*. 2007 Nov 4;591–603.
 71. Chang G, Roth CB. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*. 2001 Sep 7;293(5536):1793-800.
 72. Sauna ZE, Ambudkar SV. Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol Chem*. 2001 Apr 13;276(15):11653-61.
 73. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71:537-92.
 74. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*. 2009 Apr;3(3):281-90.
 75. Chen KG, Valencia JC, Gillet J, Hearing VJ, Gottesman MM. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of

- melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009 Dec;22(6):740-9.
76. Sajid A, Rahman H, Ambudkar SV. Advances in the structure, mechanism and targeting of chemoresistance-linked ABC transporters. *Nat Rev Cancer.* 2023 Nov;23(11):762-79.
 77. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976 Nov 11;455(1):152-62.
 78. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Mar;5(3):219-34.
 79. Rouzaud F, Hearing VJ. Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. *Peptides.* 2005 Oct;26(10):1858-70.
 80. Maellaro E, Pacenti L, Del Bello B, Valentini MA, Mangiavacchi P, De Felice C, et al. Different effects of interferon-alpha on melanoma cell lines: a study on telomerase reverse transcriptase, telomerase activity and apoptosis. *Br J Dermatol.* 2003 Jun;148(6):1115-24.
 81. Wu CP, V Ambudkar S. The pharmacological impact of ATP-binding cassette drug transporters on vemurafenib-based therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2014 Apr;4(2):105-11.
 82. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2003 Jan;55(1):3-29.
 83. Conrad S, Kauffmann HM, Ito K, Deeley RG, Susan P.C. Cole, Schrenk D. Identification of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) mutations and characterization of a G671V substitution. *Journal of Human Genetics.* 2001 Nov 1;46(11):656-63.
 84. Deeley RG, Cole SPC. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Letters.* 2005 Dec 21;580(4):1103-11.
 85. He SM, Li R, Kanwar JR, Zhou SF. Structural and Functional Properties of Human Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr Med Chem.* 2011 Jan 1;18(3):439-81.
 86. Toyoda Y, Takada T, Suzuki H. Inhibitors of Human ABCG2: From Technical Background to Recent Updates With Clinical Implications. *Front Pharmacol.* 2019; 10:208.
 87. Westover D, Li F. New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015; 34:159.
 88. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* 2008;9(1):105-127.
 89. Engle K, Kumar G. Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB1 inhibition: A recent update. *Eur J Med Chem.* 2022; 239:114542.
 90. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. *Assay guidance manual [Internet].* 2016 Jul 1.
 91. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
 92. Wu R, Feng J, Yang Y, Dai C, Lu A, Li J, et al. Significance of serum total oxidant/antioxidant status in patients with colorectal cancer. *PLoS One.* 2017 Jan 19;12(1): e0170003.
 93. Büyüktuncel E. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal.* 2013 Apr 1;17(2):93-103.

94. Niki E. [3] Free radical initiators as source of water-or lipid-soluble peroxy radicals. In *Methods in enzymology* 1990 Jan 1 (Vol. 186, pp. 100-108). Academic press.
95. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005 Dec 1;38(12):1103-11.
96. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(14):1213-21.
97. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005; 11:127-52.
98. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004; 37(4): 277-85.
99. Aslim HP and Bulut O. Western Blot. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*. 2021;6(1), 45-56
100. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*. 2017 Jan;27(1):4-25.
101. Pfaffl MW, Hageleit M: Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechn Lett*. 2001;23(4):275-82.
102. Signorello MG, Ravera S, Leoncini G. Lectin-induced oxidative stress in human platelets. *Redox Biology*. 2020 May; 32:101456.
103. Liu WK, Sze SC, Ho JC, Liu BP, Yu MC. Wheat germ lectin induces G2/M arrest in mouse L929 fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2004 Apr 15;91(6):1159-73.
104. Karlsson A. Wheat germ agglutinin induces NADPH-oxidase activity in human neutrophils by interaction with mobilizable receptors. *Infect Immun*. 1999 Jul;67(7):3461-8.
105. Wozniak A, Drewa G, Wozniak B, Schachtschabel DO. Activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in selected tissues of mice of different ages, both healthy and melanoma-bearing. *Z Gerontol Geriat*. 2004;37(3):184-189.
106. Emanuelli M, Sartini D, Molinelli E, Campagna R, Pozzi V, Salvolini E et al. The Double-Edged Sword of Oxidative Stress in Skin Damage and Melanoma: From Physiopathology to Therapeutical Approaches. *Antioxidants*. 2022; 11(4):612
107. Campagna R, Bacchetti T, Salvolini E, Pozzi V, Molinelli E, Brisigotti V et al. Paraoxonase-2 Silencing Enhances Sensitivity of A375 Melanoma Cells to Treatment with Cisplatin. *Antioxidants*. 2020; 9(12):1238.
108. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*. 1998 Jun;1(7):949-57.
109. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7265-79.
110. Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J Cancer Sci Ther*. 2019;11(4):97.
111. Ichihashi N, Kitajima Y. Chemotherapy induces or increases expression of multidrug resistance-associated protein in malignant melanoma cells. *Br J Dermatol*. 2001;144(4):745-750.