

T.C.  
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRİSİNİN İNSAN NÖRONAL SH-SY5Y HÜCRELERİNDE  
PAKLİTAKSEL KAYNAKLI OKSİDATİF STRES VE  
APOPTOZA KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sema Nur VARAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Adnan AYNA**

**BİNGÖL - 2023**

T.C.  
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRİSİNİN İNSAN NÖRONAL SH-SY5Y HÜCRELERİNDE  
PAKLİTAKSEL KAYNAKLI OKSİDATİF STRES VE  
APOPTOZA KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sema Nur VARAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Adnan AYNA**

**BİNGÖL - 2023**

**KRİSİNİN İNSAN NÖRONAL SH-SY5Y HÜCRELERİNDE PAKLİTAKSEL  
KAYNAKLI OKSİDATİF STRES VE APOPTOZA KARŞI KORUYUCU  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Adnan AYNA danışmanlığında, Sema Nur VARAN tarafından hazırlanan bu çalışma 12/09/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Ekrem DARENDELİOĞLU *İmza* :  
Üye (Danışman) : Doç. Dr. Adnan AYNA *İmza* :  
Üye : Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

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

**Prof. Dr. Zafer ŞİAR**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım süresince benden yardımlarını ve akademik bilgi birikimi ile tecrübelerini esirgemeyen, çalışmalarımın zamanında tamamlanabilmesi için gereken desteği sağlayan sayın danışman hocam Doç. Dr. Adnan Ayna'ya teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarım sırasında benimle kıymetli deneyimlerini paylaşıp yol gösteren kıymetli hocalarım sayın Doç. Dr. Ekrem Darendelioğlu'na, Dr. Öğr. Üyesi Abdullah Tunç'a, Arş. Gör. Gürkan Aykutoğlu'na çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans çalışmalarım boyunca boyunca laboratuvar çalışmalarımı sorunsuz bir şekilde yürütebilmeme imkan veren Kimya Bölümü Bölüm Başkanlığı ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bölüm Başkanlığı 'na teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, laboratuvarında yaptığım bütün deneylerde yanımda olan, beraber çok güzel zaman geçirdiğim arkadaşlarım İbrahim Bayav ve Sevda Sağ ve Şüheda Esmâ Genççe çok teşekkür ederim.

Son olarak bende büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan kıymetli, aileme ve dualarını her zaman üzerimde hissettiğim rahmetli Anneme teşekkürlerimi sunarım.

**Sema Nur VARAN**

**Bingöl 2023**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Kanser ve Kemoterapi .....	2
1.3. Paklitaksel.....	2
1.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller.....	3
1.5. Antioksidanlar .....	5
1.6. Flavonoidler.....	8
1.7. Krisin .....	9
1.8. Apoptoz .....	10
1.9. Apoptozun Önemi .....	11
1.10. Bcl-2 Ailesi.....	11
1.11. Apoptoz Yolakları .....	13
1.12. Mitokondriyal Yolak (içsel yolak) .....	13
1.13. Hücre Yüzeyi Yolakları (dışsal yolak).....	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Hücre Ekimi.....	21
3.3. Hücre Canlılığı Analizi (WST-1 Assay) .....	21
3.4. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Analizi .....	21
3.5. Real Time PCR.....	22

3.6. Immunohistokimyasal Boyama .....	24
3.7. İstatiksel Analiz .....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	26
4.1. Paklitaksel ve Krisin Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri .....	26
4.2. Paklitaksel ve Krisin Uygulamasının LPO Üzerindeki Etkisi .....	28
4.3. QTR-PCR Analizi .....	30
4.4. İmmunohistokimyasal Boyama ile Caspase-3 ve Caspase-8 Ekspresyonlarının Analizi .....	35
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	38
KAYNAKLAR .....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	47

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
SHSY-5Y:	Nöroblastoma Sinir Hücresi
NFK-B:	Nuclear Factor Kappa B
TNF- $\alpha$ :	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
IL1 $\beta$ :	interlökin 1 $\beta$
IL-6:	İnterlökin 6
SOD:	Süperoksit Dismutaz
CAT:	Katalaz
IARC:	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
LPO:	Lipit Peroksidasyonu
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
AIDS:	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu)
UV:	Ultraviyole
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
OS:	Oksidatif Stres
PDT:	Fotodinamik
SDT:	Sonodinamik Terapi
GSH:	Glutasyon
PBS:	Phosphate-Buffered Saline
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen Peroksit
FADD:	Apoptozis İndüklenebilir Faktör
%:	Yüzde
AIF:	Apoptoz İndükleyici Faktör
APAF-1:	Apoptozis İndüklenebilir Faktörü
FasL:	Fas Ligandı
8-OHdG:	8-Hidroksi- 2-deoksiguanozin
PHÖ:	Programlı Hücre Ölümü

FBS:	Fetal Bovin Serum
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
$\mu\text{M}$ :	Mikromolar
mM:	Milimolar
CHR:	Krisin
WST-1:	Water-Soluble Tetrazolium Salt
$\mu\text{l}$ :	Mikrolitre
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic Acid
TBA:	Tiyobarbütik Asit
TCA:	Trikloroasetik Asit
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MDA:	Malondialdehit
qRT-PCR:	Kantitatif Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNase/RNase:	Deoksiribonükleaz Testi/Ribonükleaz



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Antioksidanların sınıflandırılması .....	6
Şekil 2.	Krisinin kimyasal yapısı.....	9
Şekil 3.	Apoptoz intrinsik yolaka ait görüntüsü .....	14
Şekil 4.	Apoptoza ait entrinsik yolak görüntüsü .....	15
Şekil 5.	Farklı dozlarda paklitaksel ile indüklenmiş dopaminerjik sinir hattı (SHSY-5Y) hücrelerinin hücre proliferasyonuna olan etkisi.....	26
Şekil 6.	Etkin konsantrasyon olarak seçilen (15 µM) paklitaksel ile indüklenen SH-SY5Y hücreleri üzerine 500 ve 1000 µM konsantrasyonda uygulanan krisinin hücre proliferasyonuna olan etkisi. ....	27
Şekil 7.	Etkin doz olarak seçilen (30 µM) paklitaksel ile indüklenen SH-SY5Y hücreleri üzerine 500 ve 1000 µM uygulanan krisinin hücre proliferasyonuna olan etkisi. ....	28
Şekil 8.	30 µM paklitaksel, 30 µM paklitaksel+ 500 ve 1000 µM krisinin aynı anda uygulanması ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattı üzerinde oluşan lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA'nın (Malondialdehit) LPO Assay kiti kullanılarak ölçülmesi.....	30
Şekil 9.	30 µM paklitaksel, 500 ve 1000 µM krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında anti-apoptotik gen olan Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeyi.....	32
Şekil 10.	30 µM paklitaksel, 500 ve 1000 µM krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan Cas-8 mRNA ekspresyon düzeyi.....	33
Şekil 11.	30 µM paklitaksel, 500 ve 1000 µM krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan Cas-6 mRNA ekspresyon düzeyi.....	33
Şekil 12.	30 µM paklitaksel, 500 ve 1000 µM krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan Cas-10 mRNA ekspresyon düzeyi.....	34
Şekil 13.	30 µM paklitaksel, 500 ve 1000 µM krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan NFKB mRNA ekspresyon düzeyi.....	34
Şekil 14.	30 µM paklitaksel, 500 ve 1000 µM krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan p53 mRNA ekspresyon düzeyi.....	35
Şekil 15.	Paklitaksel ve krisin uygulamasının kaspaz-3 enzim ekspresyonuna etkisi.....	36
Şekil 16.	Paklitaksel ve krisin uygulamasının kaspaz-8 enzim ekspresyonuna etkisi....	37

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmalar sırasında kullanılan araçlar, ekipmanlar, kimyasal malzemeler ...	20
Tablo 2. QRT-PCR çalışmasında kullanılmış olan genlere özgü primer sekans dizileri (F:Forward, İleri,R: Reverse, Geri) .....	25

# KRİSİNİN İNSAN NÖRONAL SH-SY5Y HÜCRELERİNDE PAKLİTAKSEL KAYNAKLI OKSİDATİF STRES VE APOPTOZA KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

Paklitaksel çeşitli kanserleri tedavi etmek için kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Paklitaksel, hücre bölünmesinde yer alan temel yapılar olan mikrotübüllerin normal işlevine müdahale ederek çalışır. Paklitaksel, mikrotübülleri stabilize ederek ve hücre bölünmesi sırasında parçalanmalarını önleyerek mitoz sürecini bozar ve sonuçta hızla bölünen kanser hücrelerinin ölümüne yol açar. Kanser önleyici ilaçların temel mekanizması, kanser hücrelerinin reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi yoluyla apoptotik yollara yönlendirilmesidir. Ancak üretilen bu ROS'lar kanser hücrelerinin yanı sıra diğer hücelere de saldırarak başta nörotoksisite olmak üzere çeşitli doku ve organlarda toksisiteye neden olabilmektedir. Bunlardan sinir sistemi, yapısal özellikleri ve etkili bir damar bariyeri olmaması nedeniyle toksik ajanlara karşı çok daha hassastır. Normal şartlar altında vücutta üretilen ROS'a karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Ancak sinir hücrelerinin antioksidan savunma mekanizmaları oldukça zayıftır. Bu onları oksidatif strese karşı savunmasız bırakır. Bu nedenle sinir hücrelerinde meydana gelen ilaç toksisitesine karşı antioksidan bileşiklerin kullanımının etkili bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmanın amacı, oksidatif hasar ve apoptoz yoluyla itilil model olarak SH-SY5Y nöron hücrelerinde paklitakसेle bağlı toksisiteye karşı krisinin olası koruyucu etkilerin değerlendirilmesidir. Çalışma kapsamında öncelikle SH-SY5Y hücrelerine farklı dozlarda paklitaksel uygulanmış ve 15 ve 30 µM paklitaksel uygulamasının hücre canlılığını azalttığı ve 500 ve 1000 µM krisin uygulamasının bu etkileri azalttığı gösterilmiştir. Krisinin paklitaksel uygulanmış hücrelerde LPO seviyesini anlamlı seviyede azalttığı gösterilmiştir. Krisinin ayrıca kaspaz 10, kaspaz 8, kaspaz 6, p53 ve NFκB seviyelerini anlamlı şekilde azaltmış, Bcl-2 seviyesini ise paklitaksel uygulanmış gruba göre artırmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, krisinin oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümünün baskılanmasının, paklitaksel ile indüklenen SH-SY5Y sitotoksitesinin tedavisi için etkili bir strateji olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Paklitaksel, krisin, reaktif oksijen türleri, apoptozis.

# INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF CHRYSIN AGAINST PACLITAXEL-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND APOPTOSIS IN HUMAN NEURONAL SH-SY5Y CELLS

## ABSTRACT

Paclitaxel is a preventive medicine used to treat various cancers. Paclitaxel works by interfering with the normal function of microtubules, which are key structures in the cell structure. Paclitaxel disrupts the mitotic shell by stabilizing microtubules and preventing them from disintegrating during cell structures, leading to death of the rapidly dividing cancer body. The main groups of anti-cancer organisms are the directing of cancer growth to apoptotic pathways through the production of oxygen species (ROS). However, these produced ROS can cause effects on various tissues and organs, especially neurological, by attacking other countries as well as cancer formations. Their nervous system is much more sensitive to toxic agents due to their class and substances on an effective vascular barrier. It does not have enzymatic and non-enzymatic protective defense against ROS stored under normal conditions. However, the antioxidant defense systems that protect the nerves are quite weak. This leaves them against oxidative stress. For this reason, it was thought that it could be an effective option against drug therapy in nerve cells. The aim of this study was to evaluate the possible protective effects of chrysin against paclitaxel-induced action in SH-SY5Y cells as an in vitro model through oxidative damage and apoptosis. In the scope of the study, different doses of paclitaxel were applied to SH-SY5Y cells and 15 and 30  $\mu\text{M}$  paclitaxel cells were those that expanded cell viability and these damages of 500 and 1000  $\mu\text{M}$  chrysin cells were spent. Chrysin was also used in paclitaxel treated institutions to benefit from the LPO level. Chrysin also decreased caspase 10, caspase 8, caspase 6, p53, and NF $\kappa$ B data, and increased Bcl-2 levels compared to the paclitaxel-treated groups. These output results suggest that suppression of chrysin oxidative stress and apoptotic cell death may be an effective strategy for the treatment of paclitaxel-induced SH-SY5Y cytotoxicity.

**Keywords:** Paclitaxel, chrysin, reactive oxygen species, apoptosis.

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Kanser

Dünyada ve ülkemizde ölümcül hastalıkların başında gelen ve çağımızın hastalığı olarak bilinen ve hücrede aşırı bir bölünme reaksiyonu sonucu oluşan kanser; giderek değişen ve gelişen dünyada geldiğimiz noktada yıllardan beri süregelen hayati risk taşıyan en önemli hastalıklardan birisi olmuştur. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'a göre Avrupa'da ölümlerin %20'si kanserden kaynaklanmaktadır. Dünya sağlık örgütü (WHO)'nün yayınladığı verilere göre 2018 yılında Türkiye' de kanserden ölenlerin sayısı 116,710'dur (WHO 2018). Kanser terimi; kanserli hücrenin büyümesi, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki düzensiz dağılımı ifade eder (Ornell Moran, 2022). Kanser hücrelerinde, tümör dominant genlerin işlev kaybının ve metabolik yolların yanı sıra hücre iletişimini başlatmak için protein kodlayan genlerin aktive olması nedeniyle yüksek düzeyde ROS ile karşılaşılır. Bunu önlemek için kanser tedavisinde çeşitli terapötiklerin yanında alternatif destekleyici ajanlar kullanılmaktadır (George, 2020).

Kanser tedavisi, metastaz, anjiyogenez ve ilaç direnci gibi tedavi sırasında karşılaşılan çeşitli engeller nedeniyle karmaşık bir süreçtir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların birçoğu, doğuştan ya da sonradan edinilmiş direnç sebebiyle bu hastalığa sahip kişilerde kısıtlı geri dönüt vermekte, bu da hastalığın iyileştirilme şansına karşı kompleks ilaç etkileşimlerinin ve yan etkilerinin ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (Al-Shamma et al., 2023). Bu hayati riski ortadan kaldıracak yeni antikanser ajanların geliştirilmesinde alternatif terapötik çalışmaların ortaya çıkmasını gerekli kılmaktadır. Kanser tedavisinin asıl gayesi kemoterapi, radyoterapi gibi birçok terapötik ajanların birlikte veya destekleyici tedavi yöntemleriyle kanser hücrelerinin yaşamına son vermektir (Yang, 2022).

## 1.2. Kanser ve Kemoterapi

Kemoterapik ajanların kanser tedavisinde kullanımı sıklıkla uygulanan bir tedavi yöntemidir (Glazer, 2019). Kanserli hücreler topluluğu olan tümörlerin ilaç kullanma suretiyle tedavi edilmesi manasını taşıyan kemoterapi, kanserli hücrelerin çoğalmasını ve büyümesini önleyerek bu hücreleri önemli derecede hasara uğratar. Son yıllarda genelde klasik kemoterapi ilaçları ile yeni nesil kemoterapi ajanları birlikte kullanıldıkları için tümöre etkilerinin daha fazla olduğu bilinmektedir.

Kanser hücreleri genellikle normal hücrelerden daha hızlı büyüüp bölünme reaksiyonu gösterdiğinden, kemoterapi kanser hücreleri üzerinde daha önemli bir etkiye sahiptir. Ancak kemoterapi için kullanılan ilaçlar güçlü etkilerinden dolayı sağlıklı hücrelere de zarar verebilirler. Sağlam hücreleri tahribata uğratan bu kemoteropatik ilaçlar kalıcı hasarlara yol açabilmektedir (Zahler et al., 2019; Norwood vd., 2019; Lamarca vd., 2019; Ma vd., 2020). Yan etkilerin şiddeti, WHO tarafından yapılan açıklamaya göre hafif (derece 1), orta (derece 2), şiddetli (derece 3) veya yaşamı tehdit edici veya engelleyici (derece 4) olabilir. Deride ve saçta, kemik iliğinde ve kanda, gastrointestinal sistemde ve böbreklerde ciddi etkilere sahiptir. Kalp, akciğerler ve beyin gibi temel organlar da dahil olmak üzere vücudun tüm organları etkilenebilir. Bunlara ilaveten nörotoksisite, uyku hali, felç, spazmlar ve komaya neden olabilir. Ek olarak, kemoterapinin kronik etkileri arasında ilaç direnci, kanserojenlik ve kısırlık da bulunur (Volker Schirmache, 2019).

En sık kullanılan kemoterapötik ajanların kanserin türüne göre farklılık arzettiği bilinmektedir. Bu ilaçlardan bazıları 5-florourasil, 6-merkaptopurin, metotreksat, siklofosamid ve paklitakseldir (Naidu et al., 2004). Yıllardır kullanılmakta olan kemoteropatik ilaçların çoğu birçok kanser tedavisinde hala kullanılmaktadır.

## 1.3. Paklitaksel

Kemoteropatik ilaçların birçok çeşidi vardır bunlardan bazıları taksen ailesine ait olan Paklitaksen ve onun yarı sentetik formu olan Doksetan ilacıdır. En önemli kanser kemoterapötiklerinden olan taksan sınıfı bileşiklerden, doğal ve etkili antitümör ajanı olan Taxol (paklitaksel); ABD'de 1971 senesinde Wall, Wani ve arkadaşları tarafından,

kuzeypasifikinin içeri bölümünde bulunan dağlar ve kıyılarınca yetişen Pasifik Porsuğu olarak da adlandırılan *Taxus brevifolia* Nutt.'nın kabuğundan az miktarda izolasyonu sağlanmıştır (Croteau et al., 2006; genel 1999,2000; Wall and Wani 1995).

Paklitaksel, tübülün polimerizasyonunu teşvik eder, böylece hücre bölünmesi ve yaşamsal fazlar arası süreçler için gereken normal mikrotübül dinamiklerini bozarak hücre ölümüne neden olur. Paklitaksel karşı kazanılmış direncin mekanizmaları, tübülün yapısındaki değişiklikleri ve ilaç-dışa akım pompaları olarak işlev gören membran fosfolipid proteinlerinin amplifikasyonunu içerir. Paklitaksel, göğüs, yumurtalık, akciğer, baş ve boyun kanserleri başta olmak üzere geniş bir tümör tipi bandına karşı aktiviteye sahiptir. Paklitaksel ayrıca, önceden tedavi edilmiş lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanserleri ve özofagus, mide endometriyal, mesane ve germ hücresi tümörleri olmak üzere geleneksel kemoterapiye yanıt vermeyen diğer habis hastalıklarda da aktiviteye sahiptir.

Paklitaksel ayrıca AIDS ile ilişkili kaposi sarkomuna karşı da aktiftir. Paklitaksel ile ilişkili toksisiteler arasında doza bağımlı olarak aşırı nörotoksisite ve hematolojik toksisiteler bulunur (Markman et al., 2002; Priyadarshini et al., 2012; Sakamoto et al. 2009). Bu nedenle, bu yan etkilerin önlenmesi, azaltılması ve üstesinden gelinmesi için farklı stratejiler uygulanmalıdır. Bu yan etkilerin üstesinden gelmeye yardımcı olabilecek uygun yolları tespit etmek için bu alandaki araştırmalara odaklanmak önemlidir. Günümüzde yan etkileri azaltmak için pratik olarak çeşitli tedavi stratejileri uygulanmıştır (Cavalier et al. 2020; Luo et al. 2018; Kikuchi et al. 2019; Ayna et al. 2020; Celik et al. 2020). Bu stratejilerden biri ve en yenisi, tabii kullanım alanı oluşturan antioksidanlardır. Doğal antioksidanlar, kanserin seyrini yavaşlatıcı ve hatta durdurucu etkiye sahiptirler ve kemoterapi ile birlikte kombine tedavi şeklinde uygulanabilmektedir (George, 2020).

#### **1.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller**

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) temelini oluşturan serbest radikal kavramı yapısında serbest olarak adlandırılan eşleşmemiş veya hücrenin yörüngesinde yer alan orbitalinde tek elektron şeklinde bulunan atom veya moleküllerdir (Özcan, 2015). Bu yapılara örnek olarak süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidroperoksil radikali, singlet oksijen ve ayrıca serbest nitrojen radikalleri gibi oksijensiz radikalleri verilebilir. Biyolojik

koşullarda, özellikle karaciğer hücreleri ve makrofajlarda, oksijenli solunum veya enflamatuvar süreçler gibi süreçler sırasında az miktarlarda da olsa ROS oluşumu söz konusudur. ROS öncelikle sinyal molekülleridir. Ayrıca hücre farklılaşmasını ve apoptozu indüklemeye suretiyle doğal yaşlanma sürecine de katkıda bulunurlar.

Bunlara ilaveten kas kasılmalarına, vasküler tonusun düzenlenmesine katılırlar. Ayrıca bakterisidal ve bakteriyostatik aktiviteye sahip oldukları da bilinmektedir. Serbest radikallerin artan üretimi, UV radyasyonuna aşırı maruz kalma, uzun süreli stres koşulları, yoğun fiziksel egzersiz, yanlış beslenme ve uyarıcıların kullanımından kaynaklanmaktadır (Jakubczyk, 2020).

Reaktif oksijen türleri (ROS;  $O_2^-$ , OH ve  $H_2O_2$ ) çeşitli biyolojik ve patolojik süreçlerde önemli araçlardır. ROS ve otofaji, hücrenin yanlış katlanan proteinleri ve hasarlı organelleri, besin eksikliği veya stres altında enerji için metabolik enzimler olarak geri dönüşüm için parçalanmış bir hücre içi yıkım sürecidir (Tang, 2019) Vücudun normal fizyolojik olarak canlılığını sürdürebilmesi ve redoks sinyali için minimum düzeyde de ROS gereklidir Fizyolojik olarak ROS'un, sinyal iletimini, gen ekspresyonunu, enzim aktivasyonunu ve protein katlanmasını düzenlediği de gösterilmiştir. ROS'un miktarı belli bir seviyeye ulaştığında, vücutta oksidatif stres (OS) koşulları ortaya çıkar. (Xuchen Qi, 2022) ROS'un aşırı üretimi, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi çeşitli patojenik durumlarla ilişkili olan DNA, proteinler ve nükleik aside oksidatif hasara neden olabilir. Oksidatif stres, ROS üretimi ile antioksidan savunması arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve yaşlanmayla birlikte ilerleme gösterir. Oksidatif stres ayrıca diyabet, nöro-dejeneratif hastalıklar, obezite, kardiyak hipertrofi, hepatorenal hasar, üreme fonksiyon bozukluğu, DNA hasarı, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve hücrelerin yaşlanması gibi çeşitli kronik hastalık ve hasarlara neden olmaktadır.

ROS'un aşırı üretimi hücrede çeşitli harabiyetlere ve hatta hücrenin ölümüne kadar ilerleyen durumları oluşturur (Duprez, 2009). İntrinsik serbest radikal yoğunluğunun artışı onkogen aktivasyonu, metabolizma artışı ve mitokondriyal disfonksiyon olmak üzere çok çeşitli aktivitelerle ilişkilidir. OS, normal beyin iç dengesinin sürdürülmesinde ve önemli bir bozucusudur ve farklı beyin kanseri türlerinin karsinogenezinde rol oynar. OS DNA, proteinler ve lipidler gibi hücrenin birçok büyük yapısal bileşenlerine zarar vermektedir



(Duprez, 2009). OS ile ROS'un hücrelerde maksimum seviyelere ulaşması kanserin de içinde yer aldığı birçok habis hastalık grubunun hem görülme sıklığını hem seyrinin ilerlemesine sebep olmaktadır. Bu durum tedavide ilaca karşı direnç mekanizmasını meydana getirmektedir (Liu, 2022).

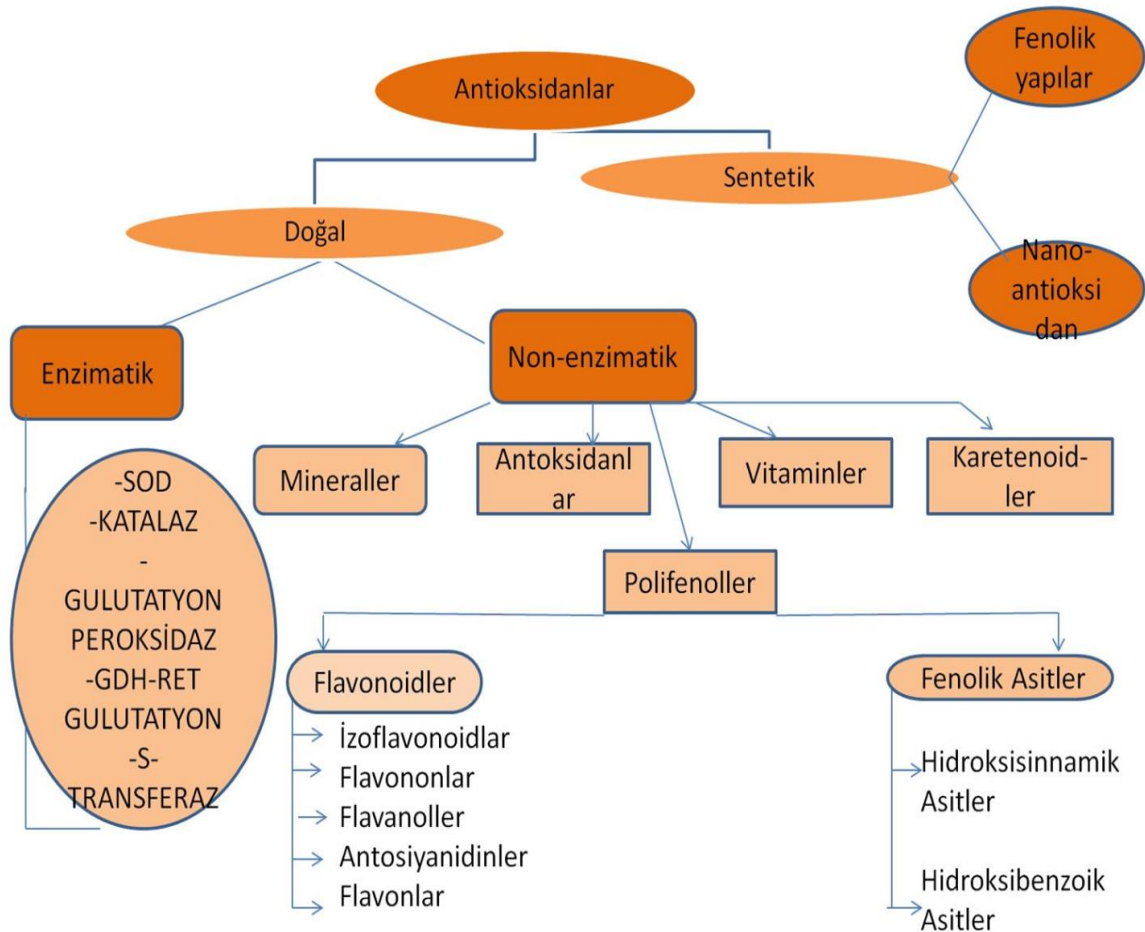
Bununla birlikte, yüksek ROS seviyesi kanser tedavisi için pozitif bir yaklaşım olarak kullanılabilir. Fotodinamik (PDT) 2 ve sonodinamik terapi (SDT) 3 gibi bazı kanser tedavisi stratejileri, ROS üretimini indükleyen ve böylece kanser hücrelerini öldüren belirli ajanların kullanımını istismar etmiştir. Bunlardan biri olan sitotoksik tedavi şekli kanser hücrelerini tetiklemek için antikanser ilaçları kullanarak eradikasyon için ROS üretmektedir.

### **1.5. Antioksidanlar**

Antioksidan kavramı, "anti" (karşı) ve "oksidan" (oksidasyona sebep olan) kelimelerinin birleşiminden meydana gelir. Bu kavram, serbest radikallerin sebep olduğu istenmeyen zararlı etkileri engelleyen veya azaltan maddeleri ifade eder. Antioksidanlar genel olarak hücresel indirgenme yükseltgenme (redoks) reaksiyonlarının korunması ve gerekli hücreler-arası iletişimi sağlamak için metabolik enerji yollarını etkilemektedir. Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girebilen ve biyolojik sistemlerde onları nötralize edebilen, genellikle 'serbest radikal temizleyiciler' olarak nitelendirilen moleküllerdir (Martemucci et al., 2022).

Antioksidan moleküllerin etki mekanizması, serbest radikallerle reaksiyona girerek ve onları stabilize ederek zararlı etkilerini önlemek veya azaltmaktan oluşur. Bu etki mekanizması, hücre düzeyinde oksidatif hasarın zararlı etkilerine karşı koruma sağlar. Normalde, hücrelerde oksidasyon ve antioksidasyon süreçleri arasında dengeli bir durum vardır. Ancak, serbest radikallerin üretiminde artış olursa ya da antioksidan savunma sistemleri yetersiz kalırsa, serbest radikaller hücrelerde ve/veya dokularda hasara neden olabilirler. Antioksidanlar, serbest radikallerin reaktif yapısına elektron vererek onları stabil hale getirir ve hasar verici reaksiyon zincirlerinin oluşumunu engeller. OS, hücre zarları, proteinler ve DNA gibi makromoleküller üzerinde zararlı etkilere yol açabilir. Antioksidanlar, söz konusu önemli makromolekülleri serbest radikal hasarına karşı

koruyarak, hücrelerin normal fonksiyonlarını sürdürmelerine yardımcı olurlar. Antioksidanlar, metabolik aktiviteler sırasında endojen olarak oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücreleri korur. Aynı zamanda bağışıklık sisteminin etkinliğini artırarak hastalıklara karşı vücudun direncini de artırırlar (Rudrapal et al., 2022).



Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırılması (Flieger et al, 2021)

Antioksidanlar hücreler tarafından doğal olarak üretilebileceği gibi (endojen), besinler ve takviyeler aracılığıyla da (eksojen) alınabilirler. Endojen olarak nitelendirilen antioksidanlar, hücreler tarafından üretilen ve serbest radikallerle savaşarak oksidatif stresi azaltan moleküllerdir. OS, hücrelerde serbest radikallerin birikmesi ve hücresel hasarın artması sonucu ortaya çıkan istenmeyen bir durumdur (Jakubczyk et al., 2020). Bu hasar, yaşlanma süreci ve çeşitli hastalıkların gelişimiyle ilişkilendirilebilir. Endojen antioksidanlar, serbest radikalleri stabilize ederek ya da onları etkisiz hale getirerek oksidatif hasarı kontrol altında tutar. Enzimatik antioksidanlar, hücrelerde serbest radikallerin zararlı etkilerini yok etmek için üretilen doğal antioksidanlardır. Bu enzimler,

hücre içinde serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidatif hasarı engellemeye yardımcı olurlar. Enzimatik antioksidanlar, vücutta dengeli bir antioksidan sistemi oluşturur ve hücrelerin sağlığını korumaya yardımcı olur. Vücutta bulunan enzimatik antioksidanlara örnek olarak süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz verilebilir (Jeeva et al., 2015).

Süperoksit dismutaz, süperoksit adı verilen serbest radikalleri hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) e dönüştüren bir enzimdir. Katalaz, hücre içinde birikmiş  $H_2O_2$ 'i parçalayarak su ve oksijene dönüştüren önemli bir enzimdir. Glutatyon peroksidaz ise hücre içinde bulunan hidrojen peroksiti ve lipid hidroperoksitleri nötralize ederek antioksidan savunmayı destekler. Glutatyon redüktaz, vücutta bulunan önemli bir enzimdir ve hücrelerde glutatyonu (GSH) yenileyen veya regenere eden bir rolü vardır. Glutatyon redüktaz, okside olmuş glutatyonu indirgeyerek tekrar aktif ve antioksidan etkisi olan azotlu bir bileşik olan glutatyonla dönüştürür. Bu şekilde, glutatyon redüktaz, hücrelerdeki oksidatif hasarı azaltmaya yardımcı olur ve serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarı önlemekte rol oynar (Jeeva et al., 2014).

Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar, vücutta doğal olarak üretilen antioksidan moleküllerdir. Bu antioksidanlar, serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltmaya ve hücrelerin sağlığını korumaya yardımcı olurlar. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar, çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar ve metabolik yollar yoluyla üretilir ve antioksidan savunmayı desteklerler. Vücutta bulunan enzimatik olmayan endojen antioksidanlardan bazıları şu şekildedir: E Vitamini (Tokoferoller ve Tokotrienoller), Glutatyon, Ubikinon (Koenzim Q10) ve Melatonin (Mirończuk et al., 2018). E vitamini, yağda çözünen bir antioksidandır ve hücre membranlarını serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna karşı korur. Buna ilaveten LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek damar sağlığını korur (Ricciarelli et al., 2000). Ubikinon, mitokondrilerde enerji üretiminde aktif rol oynayan bir molekül olmasının yanı sıra antioksidan özelliklere de sahip bir bileşiktir (Wange and Hekimi, 2016). Melatonin, beynin pineal bezi tarafından üretilen bir hormondur ve uyku düzenlemesi ile ilişkilidir. Aynı zamanda güçlü bir antioksidan olarak bilinir ve serbest radikallerle mücadelede etkili olabilir (Hardeland et al., 2006).

Glutasyon (GSH), vücutta bulunan en önemli antioksidanlardan biridir ve hücrelerin sağlığını koruyan önemli bir bileşiktir. Glutasyon, amino asitlerden oluşan bir tripeptittir ve hücre içinde serbest radikallerle mücadele ederek oksidatif stresi azaltmaya yardımcı olur. Aynı zamanda hücrelerin detoksifikasyon süreçlerinde rol oynar ve hücre zarlarını serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif hasara karşı korur. GSH'in temel antioksidan özelliği, serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirmesidir.

Glutasyon, serbest radikalleri nötralize ederek hücrelerin sağlığını ve bütünlüğünü korumaya yardımcı olur. Glutasyon aynı zamanda diğer antioksidan enzimlerin etkinliğini artırabilir. Örneğin, glutasyon peroksidaz gibi diğer enzimatik antioksidanlar, glutasyonun yardımıyla oksijen türevleri olan peroksitleri nötralize edebilirler (Kennedy et al., 2020).

Eksojen antioksidanlar, vücut tarafından doğal olarak üretilmeyen ve dışarıdan alınması gereken antioksidanlardır. Bunlar, besinler veya takviyeler aracılığıyla alınan antioksidan bileşikleridir. Eksojen antioksidanlar, vücutta oksidatif stresi azaltarak ve serbest radikallerle savaşarak hücrelerin sağlığını korumaya yardımcı olurlar. Eksojen antioksidanlara örnek olarak C vitamini, E Vitamini, Beta-karoten gibi vitaminlerin yanı sıra fenolik bileşikler ve flavonoidler örnek verilebilir (Moussa et al., 2019).

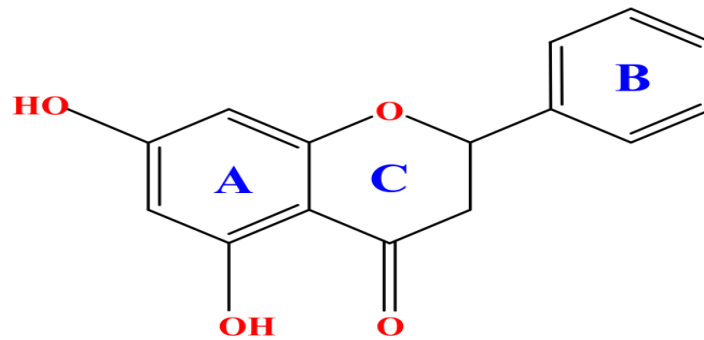
### **1.6. Flavonoidler**

Flavonoidler, bitkilerde doğal olarak bulunan önemli bir bileşik sınıfıdır. Bitkilerde renk pigmentleri olarak görev yaparlar ve çeşitli bitkisel materyallerde yaygın olarak bulunmaktadır. Flavonoidler, bitkiler için çevresel streslere karşı koruyucu bir rol oynarlar ve insanlara yararlı etkiler sağlayabilecek potansiyel biyolojik etkilere sahiptirler. Flavonoidlerin flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavan-3-oller, antosiyaninler gibi farklı alt grupları bulunmaktadır. Bazı yaygın flavonoidler arasında kuersetin, kaempferol, apigenin, kateşinler, kaempferid, antosiyaninler, epigallokateşin gallat, naringenin ve krisin gibi bileşikler yer almaktadır. Flavonoidlerin sağlık üzerinde çeşitli etkileri vardır. Bu etkiler flavonoidlerin antioksidan özelliği, anti-enflamatuar etkileri, kardiyovasküler etkiler, antikanser etkiler, anti diyabetik ve antimikrobiyal etkiler şeklinde özetlenebilir (Shen et al., 2022).

## 1.7. Krisin

Krisin doğal olarak bazı bitkilerde bulunan bir biyoaktif bileşiktir. Flavonoidler adı verilen bitki pigmentlerinin bir türüdür. Krisin, özellikle çiçekli bitkilerde bulunur ve propolis, bal ve bazı meyvelerden de izole edilebilir. Krisinin bilimsel öne çıkan özelliklerinden biri, antioksidan özelliklere sahip olmasıdır. Ayrıca, krisin anti-inflamatuari antimikrobiyal ve anti-kanser potansiyeline dair bazı araştırmalar da yapılmıştır (Naz et al., 2019).

Krisin, iki kaynaşmış halkadan (A ve C) ve C halkasının ikinci konumuna bağlı bir fenil halkasından (B) oluşan bir kimyasal yapıya sahiptir. A halkasının 5. ve 7. Karbon atomlarında ilave bir OH grubu ile ortak flavon yapısını paylaşır (Şekil 2) (Stompor-Gorący et al., 2021). Krisin, güçlü bir antioksidan olarak bilinir. Bu özelliği kanser hücrelerinin oluşumunu ve yayılmasını engellemeye yardımcı olabilir. Krisin kanser hücrelerinde apoptoz adı verilen programlı hücre ölümünü tetikleyerek kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini durdurabilme potansiyeline sahiptir. Krisin, kanser hücrelerinin hücre döngüsünü düzenleyebilir ve böylece hücrelerin normalden daha hızlı bölünmesini engelleyebilir. Krisin, anjiyogenezi engelleyerek tümörlerin büyümesini ve yayılmasını azaltabilir (Weng et al., 2005).



Şekil 2. Krisinin kimyasal yapısı

Krisin gerek sitotoksik gerek anti mikrobiyal gerek apoptotik ve hücreyi koruyucu ajan olarak savunma mekanizmalarında, okside olma süreçlerindeki görevi ve daha birçok etkileri nedeniyle önem arz etmektedir (Naz et al., 2019). Bu önemli kullanım yollarından biri de özellikle sağlık sektöründe birincil olarak rol oynamasıdır. Bugün dünyada ölümcül hastalıkların başında gelen kanserin tedavi seçeneklerinde yardımcı olarak ve bu tür

tedavilere alternatif yardımcı bir seçenek olarak kullanılabilir. Canlılardaki etkisi çok büyük olup insan biyolojisinde önemli bir etmendir. Canlı biyolojisindeki bu tedavi edici etkisi diğer tedavi yöntemleriyle ortak kullanıldığında daha iyileştirici olabilmektedir. Kemoterapi de bu tedavilerden birisi olup yan etkilerini minimuma indirmek amacıyla hasarı neredeyse yok etmeye kadar varan bir başarı sağlayarak tedaviye yeni bir soluk getiren krisinin kanserde etkisini gözardı etmek mümkün değildir.

### **1.8. Apoptoz**

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak da nitelendirilen hücresel bir olaydır. Normal gelişim ve hücre döngüsü sırasında, organizmada hücrelerin düzenlenmesi ve denetlenmesi amacıyla apoptoz sürekli olarak aktif bir şekilde meydana gelir. Bu süreç, hasarlı, yaşlanmış veya gereksiz hücrelerin kontrollü bir şekilde ölmesini sağlar. Apoptoz, hücrelerin doğal yollarla vücuttan uzaklaştırılmasını ve yeni hücrelerin oluşumunu düzenleyen önemli bir gücrel mekanizmalarda biridir (Obeng, 2020). Apoptoz süreci, çeşitli içsel ve dışsal sinyaller tarafından tetiklenebilir. Hücredeki genetik materyal (DNA) hasarı, hücrenin kendi kendini yok etmesini uyarabilir. Aynı zamanda, organizmanın bağışıklık sistemi veya vücudun diğer hücreleri tarafından gönderilen sinyaller de apoptozu başlatabilen içsel faktörler arasında yer alır. Apoptoz sürecinde genel olarak hücre içi organeller küçülür ve hücrenin hacmi azalır. Hücre içinde belirli bölgelerde parçalanma ve kromatin kondenzasyonu meydana gelir. Hücrenin parçalandığı ve komşu hücreler veya bağışıklık hücreleri tarafından temizlendiği apoptotik cisimcikler meydana gelir. Apoptoz, hücrenin kendi kendini ölmesi olduğu için genellikle iltihaplanma reaksiyonlarına sebep olmaz. Bu da çevredeki dokulara zarar vermeden hücrelerin kaldırılmasını sağlar (Obeng, 2020).

Apoptoz, normal dokuların gelişimi ve dengesi için önemlidir, ancak aynı zamanda sağlığı tehdit eden durumlarda da önemli bir rol oynayabilir. Örneğin, kanser hücreleri apoptozu önleyerek hızla çoğalabilir ve yayılabilir. Diğer taraftan, apoptozun düzensiz veya yetersiz olması, birçok hastalığın (örneğin alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı ve otoimmün hastalıklar) oluşumunda rol oynayabilir (Erekat, 2022). Apoptozun hücre hayat döngüsünü düzenleme ve hücre popülasyonunu kontrol etme yeteneği, hücre biyolojisi ve tıp alanında

yoğun araştırmalara konu olmuştur. Bu nedenle, apoptoz mekanizmalarını anlamak, çeşitli hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde potansiyel bir anahtar rol oynayabilir.

### **1.9. Apoptozun Önemi**

Apoptoz organizmanın normal gelişimi, hücre döngüsü düzenlenmesi ve hastalıkların önlenmesi için hayati bir mekanizmadır. Apoptoz, embriyonik gelişim ve organ oluşumunda önemli bir rol oynar. Bu süreç, hücrelerin özellikle belirli bölgelerde, belirli bir zamanda ve belirli bir hızda ölmesini sağlayarak vücudun düzgün bir şekilde gelişmesine yardımcı olur. Organizmanın şekli ve işlevselliği, hücrelerin doğru bir şekilde ölmesi ve vücuttaki hücre yoğunluğunun dengede olmasıyla sağlanmaktadır (Grilo and Mantalaris, 2019). Apoptoz, hücrelerin DNA hasarı veya diğer zararlı durumlara karşı tepki olarak programlanmış bir şekilde ölmesine olanak verir. Bu sayede, hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ve kanser gibi habis hastalıkların gelişimi engellenir. Apoptoz, enfekte hücrelerin veya hasarlı bağışıklık hücrelerinin kontrollü bir şekilde ölmesini sağlayarak yayılmasını önler. Kanser hücreleri, apoptozu önleyerek kontrolsüz bir şekilde büyüyebilir ve yayılabilirler. Bu nedenle, kanser tedavisi, kanser hücrelerinin apoptozu yeniden başlatmasını teşvik etmek veya apoptozu inhibe eden mekanizmaları hedeflemek üzerine odaklanır (Brokatzky et al., 2019).

Genel olarak apoptozun çalışma mekanizmasında Bcl-2 gen ailesi ürünleri, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler görev alır. Böylece hücrede apoptotik süreçte Bax ve sitokrom-c gibi proapoptotik proteinler ile apoptoz indükleyici faktör (AIF) salgılanması artmış olur.

### **1.10. Bcl-2 Ailesi**

Bcl-2 ailesi, hücrenin yaşamında ve ölümünde önemli bir rol oynayan proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin önemli bir grubudur. Bu proteinler, apoptozun düzenlenmesinde ve hücrenin yaşam veya ölüm kararının alınmasında kritik öneme sahiptir. Adını, ilk kez keşfedilen ve apoptozu düzenleyen Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) geninden almıştır. Bcl-2 ailesi üyeleri iki ana gruba ayrılır (Singh et al., 2019).

**a) Antiapoptotik Proteinler:** Antiapoptotik proteinler, hücrenin yaşamını ve hayatta kalmasını teşvik eder. Bu proteinler, hücrenin apoptozu önleyerek, hasarlı veya stres altındaki hücrelerin hayatta kalmasını sağlar. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w ve Mcl-1 gibi antiapoptotik proteinler, hücrenin ölümünden koruyan önemli aile üyeleridir. Bu proteinler, mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu inhibe ederek hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olurlar.

**b) Proapoptotik Proteinler:** Proapoptotik proteinler, hücrenin ölümünü uyararak apoptoz sürecini tetikler. Bu proteinler, hücre stresine, hasara veya diğer apoptotik sinyallere cevap olarak apoptoz yolaklarını etkinleştirir. Proapoptotik proteinler arasında Bax, Bak, Bim, Bid, Bad ve Puma gibi proteinler bulunur. Bu proteinler, mitokondriyal dış zarın permeabilitesini artırarak mitokondri içindeki proapoptotik proteinlerin serbest kalmasına ve apoptozun tetiklenmesine neden olurlar.

**c) Kaspazlar:** Kaspazlar belirli substratları keserek hücre içinde apoptotik olayların gerçekleşmesini sağlar. Kaspaz ailesi, birçok kaspazın üyelerini içerir ve hücre içinde farklı rolleri olan çeşitli kaspaz türleri bulunmaktadır. Kaspaz türlerine örnekler şunlardır (Boatright and Salsveni. 2003).

**İnisiyatör Kaspazlar:** İnisiyatör kaspazlar, apoptoz yolaklarının başlatılmasından sorumlu olan kaspazlardır. Mitokondriyal yolak (içsel yolak) veya hücre yüzeyi yolakları (dışsal yolak) tarafından aktive edilirler ve apoptoz sürecini başlatırlar. Örneğin, mitokondriyal yolaktan kaspaz-9, dışsal yolaktan kaspaz-8 ve kaspaz-10 inisiyatör kaspazlara örnek verilebilir.

**Substrat Kaspazlar:** İnisiyatör kaspazlar tarafından aktive edilen substrat kaspazlar, etki kaspazları olarak da adlandırılır. Bu kaspazlar, hücre içinde diğer prokaspazlardan veya apoptozla ilgili proteinlerden kırma ile aktive olur. Örneğin, kaspaz-3 ve kaspaz-7, hücrenin apoptoz sürecinde önemli etki kaspazlarıdır.

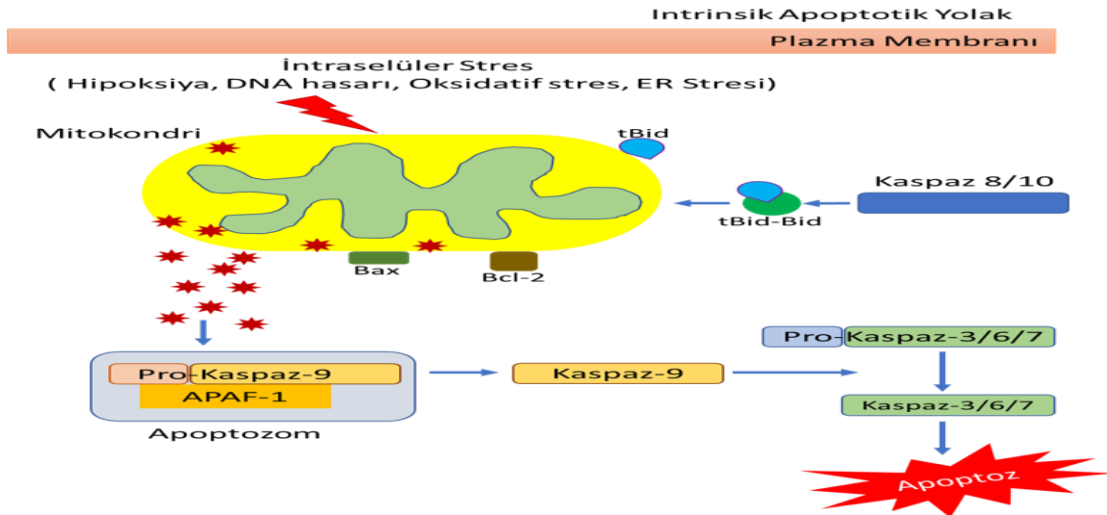


## 1.11. Apoptoz Yolakları

### 1.12. Mitokondriyal Yolak (içsel yolak)

Mitokondriyal yolak, apoptoz sürecinin ana mekanizmalarından biri olup hücre ölümünün düzenlenmesi ve sağlığın korunmasında kritik bir rol oynar. Ayrıca, kanser tedavisi ve diğer hastalıkların tedavisi açısından apoptoz mekanizmalarının anlaşılması ve manipüle edilmesi önemli bir araştırma alanıdır. Bu yolak, hücre içindeki stres veya hasar koşullarında apoptozun başlatılmasını sağlayan mekanizmalardan biridir. Mitokondriyal yolak, hücre içi pro-apoptotik proteinlerin salınması ile apoptozun başlamasını tetikler.

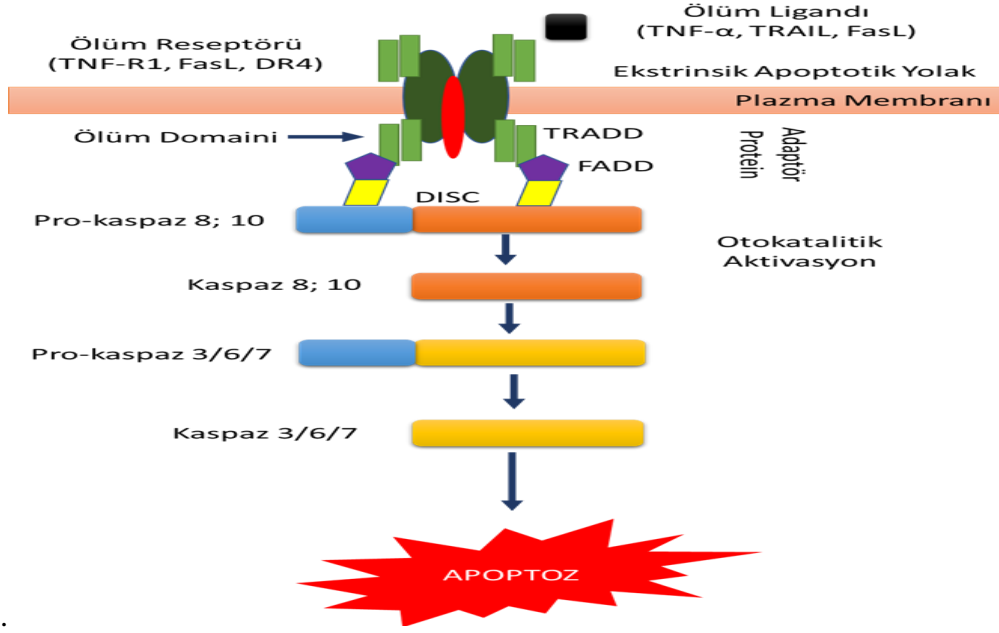
Apoptozun mitokondriyal yolak üzerinden işleyişini özetlemek gerekirse öncelikle hücre içinde çeşitli stres koşulları ortaya çıkar. Örneğin, DNA hasarı, zararlı bileşiklerin etkisi, ROS üretimi veya diğer zararlı etkenler mitokondriyal yolak için tetikleyici olabilir. Hücre içindeki stres koşulları, mitokondri zarında hasara yol açabilir. Bu, mitokondri dış zarındaki gözeneklerin açılmasına ve bazı pro-apoptotik proteinlerin mitokondri içine geçmesine neden olur. Mitokondri dış zar hasarı sonucunda, mitokondri içindeki sitokrom c gibi bazı pro-apoptotik proteinler salınır. Bu proteinler, apoptoz kaynaklı proteaz aktivasyon faktörü-1 (Apaf-1) ile birleşerek apoptozun ana aktörlerinden biri olan apoptozis indüklenebilir faktörü (APAF-1) oluşturur. APAF-1 kompleksi, hücre içindeki sitozolde bulunan prokaspaz-9 enzimini etkinleştirir. Bu etkinleştirme, prokaspaz-9'un kaspaz-9'e dönüşmesini ve diğer prokaspazların aktive olmasını sağlar. Aktive olan kaspazlar, hücre içinde bir dizi apoptotik olayı tetikler. Özellikle, kaspaz-3, hücre içinde çeşitli hücre proteinleri keser ve hücrenin içyapılarını parçalayarak apoptotik cisimciklerin oluşumuna yol açar. Apoptoz süreci ilerlerken, hücrenin içyapıları parçalanır ve apoptotik cisimcikler denilen özel parçalardan oluşan hücre içinde belirli yapılar oluşur. Bu cisimcikler daha sonra komşu hücreler veya bağışıklık hücreleri tarafından temizlenir (Jendrosek, 2012).



Şekil 3. Apoptoz intrinsik yolaka ait görüntüsü (Babacan,2023)

### 1.13. Hücre Yüzeyi Yolakları (dışsal yolak)

Hücre yüzeyi yolakları (dışsal yolak), apoptoz sürecinin tetiklenmesinde dışarıdan gelen sinyallerle ilgili olan apoptoz mekanizmalarından biridir. Bu yolak, hücre yüzeyi reseptörleriyle (ölüm reseptörleri olarak da bilinir) ölüm ligandları olarak adlandırılan moleküllerin etkileşimi yoluyla apoptozun başlatılmasını sağlar. Apoptozun dışsal yolakını başlatmak için dışarıdan gelen sinyaller gereklidir. Bu sinyaller ölüm ligandları olarak adlandırılan moleküllerdir. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-alfa) ve Fas ligandı (FasL) gibi ölüm ligandları, apoptoz yolaklarının aktive edilmesini sağlar. Ölüm ligandları, hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine bağlanır. Bu reseptörler, apoptozun tetiklenmesi için kritik öneme sahiptir ve ölüm ligandlarına özgüdürler. Örneğin, TNF-alfa, TNF reseptörüne (TNFR) bağlanırken, FasL, Fas reseptörüne (FasR) bağlanır. Ölüm ligandlarının ölüm reseptörlerine bağlanması, içsel apoptoz yolaklarından biri olan mitokondriyal yolak üzerinden kaspazların aktive edilmesini tetikler. Bu süreç, hücre içinde apoptozis indüklenebilir faktör (FADD) ve CASP-8 gibi bazı proteinlerin birleşerek bir kaspaz aktivasyon bileşiğini oluşturmasını içerir. Oluşan kaspaz aktivasyon kompleksi, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 gibi prokaspazlarının aktive edilmesini sağlar. Aktive olan kaspazlar, hücre içinde bir dizi apoptotik olayı tetikler ve apoptozun ilerlemesini sağlar (Lossi, 2022)



Şekil 4. Apoptoza ait entrinsik yolak görüntüsü (Babacan,2023)

Bu çalışmanın amacı, oksidatif hasar ve apoptoz yoluyla in vitro model olarak SH-SY5Y nöron hücrelerinde paklitaxele bağlı toksisiteye karşı krisinin olası koruyucu etkilerin değerlendirilmesidir. Böylelikle paklitaksel ile indüklenen nöron hücrelerinde meydana gelebilecek olası hasarlar ve hücre kayıpları iyileştirilebilir. Bu çalışmada insan nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri, nörodejeneratif hastalıklarda paklitakselin neden olduğu oksidatif hasar ve apoptozun neden olduğu nöronal hasarı incelemek için bir model olarak kullanılacaktır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, sıçanlarda kurkuminin paklitaksel kaynaklı omurilik ve siyatik sinir yaralanmalarına karşı koruyucu etkisi ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar, kurkuminin NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS ve GFAP'ın mRNA ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğünü, paklitakselin omurilik ve siyatik sinirinde Nrf2, HO-1 ve NQO1 seviyelerinde bir artışa neden olduğunu gösterdi. Ek olarak, kurkuminin, Bcl-2 ve Bcl-xL'yi artırarak ve p53, kaspaz-3, Apaf-1, LC3A, LC3B ve beclin-1 mRNA ekspresyon seviyelerini azaltarak apoptotik ve otofajik yolların aktivasyonunu bastırdığını da gösterdi. Elde edilen sonuçlar kurkuminin sıçanlarda paklitaksel ile indüklenen omurilik ve siyatik sinir yaralanmaları üzerinde koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (Yardım et al., 2021).

Bir başka çalışmada, salisilik asidin paklitakselin neden olduğu nörotoksositeye karşı koruyucu rolü değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucu paklitakselin nörotoksositeye neden olduğu gösterilmiştir. Salisilik asit paklitakselin neden olduğu nörotoksositeyi ortadan kaldırmıştır (Cetin et al., 2016).

Alzoubi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, paklitakselin DNA üzerindeki olası genotoksik etkisini ve ayrıca paklitakselin neden olduğu DNA hasarı üzerindeki B12 vitamininin olası koruyucu etkisi incelenmiştir. Çalışmada paklitakselin oksidatif DNA hasarının bir belirteci olan 8-OHdG'de artışa neden olduğunu ve bu artışın B12 vitamini ile engellendiği gösterilmiştir (Alzoubi et al., 2014).

Krisinin oksidatif durum üzerindeki olası koruyucu etkilerini ve sıçanlarda karbon tetraklorür ile indüklenen karaciğer ve böbrek dokusuna karşı histolojik değişikliklerin araştırılmasının amaçlandığı bir çalışmada CCl<sub>4</sub>'ün MDA, serum TNF- $\alpha$ , AST, ALT, üre ve kreatinin düzeyleri ( $p < 0,05$ ) nin arttığı, krisin ilavesinin bu sonuçları tersine çevirdiği gözlemlenmiştir (Anand et al., 2011).

Kafeik asit, krisin, kersetin ve ferulik asidin, SH-SY5Y nöron hücrelerinde siklofosfamite bağlı toksisiteye karşı olası iyileştirici etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde siklofosfaminin neden olduğu hücre toksisitesinin ve antioksidanlarla yapılan tedavilerin hücre ölümünü baskıladığını gösterdi.

Sonuçlar, krisinin, LPO seviyelerinde bir düşüş, Cas-3, Cyt c ve Bax ekspresyonunu aşağı regüle ederek ve anti-apoptotik gen Bcl-2 ekspresyonunu yukarı regüle ederek SH-SY5Y hücrelerini koruduğunu göstermektedir (Ayna et al., 2020)

Krisin ile alakalı yapılan başka bir çalışmada, krisinin apoptosis ve oksidatif hasar yoluyla diklofenak tarafından uyarılan HT-29 hücre ölümünü bastırdığı gösterilmiştir. Diklofenak ile indüklenen hücre ölümünün ROS, malondialdehit seviyeleri ve laktat dehidrojenaz salınımında artışa, toplam antioksidan ve katalaz aktivitesinde azalmaya sebep olduğu, krisin ile ön tedavinin bu etkileri tersine çevirdiği rapor edilmiştir. Bununla beraber p53, cas-3, cas-8, Bax ve sitokrom c'nin ekspresyon düzeyi Diklofenak uygulanan grupta artarken Krisin ile muamele sonucu azaldı (Ozbolat ve Ayna, 2021).

Koruyucu ajanlarla ilgili yapılan bir çalışmada ise bitkilerde ve arı ürünlerinde bulunan Quercetin, chrysin, cafeic asit ve ferulic asit gibi güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser aktivite gösteren, geleceğe bu yönde katkı sağlayacak biyoaktif bileşikler olduğu tespit edilmiştir (Ayna, 2020).

Bir başka çalışmada, krisinin sıçanlarda siklofosfamid kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı koruyucu özellikleri çalışılmıştır. Sonuçlar, siklofosfamidin kardiyak malondialdehit (MDA), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin 1 $\beta$  (IL1  $\beta$ ) ve interlökin 6 (IL-6) seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Bu arada, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi kardiyak antioksidan enzim aktiviteleri ile glutasyon (GSH) seviyesi baskılanmıştır. Krisin ile tedavi, değişen biyokimyasal ve antioksidan özellikleri önemli ölçüde geri kazandırdı. Sonuç olarak, bu sonuçlar, krisinin, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinden kaynaklanabilecek siklofosfamid kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı (kardiyoprotektif potansiyeller sunduğu sonucuna varmıştır (Ye et al., 2022).

Anti-inflamatuar, antioksidan ve antikanser gibi bir çok etki alanı olan Krisinin ve ilgili yapılan bir çalışmadan ortaya çıkan bulgular PHÖ ve otofajiyi indükleyerek hasarlı hücrelerin yaşamsal faaliyetini inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Lee et al., 2022).

İnsan Hela hücrelerinde denenmiş bir çalışmada deneysel analizlerin, krisin tedavisinin sitostatik davranışı teşvik ettiği ve ayrıca zamana ve doza bağlı bir şekilde HeLa hücrelerinin göç kapasitesini engellediğini ortaya koymuştur. (Raina vd., 2022).

Krisinle çalışılan birçok kanser hücresinde bölünerek artışta ve indüklenmiş apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (Arsh vd., 2019).

Araştırmalar, Bax olmak üzere Bcl-2 ailesi proteinlerinde hem işlev kaybının hem de işlev mutasyonlarının kazanılmasının insanda tümör oluşumu olasılığını artırdığını göstermiştir (Mark F. Brady, 2023).

SH-SY5Y hücrelerinde diklofenağın neden olduğu oksidatif hasardan krisin korumasının moleküler mekanizmalarının incelendiği bir çalışmada diklofenağın, hücreler üzerinde önemli toksisiteye neden olduğusonucuna ulaşmış. Yine bu çalışmada diklofenak etkisinin, krisin ile muamele sonucunu tersine çevirdiği, hücrel ROS ve Lipid peroksidasyon (LPO) seviyelerinde kayda değer bir artışı ve Toplam antioksidan durum (TAS) seviyesinde düşüşü tetiklediği gösterilmiştir. Diklofenak indüksiyonu, gen transkripsiyon seviyesinde Bax, sitokrom c, cas-3, cas-8 ve p53 ekspresyonunu arttırırken krisin bu etkileri önemli ölçüde azaltmıştır (Darendelioğlu, 2020).

Sıçanlarda emamektin benzoatın neden olduğu toksisiteye karşı baicalin, chrysin ve kombinasyonlarının etkilerini araştırmak için yapılan çalışmada ise Baicalin ve Chrysin Kontrol grubuna kıyasla, tek başına veya kombinasyon halinde baicalin ve chrysin ile uygulanan gruplar oksidatif stres parametreleri ve biyokimyasal göstergeler için sayısal veri olarak anlamlı bir fark göstermediği ancak Seminifer epitelyumda spermatogonia'dan spermatozoaya kadar spermatogenezin tüm aşamalarındaki mikrop hücreleri mevcut olup deney grubuna kıyasla, dokulardan herhangi biri için baicalin ve Chrysin gruplarının kombinasyon olarak çalışıldığında histopatolojik bulgularında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (Tekeli, 2023).

Paklitakselle yapılan çalışmalardan birinde klorojenik aside etkisini göstermeyip buna karşın kafein SH-SY5Y hücrelerinde doksorubisin, gemitabin ve paklitakselin hücresel ölümünü farklı mekanizmalar yoluyla hücrede bir takım işlevsel değişiklikler gerçekleştiğine dair veriler sunmaktadır (Celik vd., 2020).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmamızda kullanılan bütün ekipman ve araçlar hijyenik olarak tedarik edilip kullanılmıştır.

Tablo 1. Çalışmalar sırasında kullanılan araçlar, ekipmanlar, kimyasal malzemeler

Kimyasallar ve Materyaller	Firma Adı
Tripsin-Edta	Biological Industry
Tripsin Base	Sigma Aldrich
Hidrojen Peroksit	Sigma Aldrich
Dmem(Dulbecco's Modified Eagle Medyumu)	Bio West
Sodyum Klorit	Sigma Aldrich
Fetal Bovin Serumu (FBS)	Biological Industry
MRS Sıvı Besiyeri	LABM Company
EDTA (Etilenediaminetetraasetik asit)	Sigma Aldrich
TBA (2-tiyobarbiturik asit)	ACROS
TCA (Trikloroasetik asit)	MERCK
Malondialdehit bis (MDA)	Sigma-Aldrich
RNA izolasyon kiti	Qiagen
cDNA izolasyon kiti	Bioeksen
DNA izolasyon kiti	G-Dex
Primerler (Bcl-2, cas 6, cas 8, cas 10, P53, NFkB)	Molgen
DNA markörü	Serva
Real Time PCR Kiti	Bioksen
Etanol	Sigma-Aldrich
Gliserol	Sigma -Aldrich



### 3.2. Hücre Ekimi

İnsan nöronal hücre hattı SH-SY5Y hücre hattı ATTCC' den temin edildi. Hücreler %10 oranında Fetal Bovin Serum (FBS) ve %1 oranında antibiyotik (penisilin/streptomisin) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medyumu (DMEM) hücre kültürü besiyerinde CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37 C'de 75 cm<sup>2</sup>' lik flasklarda çoğaltılmıştır.

### 3.3. Hücre Canlılığı Analizi (WST-1 Assay)

Bir flaska ekimi yapılan SH-SY5Y hücreleri yeterli büyümeye ulaştıktan sonra Tripsin-EDTA ile kaldırılıp thoma lamında tripan-blue ile boyama işlemi yapıldıktan sonra ters mikroskop altında sayılmıştır. Hesaplanan hücreler 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta  $7 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Daha sonra hücreler üzerindeki en etkin sitotoksik paklitaksel konsantrasyonunu belirlemek için hücrelere farklı konsantrasyonlarda (3,75µM, 7,5µM, 15µM, 30µM) paklitaksel uygulandı. En etkin paklitaksel konsantrasyonu belirlendikten sonra krisinin paklitaksel kaynaklı sitotoksiteyi önleme potansiyelinin araştırılması amacıyla paklitaksel ile beraber farklı konsantrasyonlarda (125µM-1000 µM) krisin hücrelere uygulandı. 24 saatlik inkübasyondan sonra WST-1 hücre canlılık kitinden her bir kuyucuğa 3 µl eklenerek 4 saat inkübe edilip ELISA mikro plaka okuyucu cihazında 595 nm'de ölçüm yapılarak hücre canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.4. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Analizi

Serbest radikaller hücre membranının yapısını bozup, okside etkisini göstererek doymamış yağ asitlerinde hidrojen kopartarak peroksidasyon sürecini başlatırlar. Böylece zincir reaksiyonlar halinde ilerleyen peroksil radikalleri hücre zarının yapısını bozarak geçirgenliğinin artmasıyla hücre membranının zarar görmesine yol açar bu şekilde ilerleyerek son ürün olarak oluşan aldehitlerden biri olan Malondialdehit (MDA) seviyesini belirlemek için yapılan membran protein hasar tespiti işlemidir. Lipid peroksidasyonu analizi ile SH-SY5Y hücre hattına uygulaması yapılan 30 µM Paklitaksel ve 500-1000 µM krisinin lipid peroksidasyonunu ne ölçüde süpürücü etkide bulunduğu MDA ölçümü ile tespit edilmiştir. Bir gece öncesinde MDA solüsyonu (MDA stoğundan 500 µl alınarak içinde 450 µl saf su bulunan tüpe aktarıldı ve sırayla her bir tüpten (MDA stoğu hariç) 50

µl karışım alınıp sonraki tüpe aktararak seyreltildi ve +4 °C’de bekletildi. Sonraki aşamada SH-SY5Y hücreleri Tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırıldıktan sonra thoma lamında sayılarak 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta  $10^6$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 24 saat CO<sub>2</sub>’li inkübatörde inkübe edildikten sonra hücelere belirlenen miktarlarda paklitaksel ve krisin uygulaması yapılmıştır. Sonraki gün hücelere santrifüj işlemi yapıp, üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve üzerlerine %0,8’lik TBA (tiyobarbütik asit) çözeltisinden 1ml, TCA (trikloroasetik asit) çözeltisinden ise 250 µl eklenip yeterli homojenizasyon sağlamak için karıştırılmıştır. Sonrasında hücreler 95 °C deki kaynar su içerisinde 30dk boyunca kaynatılmıştır. Su banyosu işlemininşok amaçlı hücreler buz içerisine alınıp 5dk muamele edilmiştir. Şoklama işleminden sonra hücreler santrifügasyonda 1000 rpm’de santrifüj edilerek hücrelerin üstündeki supernatant kısım alınarak ölçüm için uygun plakalara aktarılmıştır. ELISA reader cihazına yerleştirilen hücrelerin 532 nm de absorbansları hesaplanmıştır.

### 3.5. Real Time PCR

Gerçek zamanlı DNA polimeraz zincir reaksiyonu olan (PCR); DNA gen sarmalını ısıya maruziyetle tekli yapıya indirgenmesini sağlayan ve çoklu tekrar ile reaksiyonunu tamamlayarak mesajcı RNA’nın izole edilerek, sayısal veriler sunan bir tekniktir. Bu yöntemle SH-SY5Y hücre hattı üzerine uygulanan paklitaksel ve krisinin total rna izolasyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezi yapıp, hücrelerin kontrollü hücre ölüm yolağı olan apoptozda rol oynayan bazı kilit genlerin (Bcl-2, kaspaz-6, kaspaz -8, kaspaz -10, p53, NFκB) ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. 50 cm<sup>2</sup>’lik flasklarda büyütülen hücreler kültür ortamına alınıp üzerlerine yeterli miktarda PBS eklenip yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler santrifüj cihazına alınıp 2500rpm’de 2dk boyunca santrifüj edilip çöktürüldükten sonra taze besiyeri ile karıştırıldı ve thoma lamında sayılarak hücreler 6 kuyucuklu plakaya aktarıldı.

Hücreler gece boyunca CO<sub>2</sub>’li inkübatörde inkübe edildikten sonra hücelere belirlenen dozlarda paklitaksel ve krisin uygulaması yapılmıştır. 24 saat sonrasında hücreler toplanmış 2500 rpm de 4 dakika santrifüj edilip çöktürüldükten sonra süpernatant atıldı ve kalan çökeltiye total RNA izolasyon kiti içerisinde bulunan lizis tamponundan 500 µl eklenmiştir. Sonrasında hücrelerin parçalanıp homojenizasyonu sağlamak için numuneler

10sn boyunca vortekslenmiş ve total RNA DNase/RNase free tüplerde kit protokolüne göre izole edilmiştir. Bir spektrofotometre mantığıyla çalışan nanodrop cihazı ile izole edilmiş olan RNA'ların saflığı ve konsantrasyonları 260/280 nm dalga boylarında ölçüldükten sonra yoğunluklarının eşitlemesi gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonları eşitlenen RNA örnekleri buz üzerine alınıp cDNA sentez kiti protokolüne göre cDNA'lere dönüştürülmüş ve elde edilen cDNA yoğunlukları ELISA reader cihazında 260-280 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Elde edilen cDNA'ların derişimleri 20ng/ml'de birbirlerine eşitlendikten sonra RT-PCR deneyi için 20 µl lik deney karışımı hazırlanmıştır. Bu amaçla kit içeriğinde yer alan qPCR syber Master karışımından 10 µl alınarak bütün reaksiyon tüplerine eklenmiştir. İleri ve geri primerler (0,6 -0,6 µl) deney tüplerine eklendikten sonra cDNA lar belirtilen konsantrasyonlarda eklenip ve totalde 20 µl olacak şekilde üzeri su ile tamamlanmıştır. Tüpler PCR rotoruna yerleştirilip kelepçesi takıldıktan sonra Rotor Gene programı açılıp çalışma şartları programa 95 °C' de 2 dk ön denatürasyon ardından 15 sn denatürasyon, 60 °C'de 1 dk 35 döngü olacak şekilde sisteme işlenmiştir. Referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Deney sonrasında cycle treshold yöntemi ile  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplamalar yapıldı ve analiz sürecinden sonra grafikleştirilme yapılmıştır. Üzerinde çalışılan bazı genlerin apoptotik aktivitelerinde ekspresyon süreçlerinde değişiklik istenen genlerin ve referans olarak belirlenen GAPDH geninin aşağıda tabloda belirtilen uygun birincil primerlere göre ve QRT-PCR master mix kiti ile ekspresyon QRT-PCR deneyleri yapıldı

Tablo 2. QRT-PCR çalışmasında kullanılmış olan genlere özgü primer sekans dizileri. (F: Forward, İleri, R: Reverse, Geri)

Genler		Primer Sekans Dizileri (5'-3' Yönünde)
Bcl-2	(F)	TTTAATTGTATTTAGTTATGGCCT
Bcl-2	(R)	AATAAACAATTCTGTTGACG
Kaspaz 8	(F)	CCTGTCCATCAGTGCCATAG
Kaspaz 8	(R)	CCTGTCCATCAGTGCCATAG
Kaspaz 6	(F)	GACCGACTAAATGCC
Kaspaz 6	(R)	AATTACTGTGCAAATGCC
Kaspaz 10	(F)	CCAGGCTATGTATCCTTTTCGGC
Kaspaz10	(R)	TCGTTGACAGCAGTGAGGATGG
NF-KB	(F)	TGCAGCAGAACCAAGGACATG
NF-KB	(R)	TGCATTGGGGGCTTTACTGCT
P 53	(F)	CGACGGTGACACGCTTCC
P 53	(R)	TTTCCTGACTCAGAGGGGGC

### 3.6. Immunohistokimyasal Boyama

Hücrenin tüm komponentlerine ait sıvılarda uygulanan deneysel yöntemde SHSY-5Y hücre hattı üzerinde çalışılan deney gruplarında hücreler üzerine yapılan 30 µM paklitaksel ve 500-1000 µM krisin uygulamalarından sonra hücreler fikse edilmiştir. Deney kit içeriğinde verilen protokole göre uygulanmış ve metil-yeşili ile boyanıp PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerinden PBS'ler alınıp uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa 1'er ml formaldehit eklenip 25dk beklenmiştir. Bekleme süresinden sonra formaldehit maddesi de hücreler üzerinden ayrıştırıldıktan sonra tekrar 1ml PBS'le yıkama işlemi yapılmıştır. Akabinde UltraVision Hydrogen Peroxide Block yüzeyi kaplayacak miktarda eklenip 10 dk bekletildikten sonra hücrelerin üzerinden uzaklaştırılmıştır, PBS ile yıkama işlemi yapıp tekrar üzerinden çekilmiştir. UltraVision Protein Block maddesi eklenip, 5 dklık bekleme süresi ardından birincil antibadileri (Caspase-3 ve Caspase-8) her kuyucuğa 120 µl olacak şekilde eklenmiştir. Primary Antibody Amplifier Quanto eklenerek 10 dk beklenip yıkama işlemi ardından HRP Polymer Quanto eklenerek 10 dk bekletildikten sonra her hücrenin olduğu kuyucuklar saf su ile yıkanmıştır. 1-2ml DAB

Quanto Substrate içerisine 30 µl DAB Quanto Chromogen eklenip, hücrelere uygulama yapılarak 5 dk süresince muamele edilmiştir. Ardından saf su ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra stain boya ile boyama yapıp mikroskop altında görüntüler alınmıştır. Caspase-3 ve Caspase-8 ekspresyonu olan hücrelerin sitoplazmaları daha koyu renkte gözlemlenmesi beklenir.

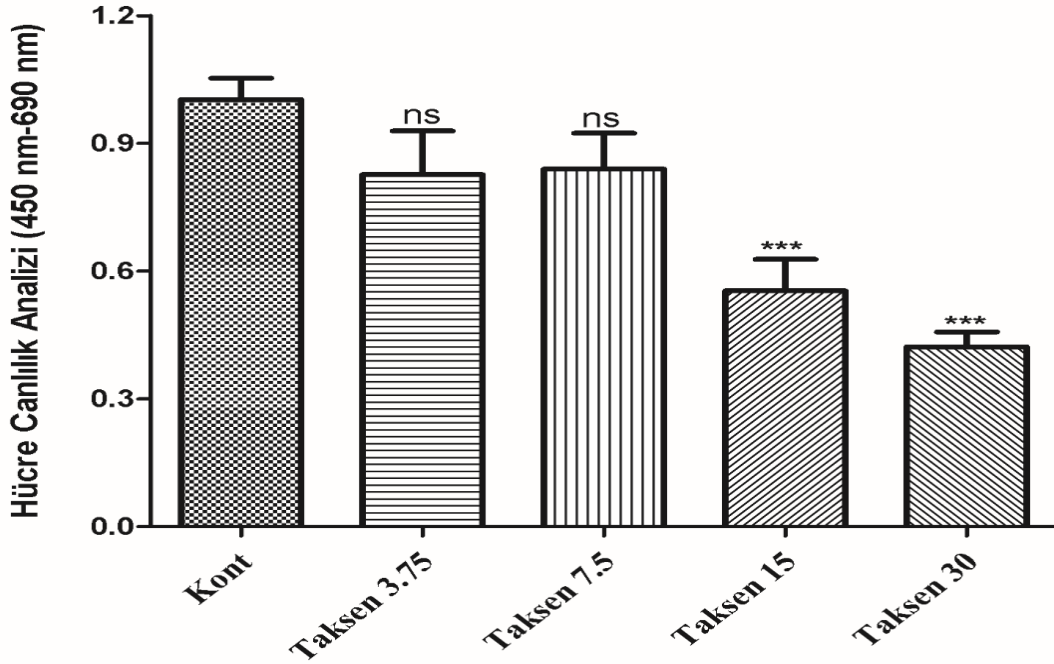
### **3.7. İstatiksel Analiz**

En az 3 tekrar şeklinde yapılan deney çalışmalarımızdan elde edilmiş olan veriler istatistiksel olarak GraphPad Prism 5.01 yazılımı aracılığıyla one-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison testi ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir ve  $p < 0,001$  anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Paklitaksel ve Krisin Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

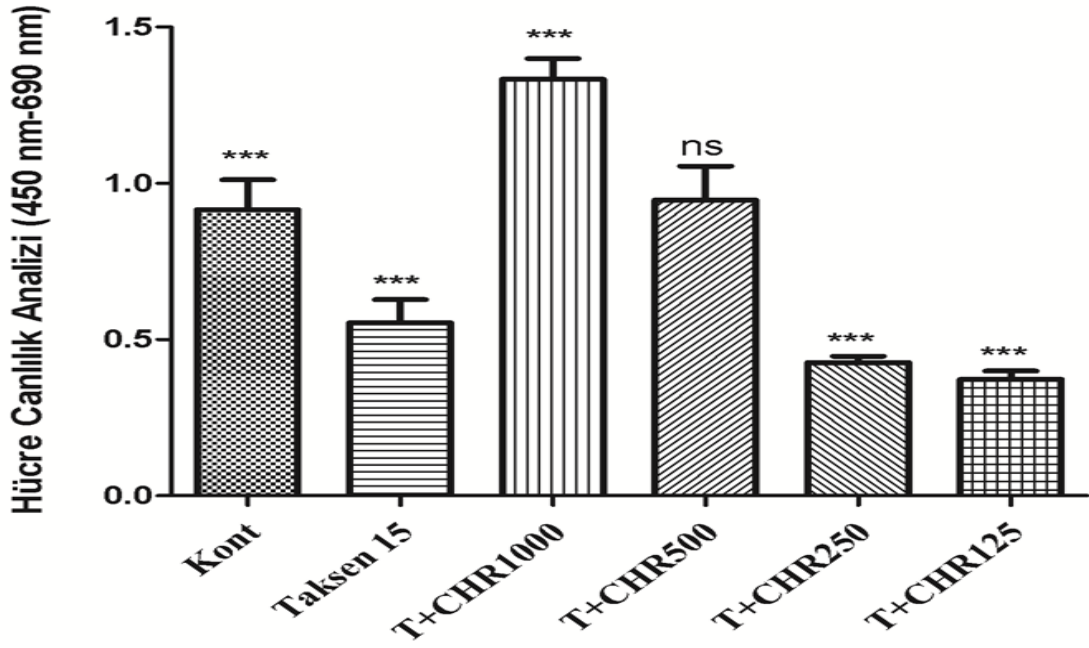
İnsan nöronal SHSY-5Y hücre hattında paklitaksel kaynaklı oksidatif stres ve apoptoza karşı koruyucu etkilerini incelemek için hücreler krisin ile muamele edildi ve oluşan hasarın ne ölçüde minimize edildiği aşağıdaki hücre canlılık testleri ile değerlendirildi. SHSY-5Y hücrelerin hasar durumunun tespiti için öncelikle 3,75, 7,5, 15, 30 uM olmak üzere 4 farklı dozda uygulama yapıldı. 15 ile 300 uM paklitakselin, hücre proliferasyonunda önemli ( $p < 0,001$ ) ölçüde azalmaya neden olduğu, 3,75 ve 7,5 uM'lik paklitakselin hücre proliferasyonunda önemli ölçüde değişime sebep olmadığı gözlemlendi (Şekil 5).



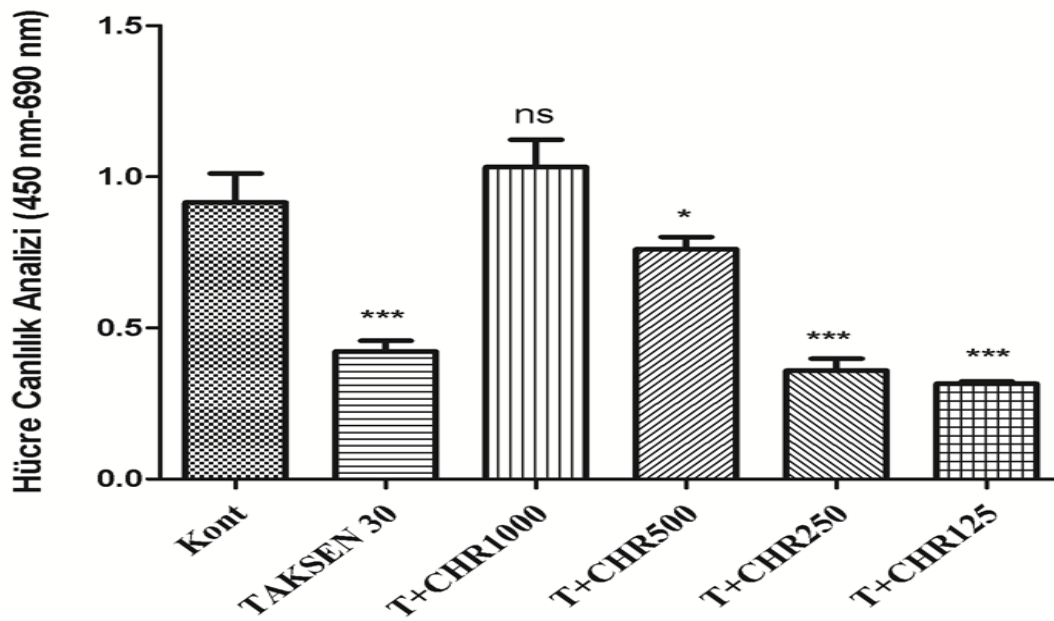
Şekil 5. Farklı dozlarda paklitaksel ile indüklenmiş dopaminerjik sinir hattı (SHSY-5Y) hücrelerinin hücre proliferasyonuna olan etkisi

15 ve 30 uM paklitakselin, hücre proliferasyonunda önemli ( $p < 0,001$ ) ölçüde azalmaya neden olduğu belirlendikten sonra krisinin ilgili dozajlardaki paklitaksel kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla 4 farklı konsantrasyonda krisin

(1000, 500, 250, 125 uM), paklitaksel ile birlikte hücelere uygulandı. 15 uM paklitaksel ile beraber 1000 uM ve 500 uM krisin hücelere uygulandığında hücre proliferasyonunun paklitaksel uygulanan hücelere oranla önemli ölçüde arttığı tespit edilmiş buna karşın 250 uM ve 125 uM krisin uygulamasının koruyucu etki gösteremediği tespit edilmiştir (Şekil 6). Benzer çalışma 30 uM paklitaksel uygulaması için de yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 5). Elde edilen bulgular ışığında sonraki çalışmalar 30 uM paklitaksel karşılık, 500 ve 1000 uM krisin ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 6. Etkin konsantrasyon olarak seçilen (15  $\mu$ M) paklitaksel ile indüklenen SH-SY5Y hüceleri üzerine 500 ve 1000  $\mu$ M konsantrasyonda uygulanan krisinin hücre proliferasyonuna olan etkisi. Kont: Kontrol, T: Paklitaksel, Chr: Krisin



Şekil 7. Etkin doz olarak seçilen (30  $\mu$ M) paklitaksel ile indüklenen SH-SY5Y hücreleri üzerine 500 ve 1000  $\mu$ M uygulanan krisinin hücre proliferasyonuna olan etkisi. Kont: Kontrol, T: Paklitaksel, Chr: Krisin

Paklitakselle yapılan çalışmalardan birinde ilgili ajanın farklı dozlarda uygulanmasının hücre ölümünü farklı mekanizmalar yoluyla hücrede bir takım işlevsel değişiklikler gerçekleştiğine dair veriler sunulmaktadır (Celik vd., 2020). SH-SY5Y hücrelerinde diklofenagin neden olduğu oksidatif hasardan krisin korumasının moleküler mekanizmalarının incelendiği bir çalışmada diklofenagin, hücreler üzerinde önemli toksisiteye neden olduğu ve bu etkinin, krisin ile muamele sonucu tersine çevrildiği gösterilmiştir (Darendelioğlu, 2020)

#### 4.2. Paklitaksel ve Krisin Uygulamasının LPO Üzerindeki Etkisi

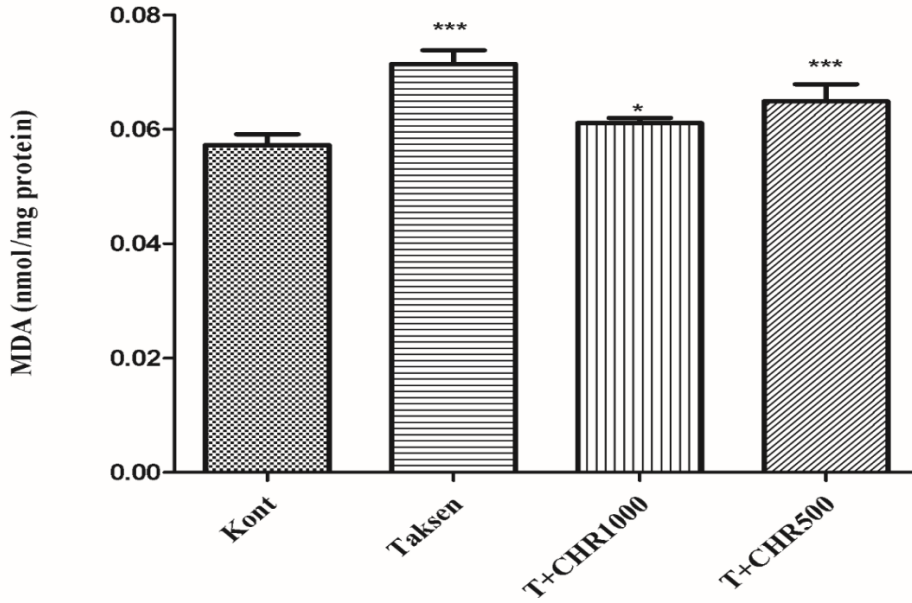
Paklitaksel, kanser tedavisinde kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Kemoterapi ilaçları, kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engelleyerek veya öldürerek çalışır. Ancak, sitotoksik ilaçlar, kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de etki edebilir ve bazı yan etkilere neden olabilir. Birçok kemoterapötik ilaç, hücrelerde oksidatif stres oluşturabilir ve lipid peroksidasyonuna yol açabilir. Paklitaksel de bu mekanizmalardan biri olabilir. Kemoterapi ilaçları, kanser hücrelerine saldırırken, serbest radikallerin oluşumunu artırarak hücre zarlarındaki lipitlerde peroksidasyona neden olabilir.



Lipid peroksidasyonu, hücrelerdeki lipitlerin (yağlar) oksidatif hasara uğraması sürecidir. Bu reaksiyonlarda serbest radikaller adı verilen yüksek reaktif moleküller tarafından başlatılan zincirleme reaksiyonları yer alır. Serbest radikaller, hücre zarlarını ve hücre içi bileşenleri etkileyerek oksidatif stres denilen duruma yol açarlar. Lipid peroksidasyonu, yağ asitleri, fosfolipitler ve kolesterol gibi hücre zarını oluşturan lipitlerin hedef alındığı bir süreçtir. Serbest radikallerin etkisiyle bu lipitlerde hidroksil grupları eklenerek lipid hidroperoksitleri oluşur. Lipid hidroperoksitleri, hücre zarının yapısal bütünlüğünü bozabilir, enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemleri tüketebilir ve diğer hücrenel bileşenlerle etkileşime girerek hücre hasarına ve hücre ölümüne yol açabilir. Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresin bir belirteci olarak kabul edilir ve birçok hastalıkta önemli bir rol oynar. Özellikle kalp-damar hastalıkları, diyabet, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve diğer kronik hastalıkların gelişiminde etkili olabilir. Buna karşılık vücut, lipid peroksidasyonuna karşı doğal olarak antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Sağlıklı bir yaşam tarzı benimsemek, dengeli bir beslenme ve antioksidanlarla zenginleştirilmiş bir diyet, lipid peroksidasyonunun önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Ancak bazı durumlarda, özellikle kronik hastalıklarda veya oksidatif stresin arttığı durumlarda, dengeli bir antioksidan sistemini desteklemek amacıyla takviyeler kullanılabilir. Ancak, bu tür takviyelerin kullanımı konusunda uzman bir sağlık uzmanıyla danışmak önemlidir.

Sağlıklı insan nöroblastoma hücrelerine paklitaksel kaynaklı kemoterapötiklerden olan 30 uM paklitaksel uygulaması sonrasında hücrelerin ne ölçüde zarar gördüğünü ve bu zararı antioksidan muamelesinin hangi seviyede minimize ettiğini gözlemlemek ve Malondialdehit seviyesini tespit etmek için lipit peroksidasyon deneyi yapılmıştır. Krisinin, paklitaksel kaynaklı toksisiteden sinir hücre ölümünü baskılamaya katkıda bulunup bulunmadığını araştırmak ve malondialdehit seviyesini saptamak için 30 uM paklitaksel karşılaştırmalı paklitaksel+500 ve 1000 uM krisin kullanılarak LPO analizi yapıldı. 30 uM paklitaksel ile indüklenen SH-SY5Y hücrelerindeki MDA seviyesi önemli ölçüde artarken ( $p < 0,01$ ), krisin ön muamelesi, paklitaksel ile indüklenen SH-SY5Y hücrelerine kıyasla MDA seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür ( $p < 0,01$ ). Deney hayvanları üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise paklitakselin lipid peroksidasyonunu artırarak periferik nöropatiye sebep olduğu rapor edilmiştir (Zbârcea et al., 2017). Bir başka çalışmada ise antioksidan içerik bakımından zengin arı sütünün kalp dokusunda paklitaksel

kaynaklı lipid peroksidasyonu azaltıcı etki gösterdiği ortaya konmuştur (Malekinejad et al., 2016). Cihan Gür ve arkadaşları tarafından yapılan bir deneysel çalışmada ise paklitakselin karaciğer hücrelerinde lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve hesperidinin bu etkiyi minimize ettiği rapor edilmiştir (Gür et al., 2022). Bu bilgiler ışığında paklitaksel tedavisi sırasında lipid peroksidasyonunu azaltmak için, hastaların antioksidanları artıran bir beslenme planı izlemesi doktor kontrolünde olması şartıyla önerilebilir.



Şekil 8. 30  $\mu$ M paklitaksel, 30  $\mu$ M paklitaksel+ 500 ve 1000  $\mu$ M krisinin aynı anda uygulanması ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattı üzerinde oluşan lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA'nın (Malondialdehit) LPO Assay kiti kullanılarak ölçülmesi

### 4.3. QTR-PCR Analizi

Kanser tedavisinde kullanılan bir kemoterapötik ajan olan paklitakselin apoptoz mekanizması üzerinde önemli etkileri vardır. Paklitaksel, hücre bölünmesini engelleyen ve kanser hücrelerinin büyümesini durduran bir etkiye sahiptir. Bu etkisi, hücre döngüsüne müdahale ederek, kanser hücrelerinin bölünmesini ve çoğalmasını önler. Ancak, paklitaksel aynı zamanda apoptozu da uyarır. Paklitaksel, hücre içinde mikrotübüller olarak adlandırılan yapıları nötralize eder. Mikrotübüller, hücre bölünmesi sırasında hücrenin iskeleti olarak görev yapar. Paklitaksel, bu yapıların stabilitesini artırarak hücre bölünmesinin düzgün bir şekilde tamamlanmasını engeller ve hücrelerin ölümüne yol açar.

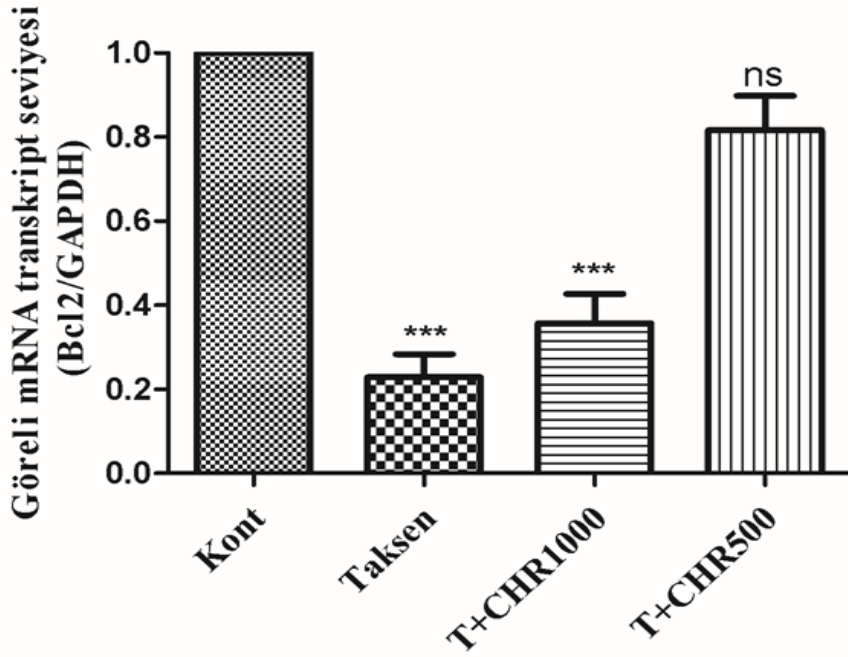
Özellikle kanser hücrelerinin, normal hücrelerden daha hızlı bölündüğü ve çoğaldığı bilinir. Bu nedenle, paklitaksel, kanser hücrelerinin hızlı bölünmesine karşı etkili bir tedavi olarak çalışırken, normal hücrelerin bölünmesini daha az etkiler ve sağlıklı hücrelerin zarar görmesini azaltır.

Paklitaksel'in apoptozu tetiklemesi, kanser hücrelerinin programlanmış hücre ölümü sürecine girmesini sağlar. Apoptoz, hücrelerin anormal büyümelerini ve potansiyel olarak kanser tümörlerini kontrol altında tutmak için önemlidir. Bu nedenle, paklitaksel gibi apoptozu tetikleyen ilaçlar, kanser tedavisinde etkili bir araç olabilir. Ancak, bu ilaçlar sağlıklı hücreleri de etkileyebilir ve tedavi sırasında bazı yan etkilere neden olabilir. Sağlıklı hücreler, kanser hücrelerinden farklı şekillerde tepki verebilirler ve bu da yan etkilere yol açabilir. Paklitaksel sağlıklı hücrelere zarar vererek hücrelerin apoptozla ölümüne sebebiyet verebilir.

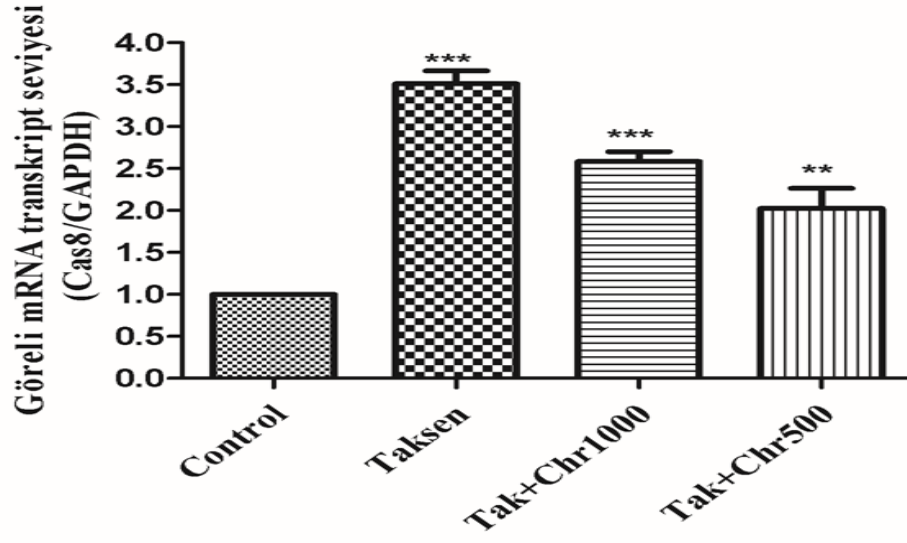
Anti-apoptotik ve apoptotik genlerin mRNA transkript seviyelerinin paklitaksel ve krisinden etkilenip etkilenmediğini test etmek için, Bcl-2, P53, Cas-6, Cas-8, Cas-10 ve NFKB ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüştür. P53, Cas-6, Cas-8, Cas-10 ve NFKB mRNA transkript seviyelerinin paklitaksel ile muameleden sonra kontrol ile kıyaslandığında anlamlı ölçüde arttığı, Bcl-2'nin mRNA seviyelerinin de önemli derecede azaldığı gözlenmiştir (Şekil 9). Krisin ile paklitaksel beraber uygulandığında, p53, Cas-6, Cas-8, Cas-10 ve NFKB'nin mRNA transkript seviyelerinin paklitaksel uygulanmış gruba kıyasla azaldığı, Bcl-2'nin mRNA seviyelerinin de önemli derecede arttığı gözlenmiştir (Şekil 9).

Tezde elde edilen verilere paralel olarak paklitakselin kaspaz-3 ve Bax düzeylerini yükselterek ve Bcl-2 düzeylerini baskılayarak siyatik sinirinde apoptozu neden olduğu daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Semis et al., 2021). Başka bir çalışmada ise paklitaksel ile muamele sonunda hem siyatik sinir hem de omurilikte kaspaz-3, p53 ve Apaf-1'in mRNA transkript seviyelerinde artış gözlemlenirken, Bcl-2 ve Bcl-xL'in mRNA transkript seviyelerinde düşüş gözlenmiştir (Yardım et al., 2021). Bir başka çalışmada ise krisin uygulamasının siklofosfamid ile indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerinde Cas-3, Cyt c ve Bax ekspresyonunu azaltıp ve anti-apoptotik gen Bcl-2'nin ekspresyonunu azaltarak SH-SY5Y hücrelerini koruduğunu göstermektedir (Ayna et al., 2020). Krisinin

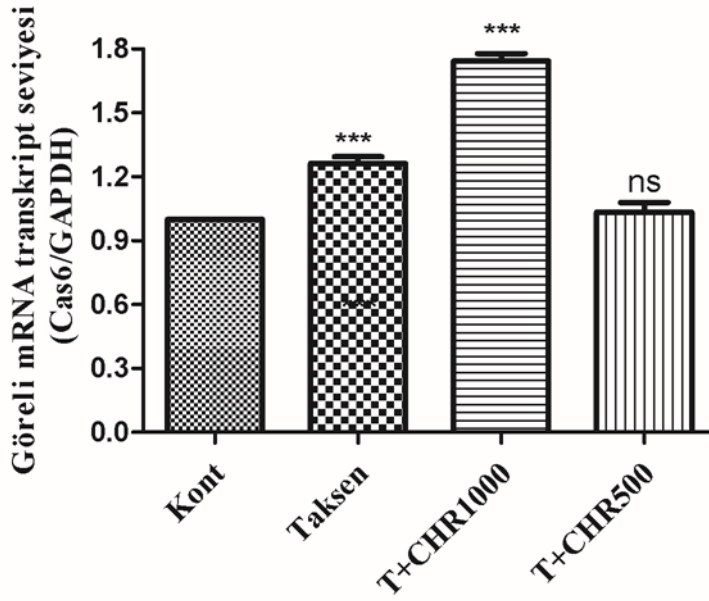
SH-SY5Y hücrelerinde diklofenakla uyarılan apoptoz üzerinde nöroprotektif etkileri başlıklı çalışmada elde edilen sonuçlara göre ise krisinin Bax, cytochrome c, cas-3, cas-8 ve p53'ün ekspresyonunu azaltıp ve anti-apoptotik gen Bcl-2'nin ekspresyonunu azaltarak SH-SY5Y hücrelerini koruduğunu göstermektedir (Darendelioğlu, 2020). Antioksidanların besin takviyeleri olarak ve özellikle krisin kullanımı, paklitakselin SH-SY5Y hücrelerinde apoptotik etkilerini azaltır ve bu da paklitakselin neden olduğu hücre yaralanmalarına terapötik yaklaşımlara derinlik kazandırabilir.



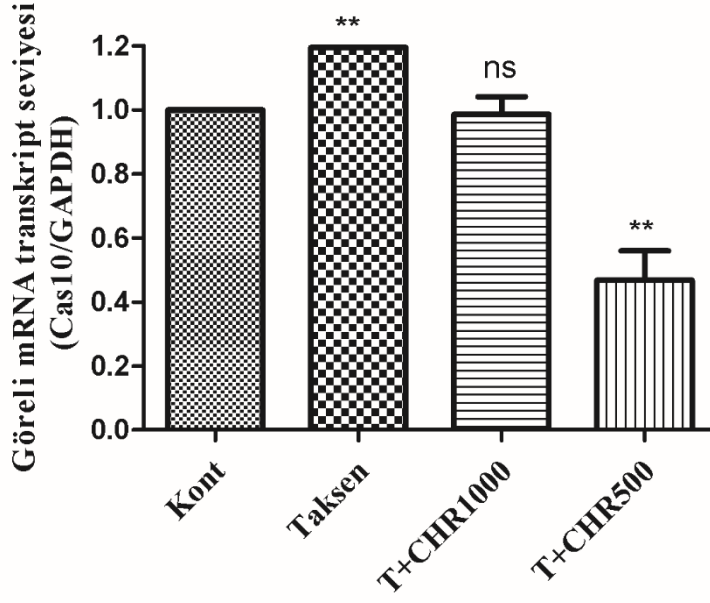
Şekil 9. 30  $\mu$ M paklitaksel, 500 ve 1000  $\mu$ M krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında anti-apoptotik gen olan Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeyi



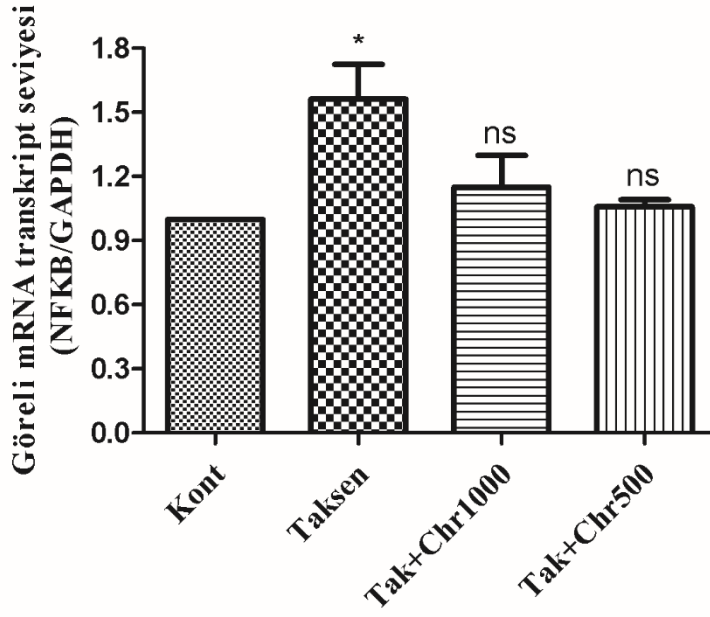
Şekil 10. 30  $\mu$ M paklitaksel, 500 ve 1000  $\mu$ M krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan Cas-8 mRNA ekspresyon düzeyi



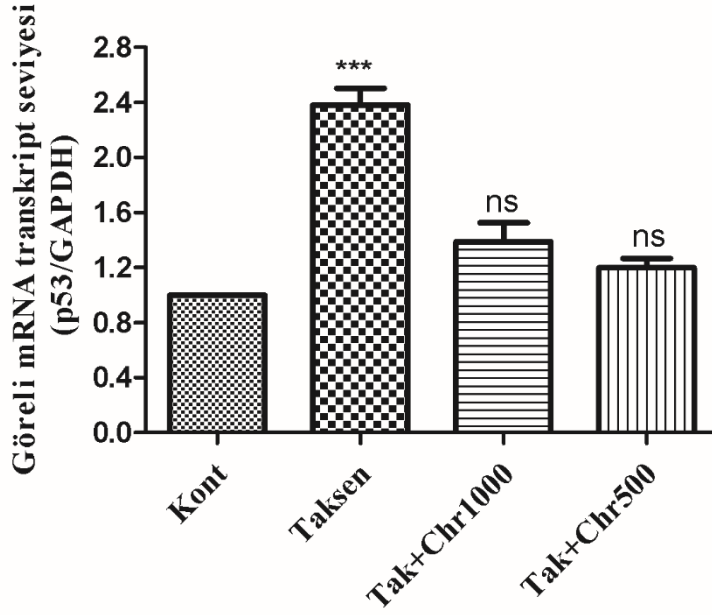
Şekil 11. 30  $\mu$ M paklitaksel, 500 ve 1000  $\mu$ M krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan Cas-6 mRNA ekspresyon düzeyi



Şekil 12. 30  $\mu$ M paklitaksel, 500 ve 1000  $\mu$ M krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan Cas-10 mRNA ekspresyon düzeyi



Şekil 13. 30  $\mu$ M paklitaksel, 500 ve 1000  $\mu$ M krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan NFkB mRNA ekspresyon düzeyi

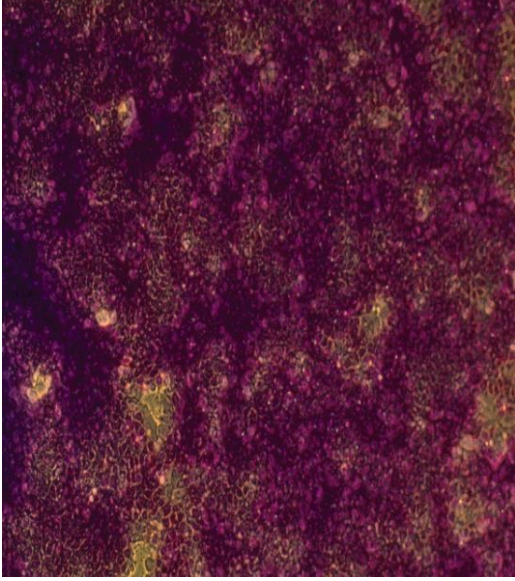


Şekil 14. 30  $\mu$ M paklitaksel, 500 ve 1000  $\mu$ M krisin ile indüklenen SH-SY5Y hücre hattında apoptotik gen olan p53 mRNA ekspresyon düzeyi

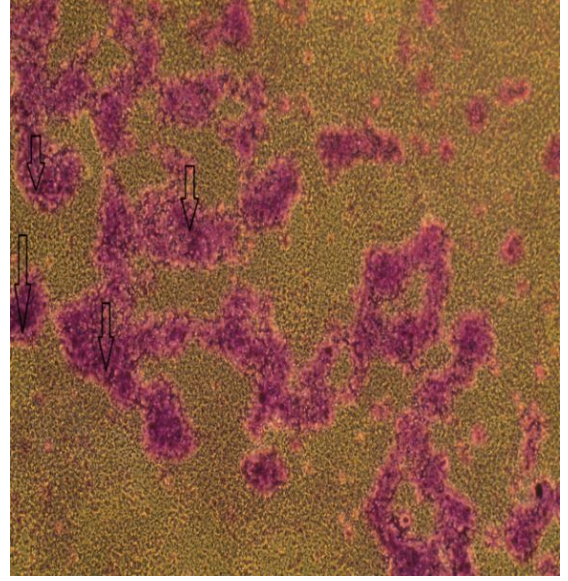
#### 4.4. İmmunohistokimyasal Boyama ile Caspase-3 ve Caspase-8 Ekspresyonlarının Analizi

Paklitaksel kaynaklı hücre ölümünün apoptozdan kaynaklanıp kaynaklanmadığını doğrulamak için, apoptozun önemli bir aracısı olan kaspaz-3'ün ve kaspaz-8'in aktivasyonu incelenmiştir. SHSY-5Y hücre hattına 30  $\mu$ M paklitaksel ve 500-1000  $\mu$ M krisin ön uygulamanın ardından fikse edilen hücre komponentleri üzerine yapılan boyama işlemiyle birlikte hücre ölüm yollarından biri olan apoptotik yolağın şekil xxxx ve şekil xxx te gösterildiği şekilde paklitaksel uygulamasının kaspaz-3 ve kaspaz 8 ekspresyonunu arttırdığı, krisin uygulamasının ise bu etkileri azalttığı görülmüştür. Paklitaksel+Chr 500 uygulanması ile 24 saat süresince fixe edilen SHSY-5Y hücre hattında kaspaz-3 ve kaspaz-8 enzimlerinin aktive olduğu koyu renkli kısımların mikroskop ile elde edilen görüntüleri şekilde görüldüğü gibi kontrole kıyasen (B) paklitaksel grubunun apoptoz ekspresyonun artışı ok işaretleriyle belirlendiği gözlemlendiği (C) ve (D) grubunda ise krisinle tedavinin hücreler üzerinde iyileştirici etkisi görülmüştür.

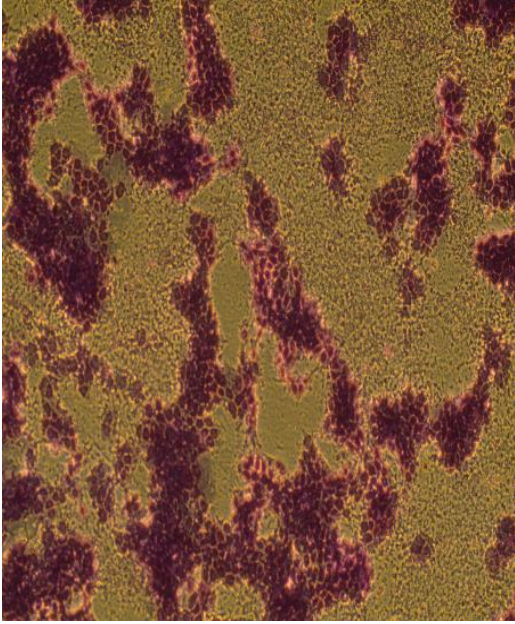
A)KONTROL GRUBU



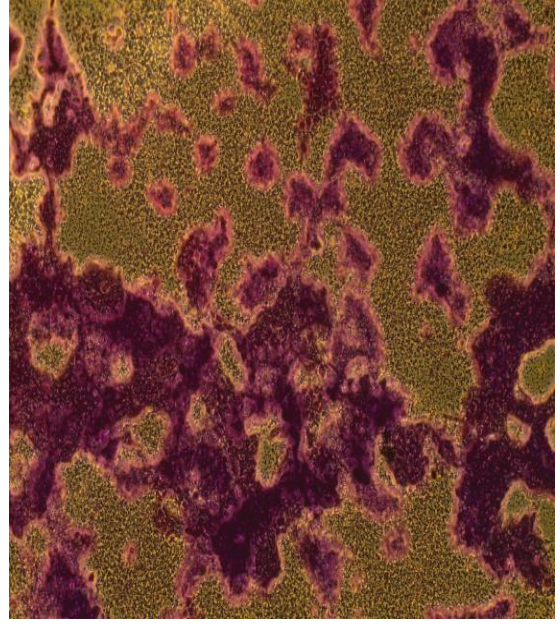
B)PAKLİTAKSEL GRUBU



C)PAKLİTAKSEL+CHR1000 GRUBU



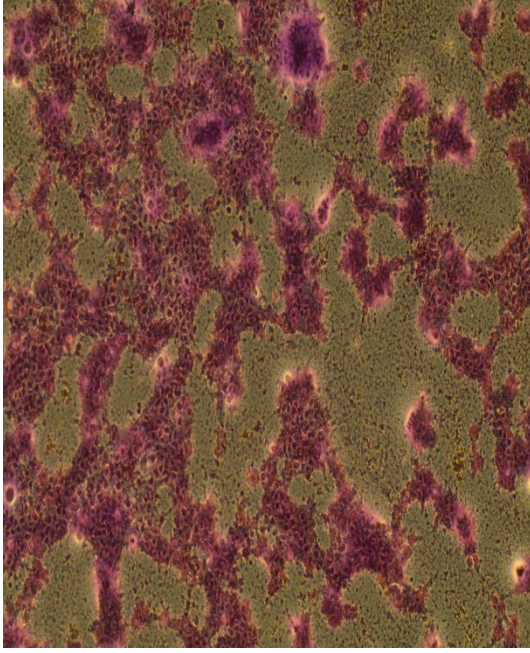
D)PAKLİTAKSEL+CHR500GRUBU



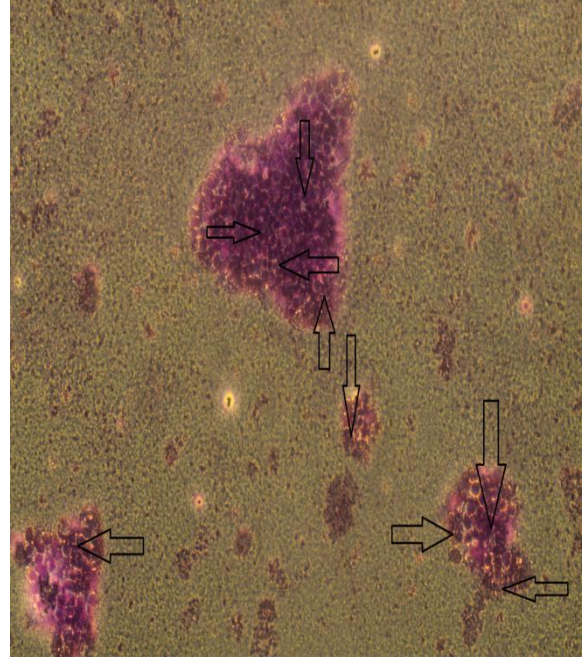
Şekil 15. Paklitaxel ve krisin uygulamasının kaspaz-3 enzim ekspresyonuna etkisi



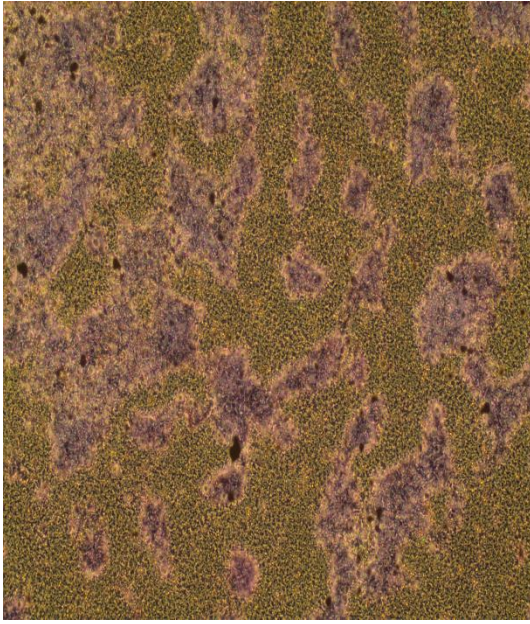
A)KONTROL GRUBU



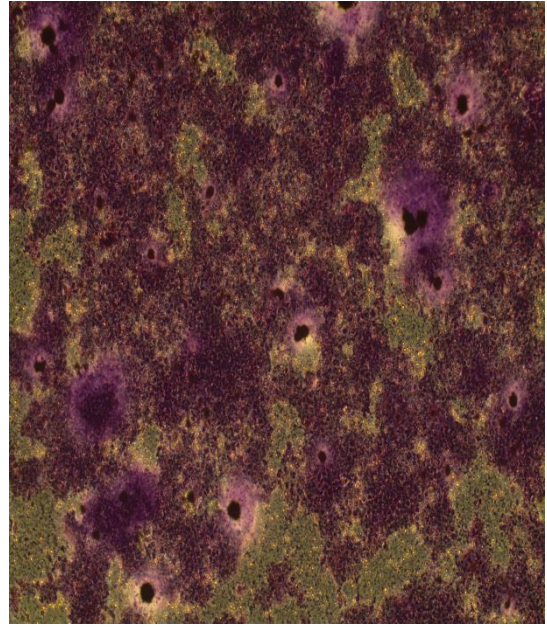
B)PAKLİTAKSEL GRUBU



C)PAKLİTAKSEL+CHR500 GRUBU



D)PAKLİTAKSEL+CHR1000 GRUBU



Şekil 16. Paklitaksel ve krisin uygulamasının kaspaz-8 enzim ekspresyonuna etkisi

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, oksidatif hasar ve apoptoz yoluyla in vitro model olarak SH-SY5Y nöron hücrelerinde paklitaksele bağlı toksisiteye karşı krisinin olası koruyucu etkileri hücre canlılığı analizi, lipid peroksidasyon analizi, qRT-PCR ve immunohistokimyasal boyama yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmada krisin bir kemoterapötik ajan olan paklitaksel ile hasara uğratılmış SH-SY5Y nöron hücreleri üzerine uygulanmış ve etkileri incelenmiştir. Çalışma kapsamında öncelikle SH-SY5Y hücrelerine farklı dozlarda paklitaksel uygulanmış ve 15 ve 30  $\mu$ M paklitaksel uygulamasının hücre canlılığını azalttığı ve 500 ve 1000  $\mu$ M krisin uygulamasının bu etkileri azalttığı gösterilmiştir. Krisinin ayrıca paklitaksel uygulanmış hücrelerde LPO seviyesini anlamlı seviyede azalttığı gösterilmiştir. Çalışmada paklitaksel ve krisin uygulamasının bazı apoptotik ve antiapoptotik genler üzerindeki etkileri de çalışılmış ve krisinin apoptotik ve anti-apoptotik genler üzerinde önemli ölçüde etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Krisin kaspaz 10, kaspaz 8, kaspaz 6, p53 ve NF $\kappa$ B seviyelerini anlamlı şekilde azaltmış, Bcl-2 seviyesini ise paklitaksel uygulanmış gruba göre arttırmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, krisinin oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümünün baskılanmasının, paklitaksel ile indüklenen SH-SY5Y sitotoksitesininin tedavisi için etkili bir strateji olabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

Abusaliya, A., Ha, S. E., Bhosale, P. B., Kim, H. H., Park, M. Y., Vetrivel, P., ve Kim, G. S. (2022). Glycosidic flavonoids and their potential applications in cancer research: A review. *Molecular ve Cellular Toxicology*, 18(1),9-16. <https://doi.org/101007>, s.13273-021-00178-x.

Ada, S., Ertürk, C., Uçar, A., Akyüz, S., Doğan, F. ve Yücel, B. (2021). Kanser Hücre Metabolizması. *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı DOI: 10.54537/tusebdergisi*. 981144. *Dergisi*, 4(3); 66-75.

Al-Shamma, S. A., Zaher, D. M., Hersi, F., Abu Jayab, N. N., ve Omar, H. A. (2023). Targeting aldehyde dehydrogenase enzymes in combination with chemotherapy and immunotherapy: An approach to tackle resistance in cancer cells. *Life Sciences*, 320, 121541. <https://doi.org/10.1016/j.lfs>.

Alzoubi, K., Khabour, O., Khader, M., Mhaidat, N., ve Al-Azzam, S. (2014). Evaluation of vitamin B12 effects on DNA damage induced by paclitaxel. *Drug and chemical toxicology*, 37(3), 276-280.

Anand, K.V., Anandhi, R., Pakkiyaraj, M., ve Geraldine, P. (2011). Protective effect of chrysin on carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced tissue injury in male Wistar rats. *Toxicology and industrial health*, 27(10), 923-933.

Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., ve Kumar, D. (2021). Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants*, 10(5), 642.

Arshi, A., Jafari, M., Sadeghi, A., Gholami, M., Kabiri, H., ve Abolhasani, M. (2019). Chrysin and its relation with gastric cancer. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 8(1), 17-24.

Atalay, P. B., ve Kaluç, N. Mitoz sırasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif strese karşı dirençte Ycal'ın rolünün incelenmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12(2), 230-239.

Attia, M., Essa, E. A., Zaki, R. M., ve Elkordy, A. A. (2020). An Overview of the Antioxidant Effects of Ascorbic Acid and Alpha Lipoic Acid (in Liposomal Forms) as Adjuvant in Cancer Treatment. *Antioxidants*, 9(5), 359. <https://doi.org/10.3390/antiox9050359>.

Ayna, A., Özbolat, S. N., ve Darendelioglu, E. (2020). Quercetin, chrysin, caffeic acid and ferulic acid ameliorate cyclophosphamide-induced toxicities in SH-SY5Y cells. *Molecular Biology Reports*, 47(11), 8535-8543.

- Babacan, D. (2023). Apoptozis. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 49(1), 1-10.
- Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., ve Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), 135-147.
- Boatright, K. M., ve Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, 15(6), 725-731.
- Brokatzky, D., Dörflinger, B., Haimovici, A., Weber, A., Kirschnek, S., Vier, J., ... ve Häcker, G. (2019). A non-death function of the mitochondrial apoptosis apparatus in immunity. *The EMBO journal*, 38(11), e100907.
- Carpenter, R., ve Brady, M. F. (2023). BAX gene. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Cavalier, A. N., Clayton, Z., Wahl, D., Seals, D., ve LaRocca, T. (2020). The Effects of Chemotherapeutic Agents and a Mitochondrial Antioxidant on the Brain Transcriptome and Cognitive Function. *The FASEB Journal*, s. 34 (1), 1-1.
- Celik, Z. B., Cankara, F. N., ve Gunaydin, C. (2020). Alterations in the matrix metalloproteinase-3 promoter methylation after common chemotherapeutics: In vitro study of paclitaxel, cisplatin and methotrexate in the MCF-7 and SH-SY5Y cell lines. *Molecular Biology Reports*, 47(11), 8987-8995. <https://doi.org/10.1007/s.11033-020-05955-w>.
- Cetraro P, Plaza-Diaz J, MacKenzie A, ve Abadía-Molina F. A (2022). Review of the Current Impact of Inhibitors of Apoptosis Proteins and Their Repression in Cancer. *Cancers*. 2022; 14(7):1671. <https://doi.org/103390/cancers14071671>.
- Chota A, George B. P, ve Abrahamse H. (2021) Interactions of multidomain pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins in cancer cell death. *Oncotarget*. 2021 Aug 3;12(16):1615-1626. doi: 10.18632/oncotarget.28031. PMID: 34381566; PMCID: PMC8351602.
- Çay, M. (2012). Ratlarda subkronik formaldehit zehirlenmelerinin karaciğerde neden olduğu hasara karşı chrysinin etkileri (Master's thesis, İnönü Üniversitesi).
- Çelik, T. (2011). Sisplatin ve Urtica dioica L. ekstresinin Ehrlich ascites tümör hücreleri taşıyan fareler üzerindeki etkileri/Effects of cisplatin and Urtica dioica L. extract against Ehrlich ascites carcinoma in mice (Doctoral dissertation).
- Çelik, H., Kandemir, F. M., Caglayan, C., Özdemir, S., Çomaklı, S., Kucukler, S., ve Yardım, A. (2020). Neuroprotective effect of rutin against colistin-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat brain associated with the Creb/Bdnf expressions. *Molecular Biology Reports*, 47(3), 2023-2034.
- Çetin, D., Hacimuftuoglu, A., Tatar, A., Turkez, H., ve Togar, B. (2016). The in vitro protective effect of salicylic acid against paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity. *Cytotechnology*, 68(4), 1361-1367.

Darendelioglu, E. (2020). Neuroprotective effects of chrysin on diclofenac-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Neurochemical research*, 1-8.

Darendelioglu, E. (2020). Neuroprotective effects of chrysin on diclofenac-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Neurochemical research*, 45(5), 1064-1071.

Erekat, N. S. (2022). Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clinical Anatomy*, 35(1), 65-78.

Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., ve Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, 14(15), 4135.

George S, Abrahamse H. Redox (2020) Potential of Antioxidants in Cancer Progression and Prevention. *Antioxidants*. 2020; 9(11):1156. <https://doi.org/10.3390/antiox9111156>.

Grilo, A. L., and Mantalaris, A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology advances*, 37(3), 459-475.

Gur, C., Kandemir, F. M., Caglayan, C., ve Satici, E. (2022). Chemopreventive effects of hesperidin against paclitaxel-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via amendment of Nrf2/HO-1 and caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Chemico-Biological Interactions*, 365, 110073.

Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., ve Cardinali, D. P. (2006). Melatonin. *The international journal of biochemistry ve cell biology*, 38 (3), 313-316.

He, Y., Shi, Y., Huang, H., Feng, Y., Wang, Y., Zhan, L., ve Wei, B. (2021). Chrysin induces autophagy through the inactivation of the ROS-mediated Akt/mTOR signaling pathway in endometrial cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 48(3), 172. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5005>.

Hickman, J. A. (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*, 11, 121-139.

Ho, G. Y., Woodward, N., ve Coward, J. I. (2016). Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology*, 102, 37-46.

Huang, F. (2021). Ursodeoxycholic acid as a potential alternative therapeutic approach for neurodegenerative disorders: effects on cell apoptosis, oxidative stress and inflammation in the brain. *Brain, behavior, ve immunity-health*, 18, 100348.

Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., ve Janda, K. (2020). Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 48(284), 124-127.

Jeeva, J. S., Sunitha, J., Ananthalakshmi, R., Rajkumari, S., Ramesh, M., ve Krishnan, R. (2015). Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *Journal of pharmacy and bioallied sciences*, s. 7(1), 331.

Jendrossek, V. (2012). The intrinsic apoptosis pathways as a target in anticancer therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(8), 1426-1438.

Jiang, H., Zhang, X. W., Liao, Q. L., Wu, W. T., Liu, Y. L., ve Huang, W. H. (2019). Electrochemical Monitoring of Paclitaxel-Induced ROS Release from Mitochondria inside Single Cells. *Small*, 15 (48), 1901787.

Kâhya, S., Yılmaz, Ö., ve Carlı, K. T. (2014). Enfeksiyöz Hayvan Hastalıklarının Teşhisinde Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR'ın Geleneksel PCR'a göre Avantajları. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32 (2), 39-44.

Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M. E., ve Cuperlovic-Culf, M. (2020). Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies. *Biomolecules*, 10 (10), 1429.

Kikuchi, H., Yuan, B., Hu, X., ve Okazaki, M. (2019). Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. *American Journal of Cancer Research*, 9 (8), 1517.

Koç, T. (2017) Paklitaksel ve mirtazapinin A2780 hücrelerine etkilerinin proliferasyon ve apoptozis yönünden değerlendirilmesi (Master's thesis, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Koç, T. (2017). Paklitaksel ve Mirtazapinin A2780 Hücrelerine Etkilerinin Proliferasyon ve Apoptozis Yönünde Değerlendirilmesi (Doctoral dissertation, Necmettin Erbakan University (Turkey)).

Lee, J. H., Yoo, E. S., Han, S. H., Jung, G. H., Han, E. J., Choi, E. Y., Jeon, S., Jung, S. H., Kim, B., Cho, S. D., Nam, J. S., Choi, C., Che, J. H., ve Jung, J. Y. (2022). Chrysin Induces Apoptosis and Autophagy in Human Melanoma Cells via the mTOR/S6K Pathway. *Biomedicines*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071467>.

Liu, P. F., Farooqi, A. A., Peng, S. Y., Yu, T. J., Dahms, H. U., Lee, C. H., ... ve Chang, H. W. (2022, August). Regulatory effects of noncoding RNAs on the interplay of oxidative stress and autophagy in cancer malignancy and therapy. *In Seminars in Cancer Biology*, 83, 269-282. Academic Press.

Lossi, L. (2022). The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochemical Journal*, 479(3), 357-384.24.

Luo, S., Zhou, L., Dai, Y., Lu, Y., and Liu, Q. (2018). Analysis of Cytotoxic Effects of Chemotherapeutic Agents for Gastrointestinal Cancer with Cell-based Impedance Biosensor. *Sensors and Materials*, 30(9), 1977-1987.

Malekinejad, H., Ahsan, S., Delkhosh-Kasmaie, F., Cheraghi, H., Rezaei-Golmisheh, A., ve Janbaz-Acyabar, H. (2016). Cardioprotective effect of royal jelly on paclitaxel-induced cardio-toxicity in rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 19(2), 221.

Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., and D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.

Markman, M., ve Mekhail, T. M. (2002). Paclitaxel in cancer therapy. Expert opinion on pharmacotherapy, 3(6), 755-766.

Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., ve Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, 63(1), 68-78.

Moussa, Z., Judeh, Z. M., ve Ahmed, S. A. (2019). Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. *Free radical medicine and biology*, 1, 11-22.

Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I.E., Shariati, M.A., Shahbaz, M., ve Heydari, M. (2019). Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life sciences*, 235, 116797.

Obeng, E. (2020). Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*, 81, 1133-1143.

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., ve Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 45(6), 487-498.

Ozfiliz, P., Kizilboga, T., Demir, S., Alkurt, G., Palavan-Unsal, N., Arisan, E.D., ve Dinler-Doganay, G. (2015). Bag-1 promotes cell survival through c-Myc-mediated ODC upregulation that is not preferred under apoptotic stimuli in MCF-7 cells. *Cell biochemistry and function*, 33(5), 293-307.

Özcan, M. (2021). Antioksidan Kullanımının Meme Kanseri Tedavisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması.

Prangsaengtong, O., Athikomkulchai, S., Xu, J., Koizumi, K., Inujima, A., Shibahara, N., Shimada, Y., Tadtong, S., ve Awale, S. (2016). Chrysin Inhibits Lymphangiogenesis *in Vitro*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 39(4), 466-472. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00543>.

Priyadarshini, K., Keerthi, A. U. (2012). Paclitaxel against cancer: a short review. *Med chem*, 2(7), 139-141.

Rashed, M. M., ve Ragab, N. M. (2004). The pattern of expression of the apoptotic inducer Fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-Hodgkin lymphomas. *Turk J Haematol*, 21(3), 141-147. (Zulaikhah, 2017).

Ricciarelli, R., Zingg, J. M., Azzi, A. (2000). Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation*, 102(1), 82-87.

Rodríguez-Landa, J. F., German-Ponciano, L. J., Puga-Olguín, A., Olmos-Vázquez, O. J. (2022). Pharmacological, neurochemical, and behavioral mechanisms underlying the anxiolytic-and antidepressant-like effects of flavonoid chrysin. *Molecules*, 27(11), 3551.

Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., ve Devi, R. (2022). Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism (s) of action. *Frontiers in pharmacology*, 13, 283.

Sakamoto, J., Matsui, T., Kodera, Y. (2009). Paclitaxel chemotherapy for the treatment of gastric cancer. *Gastric Cancer*, 12(2), 69-78.

Seçme, M. (2014). Oleuropeinin sh-sy5y nöroblastom hücre hattında çeşitli hücreyel yolaklardaki etkisinin belirlenmesi (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

Semis, H. S., Kandemir, F. M., Kaynar, O., Dogan, T., Arıkan, S. M. (2021). The protective effects of hesperidin against paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. *Life Sciences*, 287, 120104.

Schirmacher, V. (2019) From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International journal of oncology*, 54(2), 407-419.

Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food chemistry*, 383, 132531.

Singh, R., Letai, A., ve Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(3), 175-193.

Solit, D. B., She, Y., Lobo, J., Kris, M. G., Scher, H. I., Rosen, N., Sirotnak, F. M. (2005). Pulsatile administration of the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib is significantly more effective than continuous dosing for sensitizing tumors to paclitaxel. *Clinical cancer research*, 11(5), 1983-1989.

Stompor-Goraćy, M., Bajek-Bil, A., Machaczka, M. (2021). Chrysin: Perspectives on contemporary status and future possibilities as pro-health agent. *Nutrients*, 13(6), 2038.

Tang, J. Y., Ou-Yang, F., Hou, M. F., Huang, H. W., Wang, H. R., Li, K. T., ... ve Chang, H. W. (2019). Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects-involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration. *In Seminars in cancer biology* Academic Press. P. 58:109-117



Tekeli, M. Y., Eraslan, G., Bayram, L. Ç., Aslan, C., Çalimli, S. (2023). The protective effects of baicalin and chrysin against emamectin benzoate-induced toxicity in Wistar albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-25.

Üstüner, D. Tümör Hücrelerinde Western Blotlama Uygulamaları. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 3(4), 330-334.

Vishweshwaran, S., Sairam, G., Shakilarani, M., Stalin, S., Swaminathan, S., ... Uma Maheswari, K. (2014). Evaluation of Chrysin as an Effective Antilipidemic Agent. *Asian Journal of Chemistry*, 26(9), 2617-2620. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.15759>.

Yardım, A., Kandemir, F. M., Çomaklı, S., Özdemir, S., Caglayan, C., Kucukler, S., ve Çelik, H. (2021). Protective effects of curcumin against paclitaxel-induced spinal cord and sciatic nerve injuries in rats. *Neurochemical Research*, 46(2), 379-395.

Yardım, A., Kandemir, F. M., Çomaklı, S., Özdemir, S., Caglayan, C., Kucukler, S., ve Çelik, H. (2021). Protective effects of curcumin against paclitaxel-induced spinal cord and sciatic nerve injuries in rats. *Neurochemical Research*, 46, 379-395.

Yayla, M., Çetin, D., Demirbağ, Ç., ve Kılıçle, P. A. (2018). Nar Kabuğu Ekstresinin Sıçanlarda Paklitakselle İndüklenen Primer Nöron Hasarına Karşı Koruyucu Etkisi. *Kafkas Tıp Bilimleri Dergisi*, 8(3), 149-157.

Yıldız B., Bölükbaşı, S. Ş., ve Şahin, N. Kloro [1-(2-Metil-2-Propenil)-3-(2-Klorobenzil) Benzimidazol-2-İliden] Ag (I) Bileşiğinin Sh-Sy5y Nöroblastom Hücrelerindeki Antiproliferatif Aktivitesinin Araştırılması. *Bartın Üniversitesi Uluslararası Fen Bilimleri Dergisi*, 3(2), 73-83.

Zbârcea, C. E., Ciotu, I.C., Bild, V., Chiri. Ță, C., Tănase, A. M., Şeremet, O.C., ...ve Negreş, S. (2017). Therapeutic potential of certain drug combinations on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. *Rom. J. Morphol. Embryol*, 58, 507-516.

Wang, Y., Qi, H., Liu, Y., Duan, C., Liu, X., Xia, T., ... ve Liu, H. X. (2021). The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics*, 11(10), 4839.

Wang, Y., ve Hekimi, S. (2016). Understanding ubiquinone. *Trends in cell biology*, 26(5), 367-378.

Weng, M. S., Ho, Y. S., ve Lin, J. K. (2005). Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical pharmacology*, 69(12), 1815-1827.

Qi, X., Jha, S. K., Jha, N. K., Dewanjee, S., Dey, A., Deka, R., ... ve Hou, K. (2022). Antioxidants in brain tumors: current therapeutic significance and future prospects. *Molecular Cancer*, 21(1), 1-32.

[http://www.norbil.hacettepe.edu.tr/west\\_ornek.shtml](http://www.norbil.hacettepe.edu.tr/west_ornek.shtml).

<https://www.medicalpark.com.tr/pcr-testi-nedir/hg-2393>.