

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İlker DİBİRDİK

**HT-29 İNSAN KOLON ADENOKARSİNOM
MODELİNDE MODİFİYE EDİLMİŞ BİR BİYOAKTİF
FİTOKİMYASAL YAPININ TERAPÖTİK
ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

SİNEM ÇALIN

Referans no: 10640610

EDİRNE-2024

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İlker DİBİRDİK

**HT-29 İNSAN KOLON ADENOKARSİNOM
MODELİNDE MODİFİYE EDİLMİŞ BİR BİYOAKTİF
FİTOKİMYASAL YAPININ TERAPÖTİK
ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

SİNEM ÇALIN

Destekleyen Kurum:
TÜBAP

EDİRNE-2024

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
ETİK BEYAN	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kolorektal Kanser Oluşumu.....	6
2.2. Kolon Kanseri Sınıflandırılması.....	9
2.3. Apoptozis	10
2.3.1. Apoptozise Direnç	11
2.4. Kolon Kanseri Tedavisinde Kullanılan Kemoterapötik İlaçlar ve Etkileri	12
2.4.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü İnhibitörleri (EGFRI).....	13
2.4.2. 5-Fluorourasil.....	14
2.4.3. Oksaliptatin	15
2.5. Doğal Biyoaktif Fitokimyasal Bileşikler	16
2.5.1. Kurkumin	19
2.5.2. Gallik Asit.....	22
2.5.3. Glikozamin	23
2.6. İlaç keşfi.....	23
2.6.1. Öncü molekül	25
2.7. Kimerik molekül	26
2.7.1. Hibrit molekül	27
2.8. Kombinasyon İlaç Tedavisi.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
3.1. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Sentezi.....	36
3.1.1. SI-1 Bileşiğinin Sentezi	36
3.1.2. GK-1 Bileşiğinin Sentezi.....	37
3.2. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Yapı Tayini.....	38

3.2.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	38
3.2.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹ H-NMR),.....	38
3.2.3. Kütle Spektroskopisi (LC/MS)	38
3.2.4. İnce Tabaka Kromatografisi	38
3.3. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Terapötik Etkinliğinin Test Edilmesi	39
3.3.1. Hücre Kültürü.....	39
3.3.2. Hücresel Canlılık Testi.....	41
3.3.3. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerin 5-FU ve OX ile Kombinasyonların Belirlenmesi	43
3.4. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR	45
4.1. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Yapısının Aydınlatılması .	45
4.1.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları	45
4.1.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹ H-NMR) Sonuçları	46
4.1.3. Kütle Spektroskopisi (LC/MS) Sonuçları.....	48
4.2. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin ve Kemoterapötik İlaçların Sitotoksikite Test Sonuçları.....	49
4.2.1. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin MTT Test Sonuçları	49
4.2.2. Kemoterapötik İlaçların MTT Test Sonuçları.....	51
4.3. Kemoterapötik İlaçların Kombinasyon Sonuçları	53
4.4. Modifiye Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Kemoterapötik İlaçlarla Kombinasyon Sonuçları	61
4.4.1. SI-1 ile 5-FU Kemoterapi İlacının Kombinasyon Sonuçları.....	62
4.4.2. SI-1 ile OX Kemoterapi İlacının Kombinasyon Sonuçları	67
4.4.3. GK-1 ile 5-FU Kemoterapi İlacının Kombinasyon Sonuçları	72
4.4.4. GK-1 ile OX Kemoterapi İlacının Kombinasyon Sonuçları	77
4.5. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Yapıların 5-FU veya OX ile Kombinasyonlarının Terapötik Etkilerinin FOLFOX ile Karşılaştırılması.....	82
4.5.1. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Yapı SI-1 ile 5-FU veya OX Kombinasyonunun Terapötik Etkinliklerinin FOLFOX Kombinasyonunun Karşılaştırılması.....	83

4.5.2. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Yapı GK-1 ile 5-FU veya OX Kombinasyonunun Terapötik Etkinliklerinin FOLFOX Karşılaştırılması.....	87
5. TARTIŞMA.....	91
KAYNAKLAR.....	100
ÖZGEÇMİŞ	I
BENZERLİK RAPORU	II



ETİK BEYAN

“HT-29 insan kolon adenokarsinom modelinde modifiye edilmiş bir biyoaktif fitokimyasal yapının terapötik etkinliğinin *in vitro* değerlendirilmesi” adlı bana ait olan tez çalışmamın bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bütün verileri ve bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, verilerde ve sonuçlarda herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimin yazımında yapay zeka yazılımları kullanmadığımı, diğer kaynaklardan elde ettiğim bilgi ve yorumlara tezimde uygun şekilde kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar bölümünde yer verdiğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sinem ÇALIN

İTHAF

Bu tezi aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışması süresince bana kattığı bilgi, verdiği destek ve tecrübeleri ile yol gösteren değerli danışman hocam Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Öğretim Üyesi Prof. Dr. İlker DIBIRDIK' a teşekkürü borç bilirim.

Tez dönemim boyunca kimyasal maddelerin sentezlenmesinde desteklerinden ve bilgilerinden dolayı değerli hocam Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Serap YILMAZ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Sevil ERDOĞAN'a ve teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar çalıştırmalarını gerçekleştirdiğim Tıbbi Biyokimya Anabilim dalının hücre kültürü laboratuvarının cihazlarından yararlanma imkânı veren Tıbbi Biyokimya Bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca verdikleri teknik desteklerinden dolayı öncelikle Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca bilgilerini, desteklerini esirgemeyen ve laboratuvar kullanımı ve teknik açıdan kolaylık sağlayan Arş. Gör. Dr. Rıza SERTTAŞ'a ve Arş. Gör. Tuğçe KARABAŞ'a teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışmasına maddi olarak destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

SİMGE VE KISALTMALAR

5-FU:5-Fluorourasil

CI: Combination Index (Kombinasyon İndeksi)

DRI: Dose Reduction Index (Doz Azaltma İndeksi)

ED50: Effective Dose (Terapötik Olarak Etkili Doz)

ER: Endoplazmik Retikulum

Fa: Affected Fraction (Etkilenen Fraksiyon)

FOLFOX: 5-Fluorourasil/Leucovorin ve Oksaliplatin Kombinasyonu

Fu: Unaffected Fraction (Etkilenmeyen Fraksiyon)

GK-1: 3-((5-hidroksi-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil) hepta-1,4,6-trien-3-iliden) amino)-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triol

IC50: Half-Maximal Inhibitory Concentration (Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu)

IL: İnterlökin

KRK: Kolorektal Kanser

mTOR: The Mammalian Target of Rapamycin (Rapamisinin Memeli Hedefi)

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

Ns: Nonsignificant (istatistiksel olarak anlamlı değil)

OX: Oksaliplatin

PI3K: Fosfoinositol 3 Kinaz

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SI-1: 3,4,5-trihidroksi-N-(2,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2H-piran-3-il) benzamid

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

ÖZET

“HT-29 insan kolon adenokarsinom modelinde modifiye edilmiş bir biyoaktif fitokimyasal yapının terapötik etkinliğinin *in vitro* değerlendirilmesi”, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2024.

Giriş ve Amaç:

Kolorektal kanser (KRK), Dünya’da en yaygın görülen üçüncü kanser ve en yüksek ölüm oranına sahip dördüncü kanser türüdür. KRK insidansı istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Kullanılan kemoterapötik ilaçların ciddi yan etkileri ve bu ilaçlara karşı çoklu ilaç direncinin gelişmesi tedavinin yetersiz kalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle kanser hücrelerine birçok yolak üzerinden anti-kanserojenik etki gösterebilen, minimal toksisiteye sahip ve kolayca modifiye edilebilir doğal biyoaktif bileşikler kullanılarak yeni ilaç adaylarının geliştirilmesi önem kazanmıştır. Tezimiz, doğal biyoaktif fitokimyasal bileşikler glikozamin, kurkumin ve gallik asidi kullanarak anti-kanser etkili mevcut tedaviye alternatif ilaç adayı öncü madde geliştirmeyi amaçlamıştır.

Gereç ve Yöntemler:

Kurkumin, gallik asit ve glikozamin kullanılarak hibrit yapıya sahip yeni biyoaktif molekül türevleri olan SI-1 ve GK-1 sentezlenmiş, ¹H-NMR, FTIR ve LC/MS analizleri ile yapı karakterizasyonları yapılmıştır. Moleküllerimizin, KRK tedavisinde kullanılan oksaliplatin (OX), 5-fluorourasil (5-FU) ve kombine formu FOLFOX’a karşı anti-kolon kanser fonksiyonu HT-29 hücreleri kullanılarak MTT deneyleri ile incelenmiş ve GraphPad Prism-8 ile IC₅₀ değerleri elde edilmiştir. Takibinde sentezlediğimiz kimyasallar FOLFOX’un bileşenleri olan OX ve 5-FU ile kombine edilerek MTT verileri değerlendirilmiştir. Kombinasyonlar içindeki etkileşimler Chou-Talalay metoduna göre CompuSyn Software aracılığıyla yorumlanmıştır.

Bulgular:

Yapı analiz sonuçları SI-1 ve GK-1’in başarıyla sentezlendiğini doğrulamış, MTT analizleri ise anti-kolon kanser etkiye sahip olduklarına işaret etmiştir. 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda IC₅₀ değerleri sırasıyla SI-1 için 333 µM ve 56,65 µM, GK-1 için 314,5 µM ve 178,8 µM, 5-FU için 419,7 µM ve 143,8 µM ve OX için ise 26,11 µM ve 16,76 µM olarak bulunmuştur. İlaveten deneylerimiz SI-1 ve GK-1 ile 5-FU ve OX kombinasyonlarının HT-29 hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe etme oranlarının konvansiyonel terapötik FOLFOX’tan daha etkin olduğunu vurgulamıştır. CompuSyn analizleri, FOLFOX bileşenleri 5-FU ve OX’un çoğunlukla antagonistik ilişkisine işaret

ederken, SI-1 ve GK-1'nin 5-FU ve OX ile kombinasyonları büyük çoğunlukla sinerjetik etkileşim göstermiştir.

Sonuç:

Ürünlerimiz SI-1 ve GK-1, in vitro insan kolon adenokarsinom HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstererek proliferasyonlarını baskılamıştır. Ürünlerimiz konvansiyonel terapötik FOLFOX'un bileşenleri olan OX ve 5-FU ile ayrı ayrı kombine edildiğinde, kanser hücre proliferasyonunu baskılama yeteneklerinin FOLFOX'tan daha etkin olduğu bulunmuştur. Deneylerimiz özgün kimyasal yapılarımız SI-1 ve GK-1'in insan anti-kolon kanser fonksiyonlu ilaç adayı öncü molekül olarak eşsiz potansiyellerini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Kolon kanseri, ilaç keşfi, 5-fluorourasil, oksaliptin, FOLFOX

Destekleyen Kurum: Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2023/164

ABSTRACT

“*In vitro* evaluation of the therapeutic efficacy of a modified bioactive phytochemical structure in the HT-29 human colon adenocarcinoma model.”, Trakya University, Institute of Health Science, Department of Medical Biochemistry, Master's Thesis, Edirne, 2024.

Background and Aim:

Colorectal cancer (CRC) ranks third globally in cancer incidence and fourth in cancer-related mortality, with its prevalence on the rise. Chemotherapeutic drugs' severe side effects and the emergence of multi-drug resistance hinder treatment efficacy. Hence, developing novel drug candidates from natural bioactive compounds capable of multi-pathway anti-carcinogenic effects with minimal toxicity is imperative. Our thesis aims to create precursor molecules for alternative anti-cancer drugs using bioactive phytochemicals like glucosamine, curcumin, and gallic acid.

Material and Methods:

Hybrid bioactive molecules SI-1 and GK-1, which are derivatives of phytochemicals curcumin, gallic acid, and glucosamine, were synthesized and structurally characterized using ¹H-NMR, FTIR, and LC/MS analyses. The anti-colon cancer function of our molecules against oxaliplatin (OX), 5-fluorouracil (5-FU), and the combination therapy FOLFOX, commonly used in CRC treatment, was investigated using MTT assays with HT-29 cells. IC₅₀ values were obtained using GraphPad Prism-8. Additionally, the synthesized chemicals were combined with OX and 5-FU, the components of FOLFOX, and MTT data were evaluated. The interactions within the combinations were interpreted using the Chou-Talalay method via CompuSyn Software.

Results:

Structural analysis confirmed SI-1 and GK-1 synthesis success, and MTT assays demonstrated their anti-colon cancer properties. IC₅₀ values after 48 and 72 hours were as follows: SI-1, 333 μ M and 56.65 μ M; GK-1, 314.5 μ M and 178.8 μ M; 5-FU, 419.7 μ M and 143.8 μ M; OX, 26.11 μ M and 16.76 μ M, respectively. Our experiments also revealed that the combinations of SI-1 and GK-1 with 5-FU and OX inhibited the proliferation of HT-29 cells more effectively than the conventional therapeutic FOLFOX. CompuSyn analyses indicated that while the components of FOLFOX, 5-FU, and OX mostly exhibited an antagonistic relationship, the combinations of SI-1 and GK-1 with 5-FU and OX predominantly displayed synergistic interactions.

Conclusion:

Our products, SI-1 and GK-1, exhibited cytotoxic effects on in vitro human colon adenocarcinoma HT-29 cells, suppressing their proliferation. When our products were separately combined with the components of the conventional therapeutic FOLFOX, OX, and 5-FU, it was found that their abilities to suppress cancer cell proliferation were more effective than FOLFOX. Our experiments have highlighted the unique potentials of our original chemical structures, SI-1 and GK-1, as promising precursor molecules for human anti-colon cancer drugs.

Keywords: Colon cancer, drug discovery, 5-fluorouracil, oxaliplatin, FOLFOX

Financial Support: The present study was supported by the Research Fund of Trakya University. Project No: 2023/164



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser Dünya’da en sık görülen kanser türlerinden biridir (1). İnsidansı ve mortalitesi her geçen yıl artmaktadır (1,2). Son yıllarda ileri yaşta olan hastalardan ziyade kolon kanserine yakalanan genç vakalarda artış görülmektedir (3,4). KRK insidansının ve mortalitenin azaltılması için erken tanı ve tedavi oldukça önemlidir (3). Bunun başarılabilmesi için tarama testlerinin sıklığının arttırılması ve teste tabi tutulan yaş aralığının genişletilmesi önerilmektedir (3).

Kanser, vücut hücrelerinin çeşitli nedenlerle tetiklenerek kontrolü sağlanamayan hücre bölünmesi ve bu hücrelerin metastazı ile tanımlanabilmektedir (5,6). Kanser hücrelerinin kendine özgü özellikleri arasında çevreden bağımsız bir şekilde kendilerini yönetmeleri, kontrolsüz çoğalmayı inhibe edici faktör ve sinyallerin mutasyonundan dolayı apoptozisten kaçmaları, kontrolsüz bölünebilme yetenekleri, anjiyogenezi tetikleme, çevre dokuları istila etme ve uzak dokuları işgal etme yetenekleri sayılabilir (6–8). KRK’nın oluşumunun altında yatan patogeneze; sporadik ve kalıtsal risk faktörlerine bağlı geliştiği belirtilmektedir (8,9). Çevresel etmenlere bağlı olarak gelişen sporadik vakalar kolon kanseri vakalarının yaklaşık %60’ından kalıtsal vakalar ise %40’ından sorumludurlar (8,9).

Kanser tedavisinde ilk basamak lokal olarak çoğalmış olan hücrelerin bölgeden cerrahi yöntemlerle uzaklaştırılmasıdır (10). Kanser hücrelerinin bölgeden uzaklaştırılamaması, metastazı veya nüksetmesi durumunda ise kemoterapi uygulanmaktadır (10). İleri seviyedeki KRK oluşumlarında kemoterapi, hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve radyasyon tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (10). Kolon kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ilaçlar arasında; 5-fluorourasil (5-FU), kapesitabin, irinotekan, oksaliptatin (OX) gibi ilaçlar ve bunların birlikte kullanımı [FOLFOX (5-FU+OX+leucovorin (LV)), CAPEOX (kapesitabin+OX) ve FOLFIRI (5-FU+irinotekan+LV)] gösterilebilir (4,11–14). Kanser hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle konvansiyonel tedavi güçleşmektedir (14). Bunun üstesinden gelmek için kullanılan ilacın dozu arttırılarak veya ilacın kombinasyonlarından yararlanılarak tedavinin daha etkin hale gelmesi sağlanmaktadır. Fakat bu durumda tedavide kullanılan ilacın arttırılan dozu ve uygulama süresinin uzun olmasına bağlı

olarak ilaç direnci ve ciddi yan etkiler ortaya çıkmaktadır (14–19). Ayrıca bu olumsuz etkiler hastalığın nüksetmesi, tümör hücrelerinin metastazı ve hastanın hayatını kaybetmesine neden olabilmektedir. İlerleyen yıllarda genç yaşta kolon kanseri vakalarının artacağı ve bu kanser hücrelerinin ileri yaştaki hastalardan farklı genetik ve histopatolojik davranışa sahip olabileceği bulunmuştur (20,21). Bu farklılıklar nedeniyle yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve ilaçların keşfedilmesi gerektiği belirtilmektedir (20,21).

İlaç keşfi 12-15 yıl süren uzun bir süreçtir (22). Bu süreç keşif öncesi, ilaç keşfi süreci, klinik öncesi, klinik süreç ve izleme olmak üzere 5 ana basamaktan oluşmaktadır (22). İlaç keşif basamağında birçok aday içerisinde seçilen aktif moleküllerin modifikasyonu ile geliştirilen öncü moleküller ortaya çıkmaktadır (22). Yeni ilaç keşfinde kullanılan kimerik molekül ile bu modifikasyonlar çok kolay yapılabilir (23). Bu molekül çok yönlü hedefleme, daha etkin sitotoksite, hedefe yönelik daha spesifik davranış ve daha güçlü anti-kanser etkili bir ilaç tasarım olasılığı mevcuttur (23). Kimerik moleküller kullanım alanlarına göre biyokonjugatlar, iki işlevli bileşikler, çok hedefli moleküller, kimera, hibritler ve tasarlanmış bileşikler gibi farklı isimlerle anılmaktadırlar. Bu moleküllerin en popüler olan doğal bileşik temelli hibrit moleküllerdir (24). Bu moleküller yapıyı oluşturan bileşenlerden daha etkili anti-kanser özellik göstermektedir (25,26). Bu çalışmada biyoaktif fitokimyasal olan kurkuminin ve gallik asidin glikozamin ile hibrit yapıları oluşturulmuştur.

Fitokimyasal bileşiklerin tarih boyunca hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanıldığı çeşitli kaynaklarda belirtilmiştir (17). Çoğu fitokimyasal bileşik biyolojik olarak aktif maddedir. Bu bileşikler, bitkiler tarafından kendilerini savunmak veya fizyolojik dengenin sağlanabilmesi için üretilen farmakolojik etkiye sahip biyoaktif yapılardır (17). Çoğunun kanser hücreleri üzerinde hücre döngüsünde kritik noktalar ve proapoptotik faktörleri etkileyerek apoptozisin tetiklenmesi gibi anti kanserojenik etkileri tespit edilmiştir (27–29). Çeşitli çalışmalar kurkumin, genistein, epigallokatenin-3-gallat, resveratrol, likopen, piperin, kuersetin, β -karoten, gallik asit, sülforafan, sinemik asit, silibinin ve diğer birçok fitokimyasalın kanser kök hücreleri üzerinde anti kanser etkileri olduğunu göstermiştir (30–41). Günümüzde de uluslararası ilaç federasyonları tarafından onaylanmış ilaçlar arasında antibakteriyel omadasiklik, antiviral oseltamivir fosfat, antiparazitik eflornitin, antikanser leucovorin, antidiyabetik akarboz ve multipl sklerozis ajanı dimetil fumarat gibi fitokimyasal kaynaklı ilaçlar

önemli bir yer tutmaktadır (42). Aynı zamanda antikanser ilaçların çoğunun irinotekan, leucovorin, deksametazon, vinorelbin, dosetaksel, epirubisin ve etoposid gibi fitokimyasal bileşiklerden türeyen ilaçlar olduğu dikkat çekicidir (28,42). KRK'nın önlenmesinde, tedavisinde, ilaç direncinin kırılmasında, metastazında ve nüksetmesinde fitokimyasal biyoaktif bileşiklerin etkin rol oynadığı görülmüştür (28,43). Bu bileşiklerin kanser hücreleri üzerinde aynı anda birden fazla sinyal yolağı üzerinden etkilerini gösterebildikleri ve sağlıklı hücrelerden ziyade tümörlü dokularda seçici olarak sitotoksik özellik gösterdikleri raporlanmıştır (48,50-54).

Kurkumin, zerdeçaldan elde edilen sarı renkli bir fitokimyasaldır. Kurkuminin, güçlü anti-kanser etkisinin yanında anti-inflamatuar, anti-diyabetik, ağrı kesici, anti-mikrobiyal, anti-ülser, yaşlanma karşıtı, kolesterol düşürücü, anti-oksidan ve kemopreventif etkileri de bulunmaktadır (47-52). Kanser hücrelerinde kurkumin, metabolik yollar, mikroçevre ortamı, apoptotik proteinler, apoptoz yolları, ilaç dirençleri ve hücre sağ kalım/ölüm reseptörleri üzerinden anti-kanser etki göstermektedir (34,53-56). Tümör hücrelerinde birçok farklı yolağı regüle edebilmesi kurkuminin güçlü anti kanser etkinliğinin nedeni sayılmaktadır (57).

Gallik asit, çay yaprağı ve meşe gibi bitkilerde bol bulunur (58). Emilimi ve biyoyararlılığı yüksektir (59). Gallik asidin, güçlü anti-kanser etkisinin yanında anti-bakteriyel, anti-apoptotik, yaşlanma karşıtı, anti-inflamatuar, anti-oksidan, ilaç direncini azaltma, obezite karşıtı ve kolesterol düşürücü etkilerinin de olduğu tespit edilmiştir (36,60-63). Gallik asit, kanser hücreleri üzerinde reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesini arttırarak, hücre büyümesini ve metastazı inhibe ederek, pro/anti apoptotik protein ve ölüm reseptörlerinin ekspresyonu regüle ederek, hücre döngüsünü düzenleyerek, mitokondri membran potansiyelinde değişime neden olarak ve ilaca direnci tersine çevirerek hücre proliferasyon yolları aracılığıyla anti-kanser etkisini gösterir (36,64-69).

Glikozamin, vücutta daha çok bağ dokusunda bulunan bir amino şekerdir. Osteoartrit tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (70). Son zamanlarda anti-kanser etkilerinin olduğu da tespit edilmiştir (71). Biyoyararlılığı yüksektir (72). *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalarla tümör oluşum riskini, mortaliteyi ve tümör hacmini azalttığı, apoptozisi indüklediği, metastazı, hücre farklılaşmasını, otofajiyi ve immün sistemi düzenleyerek anti-kanser etki gösterdiği bildirilmiştir (71,73-77).

Çalışmamızın amacı, KKK hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösteren ve/veya mevcut kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığında bunların etkilerini arttırabilen fitokimyasal temelli hibrit öncü molekül(ler) geliştirmektir.



2. GENEL BİLGİLER

Kanser, vücut hücrelerinin sürekli, hızlı ve kontrolsüz bir şekilde bölünmesiyle belirli bir dokuda oluşabilen ve vücudun diğer organlarına da yayılabilen bir hastalıktır (5). Kontrolsüz bölünme; proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarımından sorumlu genlerin mutasyonları sonucu hücre sağkalımı-ölümü arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır (6).

Kanser, erkeklerde kadınlara kıyasla daha yüksek sıklıkta görülmekle birlikte Dünya’da her yıl bin kişiden 2’sine kanser hastalığı teşhisi konmakta ve bin kişiden biri kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir (78). KRK günümüzde, 100 binde 19,5 insidans ile Dünya’da göğüs ve akciğer kanserinden sonra üçüncü en yaygın görülen ve 9,0 ölüm oranı ile en fazla mortaliteye sahip dördüncü kanser çeşididir (2). KRK’nın Türkiye’de 100 binde 20,6 insidans oranı ile en yaygın görülen dördüncü ve 100 binde 10,1 mortalite oranı ile beşinci sırada olan kanser türüdür (79,80).

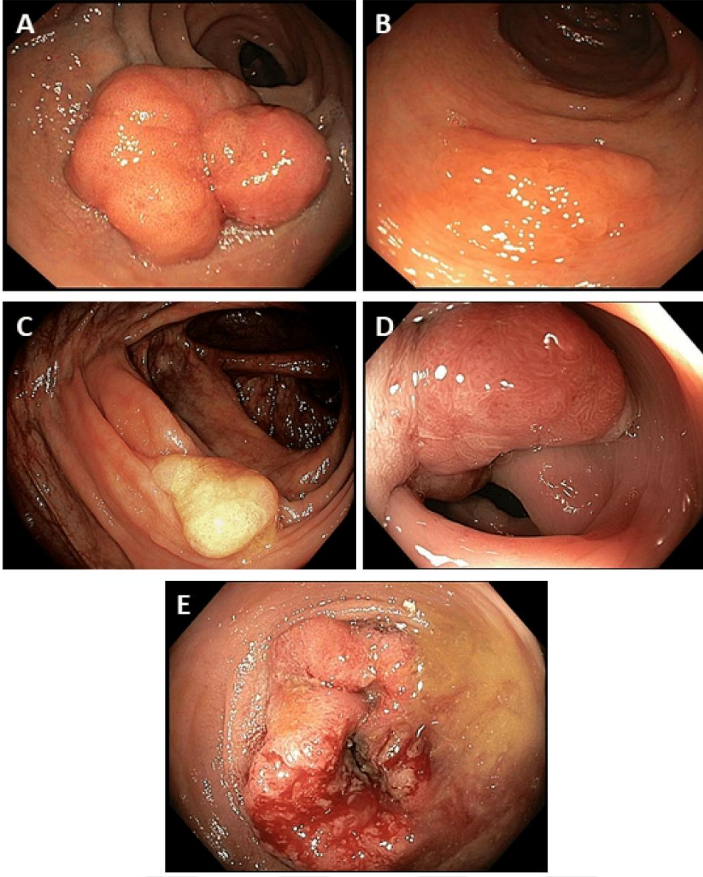
KRK geçmişten günümüze artan insidansa sahiptir (1). KRK’nın insidansının 2020 yılında %10 artış göstererek 1,9 milyon yeni hasta ekleneceğini ve mortalitesinin %9,4’e yükselerek 935 bin kişi olacağı rapor edilmiştir (81). Hastaların çoğu 45 yaş ve üzeri olmakla birlikte son yıllarda genç yaşta da vakaların arttığı görülmektedir (3). Gelecekte insidansının en çok artması beklenen iki kanser türünden biri de kolon kanseridir (82). 2030 yılına kadar genç nüfusta (20-34 yaş) kolon kanserinin %90, rektum kanserinin ise %124,2 artacağı tahmin edilmektedir (4). 2020 yılındaki mevcut hasta sayısının 2040 yılına kadar yaklaşık %49 ve mortalitenin yaklaşık %62 oranında artması, 2070 yılında ise kolon kanserinin diğer kanser türleri arasında 4,7 milyon yeni vaka sayısı ile en çok artan insidansa sahip kanser türü olması beklenmektedir (82-84).

Erken tanı ve tedavinin hastalığın seyrinde, iyileşmesinde ve sağ kalımda büyük önemi vardır (3). Yapılan değerlendirmelerde kolon kanseri risk taramasının yeterince yapılmadığı görülmüştür (3). Özellikle 45 yaş ve üzeri bireylerin tarama testlerini düzenli aralıklarla yaptırmaları önerilmektedir (3). Hastalara, hastalığa özgü semptomlar, tıbbi geçmiş, aile öyküsü, fiziki muayene, tümör gen durumunun belirlenmesi ve karsinoembriyonik antijen düzeyinin ölçülmesini içeren rutin laboratuvar sonuçlarına göre KRK tanısı konmaktadır (4).

2.1. Kolorektal Kanser Oluşumu

Kolorektal kanser, risk faktörlerine göre sporadik ve kalıtsal olarak kategorize edilmiştir (8). Tüm vakaların %60'ından sorumlu olan sporadik vakalar, diyet (yüksek bedensel kitle indeksi ve fazla yağlı ve düşük lifli beslenme) ve çevresel faktörlerden (sigara ve alkol tüketimi, sedanter yaşam), %40'ından sorumlu olan kalıtsal vakalar ise kolon kanseri aile öyküsü varlığından, genetik veya kalıtsal geçişlerden kaynaklanmaktadır (8,9).

İntestinal kök hücreleri kendini yenileyen özellik gösterirler her gün milyonlarca ölen hücrelerinin yerine yenisi gelmektedir (85). Bu hassas hemostatik denge epidermal büyüme faktörü (EGF), Wnt ve kemik morfolojik protein (BMP) gibi epitel dokudan salgılanan fizyolojik sinyallerle sağlanır (85). İntestinal kök hücre fonksiyonu ve kök hücrelerin olgunlaştığı kriptal çukurlarının oluşumu Wnt ligantlarına ve onun ko-faktörlerine, epitel hücrelerin farklılaşması ise BMP sinyaline bağlıdır (85). Kolon kanseri oluşumu, bu fizyolojik dengenin bozularak normal epitel hücrelerin farklılaşmaları sonucu kanser kök hücrelerine dönüşmeleriyle meydana gelmektedir (8). Kolonda tümörlü hücre oluşumu başlama, gelişme ve ilerleme olmak üzere üç basamakta incelenmektedir (9,86). Başlama evresinde, epitel hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümüne eğilimli hale getiren geri dönüşümsüz genetik hasar oluşur (87). Başlama evresinde oluşan genetik hasarlı epitel hücreler, gelişme evresinde aşırı çoğalarak kanserli dokuyu oluştururlar (87). İlerleme evresinde ise adenomatöz polipler (tübüler, villoz ve tubulo-villoz adenomlar) ve tırtıklı polipler gibi kanserin öncüsü olan iyi huylu lezyonlar tümör hücrelerine dönüşerek metastatik özellik kazanırlar (Şekil 2.1) (87).



Şekil 2.1. Kolorektal Tübüler adenom (A), Tubulo-villöz adenom (B), Tırtıklı adenom (C), Evre 1 tübüler adenokarsinom (D) ve Evre 2 tübüler adenokarsinom (E) evrelerine ait endoskopik görüntüler (87)

Kolon kanseri oluşumu moleküler düzeyde incelendiğinde; genetik ve epigenetik farklılaşma, moleküler ve morfolojik seviyede değişiklik, genomik stabilitenin kaybı ve kalıtsal kanser formu olmak üzere 4 temel patogenezin olduğu düşünülmektedir (8). Kolon kanserinin genetik instabilitesi ve patogenezinde; kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI) ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) yolları olmak üzere üç ana yol tanımlanmıştır (9). Bu moleküler yollar iyi huylu tümörün adenokarsinoma dönüşmesinde etkilidir (88). CIN, KRK adenokarsinom dönüşümünün yaklaşık %85'inden sorumludur. CIN yolunda *PTEN*, *APC* ve *TP53* gibi tümör baskılayıcı genlerin (TSG) inaktivasyonu, onkogenlerin (*KRAS* ve *BRAF*) aktivasyonu ve kromozom 18'in uzun kolunun fonksiyon kaybı görülür (9,88). Kanser geni atlas ağı analiz sonuçları bazı gen bölgelerinin kazanımının bazı bölgelerinin ise kaybının olduğunu göstermiştir (88). CIMP yolu, normal hücrelerde metillenmemiş olan promotör bölgede kanser hücresinde hipermetilasyon ve genel olarak DNA

hipometilasyonu ile ilişkilidir ve bu mutasyon TSG genlerin susturulmasına ve onkogenlerin aşırı ekspresyonuna neden olur (9). CIMP yolu KRK adenokarsinom dönüşümünün yaklaşık %17'sinden sorumlu iken DNA'yı onaran faktörlerin fonksiyon bozukluğu ile oluşan MSI yolu, KRK adenokarsinom dönüşümünün yaklaşık %15'inden sorumludur (88). DNA'yı onaran genlerde anormal DNA metilasyonu veya somatik mutasyon yoluyla etkisiz hale gelmişlerdir (89).

İntestinal boşluktaki kronik inflamasyonun varlığı normal epitel hücrelerin tümör hücrelerine dönüşümünü tetikleyebilmektedir. İnflamasyon durumunda makrofajlar aktif hale geçer. DNA hasarına ve *Tp53*, *c-src*, *KRAS*, *β-katenin* ve *adenomatöz poliosis koil (APC)* genlerinin mutasyonuna yol açabilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve nitrik oksit sentetazın, pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-11 ve IL-22) ve TNF alfa'nın salınımını gerçekleştirir. TNF alfa, T hücreleri ve fibroblastları uyarak IL-17, IL-22, IL-6, epiregulin (EREG), heparin bağlı EGF benzeri büyüme faktörü (HBEGF) ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) salınımını uyarır. Epitel hücrelerde ve tümör hücrelerinde, sitokin ve genotoksik maddeler, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT3)'ün gen aktivasyonuna neden olurken EREG ve HBEGF ise hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) geninin aktivasyonuna neden olur. STAT3 ve ERK genlerinin aktifleşmesi epitel hücrelerin başkalaşmasına yol açar. VEGF tümör hücrelerinde besin ve oksijen sağlamak için anjiyogenezi destekler. Sitokinler ve genotoksik maddeler otofajiyi destekler. Otofaji ile apoptozis birbiri üzerinde etkilidir. Biri aktif iken diğeri baskılanır. Otofaji aktif olduğunda rapamisin memeli hedefini (mTOR) inhibe eder. Otofaji, ERK1/2 ve AMP ile aktifleştirilen protein kinazı (AMPK) aktive eder bu da hücrenin hayatta kalmasını destekler (90).

APC/Wnt/*β-katenin*/Tcf yolunun kanser oluşumunun başlamasında, kanser hücrelerinin kendini yenilemesinde ve gelişmesinde önemli etkisi vardır (9). Wnt ile uyarılmamış hücrelerde *β-katenin* (fosforile form), AXIN (eksen inhibisyon proteini), APC ve GSK-3 β (glikojen sentaz kinaz 3 β) ile kompleks formda bulunur. Bu kompleks *β-katenin*'in bozunmasına aracılık ettiği için bozunma kompleksi olarak adlandırılmaktadır. Wnt sinyali reseptörlere bağlandığında *β-katenin*'in defosforile formu sitoplazmada artar çekirdeğe geçerek birikir. Biriken *β-katenin* çekirdekte T hücrelerine özgü faktör (TCF)/lenfoid arttırıcı bağlama faktörü (LEF) ile kompleks oluşturarak pro-onkogen olan *myc* ve *siklin D1*'i de kapsayan hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (91).

APC geni, farklı bağlanma bölgelerine sahip olup hücre proliferasyonu, migrasyonu ve apoptoz dahil birçok süreçte yer almaktadır (9). Bu gendeki mutasyon sonucu etkisinin azalması β -katenin birikmesine pro-onkogenlerin transkripsiyonunun artmasına neden olur (91). *APC* geninde oluşan çok sayıda mutasyon kalıtsal vakalarda karşımıza çıkmaktadır (92).

TP53 geni, strese yanıt olarak etkinleşir ve ‘genomun koruyucusu’ olarak bilinmektedir. Kolon kanseri vakalarının çoğunda bu gende mutasyon veya fonksiyon kaybı görülmektedir (9). *TP53* tümörün baskılanmasına da katkıda bulunur (93). DNA onarımı, hücre döngüsü, yaşlanma ve apoptoz ile ilgili proteinleri kodlamaktadır (9).

2.2. Kolon Kanseri Sınıflandırılması

Kolorektal kanser sınıflandırması, tedaviye karar verilmesi, prognoz tahmini histopatolojik özelliklere dayanmaktadır (11). Kolon kanseri tedavisinde cerrahi müdahaleler, radyoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi kullanılmaktadır. Erken evrede cerrahi müdahale, eğer tümör büyükse cerrahi müdahale öncesi kemoterapi ve müdahale sonrasında nüksetme riskine ve kalan kanser hücrelerine karşı adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır. Kolon kanserinin ileri evresinde tedavide ilk basamak olarak kemoterapi kullanılmaktadır. Gen (*KRAS* ve *BRAF* gibi) mutasyonları olan hastalar için hedefe yönelik tedavi ve kemoterapi birlikte uygulanmaktadır. MSI veya dMMR gibi genetik belirteçlere sahip kanser hücrelerinde immünoterapi ilaçları kullanılmaktadır. Metastatik kanser için radyasyon terapisi, kriyoablasyon veya radyofrekans ablasyonu gibi lokalize tedaviler ağrı, kanama hastalığı kontrol altına almada kullanılabilir (10).

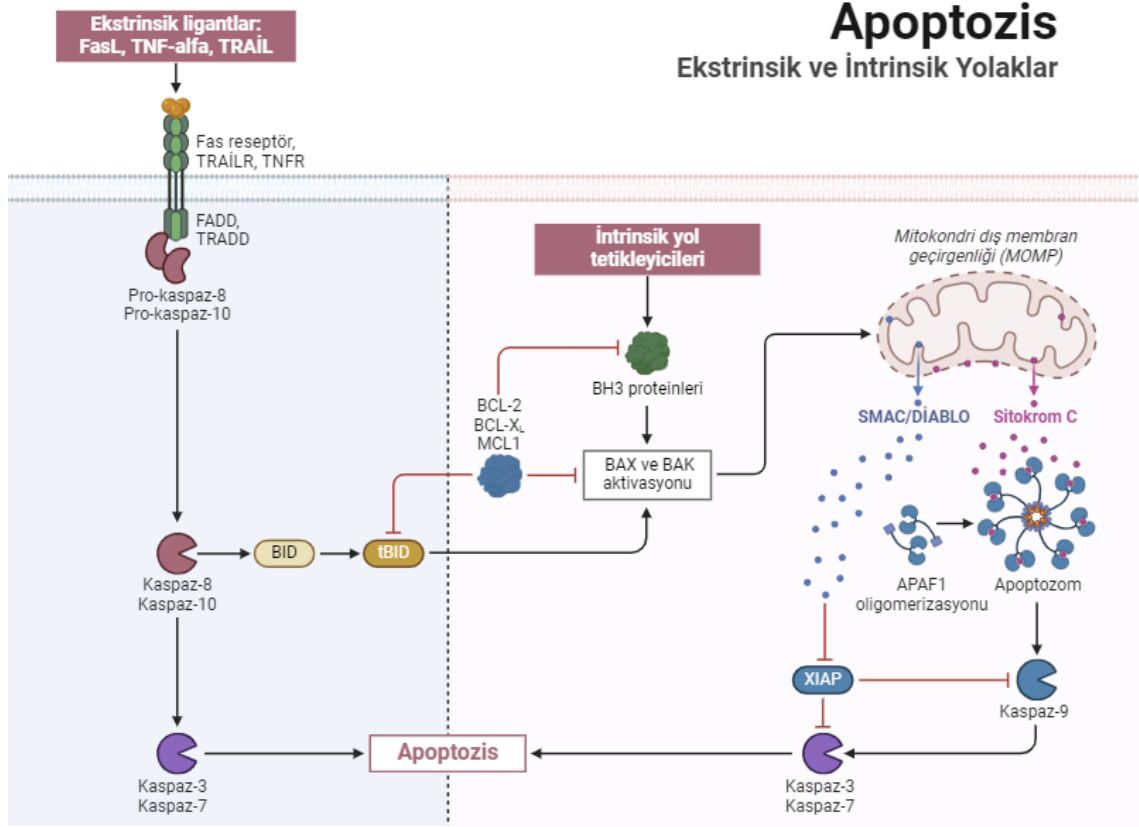
Amerikan Kanser Ortak Komitesi Evreleme sistemine göre, KRK, Primer Tümörün Tanımı (T), Bölgesel Lenf Nodu Evrelemesi (N) ve Uzak Metastaz Evrelemesi (M) kriterlerine göre 5 temel evreye ayrılmıştır (13). KRK, tümör boyutu, metastaz genişliği ve lenf nodu boyunca tümörlü hücrelerin yayılımına göre 0’dan IV’e kadar evrelere kategorize edilmiştir (94).

2.3. Apoptozis

Apoptoz, hücrenin bir ölüm sinyaline yanıt olarak oluşturduğu programlı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Apoptozis ekstrinsik ve intrinsik olarak iki farklı yol ile tetiklenmektedir (Şekil 2.2). Ekstrinsik yol, ligantına özgü transmembran reseptörleri yoluyla hücreyi ölüme götürecek hücre dışındaki sinyali hücre içine iletir. Bu reseptörler ölüm reseptörü olarak bilinmektedirler ve TNF reseptör (TNFR) süper ailesi üyesidirler. TNFR1, Fas reseptörü ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörü 1 ve 2 (TRAIL-R1/R2) bilinen ölüm reseptörleridir. Reseptöre spesifik ligand bağlandığında reseptör yapısında oluşan oligomerizasyon aracılığıyla apoptozis başlatıcı grup-II kaspazlar aktifleşir. Başlatıcı kaspazlar, efektör kaspaz 3 ve 7'yi aktifleştirir. Kaspaz-3, DNA fragmentasyon faktör 45 (DFF45) ve 40 (DFF40) aktifleştirerek DNA fragmentasyonunu sağlar (7).

İntrinsik yol, mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER) tarafından tetiklenebilir. Mitokondri kaynaklı apoptozis, DNA hasarı, oksidatif stres ve hücre içi artmış Ca^{2+} konsantrasyonu gibi nedenlerle oluşan mitokondri hasarıyla tetiklenmektedir. Mitokondri kaynaklı apoptozis, B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ailesine ait pro- ve anti-apoptotik proteinlerin regülasyonu sonucu düzenlenmektedir. ER'da biriken yanlış katlanmış proteinler strese yol açar ve bu duruma duyarlı bazı faktörler hücre içi sinyal oluşturarak pro-apoptotik proteinleri aktive eder. Mitokondri kaynaklı intrinsik yol direkt olarak Bcl-2 ailesi ile veya ekstrinsik yolla BH3 etkileşimli alan ölüm agonisti (BID) ile etkileşimi yoluyla apoptozis tetiklenir. İntrinsik yola ve ekstrinsik yola etki eden Mcl1 (miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini 1), Bcl-XL ve Bcl-2 anti-apoptotik etki gösterir. Her iki yolla da mitokondri membranında bulunan Bcl-2 ile ilişkili X (BAX) ve B hücreli lenfoma 2 öldürücü (BAK) proteinler etkilenecek mitokondri dışı membran geçirgenliğinin artmasına neden olurlar. Mitokondri geçirgenliğinin artmasıyla serbestleşen Smac/DIABLO, (ikinci mitokondriden türetilmiş kaspaz aktivatörü/düşük pI'lı apoptoz bağlayıcı proteinin doğrudan inhibitörü) apoptotik proteinleri ve kaspaz-9'u inhibe eden faktör XIAP (X'e bağlı apoptoz proteininin inhibitörü)'i inhibe ederek ayrıca sitokrom c, APAF1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ile apoptozom oluşturarak ekstrinsik yolla intrinsik yolu birleştiren kaspaz-9'u aktive eder. ER kaynaklı intrinsik yolda ER stresi, proapoptotik faktörlerin C/EBP

homologous protein (CHOP) geni aracılığıyla transkripsiyonunu tetikleyerek apoptozis üzerinde etkisini gösterir (7).



Şekil 2.2. Apoptozisin ekstrinsik ve intrinsik yolları (95,96)

Tedavide kullanılan bazı ilaçlar apoptozis yoluna müdahale ederek anti-kanser etki gösterirler. Bu ilaçlardan biri olan etanercept ilacı ekstrinsik yolda etkili iken bir diğeri ise kinaz inhibitörü olan sorafenib intrinsik yolda etkisini göstermektedir (7).

2.3.1. Apoptozise Direnç

Kanser hücrelerinde bozulmuş pro-apoptotik ve anti-apoptotik faktörlerin ekspresyonu, ekstrinsik yolda bulunan hücre dışı ölüm sinyallerini algılayan ölüm reseptörlerinde fonksiyon kaybı veya ekspresyonun azalması apoptoza direnç ile ilişkilidir (7).

Kolon kanseri hücrelerinde apoptoza direnç, anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri üyesi olan Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 proteinlerinin artan ekspresyonları (97), pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi ve ER stres ile ilişkili apoptozda görevli olan Bcl-2 ile ilişkili

yumurtalık öldürücü (BOK) proteininin azalan seviyesi (98), apoptoz yolunda görevli bazı kaspazların mutasyonu (99–101), pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi ve intrinsik yolda apoptotik aktivite için gerekli olan Bcl-XL/Bcl-2 ilgili ölüm promoteri (Bad) mutasyonu (102) TP53 tümör baskılayıcı gen mutasyonundan kaynaklanan bozulmuş apoptozis yolu (9) ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar kanser oluşumunun tetiklenmesine ve kanser tedavisi sırasında kemoterapiye direnç neden olurlar (7).

2.4. Kolon Kanseri Tedavisinde Kullanılan Kemoterapötik İlaçlar ve Etkileri

Hastaların her birine tümör, lenf nodu ve metastaz evreleme (TNM) sistemine ait standart tedavi yaklaşımı uygulanmaktadır (11,13). Kolon kanseri hastalarında hastalığın evresi, şiddeti ve bireyin yaşı göz önüne alınarak ilaç bileşenleri, dozları, program ve uygulama yöntemine karar verilmektedir (4,11). Evre I-III arasında temel olarak tümörlü hücrelerin cerrahi yöntemlerle bölgeden uzaklaştırılması tercih edilmektedir. Riski yüksek evre II ve evre III için ek olarak bireyin tercihleri göz önüne alınarak adjuvan kemoterapi de 3-6 aylık bir süreçle tedaviye eklenir (11,18,103,104).

(Neo)Adjuvant kemoterapinin, hastalığın nüksetmesi, tümör büyüklüğü ve sağkalım üzerinde önemli etkileri olduğu görülmüştür (12,103,104). Bu tedavide 5-FU, kapesitabin, OX gibi kemoterapötik ilaçlar ve bunların birlikte kullanımı [FOLFOX (5-FU/LV ve OX), CAPEOX (kapesitabin ve OX), FOLFIRI (LV, 5-FU ve irinotekan)] uygulanmaktadır (4,11,12,13,14). Evre IV hastalıkta metastaz fazla olduğundan cerrahi müdahale diğer evrelere nispeten daha az kullanılabilir (11). Bu evrede temel tedavi kemoterapötiklerle müdahaledir (11). Bununla birlikte, kemoterapide kullanılan ilaçların kortikal körlük, duyuşal nöropati, ishal, kusma, kabızlık, baş ağrısı, nöbetler, kilo kaybı, anoreksi, felç, kas krampları gibi ciddi yan etkileri olduğu görülmüştür (18,19,105).

Kemoterapiye direnç tedavinin başarısız olmasına ve hastalığın nüksetmesine sebep olmaktadır (43). Bu direncin atlatılması stratejisinde gen terapisinin, kombinasyon terapisinin, yeni ilaç taşıma teknolojilerinin, ilaçların yeniden kullanılmasının, protein inhibitörlerin ve doğal bileşiklerin kullanılması yer almaktadır (43). En güvenli ve en hızlı etki gösterdiği için son yıllardaki kemoterapiye duyarlılığı artırma çalışmalarında en popüler seçimler arasında kurkumin, resveratrol gibi doğal bileşikler yer almaktadır (43).

Kanser hücrelerinde hücre döngüsünde yer alan önemli faktörlerde ve sinyal yollarında oluşan mutasyonlar, aşırı gen ekspresyonları ve gen susturma mekanizmaları tedavide dirençe sebep olur (106). KRK hücrelerinde aktifleşen Wnt/ β -catenin, NF- κ B ve PI3K/AKT yolları kemorezistansda hayati rol oynayan bazı faktörlerin aşırı ekspresyonuna neden olurlar (104). Timidilat sentaz, FOXO1 ve MAPK sinyal yolunun aşırı aktifleşmesi ve Bcl-2 stabilizasyonu ilaç direncini işaret etmektedir (106,107).

Bu çalışmada kolon kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-FU ve OX kullanıldığından dolayı bu kemoterapötik ilaçlara aşağıda daha detaylı bir şekilde değinilecektir.

2.4.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü İnhibitörleri (EGFRI)

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ErbB/HER ailesinin dört üyesinden biri olan tirozin kinaz aktivitesine sahip membran bağlı reseptördür. Ligand bağlı olmadığında monomer yapıda bulunan EGFR ligand bağlandığında homo/hetero-dimer yapıya dönüşür ve reseptörün tirozin kinaz aktivitesi hücre içi sinyal oluşumunu başlatır. Bilinen EGFR ligandları arasında EGF, amfirogulin, epiregulin (EREG), HBEGF, betaselulin, epigen ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) alfa vardır. Bu ligantların reseptör aracılı hücre içi sinyalleri, PI3K/AKT, RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK), JAK/STAT ve PLC γ 1/PKC yolları aracılığıyla iletilir. Hücre içi sinyaller çekirdekte transkripsiyonu başlatarak proliferasyonun, anti-apoptozisin, anjiyogenezin ve metastazın belirlenmesinde rol alırlar (108). Kanser hücrelerinde EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK (109) ve EGFR/PI3K/AKT/mTOR yolu inhibisyonu hücre proliferasyonunda azalma ile ilişkilidir (110,111).

Eritroblastik lösemi viral onkojen homolog (ERBB) ve EREG tümör oluşumu ile yakından ilişkilidir (112). ERBB ve EREG ekspresyon seviyesi normal hücrelerde düşükken tümör hücrelerinde ve tümör mikro çevresinde arttığı bulunmuştur. Bu faktörler EGFR'ye bağlanarak kanser oluşumunun ilerlemesine ve ilaç direncine neden olmaktadır (112).

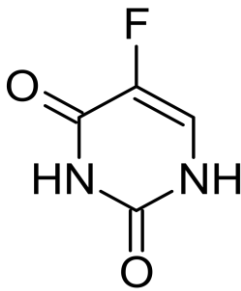
Epidermal büyüme faktörü reseptörü mutasyonları ve aşırı ekspresyonları kolon kanseri başta olmak üzere kanser türlerinde sıklıkla rastlanmaktadır (112-116). Uygun büyüme koşulları sağlandığında ligand bağlı EGFR hücre proliferasyonunu uyarır (116). EGFR sinyal yolu kanser hücresi metabolizmasında; glikolitik enzimlere (110,112), GLUT1 (110,112,117), GLUT-3 (112) ve SGLT-1 (118) gibi glikoz

taşıyıcılarına ve çeşitli mekanizmalar yoluyla glikoz mekanizmasına etki ederek glikolizin hızlanmasına, aerobik koşullarda bile glikolizin son ürününün kanser hücresinin bağışıklık hücrelerinden kaçışını sağlayan laktat olmasına, Warburg etkisine (116), sterol regülatör element bağlı protein-1 (SREBP-1), düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör (LDLR) ve steroil-KoA desaturaz-1 (SCD-1) (111) aracılığıyla kolesterol ve yağ metabolizması üzerinde etkilidir (112,116).

Metastatik KRK tedavisinde tirozin kinaz inhibitörleri sıklıkla kullanılır (14,119). EGFR hedefli tedavilere dirençli hücrelerin olası direnç mekanizmalarında PTEN fonksiyon kaybı, PI3K, *BRAF* ve *KRAS* mutasyonlarının (120) ve MAPK1 amplifikasyonunun rol oynadığı (112,119) rapor edilmiştir. Ayrıca NF-κB yolu aktivasyonu da tirozin kinaz inhibitörlerinin tedavisine karşı dirençle ilişkilendirilmiştir (119).

2.4.2. 5-Fluorourasil

1957 yılında geliştirilen antikanser aktiviteye sahip ilk kemoterapötik ilaçlardan 5-FU klinikte kullanılan dört pirimidin antimetabolitinden biridir (Şekil 2.3) (121,122). Günümüzde KRK ve diğer gastrointestinal kanserler başta olmak üzere birçok kanser türünün tedavisinde ilk basamakta kullanılmaktadır. 5-FU kemoterapide sıklıkla sağ kalımı arttırmak, ilaç direncini aşmak için OX ve irinotekan gibi çeşitli ilaçlarla kombine olarak kullanılmaktadır (15).



Şekil 2.3. 5-FU'nun yapısı

5-Fluorourasil, tümör hücresine kolaylıkla nüfuz edebilir ve DNA replikasyonu için gerekli olan dUMP-dTMP dönüşüm yolağını katalizleyen timidilat sentazın inhibisyonu yoluyla antitümör etki gösterir (122). Bu dönüşüm yolağında RNA ile

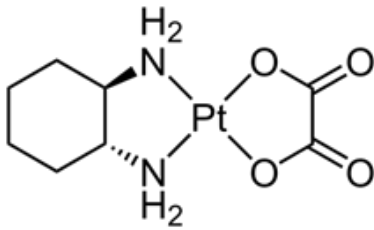
etkileşime girebilir ve urasilin yerine geçebilir (123). RNA'dan DNA oluşmasıyla DNA'nın yapısının bir parçası olup DNA'nın parçalanmasına neden olur (123). Sonuç olarak tümör hücresinin ölümüyle sonuçlanır (15). Aynı zamanda Bcl-2 ve Bcl-XL anti-apoptotik proteinlerin ve p53, AMPK ve mTOR yolaklarının regülasyonu aracılığıyla apoptoz ve otofajiyi artırır (124,125).

Uzun süreli kullanılan birçok kemoterapötığe karşı olduğu üzere 5-FU'ya karşı da tümör hücreleri tarafından direnç mekanizmaları gelişmektedir (15,16). 5-FU bazlı tedaviye direncin en önemli belirleyicisi *TP53* gen mutasyonudur (126). Bunun yanı sıra 5-FU kullanımı hastalarda, ateş, halsizlik, mukozit, stomatit, bulantı, kusma, ishal, lökopeni, nötropeni, trombositopeni, anemi, nöropati, deri döküntüsü, saç dökülmesi, ışığa duyarlılık ve el-ayak sendromu gibi yan etkilere neden olmaktadır (105,127). Ayrıca bilişsel disfonksiyon da önemli yan etkileri arasındadır (128,129).

2.4.3. Oksaliplatin

Platin bazlı ilaçların en yeni üyesi olan OX 1996 yılında geliştirilmiş 2004 yılında ise FDA tarafından onaylanmıştır (130,131).

Oksaliplatin (trans-1,1,2-diaminosikloheksanoksalo-platinum) hedef molekülü DNA olan KRK hastalarında sıklıkla kullanılan anti-tümörojenik ilaçtır (Şekil 2.4) (132). OX ve 5-FU, KRK tedavisinde sıklıkla birlikte kullanılmaktadır. Klinikte 5-FU ile kullanıldığında anti-kanser etkinin artmasına sebep olmaktadır (17).



Şekil 2.4. OX'un yapısı

Malign tümör tedavisinde ilk tercih olan OX plazmada hızlıca nonenzimatik transformasyonla bileşenleri dikloro (DACH) platinum ($Pt(dach)Cl_2$) ve oksalata ayrılır. Ardından $Pt(dach)Cl_2$ kompleksi nükleus içine girip DNA ile etkileşim yoluyla replikasyon ve transkripsiyonu inhibe eder (130).

Oksaliplatinin en yaygın yan etkisi ilaç nörotoksitesinden kaynaklanan nöropatidir (14). Diğer yan etkileri arasında vücut koordinasyon bozukluğu, işitme kaybı, bulantı, kusma, ishal, nötropeni, hipokalemi ve rabdomiyoliz bulunmaktadır (17). Yan etkileri azaltmak için doz ve uygulama zamanının azaltılması önerilmektedir (14).

2.5. Doğal Biyoaktif Fitokimyasal Bileşikler

Bitkiler, hayvanlar, mantarlar, deniz canlıları veya bakteriler tarafından üretilen farmakolojik etkiye sahip olan kimyasal maddelere doğal biyoaktif bileşikler olarak adlandırılır (17). Doğal biyoaktif bileşikler, kemoterapinin etkisini arttırmak ve kanser hücrelerinin tedaviye karşı geliştirdiği direnci azaltmak amacıyla kanser tedavisinde kullanılmaktadır (41). Aynı zamanda günümüzde Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından onaylanan birçok antikanser ilacı ve ilaç adayı bitki ekstraktlarından, hayvan biyolojik materyalinden ve mikroorganizmalardan elde edilen doğal biyoaktif bileşiklerdir (29).

Newman ve Cragg tarafından yapılan bir araştırmada 1981 ve 2019 yılları arasında FDA gibi uluslararası ilaç federasyonlarınca kullanımı onaylanan 1602 adet ilaç olduğu belirtilmiştir. Bu ilaçlar, botanik doğal ürün, değiştirilmemiş doğal ürün, doğal ürün türevi, öncüsü doğal ürün olan sentetik ilaç, sentetik ilaç, organizma veya hücreden elde edilen biyolojik ajan ve aşı olmak üzere kaynakları bakımından kategorilere ayrılmıştır. 1981-2019 yılları arasında onaylanan ilaçların tamamı içerisinde yaklaşık yarısının doğal ürünün veya onun sentetik yapısının kullanımı görülmektedir. 1946-2019 yılları arası onaylanan antikanser etkili ilaçların %63,5'i doğal ürün veya onun türevinden oluşmaktadır. Onaylanan doğal biyoaktif bileşik kaynaklı anti kanser ilaçlara örnek olarak kanser ağacı diye de adlandırılan *Camptotheca* ağacından elde edilen etken maddesi kamptotesin olan kolorektal kanser tedavisinde sık kullanılan irinotekan ve katarantin-vindoline doğal bileşiklerinin hibrit yapısının modifikasyonu ile oluşan akciğer kanserinin tedavisinde sık kullanılan vinorelbin gösterilebilir (42).

Kanser üzerinde denenen kimyasal maddeler hem tek bir hedef üzerinde etkilidirler hem de ciddi yan etkilere sahiptirler (91). Biyoaktif bileşikler ise kanser hücresine özgü metabolizmada sinyal yolları üzerinde birçok hedef üzerinde etkilidirler ve yan etkileri yok denecek kadar azdır. Biyoaktif bileşikler kanser kök hücreleri üzerinde Warburg etkisi ve glikoliz metabolizması, glikoz taşıyıcıları ve metabolizma

enzimleri, pentoz fosfat yolağı, trikarboksilik asit döngüsü, anaerobik solunum yolu, HIF-1, AMPK yolağı, ROS, oksidatif etki ve inflamasyon gibi kanser hücrelerinin gelişimi için önemli olan metabolik olaylar üzerinde düzenleyici etki gösterirler (133-136).

Fitokimyasallar, besinlerde makro ve mikro besin öğeleri dışında az miktarlarda bulunan fakat önemli etkilere sahip biyoaktif bileşiklerdir (17). Kimyasal yapılarına göre: terpenler, karotenoidler, fenolik bileşikler, alkaloidler, flavonoidler, stilbenler, kumarinler ve tanenler olarak sınıflandırılmaktadır (17). Kanser tedavisinde, teşhisinde ve önlenmesi aşamalarında etkili olabilecek birçok fitokimyasal üzerinde çalışılmaktadır. Bu fitokimyasalların hücre proliferasyonunu inhibe etme, hücre döngüsünü düzenleme, sinyal yollarını etkileme, hücre farklılaşması, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz üzerindeki etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (31-41,53,133-136).

Önemli flavonoidler arasında kurkumin, resveratrol, kuersetin, epigallocatekin galat (EGCG) ve antosiyaninler gösterilebilir. Birçok çalışmada KRK hücreleri üzerinde kurkumin, kuersetin, resveratrol, likopen, sinamik asit, EGCG, silibinin ve gallik asit gibi biyoaktif bileşiklerin anti-kanserojenik etki gösterdiği belirtilmiştir (36,37,137-139). Bu biyoaktif bileşiklerin KRK hücreleri üzerinde, kanser hücresi oluşumu riskini azalttığı, hastalığın nüksetmesini azalttığı, apoptozu tetiklediği, 5-FU aktivitesini desteklediği, glikoz metabolizmasını düzenlediği, PI3K/AKT/mTOR yolağı ve MAPK/ERK yolağını regüle ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (137).

Önemli karotenoidler arasında α -karotenoid, β -karotenoid, lutein ve likopen gösterilebilir. Bu biyoaktif bileşiklerin antioksidan etkileri ön plandadır. Karotenoidlerin KRK başta olmak üzere kanser hücrelerinde, WNT/ β -katenin yolunu modüle ederek mutajenezi, mRNA ve DNA ile etkileşime girerek hücre proliferasyonunu, tedavinin yol açtığı oksidatif stresi ve mTOR aktivitesini inhibe etmede önemli etkileri vardır (40). Wnt/ β -katenin sinyal yoluna hedefli şimdiye kadar porcupin inhibitörleri gibi kimyasal maddeler denenmiştir. Fakat yan etkilerden ve oluşan dirençlerden dolayı kliniğe ulaşamamış bu kimyasal maddelerin yerine fitokimyasallardan yararlanma ön plana çıkmıştır (91).

Lahana gibi turpgillerde bulunan 3,3'-diindolilmetan, β -kateninin fosforillenmesini destekleyerek kararsız formda kalmasını sağlar ve aynı zamanda

nükleusa geçmesini engellemektedir (140). Yapılan bir çalışmada, 3,3'-diindolilmetan hepatoselüler kanser hücrelerinde p38-MAPK sinyal yolu aracılığıyla hücre içi Ca^{2+} ve kaspaz-3 seviyesini arttırarak ve apoptotik kaspaz yolu faktörlerini etkileyerek apoptozisi desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca fosforile AKT protein seviyesini azalttığı ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir (140). Başka bir çalışmada 3-diindolilmetanın, hücre canlılığını inhibe ettiği, siklin B ve E ekspresyonunu azalttığı, hücre içi ROS miktarını, pro-apoptotik proteinlerin, CHOP ve p21 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür (141). Sırasıyla siklin B ve siklin E seviyesindeki azalma hücre döngüsünün G_2/M ve G_1 fazında durduğunun belirtecidir (140). Ayrıca ROS, BAX, fosforile p38 ve p53 seviyelerini arttırarak ve anti-apoptotik Bcl-2 seviyesini azaltarak intrinsik apoptotik yolda etkili olduğu gösterilmiştir (140,141).

Ruvinov ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada limon otu ekstraktının HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücreleri ve NCM-460 sağlıklı kolon mukoza hücreleri üzerinde antikanser aktivitesi araştırılmıştır. HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde apoptotik etki gösterirken NCM-460 hücrelerinde bu etkinin olmadığı gösterilmiştir. Limon otu ekstraktının tek başına uygulanmasının ROS üretimini ve mitokondri membran geçirgenliğini arttırdığı görülmüştür. *In vitro* ortamda Limon otu ekstraktının tek başına uygulanması ve FOLFOX veya Taxol ile kombine edilip uygulanması, bu kemoterapötik ilaçların tek başlarına uygulanmasına kıyasla daha etkili anti-kanser aktivite göstermiştir. Fareler üzerinde yapılan çalışmada ise limon otu ekstraktı ile FOLFOX kombinasyonunun uygulanması tümör hacminde ve ağırlığında belirgin bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca limon otu ekstraktının APC geni mutant farelerde kansere karşı koruyucu olduğu da belirtilmiştir (45).

Soya fasulyesinde bulunan bir flavonoid olan genisteinin, kanser hücrelerinde antikanser etkinliği araştırılmıştır. Sitokrom c ve BAX seviyesinde artma, Bcl-2 seviyesinde azalma ve ROS üretiminde artışa bağlı olarak mitokondri membran geçirgenliğinde artma ile apoptozu desteklediği ve hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (35,141). Ayrıca FOXO3a ve PUMA ekspresyonunda artış rapor edilmiştir (35). Hücre döngüsünde siklin B ekspresyonunda azalmaya yol açarak hücre döngüsünü G_2/M fazında durdurduğu gösterilmiştir. P21 ekspresyon seviyesinde artışa neden olarak melanom hücrelerinin morfolojisini değiştirdiği görülmüştür (141). ER bağlı apoptozu, hücre içi ROS miktarını indükleyerek Nrf2 ekspresyonunda azalmaya, ayrıca apoptoz proteinlerinin ve CHOP ekspresyonunda artışa neden olarak desteklediği

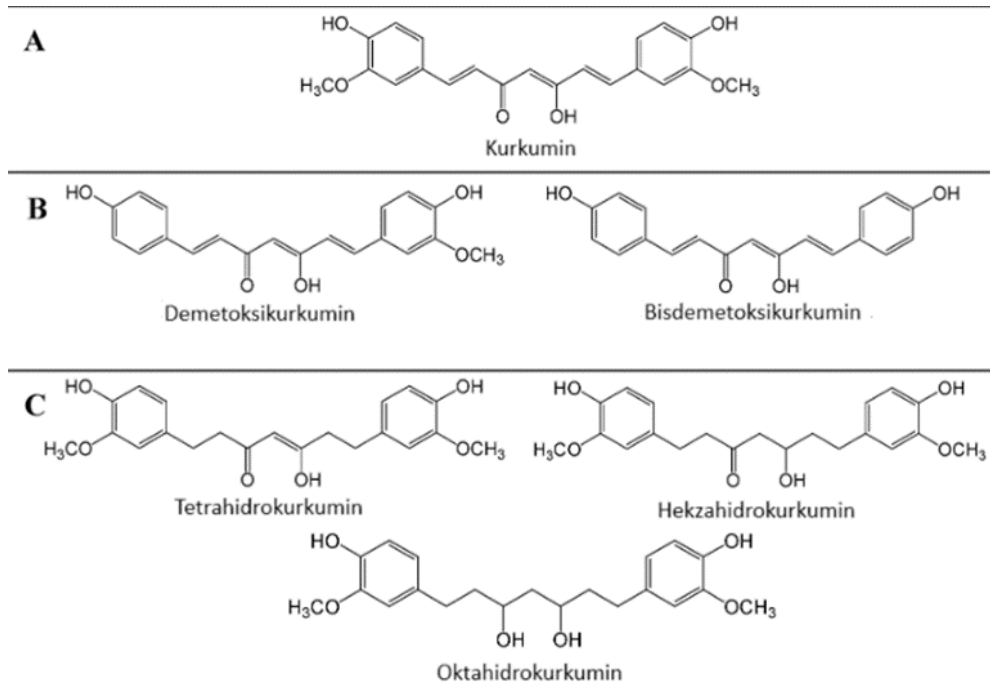
gösterilmiştir (141). Ayrıca BAX, fosforile p38 ve p53 seviyesini arttırarak ve Bcl-2 protein seviyesini azaltarak apoptotik mitokondriyel yolda etkili olduğu gösterilmiştir (141).

Kolon kanseri tedavisine biyoaktif fitokimyasal bileşiklerin eklenmesi, kemoterapötik ilaçların etkileyemediği kanser kök hücrelerinin kendini yenilemesini ve kanserin nüksetmesini engelleme gibi önemli hücrel olaylar üzerinde etkin olabilir. Ayrıca bu fitokimyasallar, pentoz fosfat, AMPK, JAK/STAT yolağı gibi apoptoziste ve trikarboksilik asit döngüsü gibi kanser hücresinin büyümesinde rol oynayan hücrel metabolik olayları etkileyebilmektedirler. Tedaviye ek olarak kullanımlarının güvenli olması, bitki ekstraktlarından veya sentetik olarak kolayca elde edilebilir olmaları ve kolaylıkla modifiye edilerek yeni molekül geliştirmek için olanak verebilmeleri avantaj sağlayabilmektedir (27).

Fitokimyasal dünyası anti-kanser etkili bileşikler açısından çok zengindir. Tezimizde bunlardan kurkumin, gallik asit ve glikozaminin yeni kimyasal yapıların oluşturulmasında değerlendirilmiştir.

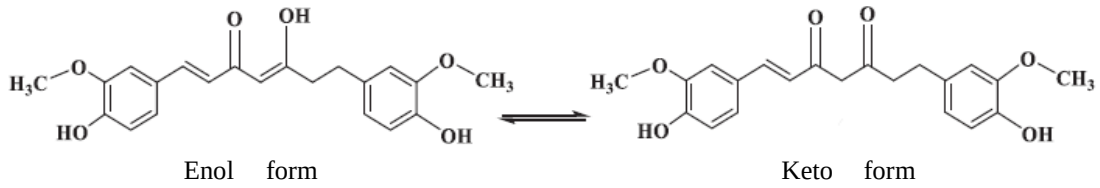
2.5.1. Kurkumin

Kurkumin, zerdeçaldan (*Curcuma longa*) izole edilen ve aynı zamanda biyosentez yoluyla da elde edilebilen önemli bir fitokimyasaldır (142). Zerdeçalın en önemli etken maddesi kurkuminoidlerdir. Kurkuminoidler yaygın olarak baharat, pigment ve katkı maddesi olarak kullanılan fenolik bileşiklerdir (143). Kurkumin, kurkumin demetoksi türevleri ve hidrojene kurkumin türevi olmak üzere üç majör kurkuminoid vardır (Şekil 2.5) (142). Yapılan kapsamlı araştırmalar, kurkuminoidlerin birçok önemli işlevi olduğunu ortaya çıkarmıştır (143). Bu fitokimyasal anti-inflamatuar, anti-diyabetik, ağrı kesici, anti-mikrobiyal, anti-ülser, yaşlanma karşıtı, kolesterol düşürücü, anti-oksidan, kansere yakalanma riskini azaltma ve anti-kanser gibi birçok etkisinin olduğu bulunmuştur (17,47–50,52). Antikanser etkisi güçlüdür çünkü kanser hücrelerinde hayati öneme sahip birçok hedef yoluna spesifiktir ve kanser hücrelerine özgü toksisite gösterir (46).



Şekil 2.5. Kurkumin (A), Kurkumin demetoksi türevleri (B), Hidrojene kurkumin metabolitlerinin (C) kimyasal yapısı (144)

Kurkuminin IUPAC adlandırılması (1E,6E)-1,7-Bis (4- hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione’ dur. Molekül formülü $C_{21}H_{20}O_6$ molekül ağırlığı 368.38 g/mol dur. Kurkuminin temel yapısındaki metoksi ve fenolik grup içeren 2 aromatik halka arasında α ve β doymamış karbonil grupları içeren 7 karbon atomu uzunluğunda zincir bulundurur. Zerdeçalın sarı rengini veren polifenol kurkumin keto-enol tautomerizmi sergiler (Şekil 2.6) (144). Kurkumin keto formunda bulunan β diketon kalıntısı kimyasal çevre ile etkileşime açıktır. β diketon kalıntısının H—H bağı kurması, birçok enzimde de bulunan metal iyonlarıyla kolaylıkla bağ kurabilmesi, aromatik hidroksil grubunun H—H bağı kurabilmesi ve birçok hedef ile moleküler içi etkileşimlerden sorumlu C—C bağı arasında rotamerizasyona neden olduğundan moleküller arası etkileşime ve hedef molekül ile reaksiyona girmesini kolaylaştırmaktadır (142).



Şekil 2.6. Kurkuminin enol ve keto formları

Kurkumin çok yönlü güçlü anti-kanser etkisini, hücre proliferasyonu, hayatta kalması ve apoptozisi gibi hücrenin kaderini belirleyen yollar üzerinde göstermektedir (57,139,142,145). Yapılan bir çalışmada kurkuminin, karaciğer, mide, kolon, meme, renal, serviks, prostat ve akciğer kanseri hücreleri üzerinde HIF-1 aktivasyonunu engellediği, tümör hacmini azalttığı, HIF aktivasyonu için gerekli olan aril hidrokarbon reseptör nükleer translatör faktörün yıkılımını sağladığı ve hipoksik hücrelerde HIF aracılığıyla artan EPO ve VEGF proteinlerinin ekspresyonunun azalttığı bulunmuştur (56). Göğüs kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise sitotoksiteyi arttırdığı, kaspaz 3 ve 9 aktivitesini artırarak apoptozisi indüklediği, miR-21 ekspresyonunu azalttığı, PTEN protein ekspresyonunu arttırdığı ve p-Akt protein ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (55). HT-29 kolon kanseri hücrelerinde kurkuminin artan dozuna ve artan zamana bağlı olarak sitotoksitenin arttığı ve kurkuminin en düşük konsantrasyonda uygulandığında bile KRC hücrelerinde artmış ekspresyonu ile bilinen siklooksijenaz 2 (COX-2)'nin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (146).

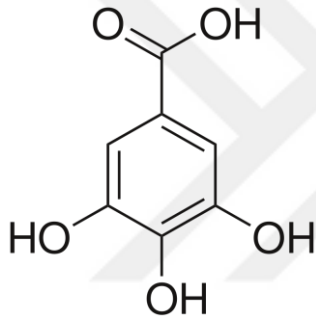
Kurkumin hem kanser tedavisinde kullanılan kimyasalların zararlı etkilerini önleyicidir hem de kanser hücrelerini tedavide kullanılan ilaca duyarlı hale getirir (137). Kurkumin KRC hücresinde apoptoziste rol oynayan Bcl-2 ailesinin (BAK, Bcl-2, BAX ve Bcl-XL), BH3 proteinlerinin (BIM, BAD ve BID), kaspaz proteinlerinin (kaspaz-3 ve kaspaz-8), ölüm reseptörlerinin (DR5, TRAIL ve Fas), kanser metabolizması önemli faktörlerinin (Wnt/ β -catenin, NF- κ B, AP-1, PPAR- γ ve p53), COX-2 ekspresyonunu ve PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağını, ER kaynaklı apoptozis yollarını, TGF- β yolağını, ROS kaynaklı apoptozisi düzenleyerek hücre göçü, invazyonu, başkalaşım ve metastazı inhibe ettiği görülmüştür (51,54,142,147–149).

Kurkumin birçok kanser türü için apoptozisi indüklemesine rağmen Bbazı akciğer, böbrek, prostat ve serviks kanser hücre tipleri apoptozise karşı direnç gösterebilmektedir (142). 5-FU ve kurkuminin tek başlarına uygulanmasına kıyasla

kombinasyon şeklinde uygulanması KRK hücrelerinde ERK1/2 ve STAT1 aktivasyonunda düşüşe, metastazda azalmaya ve anti-apoptotik faktörlerin protein seviyelerinde düşüşe neden olarak apoptozu tetiklemede, hücre proliferasyonunu inhibe etmede ve tümör büyümesini azaltmada daha etkili olduğu görülmüştür (150,151).

2.5.2. Gallik Asit

Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit), molekül formülü $C_7H_6O_5$ ve molekül ağırlığı 170.1 g/mol olan fenolik bileşiktir (Şekil 2.7). Çay yaprağı, meşe ve fındık gibi birçok bitkinin yapısında bulunur (59). Gallik asidin biyoyararlılığı yüksektir, bağırsaklardan emilimi yaklaşık %70 olarak bulunmuştur (60).

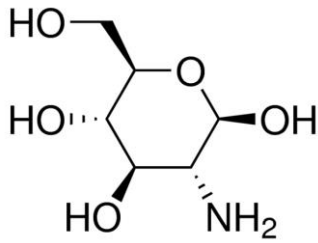


Şekil 2.7. Gallik asidin yapısı

Gallik asitin, anti-bakteriyel, anti-apoptotik, yaşlanma karşıtı, anti-inflamatuar, anti-oksidan, ilaç direncini azaltma, obezite karşıtı, kolesterol düşürücü ve anti-kanser etkileri vardır (44,60,62,64,65,152). Birçok kanser türünde PTEN, EGF, PI3K/Akt/NF-kB yolağı, *TP53* ve Mcl-1 ekspresyonu, hücre döngüsü, reaktif oksijen türleri seviyesi, mitokondri membran potansiyeli, pro/anti-apoptotik protein ve ölüm reseptörleri ekspresyonu gibi farklı yolları düzenleyerek hücre ölümünü, büyümesini ve metastazını kontrol etmekte ve anti kanser etki göstermektedir (44,61,65–69,153–157). Ayrıca gallik asit kanser hücrelerine sitotoksik etki gösterirken sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkisi olmadığı görülmüştür (44).

2.5.3. Glikozamin

Glikozamin (2-amino-2-deoksi-beta-D-glikopiranoz), vücutta doğal olarak oluşan bir amino şekerdir (Şekil 2.8) (40). Formülü $C_6H_{13}NO_5$ ve molekül ağırlığı 179,174 g/mol dur (158). Daha çok kıkırdak gibi bağ dokularda bulunur ve kondroitin, heparin ve hyaloronik asit gibi yapısal moleküllerin esansiyel yapı taşını oluşturur (70). Glikozaminin farmakolojik olarak etkin üç formu (glikozamin hidroklorit, glikozamin sülfat ve N-asetil glikozamin) bulunmaktadır (159). En iyi absorbe olan ve yarılanma ömrü en uzun olan glikozamin türevi glikozamin sülfat olup oral yolla alındığında yaklaşık %90'ının absorbe edildiği belirtilmiştir (159).



Şekil 2.8. Glikozamin yapısı (158)

Osteoartrit tedavisinde popüler olarak kullanılan glikozamin son yıllarda kanser çalışmalarında da kullanılmaktadır. Glikozamin alımının bireylerde kolorektal kanserde başta olmak üzere birçok kanser türünde tümör dokusu oluşum riskini ve mortaliteyi azalttığı bulunmuştur (74–77,94). Kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığında apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (160). Glikozamin hücre içi bir dizi faktörü etkileyerek RNA etkileşimi, hücre farklılaşması, seçici olarak kanser hücresi membran yapısını değiştirmesi, otofaji, proteozom aktivitesi, anjiyogenez, hücre döngüsü, tümör hücresi büyümesi ve metastazı üzerinde etkisi gösterilmiştir (71,73,161,162). Oral yol ile alındığında bile immün sistemi, apoptozisi tetikleyerek ve tümör hacminde azalmaya neden olarak anti tümör etki gösterdiği görülmüştür (71,72).

2.6. İlaç keşfi

İlaç keşfi, yeni farmasötik bileşiklerin keşfedildiği ve kullanıma sunulduğu süreçtir (163). İlaç keşfi, keşif öncesi, ilaç keşfi süreci, klinik öncesi, klinik süreç ve izleme aşaması olmak üzere 5 temel aşamadan oluşan yaklaşık 12-15 yıllık bir serüvenden

oluşan uzun bir süreçtir (164). Keşif öncesi süreç, ilgilenilen hastalıkla bağlantılı işlevi bozulan/değişen/artan makromolekölün veya sinyal yolağının mekanizmaları hakkında detaylı bir araştırmayı ve bu hastalığa spesifik terapötik hedeflerin tanımlanmasını kapsamaktadır (163). İlaç keşfi süreci, hastalıkta tanımlanan spesifik hedefler üzerinde etkili olabilecek muhtemel terapötik ajanların araştırılmasını ve modifiye edilerek geliştirilmesini kapsamaktadır (22). Klinik öncesi süreç, terapötik ajanların *in silico*, *in vitro* ve *in vivo* araştırılmasını, potansiyel ilaçların güvenliğinin test edilmesini ve ilaç adaylarının belirlenmesini içermektedir (22). Aynı zamanda bu süreçte ilaç adayının emilim, dağılım, metabolizma ve atılım çalışmaları da yürütülmektedir (163). Klinik fazdan önce bulunan ilaç adayının Araştırma Amaçlı Yeni İlaç (IND) statüsü altında uluslararası ilaç federasyonlarına başvuruda bulunulur. Başvurunun onaylanmasının ardından klinik süreç başlatılır (165). Bir ilaç adayının klinik sürece geçebilmesi için öncelikle stabil bir molekül yapısına, kabul edilebilir bir çözünürlüğe, hedefe yüksek afinite ile *in vitro* ve *in vivo* etkinliğe ve yarılanma ömrüne sahip olması gerekir. Ayrıca kardiyak toksisite (hERG bağlanması), genotoksisite ve hepatotoksisite göstermemelidir (165). Klinik süreç, faz I, faz II ve faz III ilaç adayının terapötik etkinliğinin insanlar üzerinde değerlendirilmesini kapsamaktadır (165). Faz I çalışmasında 20-80 sağlıklı birey ile ilacın güvenilirliği ve tolere edilebilirliği test edilmektedir. Faz II çalışmasında çeşitli popülasyonlarda aday ilacın güvenilirliğinin yanında 100-500 hasta ile terapötik etkinliği ve uygulama dozu test edilmektedir. Faz III çalışmasında aday ilacın terapötik etkinliği farklı ülkelerdeki 1.000-5.000 hasta ile randomize çalışmaları içerir. Bu fazda aynı zamanda ilaç adayının diğer ilaçlarla etkileşimi, plaseboya karşı etkinliği, saklama koşulları, en iyi formunu geliştirme ve doz ayarı gibi tanımlamalar da yapılmaktadır. Ardından uluslararası ilaç federasyonlarına Yeni İlaç Başvurusu (NDA) yapılır. İzleme süreci, uluslararası ilaç federasyonları tarafından etkin bulunan ilaç adayının onaylanması ardından ilacın hastaların kullanımına sunulması ve kullanım sırasında oluşturabileceği yan etkilerinin izlendiği faz IV çalışmasını içermektedir. Faz IV çalışması gerçek dünya kanıtları olarak da bilinmektedir. Bu fazda çok geniş bir popülasyona ulaşıp ilacın uzun süreli kullanımına bağlı olumsuz etkileri, nadir görülen yan etkileri ve kontrendikasyonları izlenmektedir (22). İlaç keşfinin son aşamasında gelişmiş biyoteknolojiden faydalananak hastalığı değiştirici etkisinin olabileceği düşünülen biyolojik bir hedefin etkinliğinin *in*

vivo ortamda test edilerek tanımlanmasını kapsayan hedef-bazlı ilaç tasarımı yaklaşımları uygulanabilmektedir (163,166).

Günümüzde kullanılan terapötik ajanlar biyolojik ve küçük moleküler yapıdan oluşmaktadır. Küçük moleküler ajanlar, 80-100 atom içeren genellikle doğal bileşiklerden veya sentez yoluyla elde edilen organik bileşiklerdir. Biyolojik ajanlar, yüksek moleküler ağırlığa sahip ve nükleik asitlerden, çeşitli rekombinant proteinlerden, antikorlardan veya bazı peptit türlerinden oluşan biyolojik kökenli moleküllerdir. Küçük moleküler yapıda olan ajanlar biyolojik yapılara kıyasla daha hafif moleküler ağırlığa, oda sıcaklığında daha stabil duruma, basit yapıya, genellikle oral kullanıma elverişli olma, daha yüksek hücre membranından geçebilme yeteneğine, daha az bağışıklık sistemini uyarma ve maliyet açısından daha uygun olma gibi avantajlı özelliklere sahiptirler. Bu yüzden daha popüler olarak ilaç geliştirme için tercih edilmektedirler (22,166).

2.6.1. Öncü molekül

İlaç keşfinde öncü molekül, biyolojik ve farmakolojik terapötik özelliklere sahip olan bir kimyasal yapı olarak tanımlanmaktadır (167). Öncü yapı, ilaca giden yolda başlangıç noktasıdır. Etkinin gücü, özgüllüğü, süresi optimize edilmeli ve genellikle ayrıntılı, yinelenen bir süreçte yan etkiler ve toksisite en aza indirilmelidir (166,167). Etki gücü, herhangi bir öncü molekülün az bir konsantrasyonda istenilen farmasötik etkiyi gösterebilmesidir. Biyoyararlanım, molekülün etki edeceği hedef bölgeye ulaşabilmesidir. Etki süresi, molekülün uygulandıktan istenilen farmakolojik yanıtı göstermesine kadar olan vakittir. Güvenilirlik, organizmada herhangi bir yan etki ve toksisite göstermemesidir. Farmasötik özellikler, uygulanabilir sentez yolu, iyi çözünürlük, kimyasal stabilite ve çözünme hızı gibi parametrelerin uygun olmasını içermektedir (165,167). Bu özelliklerin geliştirilmesi için öncü molekülün yapısal modifikasyonlarından yararlanılabilmektedir (26).

Öncü moleküller, farmasötik bilimlerde doğal, sentetik ve semi sentetik olarak üç kategoriye ayrılmaktadır (167). Bitkiler, hayvanlar, deniz canlıları ve mikroplar tarafından bir hastalık üzerinde iyileştirici etkili çok sayıda biyoaktif ikincil metabolit sentezlenmektedir ve bu doğal ürünlerden doğal öncü moleküller türetilmektedir (25). Farmakolojide çoğunlukla doğal ürünlerden türetilen öncü moleküller daha az toksisite gösterdikleri için ön plana çıkmaktadır. Doğal öncü molekül sentezleme, biyoaktif

molekölün bitki ekstraktlarından, mikroorganizmalardan ve hayvan biyolojik materyallerinden izole edilmesiyle başlayan ardından optimize edilmesiyle devam eden bir süreçtir (25,167). Doğal ürünler ilaç geliştirme sürecinde en iyi öncü kaynak olduğu görülmüştür (168). Doğal biyoaktif bileşik kaynaklı geliştirilen ilaçlar arasında en fazla bitki ekstraktlarından elde edilerek geliştirilmiş olan öncü moleküller yer almaktadır (25,166). Hastalıkların tedavisinde kullanılan anti kanser etkili paklitaksel, anti-inflamatuar etkili salisin ve merkezi sinir sistemini stimüle eden morfin bu öncü moleköl örneklerinden bazılarıdır. Sentetik öncü moleköl, organik sentetik kimya ile kombinatoriyal kimyanın kombinasyonunun sentetik olarak tasarlanan molekölüdür. Bu moleküllerin tasarımı hedef bölge ile uyumluluğuna, afinitesine, stabilitesine ve toksisitesine göre yapılmaktadır. Bu ilaçlara anti-bakteriyel zabiax, anti-diyabetik marizev ve anti-hipertansif antresto örnek olarak gösterilebilir. Semi sentetik öncü moleküller, başlangıç maddesi doğal bir ürün kaynaklı olan fakat bitiş kısmında kimyasal ürün olan moleküllerdir. Zaten etkili olan doğal bileşiğin hedef üzerindeki etkisini daha da arttırmak için farmasötik kimyadan yararlanılmaktadır. Modifikasyonlar molekölün fonksiyonel grubunun özellikleri dikkate alınarak yapıldığından doğal etkilerini korumaktadırlar (167). Bu ilaçlara örnek olarak en bilinen anti-bakteriyel ajan mikrobiyal kaynaklı penisilin verilebilir.

2.7. Kimerik moleköl

Kimerik moleköl, iki veya üzeri bileşenin yeni bir terapötik ajan oluşturmak üzere bağlandığı biyomühendislik ürünü olan ve bifonksiyonel özellik gösteren bir yapıdır (23,169). Kimerik moleköl, hücreye spesifik hedef moleköl, hücre içinde farmakolojik etkisini gösterecek olan efektör kısım ve genellikle bu molekülleri birbirine bağlayan bağlayıcı yapı olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bu moleküllerin ortak yapıları farklı hedeflere veya farmakolojik aktiviteye sahip iki bileşendir. Her kimerik moleköl bağlayıcı içermemektedir (23).

Kimerik moleküllerin avantajları arasında ilaç taşıyıcıları gibi davranarak hedefe spesifik bağlanarak biyomolekülleri hücreye iletmesi ve molekölü oluşturan bileşenlerin kolayca modüle edilebilir olması yer almaktadır (23,170). Bu avantajlar bu bifonksiyonel molekülleri ilaç keşfinde yararlanılabilecek adaylar yapmaktadır (23).

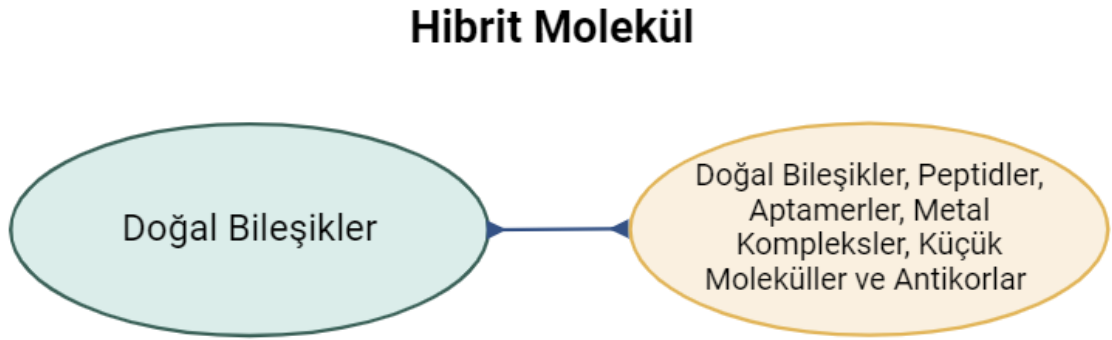
Kimerik moleküller biyokimyasal birçok alanda kullanılmaktadır. Kullanım alanları arasında ilaç hedefleme, takibi, salınımı, ilacın hedef ile etkileşimi ve ilacın

hedef hücredeki etki mekanizmalarının açıklanması bulunmaktadır. Kimerik moleküller kullanım alanlarına göre biyokonjugatlar, iki işlevli bileşikler, çok hedefli moleküller, kimera, hibritler ve tasarlanmış bileşikler gibi farklı isimlerle de anılmaktadır (23).

2.7.1. Hibrit molekül

Hibrit moleküller, molekülü oluşturan bileşenlerden daha stabil, seçici, dayanıklı, gelişmiş farmokinetik ve farmakodinamik özellik, artmış çözünürlülük, daha yüksek biyoyararlanım ve daha güçlü farmasötik etki göstermektedir (24).

Doğal bileşik temelli hibrit moleküller, doğal bileşik ile bir diğer doğal bileşiğin, peptidin, aptamerin, metal kompleksin, küçük molekülün veya antikorun kovalent konjugasyonu ile oluşan yapılardır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Doğal bileşik temelli hibrit molekülün genel yapısı (96)

Biyoaktif bir doğal bileşik ile heterosiklik bileşiklerin, proteolizi ve otofajiyi indükleyen ligantların, fenil analoglarının, folik asitlerin, steroidlerin ve diğer doğal bileşiklerin kovalent konjugasyonu sonucu küçük molekülü doğal ürün hibriti oluşmaktadır (29). Heterosiklik yapı, biyoaktif moleküllerin çözünürlüğünün, lipofilitesinin, polaritesinin ve hidrojen bağlama kapasitesinin artmasına neden olmaktadır (171). Heterosiklik yapıların bu özellikleri ilaç keşfinde ve öncü molekül olmaları açısından avantaj sağlamaktadır (171). Ayrıca heterosiklik öncü moleküllerin çoğunun doğal bileşiklerden elde edilen ve modifiye edilmiş yapıda oldukları görülmektedir. Heterosiklik yapılara biyoaktif özellik gösteren kimyasal yapıların çoğunda rastlanmaktadır (171). İsatın-pirol konjugatı sunitinib, isatin-piperazin konjugatı nintedanib ve kinazolin-furan konjugatı lapatinib ilaçlarının bazı kanser

türlerinde kullanımı FDA tarafından onaylanmış ve çeşitli kanser türleri üzerinde halen klinik çalışmaları devam etmektedir. Bunların yanı sıra kinolon-tiyazol konjugatı olan ilaç adayı voreloksinin akut miyeloid lösemi ve miyelodisplastik sendrom üzerinde klinik çalışmaları devam etmektedir (24).

Tek başlarına halihazırda anti-kanser etkisi gösteren iki biyoaktif bileşikten oluşturulan hibrit yapının, birçok hücrel hedef ile etkileşerek hibrit yapıyı oluşturan biyoaktif moleküllerin gösterdikleri anti-kanser etkiden daha kuvvetli olduğu görülmüştür (24,172). Kurkumin ve gallik asidin yanında resveratrol gibi birçok biyoaktif bileşiğin kovalent konjugasyonu ile oluşan hibrit moleküllerin antikanser etkileri yapıyı oluşturan bileşenlerden daha gelişmiş olduğu belirtilmektedir (173). Ve bu yapılar ilaç keşfinde öncü molekül adayları olarak gösterilmektedir (173,174).

Bir fitokimyasal olan resveratrol ile fenolik bileşik kafeik asitten oluşturulan hibrit molekülün MDA-MB-231 insan meme kanseri ve HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücresi üzerinde sitotoksik etkisi yapıyı oluşturan doğal bileşiklere kıyasla oldukça yüksek olduğu ve bu hibrit moleküle HT-29 hücrelerinin daha hassas olduğu gösterilmiştir. Bu hibrit molekülün MDA-MB-231 hücrelerinde STAT3, kaspaz-3, kaspaz-9, siklin D1 ve Bcl-2 ekspresyonlarını düzenleyerek proliferasyon ve apoptoz üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca *in vivo* meme kanseri geliştirilen farelerde tümör ağırlığında ve tümör dokuda aktif STAT3 protein seviyesinde önemli ölçüde azalma olduğu gösterilmiştir (175).

Zeytinyağında bulunan fitokimyasal oleik asit ile kuarsetinin, propoliste bulunan flavanon pinocembrinin, morinin ve çay yaprağında bulunan kateşinin hibrit yapıları oluşturulmuştur. Bu hibrit yapıların normal bağırsak epitel hücrelerinde sitotoksik etki göstermezken HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücreleri başta olmak üzere prostat, meme bezi ve hepatoselüler insan adenokarsinom hücre hatlarında sitotoksik etkili oldukları görülmüştür. Oleik asit-kuarsetin hibritleri çalışmada oluşturulan hibrit moleküller arasında kanser hücreleri üzerinde en etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca hibrit yapının bir bileşeni olan kuarsetinin orta derecede sitotoksik etki gösterdiği normal epitel hücreleri üzerinde bu hibrit yapı sayesinde sitotoksik etkinin kalktığı gösterilmiştir (176).

Formononetin-kumarin hibriti, *in vitro* gastrik kanser hücreleri üzerinde Wnt/ β -Katenin ve AKT/mTOR yolağını düzenleyerek, N-kadherin ekspresyon seviyesini azaltarak hücre göçünü engelleyebildiği ve güçlü antiproliferatif etkisinin olduğu

bulunmuştur. Ayrıca *in vivo* gastrik kanser geliştirilen farelerde tümör hacmi ve ağırlığında önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir (177).

Doğal polifenol olan magnolol ile sebzelerde bol bulunan bir izotiyosiyanat olan sülforafan hibritinin, hibriti oluşturan bileşiklere kıyasla insan akciğer kanseri hücreleri H460, insan kolorektal kanser hücresi LoVo ve insan meme adenokarsinom hücresi MCF-7, üzerinde daha etkili sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra A549 akciğer, OVCAR3 yumurtalık, AGS gastrik ve SW480 kolorektal kanseri hücreleri üzerinde de güçlü sitotoksik etkisinin olduğu bulunmuştur. Aksine normal insan hepatosit hücresi LO2 üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. A549, H460 ve LoVo hücreleri üzerinde metastazı inhibe ettiği ve apoptotik proteinlerin ekspresyonunu regüle ederek apoptozu indüklediği görülmüştür. Bu hibrit molekülün ayrıca *in vivo* meme kanseri, akciğer kanseri ve yumurtalık kanseri oluşturulan farelerde tümör hacminin önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (178).

Kurkumin ile birçok bitkide bulunan ve warfarin gibi kan sulandırıcı ilaçların öncüsü olan kumarinin triazol bağlayıcı aracılığıyla oluşturulan hibritinin kolon hücreleri, prostat hücresi ve lösemi hücresi üzerinde sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Kolon kanseri hücrelerinin ve lösemi hücresinin bu hibrit yapıya 48 saat maruz kalmasının sonucu hücre canlılık oranının prostat hücresine kıyasla daha az olduğu bulunmuştur (179).

Kurkumin ile kakao çekirdeklerinde bulunan kimyasal bileşik ligustrazin hibritinin akciğer kanseri hücreleri üzerinde ROS seviyesini arttırdığı, apoptozisi tetiklediği ve NF- κ B, AKT ve ERK gibi önemli hücresel yolları inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca ilaca dirençli akciğer tümör dokusuna sahip farelerde tümör hacminin azaldığı gösterilmiştir (180).

Kurkumin ile piperinin, glutamik asidin ve valinin biyokonjugatları, ağız ve rahim ağzı kanseri hücrelerinde anti-kanser, anti-bakteriyel ve anti-fungal etkilerinin olduğu gösterilmiştir (181). Başka bir çalışmada piperin-kurkumin hibriti, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında güçlü sitotoksik etki göstermiş, Bcl 2 ekspresyonunda azalma, BAX protein seviyesinde artma, Smac apoptotik proteinin salınımında artma, Sitokrom c sitozoldeki seviyesinde artma ve AIF salınımında artma gibi etkilerle apoptozisi tetiklemiş ve NF- κ B ekspresyonunda azaltmıştır (182).

Gallik asit ile oluşturulan hibrit moleküllerin, anti-oksidan, anti-kanser ve anti-mikrobiyal etkileri gözlenmiştir (183). Plazminojen aktivatör inhibitörü-1, anti-

anjyogenik aktivite, anti-kanser aktivite ve sitokrom P450 inhibitörü olarak mevcut patent almış birçok gallik asit türevi vardır. Bunun yanı sıra klinik çalışmada anti-oksidan, anti-mikrobiyal anti-proliferatif, anti-lipoperoksidant, anti-bakteriyel, kolon kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türleri üzerinde anti-kanser, anti-tüberküloz, anti-viral, anti-HIV ve anti-malarya etkileri üzerinde çalışılmaya devam edilmektedir (183). Gallik asit-rosmarinik asit semi sentetik bileşiği, yapıyı oluşturan bileşenlerinden daha güçlü anti-oksidan etki ve Ca^{2+} mobilizasyonunu zayıflatarak trombosit agregasyonunu önleyici etki göstermiştir (184).

Gallik asit-kumarin hibriti prostat kanseri, miyeloid lösemi ve sağlıklı sıçan fibroblastından elde edilen hücre hatlarında çalışılmış ve sadece kanser hücrelerinde doza bağımlı olarak sitotoksiteyi arttığı görülmüştür. Bu hibrit yapının tümör hücrelerinin koloni oluşturmalarını engellediği, hücre siklusunu G1/G0-S fazında durdurduğu, apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (185).

2.8. Kombinasyon İlaç Tedavisi

Kombinasyon tedavi ile etkilenen hedef ve tedavi edilen hastalık çeşidinin artması sağlanabilir. Hastalık tedavisinde birbirinden farklı yollar üzerinde etkinin görülmesiyle daha efektif bir iyileşme sağlanabilir.

Prensip olarak kombine ilaçlar antagonistik, aditif ve sinerjetik etki gösterebilirler. İki veya daha fazla ilacın kombinasyonu sonucu çıkan etki, tek başlarına olandan daha fazla ise bu sinerjetik etkidir. Tam tersi bir etki gösteriyorlarsa antagonistik etkidir. Sinerjizm varlığı; daha etkili tedavi etme, birlikte kullanıldığında ciddi toksisite yaratan ajanların dozunun azaltılarak yan etkinin azaltılmasına olanak sağlama ve buna karşın etkinin kaybolmamasına ve tedaviye başlandıktan belirli bir süre sonra ortaya çıkan ilaca karşı gelişen direncin azalmasına neden olur (186).

In vitro veya *in vivo* çoklu moleküller arasındaki etkileşimler Chou-Talalay metodu (186) ile ve bu metodla geliştirilen program aracılığıyla belirlenebilmektedir. Bu metod ile doz-etki ilişkisi, kombinasyon indeksi (CI), doz azaltma değeri (DRI) ve medyan-etki gücü (Dm) gibi değerler hesaplanmaktadır.

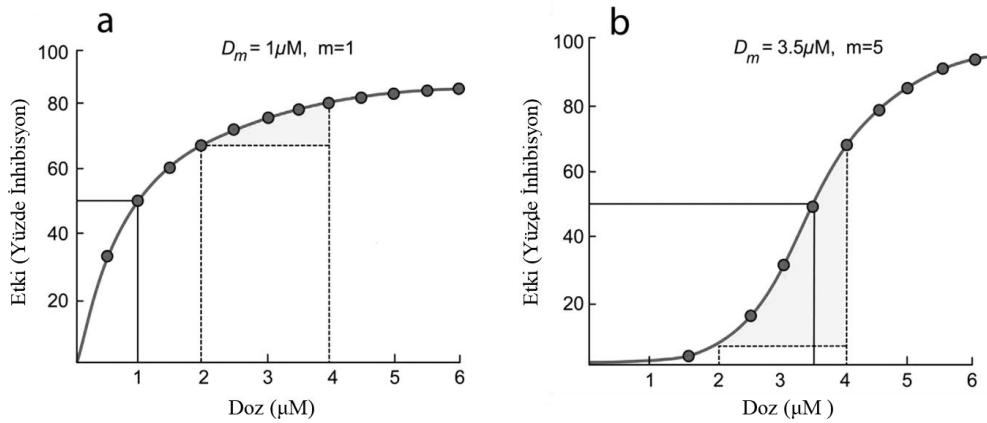
Doz-etki denklemi “birleşik teori” olarak adlandırılır. *Birleşik teorisinin* öncüleri; enzim kinetiği denklemini ortaya atan Michaelis-Menten, ligant doygunluğu eşitliğini

öne süren Hill, pH hesaplama formülünü geliştiren Henderson-Hasselbalch ve reseptör bağlanma eşitliğini bulan Scatchard olarak kabul edilir (186).

Kombinasyon indeksi Chou ve Talalay tarafından geliştirilmiştir. Çoklu moleküller arasında gelişen sinerjetik, antagonistik veya aditif etkiyi göstermekte kullanılır (186).

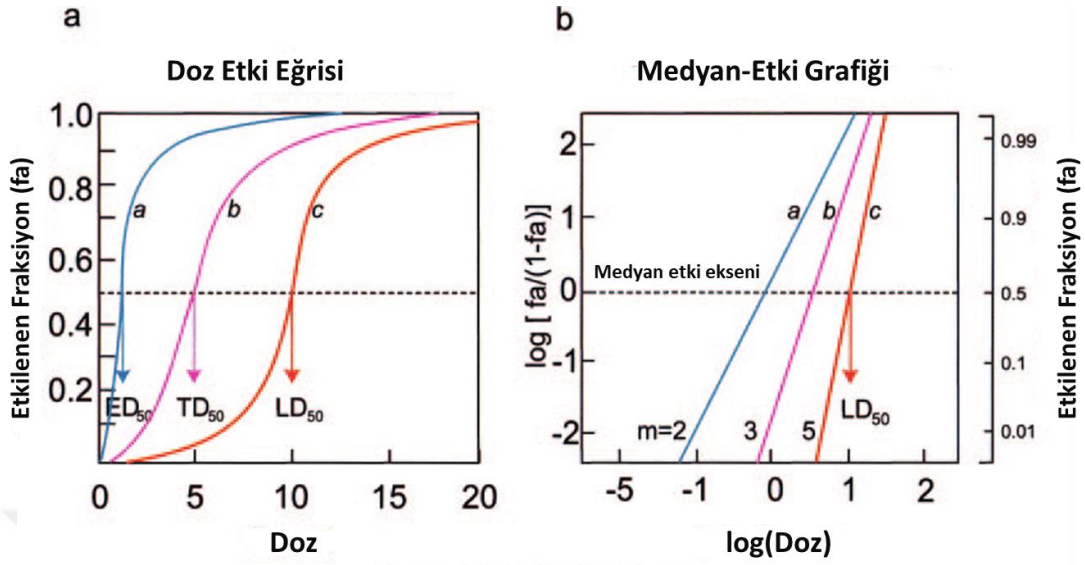
Doz azaltma indeksi, DRI olarak ilk defa Chou ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür (186). DRI değerinin pozitif olması beklenmektedir. Doz azaltma indeksinde amaçlanan ilacın dozunu azaltmak ve dozun azalmasına bağlı toksik etkininde elimine edilmesidir. Doz azalmasına karşın sinerjizmden dolayı etkinin değişmediği görülür. DRI sinerjizm etkili bir kombinasyonda belli bir etki seviyesinde kombinasyonu oluşturan ilaçların tek tek etkili dozlarına karşın kombinasyonla dozun kaç kat azaltılabileceğinin göstergesidir (186).

Şekil 2.10'da sunulan doz-etki grafiğinde şekil açısından sayısal değeri m olarak ifade edilir. Sigmoidal eğri ($m>1$), hiperbolik ($m=1$), düz sigmoidal eğri ($m<1$) formunda olduğunu gösterir (186).



Şekil 2.10. Hiperbolik Doz Etki eğrisi (a) ve Sigmoidal Doz Etki eğrisi (b) örnekleri (186)

D_m , hedef ortamın %50 inhibisyonu için gerekli dozu temsil eder ve IC50 (İnhibitör Konsantrasyonu), LD50 (Letal Doz), ED50 (Terapötik Olarak Etkili Doz) veya TD50 (Toksik Doz) olarak belirtilir (187). Sigmoidal Doz-Etki Grafiği ve Çizgisel Medyan Etki Grafiği örnekleri Şekil 2.11'de verilmiştir.



Şekil 2.11. Sigmoidal Doz-Etki Eğrisi (a) ve Çizgisel Medyan Etki Grafiği (b) örnekleri f_a : etkilenen fraksiyon, f_u : etkilenmeyen fraksiyon, $\log[f_a/(1-f_a)]=\log(f_a/f_u)$ (187)

Kombinasyonlar oluşturulurken sabit oranlı (konstant) veya sabit olmayan oranlı (nonkonstant) orana sahip doz değerleri ile belirlenmektedir. Sabit oranlı kombinasyonlar seri dilisyon ile hazırlanabilirler. İkili bir kombinasyonda, kombinasyona ait birinci ilacın IC_{50} 'si ile ikinci bir ilacın IC_{50} oranına $[(IC_{50})_1/(IC_{50})_2]$ ait katsayı bütün kombinasyon değerlerinde eşittir. Sabit olmayan oranlı kombinasyonlarda ise sabit bir katsayı yoktur. Kombinasyonu oluşturan bir ilacın doz değeri sabit kalırken diğerinin değişmesi söz konusudur. Bunlar sabit olmayan orana $(IC_{50})_1+(IC_{50})_2$, $(IC_{50})_1+(IC_{50})_2/2$ ve $(IC_{50})_1+(IC_{50})_2/4$ gibi kombinasyon değerlerine sahiptirler (186).

İlaç kombinasyonlarında ilaçlar arasındaki etkileşimin niceliksel olarak değeri CI değeridir. CI eşitliği ile kombinasyonu oluşturan ilaçların belirli dozlarında bulunan yüzde inhibisyon değerlerinin oranları toplamı sonucunda elde edilen sayısal değer CI değerini vermektedir (Şekil 2.12). Kombinasyon niteliği eşitlik sonucu bulunan $CI < 1$ ise sinerjizm, $CI = 1$ ise aditif etki ve $CI > 1$ ise antagonizm olarak sınıflandırılmaktadır.

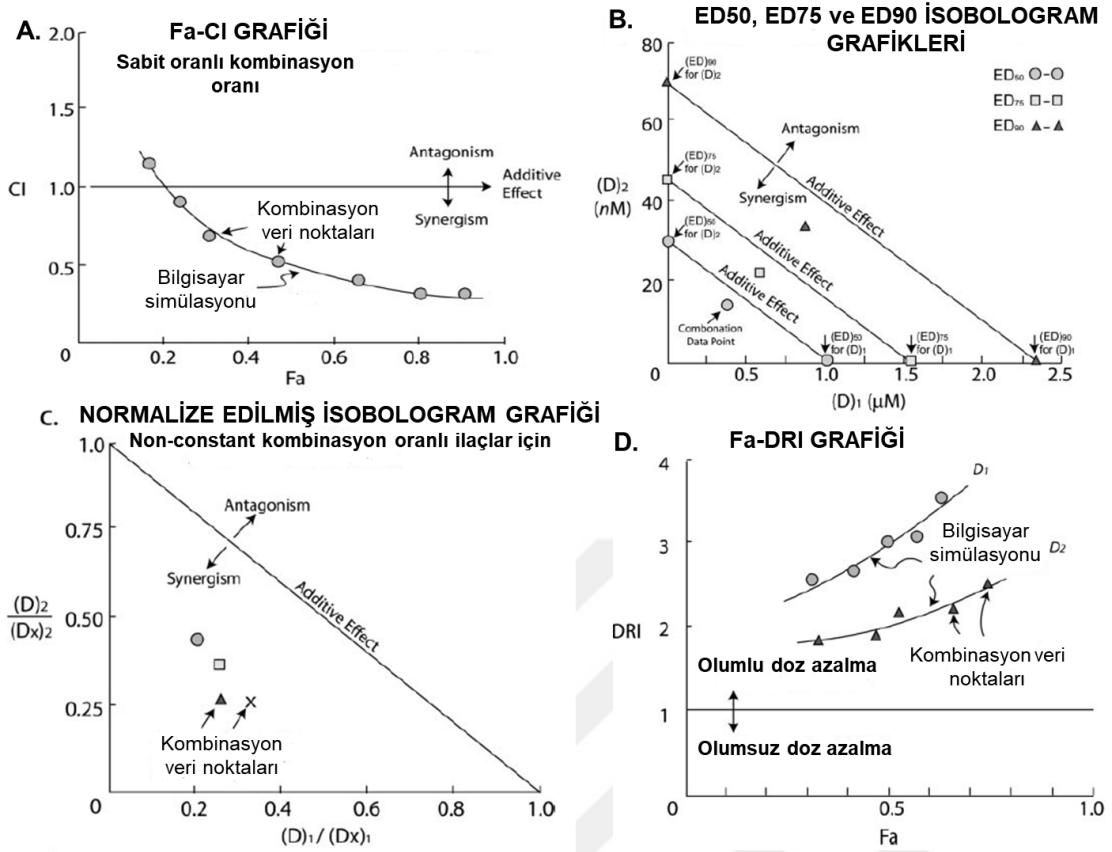
$$D = D_m [f_a / (1 - f_a)]^{1/m}$$

$$f_a = 1 / [1 + (D_m / D)^m]$$

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_2}}$$

Şekil 2.12. Kombinasyon indeksi eşitliği: D:Doz, D_x:ilacın tek başına %x inhibisyon etkisi, f_a:etkilenen fraksiyon, D_m:medyan etki dozu, m:doz-etki ilişkisini gösteren katsayı (186)

Şekil 2.13'te Chou-Talalay kombinasyon indeksi teoremiyle yorumlanan bazı ilaç kombinasyon grafikleri verilmiş olup, Şekil 2.13.A'daki grafik herhangi bir etki seviyesinde (F_a) ilaçların birbiri ile etkileşimlerini göstermektedir. İlaçlar arasındaki etkileşime göre oluşturulan isobologram grafikleri sinerjizm, antagonizm ve aditif etki hakkında bilgi vermektedirler (Şekil 2.13.B ve C). Hipotenüs çizgisi üstünde kalan veri noktaları antagonizm, üzerinde kalan veri noktaları aditif etkili ve altında kalan veri noktaları ise sinerjizm etkilidir. Klasik ED₅₀-İsobologram grafiği (Şekil 2.13.B) sabit oranla oluşturulmuş kombinasyonlarda (konstant) tercih edilirken normalize edilmiş ED₅₀-İsobologram grafiği (Şekil 2.13.C) sabit olmayan oranla oluşturulmuş kombinasyonlarda (non-konstant) kullanılmaktadır. Herhangi bir etki seviyesinde kombinasyonu oluşturan bileşenlerin DRI değerlerinin verildiği grafik örneği Şekil 2.13.D'de sunulmuştur. F_a -DRI grafiğinde eksenin altında kalan noktalar için doz azaltımına gidilemeyeceğini gösterir. Doz azaltımına gidilebileceğini gösteren sonuç ise eksen üstünde kalmaktadır.



Şekil 2.13. Chou-Talalay kombinasyon indeksi teoremiyle yorumlanan ilaç kombinasyonlarının Fa-CI (A), ED50, ED75 ve ED90 İsobologram (B), Normalize Edilmiş İsobologram (C), Fa-DRI (D) grafikleri (186)

Fa-log(CI) grafiğinde negatif değerler [$\log(\text{CI}) < 0$] sinerjetik, pozitif değerler [$\log(\text{CI}) > 0$] antagonistik özellik, eğri [$\log(\text{CI}) = 0$] aditif etki gösterir. Fa, ilaca maruz bırakılan ortamın inhibe edilen hücre fraksiyonunu belirtir (186).

Sinerjistik ve antagonistik etkili kombinasyonların bulunan CI değerine göre sınıflandırılması yapılmaktadır. Bulunan CI değeri, 0,9'dan küçükse sinerjizm olduğunu gösterir. CI değeri, 0,3 ila 0,1 arasında ise kuvvetli sinerjizm, 0,1'den küçükse çok kuvvetli sinerjizm olduğunu gösterir. CI değeri 0,9 ila 1,1 arasında ise aditif etkili olduğu anlamına gelmektedir. CI değeri 1,10'dan büyükse antagonizm etkileşimi olduğu görülür. CI değeri, 3,3 ila 10 arasında ise kuvvetli antagonizm, 10'dan büyükse çok kuvvetli antagonizm etkili olduğunu gösterir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Chou-Talalay metoduna göre oluşturulan kombinasyon indeksi sınıflandırılması

Kombinasyon İndeksi Değeri	Sınıflandırılması	Semboller
<0,1	Cok kuvvetli sinerjizm	+++++
0,1-0,3	Kuvvetli sinerjizm	++++
0,3-0,7	Sinerjizm	+++
0,7-0,85	Orta derece sinerjizm	++
0,85-0,90	Hafif sinerjizm	+
0,90-1,10	Neredeyse aditif	+ -
1,10-1,20	Hafif antagonizm	-
1,20-1,45	Orta derece antagonizm	--
1,45-3,3	Antagonizm	---
3,3-10	Kuvvetli antagonizm	----
>10	Çok kuvvetli antagonizm	-----

CI<1 Sinerjizm, CI=1 Aditif Etki, CI> 1 Antagonizm iki ilaç arasındaki ilişkiyi gösterir (186).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

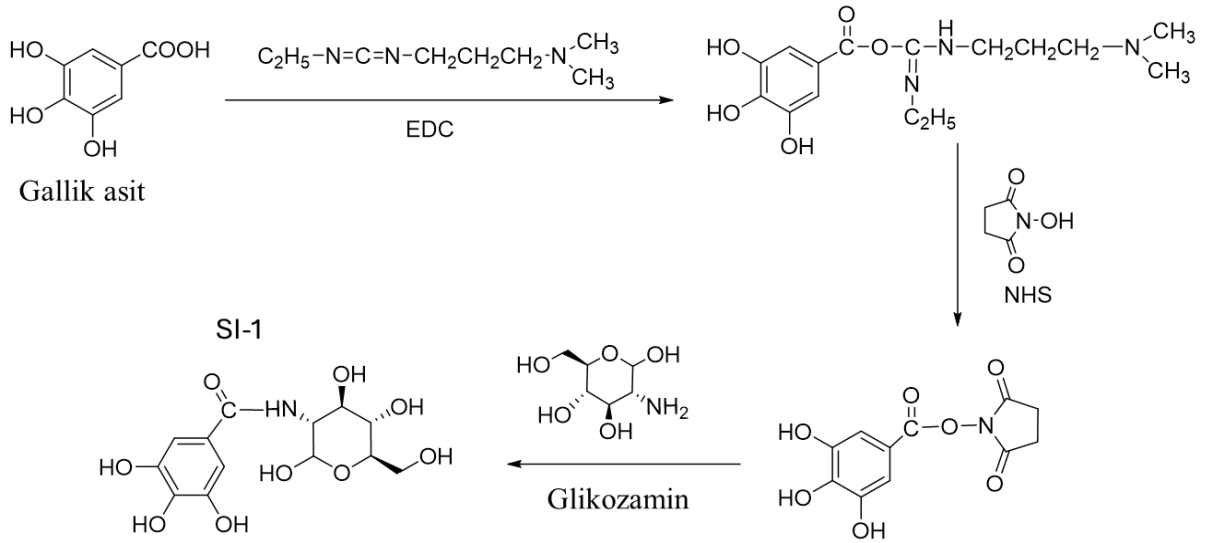
3.1. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Sentezi

Tez çalışması kapsamında glikozamin monosakkaritinin, kurkumin ve gallik asit amidifikasyon reaksiyonu kullanılarak semisentetik türev oluşturuldu.

Bu tez çalışmasında antikanser etkisi değerlendirilen bileşikler Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Laboratuvarında sentezlendi.

3.1.1. SI-1 Bileşiğinin Sentezi

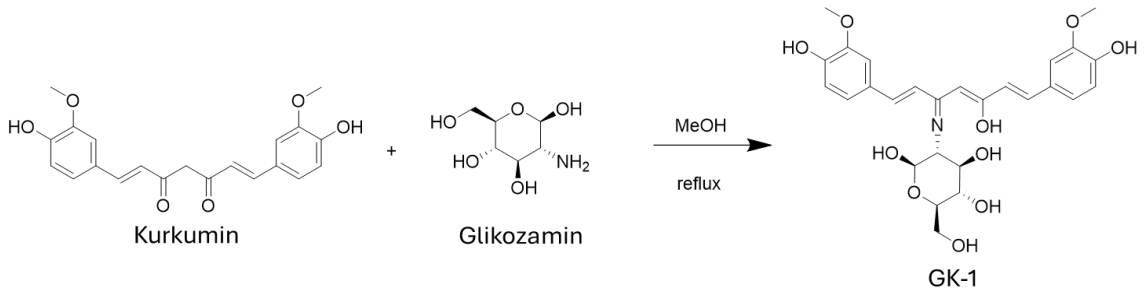
Sentez için, öncelikle 10 mmol gallik asit 20 ml etanol içerisinde çözüldükten sonra üzerine 10 mmol karboksil aktive edici birleştirme reaktifi 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) eklendi ve karıştırıcıda buz içerisinde 20 dakika karıştırıldı. Ardından karboksilik asit aktive edici ve amin ile reaksiyona girmesini sağlayacak olan reaktif N-hidroksisüksinimid (NHS) karışıma eklendi ve buz banyosunda 10 dakika daha karıştırıldı. Üzerine 10 mmol glukozamin eklenerek buz banyosunda 30 dakika karıştırıldı ve ardından oda ısısında 24 saat süresince karıştırılmaya devam edildi. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile reaksiyon takibi yapıldı ve çözücü olarak hekzan:etilasetat (1:1) ikilisi kullanıldı. Sentez işlemi sona erince çözücü rotari evaporatörde uçurularak kalan kısım kristallendirildi. Sentez şeması Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. SI-1 bileşiğinin sentez şeması: SI-1: 3,4,5-trihidroksi-N-(2,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2H-piran-3-il) benzamid

3.1.2. GK-1 Bileşiğinin Sentezi

Sentez için, 10 mmol glukozamin ve 10 mmol kurkumin 20 ml metanol (MeOH) içerisinde geri çeviren dik soğutucu altında ısıtılarak reaksiyona sokuldu. Reaksiyon ortamının belli saat aralıklarıyla İTK ile kontrol edildi. 3 saat sonunda reaksiyonun tamamlandığı görülüp reaksiyonlara son verildi. Reaksiyon ortamı buza döküldü. Oluşan çökelti süzülerek alındı ve etanolde kristallendirilerek saflaştırıldı. Saflık kontrolleri İTK ile yapıldı. Sentez şeması Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. GK-1 bileşiği sentez şeması: GK-1: 3-((5-hidroksi-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil) hepta-1,4,6-trien-3-iliden) amino)-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triol

3.2. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Yapı Tayini

Modifiye edilmiş biyoaktif fitokimyasal türevlerinin yapı karakterizasyonu için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^1H -NMR) ve kütle spektroskopisi (LC/MS) kullanıldı.

3.2.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Çalışma kapsamında yeni sentezlenen bileşiklerin fonksiyonel gruplarındaki değişim ve kimyasal bağ karakterizasyonları Perkin Elmer ATR FTIR cihazı ile incelenmiştir. Bileşiklerin FTIR spektrumları $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında kaydedildi.

3.2.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^1H -NMR),

Yeni sentezlenen bileşiklerin molekül formülü ve bağlanma özellikleri ^1H -NMR spektrumu ile teyit edildi. ^1H -NMR Spektroskopisi Varian UNITY INOVA (500 MHz) marka cihaz ile alındı. Tetrametilsilan ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) referans bileşik olarak kullanılırken, dimetil sülfoksit (DMSO-d_6) çözücü olarak kullanıldı.

3.2.3. Kütle Spektroskopisi (LC/MS)

Sentezlenen bileşiklerin iyonlaştırılması ile oluşturulan moleküler iyon ve onun parçalanmasıyla oluşan molekül fragmanlarının kütlesi Agilent 6400 Triple Quadrupole marka cihaz ve cihaza bağlı AB-SCIEX 3200QTRAP aparatı ile belirlenerek yeni bileşiklerin molekülün yapısı tayin edildi.

3.2.4. İnce Tabaka Kromatografisi

Sentezlenen bileşiklerin reaksiyon takibi ve saflıkları İTK kullanılarak tespit edildi. Yeni sentezlenmiş bileşiği içeren çözelti ve karşılaştırmada kullanılacak standartlara ait çözeltiler kapiler ile ince tabaka kromatografisi Silica Gel 60 F254 Alüminyum plakaları (Merck) üzerine damlatılarak, hekzan:etilasetat (1:1) karışımı mobil fazda yürütüldü. Bu işlemin ardından İTK plakası, uygun bir çözücü veya çözücü karışımıyla

yürütülerek, sentezlenen bileşiklerdeki standartların türü bileşiklerdeki lekeler ile standartların lekeleri karşılaştırılarak belirlendi.

3.3. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Terapötik Etkinliğinin Test Edilmesi

Sentezlenen moleküllerin terapötik etkinlik testleri *in vitro* ortamda HT-29 insan kolon adenokarsinom hücreleriyle yapıldı.

Bu tez çalışmasındaki hücre kültürünün çoğaltılması ve ilaç etken maddelerinin HT-29 hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin laboratuvar çalışmaları Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.3.1. Hücre Kültürü

In vitro kolon kanseri modeli olarak HT-29 (ATCC® HTB-38™) insan kolorektal adenokarsinom hücreleri kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan hücre serisi kültürü Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC)'nin önerdiği protokole göre yapılmıştır. Temel hücre kültürü yöntemleri olarak; hücrelerin çözülmesi, çoğaltılması, pasajlanması ve dondurulmasını içeren yöntemler kullanıldı.

Hücre kültüründe besiyeri olarak L-Glutaminli McCoy's 5A Medium kullanılmıştır. Besiyeri, içerisine %10 oranında Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 oranında penisilin-streptomisin konularak hücre kültürlenmesinde kullanıldı.

Hücrelerin çözdürülmesi:

1. Sıvı azot tankında muhafaza edilen cryo tüp içinde bulunan donmuş HT-29 hücrelerini, önceden ısıtılmış 37°C'deki su banyosuna alındı.
2. Tüpün kapak kısmının suya değmemesine dikkat edilerek yaklaşık 2 dk su banyosunda bekletildi.
3. Hücrelerin hızla çözdürülüp ortam ısısının yükselmesi sağlandı.
4. 15 mL'lik santrifüj tüpüne toplam hacmi 9 mL olacak şekilde kültür ortamı ve üzerine besiyeri eklendi.

5. 125xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Kalan peletin üzerine taze besiyeri eklenerek resüspanse edildi.
8. Ardından hücreler 75 cm²'lik flaska aktarıldı ve 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.
9. Haftada 2-3 defa besiyeri değiştirildi.

Hücrelerin pasajlanması:

1. Flask içindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. Flask 3 mL Fosfat Tamponlu Salin (PBS) ile yıkandı.
3. 75 cm²'lik flaska 3 mL %0,25 (a/h) Tripsin-0,53 mM EDTA çözeltisi eklendi ve hücreler 5 ila 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Flaska yapışmış olan hücreler bu sürede yüzeyden ayrıldı. 3 mL tripsin-EDTA ve HT-29 hücrelerinden oluşan çözelti üzerine besiyeri eklendi ve 15 mL'lik santrifüj tüpe aktarıldı.
5. 125xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonunda süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Santrifüj tüpün dibinde kalan hücre pelleti, 6-8 mL besiyeri konup pipetlenerek homojen hale getirildi ve 75 cm² 'lik flaska aktarıldı. İnverted mikroskopta hücre yoğunluğu kontrol edilen hücreler, 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatöre bırakıldı.

Hücrelerin dondurulması:

Hücre pasajlanması protokolünde belirtildiği gibi hücre pelleti elde edildi. Hücre pelleti üzerine %95 besiyeri ve %5 DMSO eklenerek karışım, cryo tüplere aktarıldı. Hücre dondurulması aşamasında hücre yoğunluğuna dikkat edildi. Cryo tüpler saklama süresine bağlı olarak önce -80°C'ye eğer kullanmak için beklenilecek süre uzunsa sıvı azot tankına alındı.

Hücre sayımı:

Hücre sayımı, hemositometre yöntemiyle yapılmıştır.

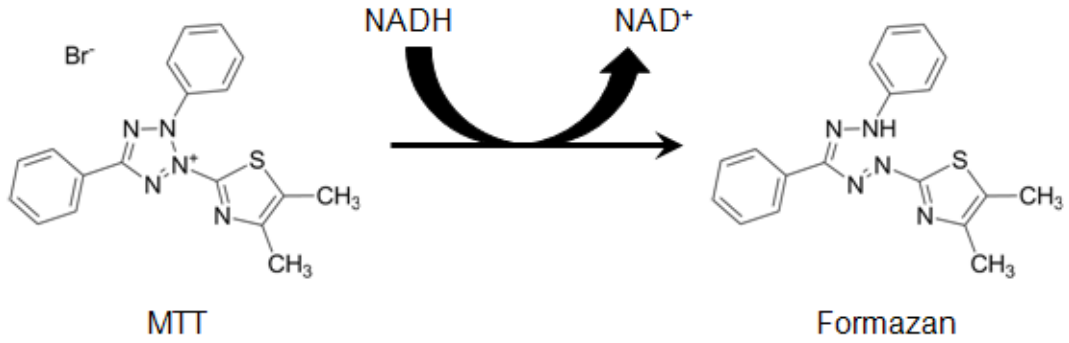
1. Hücre sayımı için hücrelerin pasajlanması prosedürü uygulanıp hücre pelleti elde edildi.
2. Hücre pelleti üzerine 10 mL besiyeri konularak homojenize hale getirildi.
3. Steril endorf tüpe hücre çözeltisinden 10 µL alındı ve üzerine 10 µL tripan mavisi ilave edildi.
4. Karışım pipet yardımıyla homojenize edildi.
5. Ardından homojenize hücre-tripan mavisi çözeltisinden 10 µL alınarak örnek uygulama noktasından mikropipet yardımıyla Thoma lamı ve lamel arasına dikkatlice bırakıldı.
6. Hücre sayısı belirlendi.

Hücre sayımı, iki tekrarlı olarak yapıldı. Hücre sayısı, Thermo Fisher Scientific Hemositometrede Hücre Sayma Protokolüne göre belirlendi (188).

3.3.2. Hücresel Canlılık Testi

Sentezlenen bileşiklerin HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile belirlendi. Fitokimyasal kaynaklı sentezlenen türevler 0-1000 µM doz aralığında ve KRK tedavisinde kullanılan 5-FU ve OX kemoterapötik ilaçları 24, 48, 72 saat zaman aralıklarında HT-29 hücre hattında uygulandı ve hücre canlılığına etkileri araştırıldı. Deneyler en az üç kez tekrarlandı.

Bu deneylerde MTT reaktifinin yalnızca aktif canlı memeli hücrelerinde NAD(P)H'ye bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimlerinin metabolik aktivitesi sonucu mor renkli formazan kristalleri oluşturması esasına dayanarak (Şekil 3.3) kolorimetrik yöntemle hücre canlılığına bakıldı.



Şekil 3.3. MTT yapısı ve renk veren formazan kristali oluşum reaksiyonu

Deney prosedürü şu şekildedir:

- 1- HT-29 KRK hücreleri 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklendi.
- 2- Sentezlenen bileşikler ve kemoterapötik ilaçlar istenilen doz aralığında uygulandı.
- 3- Kimyasal uygulamasının ardından 24, 48 ve 72 saat sonra kuyucuklardan ortam uzaklaştırıldı.
- 4- MTT çözeltisi hazırlama; katı toz halinde bulunan MTT, 1 mg/mL PBS kullanılarak çözdürüldü. Uygulanana kadar karanlık ortamda ve +4 °C' de saklandı.
- 5- Kuyucuklardan ortam uzaklaştırıldıktan sonra 100 µl besiyeri ve 50 µl MTT çözeltisi eklendi ve ardından 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
- 6- MTT çözeltisi eklenmiş besiyeri hücrelerden uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 200 µl DMSO ilave edildi.
- 7- Mikroplaka okuyucuda, 570 nm'de absorbans değerleri ölçülerek hücre canlılığı hesaplandı.

IC50 değerleri GraphPad Software Prism 8 ile hesaplandı. Yüzde canlılık ve toksisite Şekil 3.4'te verilen formüller ile hesaplanmıştır.

$$\text{Yüzde Canlılık} = \frac{\text{Ortalama Deneysel Absorbans}}{\text{Ortalama Kontrol Absorbans}} \times 100$$
$$\text{Toksosite (\%)} = \frac{\text{Ortalama Kontrol Absorbans} - \text{Ortalama Deneysel Absorbans}}{\text{Ortalama Kontrol Absorbans}} \times 100$$

Şekil 3.4. Yüzde Canlılık ve Yüzde Toksisite formülleri

3.3.3. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerin 5-FU ve OX ile Kombinasyonların Belirlenmesi

Sentezlenen biyoaktif fitokimyasal türevi SI-1 ve GK-1 moleküllerinin MTT çalışmaları sonucunda hesaplanan IC50 değerleri üzerinden KKK tedavisinde sık kullanılan OX ve 5-FU kemoterapötik ilaçların kombinasyonu yapılmıştır. Aynı süreçte sonuçlarımızı karşılaştırmak için klinikte KKK tedavisinde genellikle kullanılan FOLFOX'un kemoterapötik bileşeni 5-FU+OX kombinasyonu deneylerimizde klinikte kullanılan konsantrasyonları temelinde değerlendirilmiştir (189,190). Bu yüzden Şekil 3.5'te gösterildiği üzere *in vitro* kullanılacak doz (mg cinsinden), klinikte kullanılan doz (mg cinsinden) ile hücre ekimi yapılacak yüzeyin alanı (m² cinsinden) ile çarpılarak tespit edilmiş ve bulunan doz mortalite formülü kullanılarak molar cinsine çevrilerek MTT analizlerinde kullanılmıştır.

$$\text{In Vitro Kullanılacak Doz (mg)} = \text{Klinikte Kullanılan Doz (mg)} \times 96\text{'lik Plate Yüzey Alanı (m}^2\text{)}$$

$$\text{Mortalite (M)} = \frac{\text{Kütle (g)}}{\text{Moleküler ağırlık (g)} \times \text{Çözücü hacmi (L)}}$$

Şekil 3.5. Klinikten *in vitro*ya ilaç dozunun çevrilmesi ve Molarite formülleri

Klinikte KKK kemoterapisinde kullanılan OX ve 5-FU kombinasyonu HT-29 KKK hücre kültürü ortamına uyarlandığında sırası ile 0,625 μ M ve 25 μ M konsantrasyonlarına eş gelmektedir (191-196). HT-29 KKK hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saat dilimlerde sitotoksik fonksiyonlarını değerlendirilirken OX ve 5-FU'in bu sabit oranını kullanılarak hesapladığımız 8 farklı FOLFOX konsantrasyonunu kullandık (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde FOLFOX uygulamalarında kullanılan 5-FU ve OX konsantrasyonları

Kombinasyon	OX (μ M)	5-FU (μ M)
FOLFOX 1	0.313	12.5
FOLFOX 2	0.625	25
FOLFOX 3	1.25	50
FOLFOX 4	2.5	100
FOLFOX 5	5	200
FOLFOX 6	10	400
FOLFOX 7	20	800
FOLFOX 8	40	1.600

3.4. İstatistiksel Analiz

Yeni sentezlenen semisentetik bileşiklerin ve kemoterapötik ilaçların IC50 değerleri GraphPad Software Prism 8 ile hesaplandı. Kolerasyon analizi GraphPad Software Prism 8 aracılığıyla tek yönlü varyans (ANOVA) analizi kullanılarak incelendi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Kombinasyon CI, ED ve DRI değerleri Chou-Talalay metodu ile CompuSyn Software aracılığıyla ile hesaplandı.

4. BULGULAR

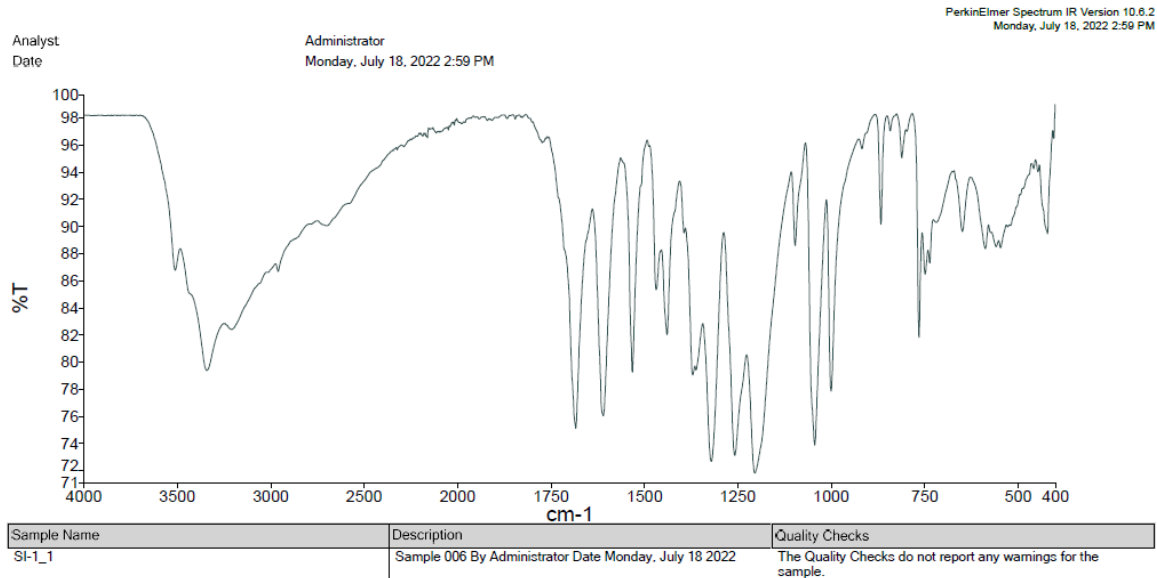
4.1. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Yapısının Aydınlatılması

Modifiye edilmiş biyoaktif fitokimyasal türevlerinin yapısının aydınlatılmasında FTIR, $^1\text{H-NMR}$ ve LC-MS analizleri kullanıldı.

4.1.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları

SI-1 bileşiğinin FTIR analizi:

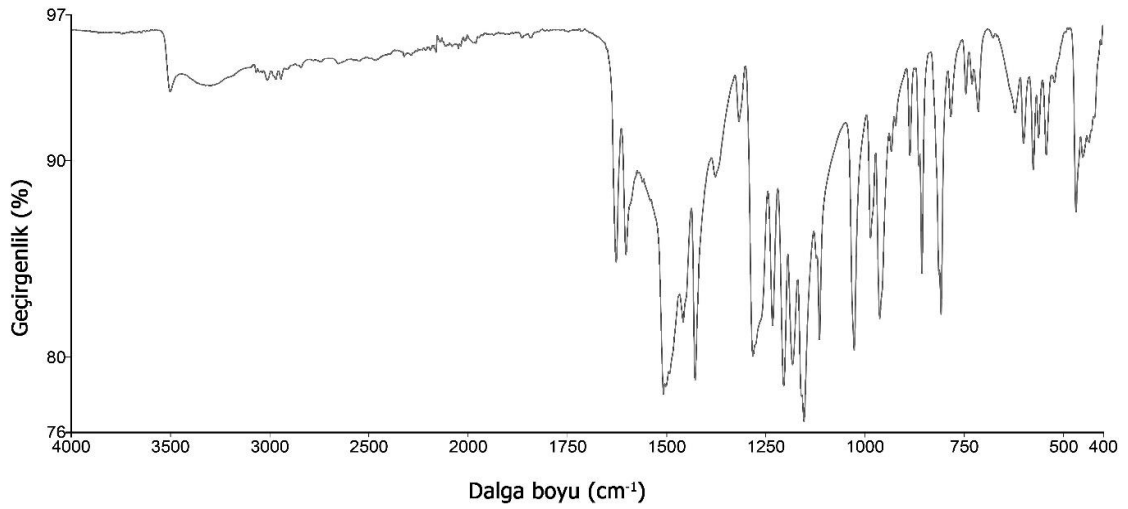
SI-1 Bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde, -OH gruplarına ait gerilim bandı 3.514cm^{-1} , -NH grubuna ait gerilim bandı 3.344cm^{-1} , -CH gruplarına ait gerilim bantları $3.212\text{-}2.962\text{cm}^{-1}$ aralığında, -CONH (amid) yapısındaki karbonil grubunun gerilim bandı 1.684cm^{-1} , C-H eğilim bantları $1.532\text{-}1.439\text{cm}^{-1}$ aralığında, C-O gerilim bantları $1.258\text{-}1.204\text{cm}^{-1}$ aralığında, sübstitüe benzene ait C-H eğilim bandı 764cm^{-1} dalga boylarında gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. SI-1 bileşiğine ait FTIR spektrumu

GK-1 bileşiğinin FTIR analizi:

GK-1 Bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde, -OH gruplarına ait gerilim bantları $3.504\text{--}3.296\text{ cm}^{-1}$, -CH gruplarına ait gerilim bantları $3.212\text{--}2.962\text{ cm}^{-1}$ aralığında, -C=N yapısındaki amin grubunun gerilim bandı 1.627 cm^{-1} , -C=C yapısındaki çift bağların gerilim bandı 1.602 cm^{-1} , C-H eğilim bantları $1.507\text{--}1.428\text{ cm}^{-1}$ aralığında, C-O gerilim bantları $1.282\text{--}1.204\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenmiştir (Şekil 4.2).

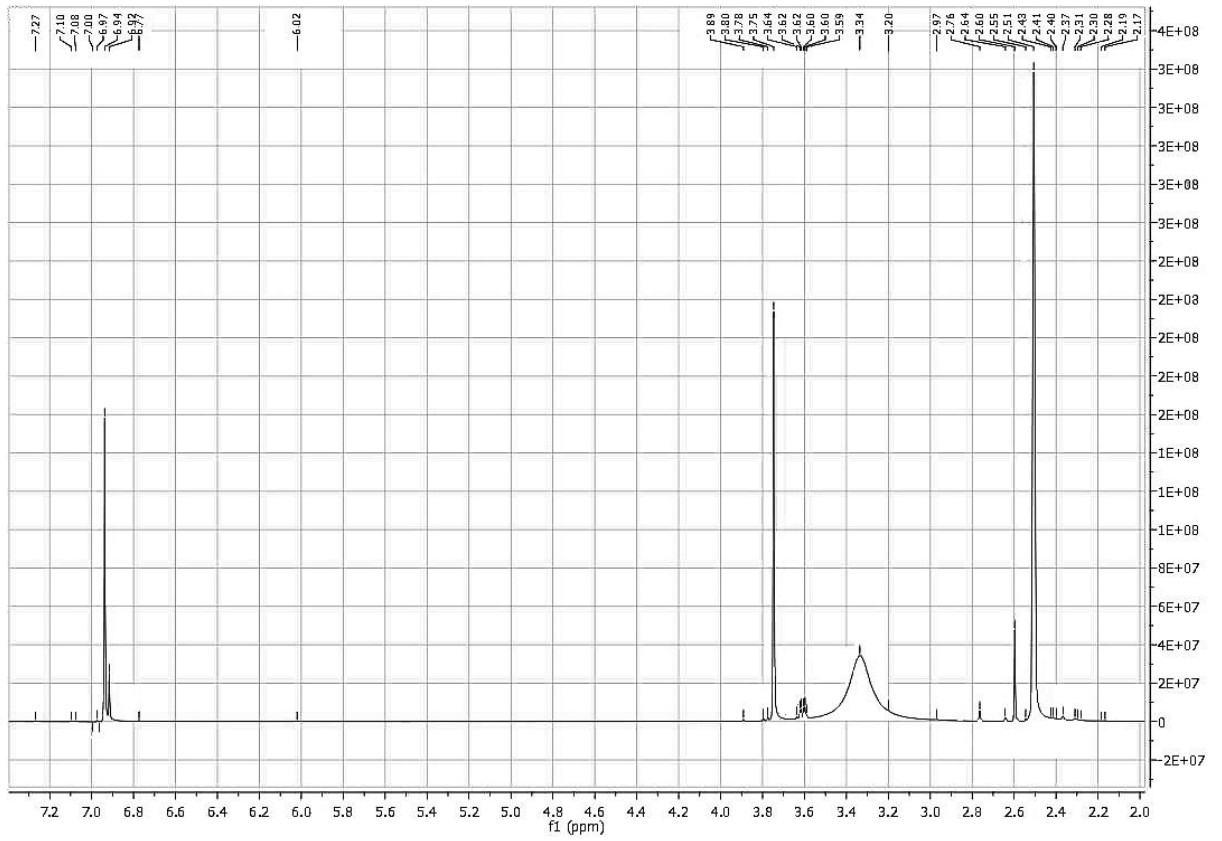


Şekil 4.2. GK-1 bileşiğine ait FTIR spektrumu

4.1.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^1H -NMR) Sonuçları

SI-1 Bileşiğinin ^1H -NMR Analizi:

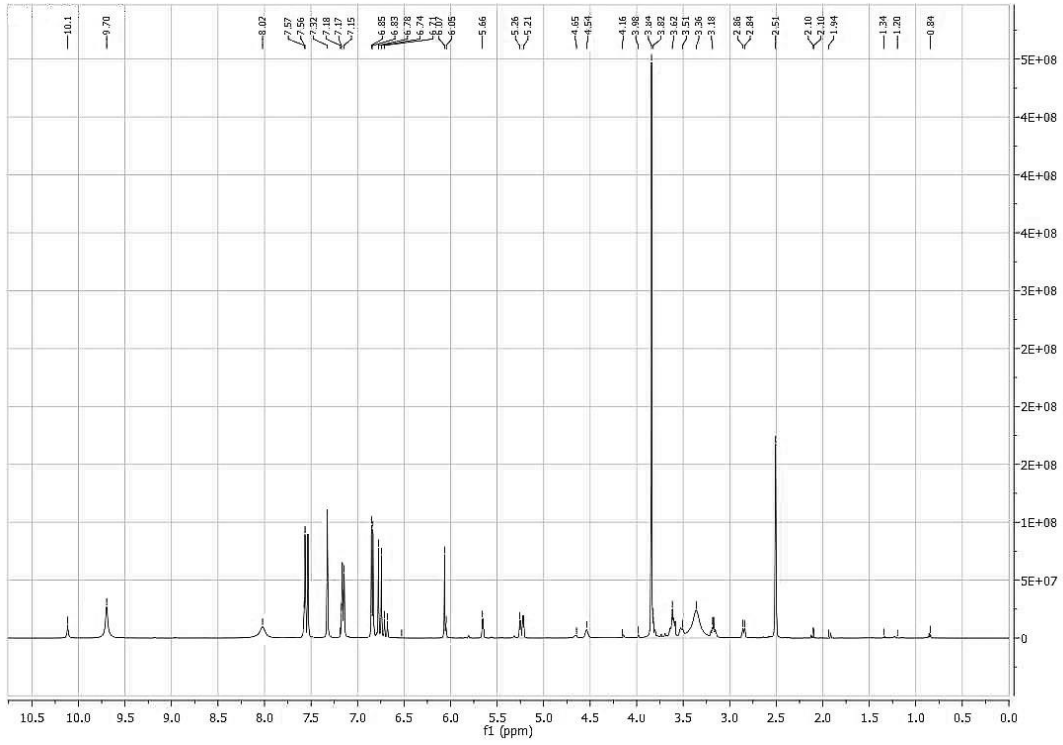
SI-1 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumunda gözlenen, 2,55 ppm'de yer alan singlet şeklindeki pikler piran halkasının hidrojenleri, 3,75 ppm'de yer alan singletin -CH₂ yapısındaki hidrojenleri, 6,90 ve 6,92 ppm'de yer alan singletlerin aromatik benzen halkasındaki hidrojenleri, 9,15 ppm'de yer alan yayvan pikin -NH grubundaki hidrojeni karşıladığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. SI-1 bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu

GK-1 Bileşiğinin ^1H -NMR Analizi:

GK-1 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumunda gözlenen, 2,51 ppm'de yer alan singlet şeklindeki pikler piran halkasında N atomuna bağlı C üzerindeki hidrojeni, 3,10-3,72 ppm'de yer alan pikler piran halkasındaki diğer -CH yapısındaki hidrojenleri ve -CH₂-OH yapısındaki metilen hidrojenlerini, 3,84 ppm'de yer alan singlet -OCH₃ gruplarındaki hidrojenleri, 4,54-4,65 ppm'de yer alan pikler piran halkasındaki -OH gruplarına ait hidrojenleri, 5,21-6,07 ppm'de yer alan pikler alken yapısındaki -C=C-H gruplarına ait hidrojenleri, 6,71 ve 7,57 ppm'de yer alan piklerin aromatik benzen halkasındaki hidrojenleri, 9,70 ppm'de yer alan singletin aromatik -OH gruplarına ait hidrojenleri, 10,1 ppm'de yer alan singletin imin yapısına komşu -C=C-H grubundaki hidrojeni karşıladığı gözlenmiştir (Şekil 4.4).

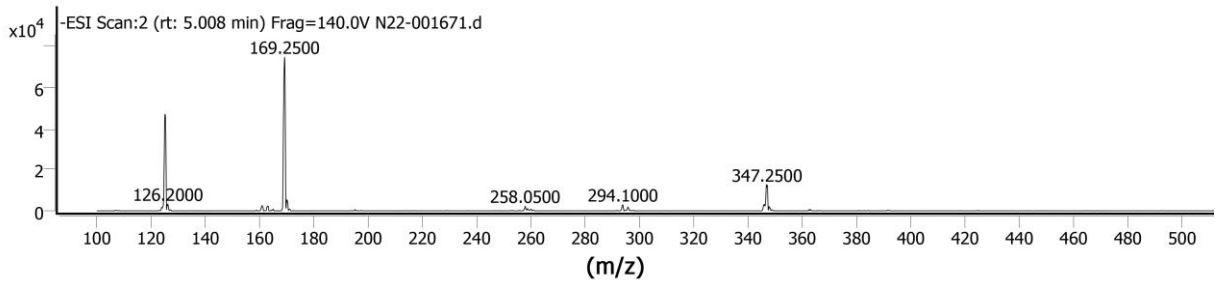


Şekil 4.4. GK-1 bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu

4.1.3. Kütle Spektroskopisi (LC/MS) Sonuçları

SI-1 Bileşiğinin LC/MS Analizi:

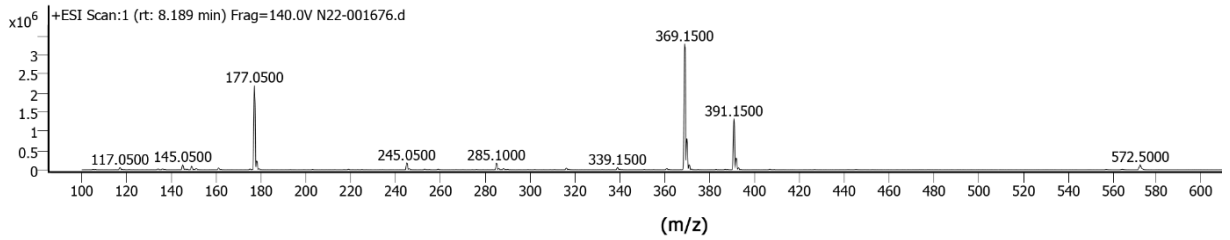
SI-1 bileşiğinin hesaplanan molekül ağırlığı (MA) 331,27 olarak bulunmuştur. LC/MS spektrumunda 347m/z olarak moleküler iyon ve su birlikte $\text{M}^+ + 18 - 1$ fragmanı olarak gözlenmiştir. 169 m/z piki molekül yapısından piran halkasının ayrılmasıyla $\text{M}^+ - 166$ fragmanı olarak, 126m/z piki $\text{M}^+ - 205$ 3,4,5-trihidroksi benzoik aside ait fragmanı göstermektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. SI-1 bileşiğine ait LC/MS spektrumu

GK-1 Bileşiğinin LC/MS Analizi:

GK-1 bileşiğinin hesaplanan molekül ağırlığı (MA) 529,274 olarak bulunmuştur. LC/MS spektrumunda 572m/z olarak moleküler iyon ve CH₃CN birlikte M⁺+41+1 fragmanı olarak gözlenmiştir. 366 m/z piki molekül yapısından piran halkasının ayrılmasıyla M⁺-163 fragmanı olarak, 177 m/z piki molekül yapısından kurkuminin yapısının ayrılmasıyla M⁺-352 fragmanı olarak gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. GK-1 bileşiğine ait LC/MS spektrumu

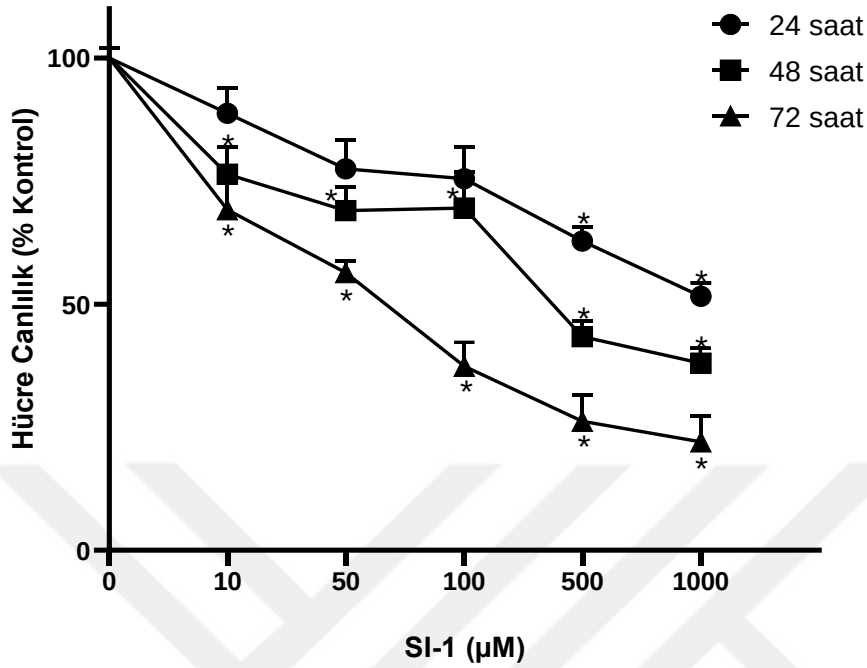
4.2. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin ve Kemoterapötik İlaçların Sitotoksikite Test Sonuçları

Modifiye edilmiş biyoaktif fitokimyasal türevlerinin sitotoksikite etkinlikleri 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde uygulanan MTT analizleri ile belirlenmiştir.

4.2.1. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin MTT Test Sonuçları

SI-1 bileşiği, HT-29 insan kolon adenokarsinom hücreleri ile 0-1.000 µM doz aralığında 24 saat, 48 saat ve 72 saat muamelesi sonrası her saat dilimine ait IC₅₀ değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.7).

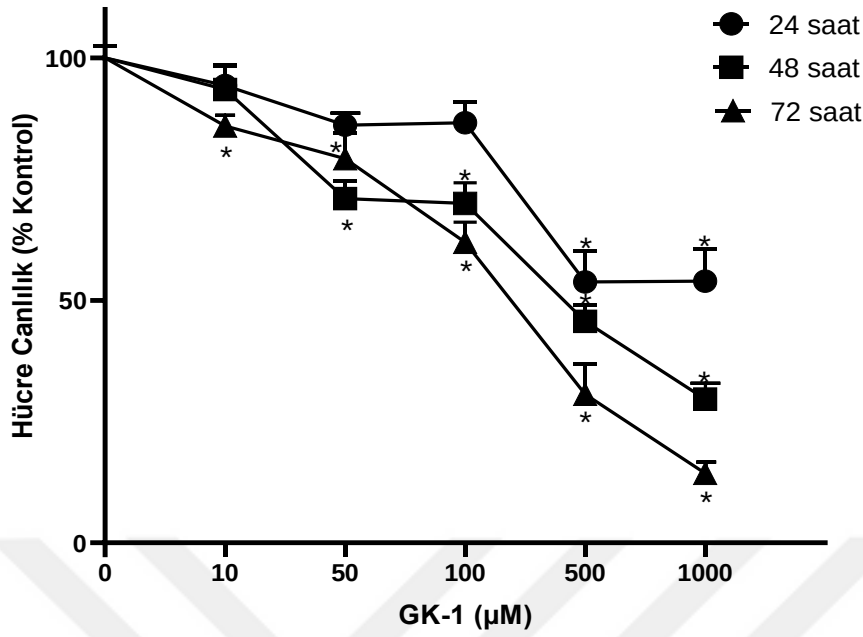
SI-1 bileşiğinin HT-29 hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisi, 24. saatte 10, 50, 100, 500, 1.000 µM dozlarda sırasıyla %11,2, %22,5, %24,5, %37,2 ve %48,4, 48. saatte 10, 50, 100, 500, 1.000 µM dozlarda inhibisyon etkisi sırasıyla %23,6, %31, %30,5, %56,6 ve %62 ve 72. saatte 10, 50, 100, 500, 1.000 µM dozlarda inhibisyon etkisi sırasıyla %30,8, %43,6, %62,6, %73,8 ve %78 olarak bulunmuştur. SI-1'in IC₅₀ değeri, 24 saat inkübasyon sonucu 1.393 µM, 48 saat inkübasyon sonucu 333 µM ve 72 saat inkübasyon sonucu 56,65 µM bulunmuştur. SI-1 bileşiğinin HT-29 insan kolon adenokarsinom hücre modelinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.7. SI-1 bileşiğine ait *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat dilimlerinde hücre canlılık grafiği (*: $p < 0,05$)

GK-1 molekülünün, HT-29 insan kolon adenokarsinom hücreleri ile 0-1.000 µM doz aralığında 24 saat, 48 saat ve 72 saat muamelesi sonrası her saat dilimine ait IC50 değerleri belirlendi (Şekil 4.8).

GK-1 bileşiğinin HT-29 hücreleri üzerinde inhibisyon etkisi, 24. saatte 10, 50, 100, 500, 1.000 µM dozlarda sırasıyla %5,7, %14, %13,4, %46,2 ve %46, 48. saatte 10, 50, 100, 500, 1.000 µM dozlarda inhibisyon etkisi sırasıyla %6,5, %39, %30, %54,4 ve %70,4 ve 72. saatte 10, 50, 100, 500, 1.000 µM dozlarda inhibisyon etkisi sırasıyla %14, %20,75, %38, %69,4 ve %85,7 olarak bulunmuştur. GK-1'in IC50 değeri, 24 saat inkübasyon sonucu 910,4 µM, 48 saat inkübasyon sonucu 314,5 µM ve 72 saat inkübasyon sonucu 178 µM bulunmuştur. GK-1 bileşiğinin HT-29 insan kolon adenokarsinom hücre modelinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür.

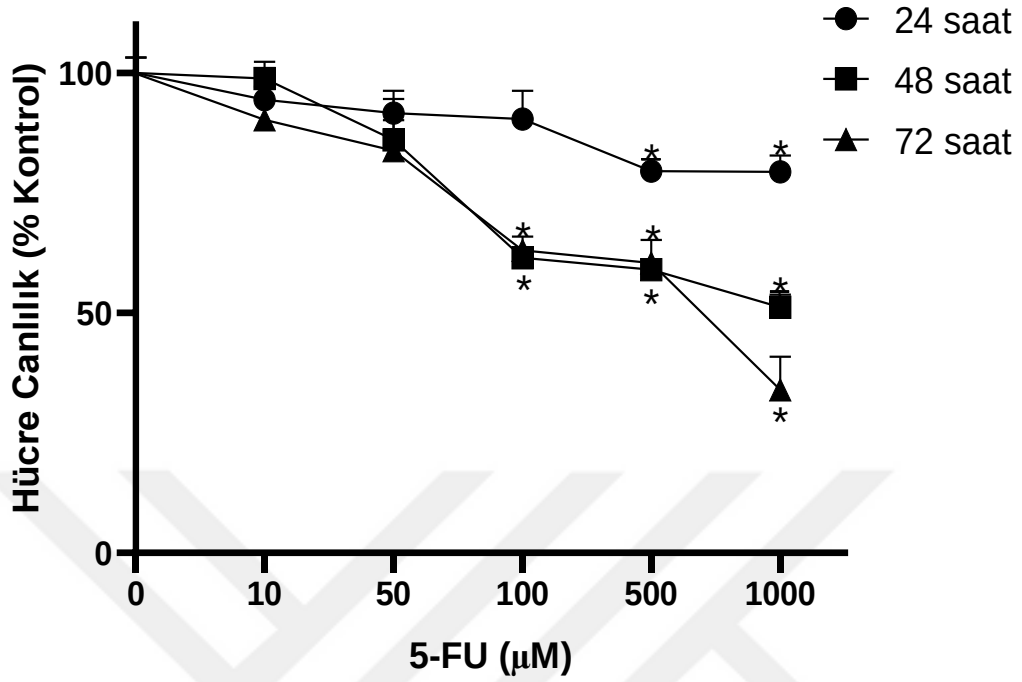


Şekil 4.8. GK-1 bileşiğine ait *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat dilimlerindeki hücre canlılık grafiği (*: $p < 0,05$)

4.2.2. Kemoterapötik İlaçların MTT Test Sonuçları

Kemoterapötik ilaç 5-FU'nun HT-29 hücreleri ile 0-1.000 μM doz aralığında 24 saat, 48 saat ve 72 saat muamelesi sonrasında her saat dilimine ait IC50 değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.9).

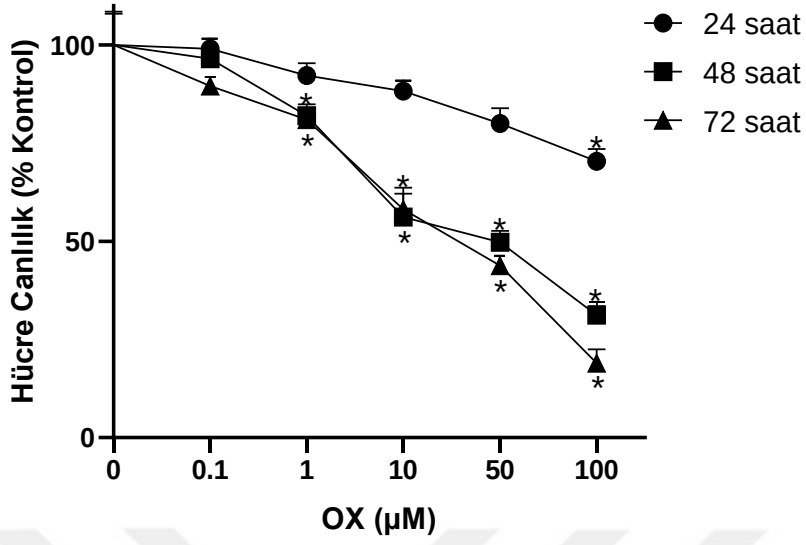
5-Fluorourasil'in HT-29 hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisi, 24. saatte 1, 10, 50, 100 ve 1.000 μM dozlarda sırasıyla %5,6, %8,4, %10,7, %20,5 ve %20,6, 48. saatte 1, 10, 50, 100 ve 1000 μM dozlarda inhibisyon etkisi sırasıyla %1,2, %14, %38,5, %41 ve %48,9 ve 72. saatte 1, 10, 50, 100 ve 1.000 μM dozlarda inhibisyon etkisi sırasıyla %9,8, %16,2, %37, %39,6 ve %66 olarak bulunmuştur. 5-FU'nun IC50 değeri, 24 saat inkübasyon sonucu anlamlı sonuç bulunamamıştır. 48 saat inkübasyon sonucu 419,7 μM ve 72 saat inkübasyon sonucu 1438 μM bulunmuştur. 5-FU'nun HT-29 insan kolon adenokarsinom hücre modelinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.9. 5-FU kemoterapi ilacına ait *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat dilimlerindeki hücre canlılık grafiği (*: $p < 0,05$)

Kemoterapotik ilaç OX'un HT-29 hücreleri ile 0-100 μM doz aralığında 24 saat, 48 saat ve 72 saat muamelesi sonrasında her saat dilimine ait IC50 değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.10).

Oksaliplatin'in uygulanan dozlarının HT-29 hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisi, 24. saatte 0,1, 1, 10, 50 ve 100 μM dozda sırasıyla %1, %7,25, %11,75, %20 ve %29,6, 48. saatte 0,1, 1, 10, 50 ve 100 μM dozda inhibisyon etkisi sırasıyla %3,5, %18, %43,8, %50,2 ve %68,8 ve 72. saatte 0,1, 1, 10, 50 ve 100 μM dozda inhibisyon etkisi sırasıyla %10,4, %19, %41,8, %56,2 ve %81 olarak bulunmuştur. OX'un IC50 değeri, 24 saat inkübasyon sonucu 887,2 μM , 48 saat inkübasyon sonucu 26,11 μM , 72 saat inkübasyon sonucu 16,76 μM olarak bulunmuştur. OX'un HT-29 insan kolon adenokarsinom hücre modelinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür.

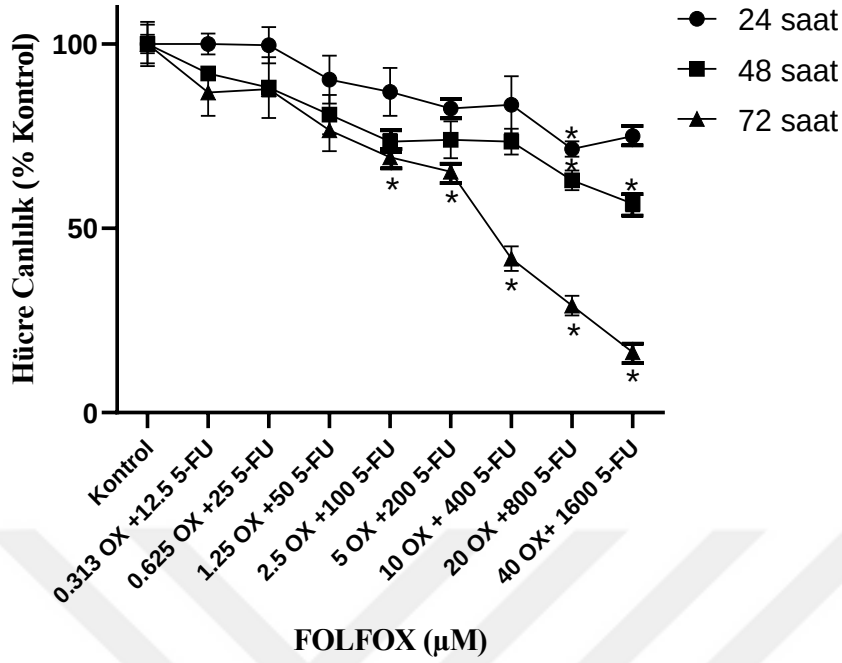


Şekil 4.10. OX kemoterapi ilacına ait *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat dilimlerindeki hücre canlılık grafiği (*: $p < 0,05$)

4.3. Kemoterapötik İlaçların Kombinasyon Sonuçları

Oksaliplatin ve 5-FU kemoterapötik ilaçları 8 farklı konsantrasyon ile kombine edilmiştir. Kombine edilen çeşitli dozların HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin olduğu görülmüştür.

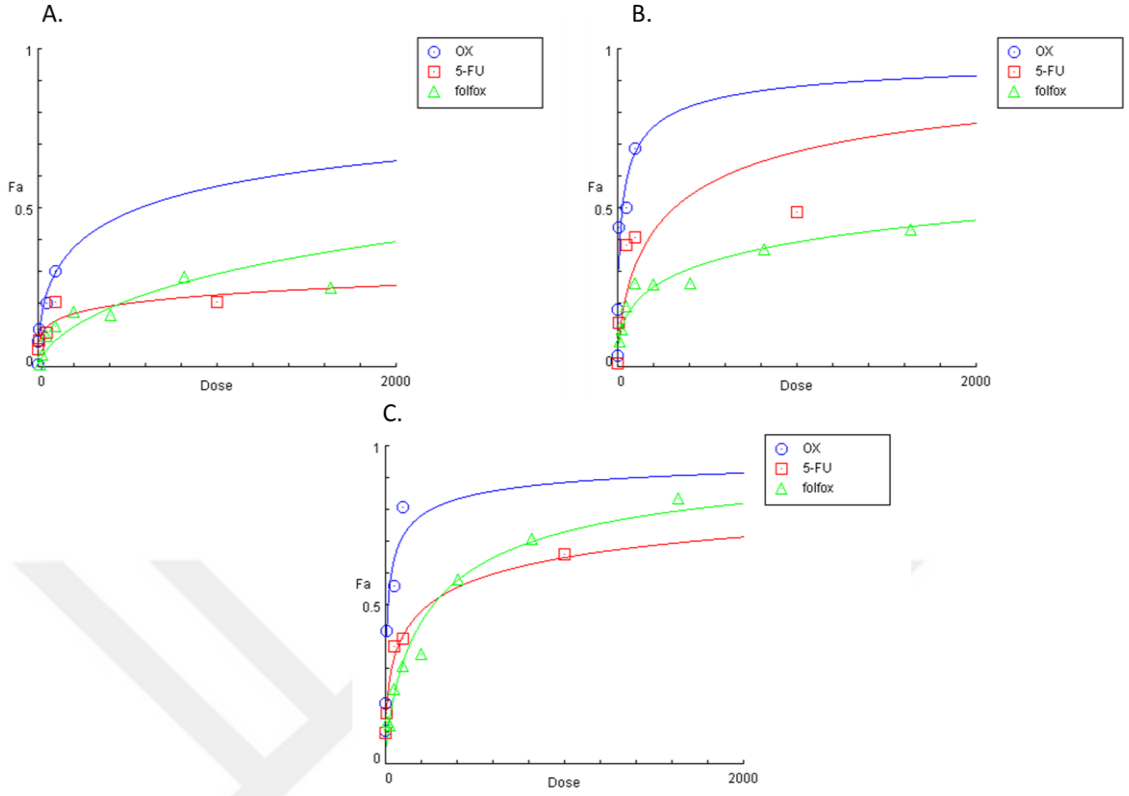
FOLFOX'un çeşitli kombinasyonlarının HT-29 hücreleri ile 24 saat, 48 saat ve 72 saat muamelesi sonrası her saat dilimine ait sitotoksik etkileri incelenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. FOLFOX’u oluşturan 5-FU+OX kemoterapötik ilaç kombinasyonunun *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat dilimlerindeki hücre canlılık grafiği (*: $p < 0,05$)

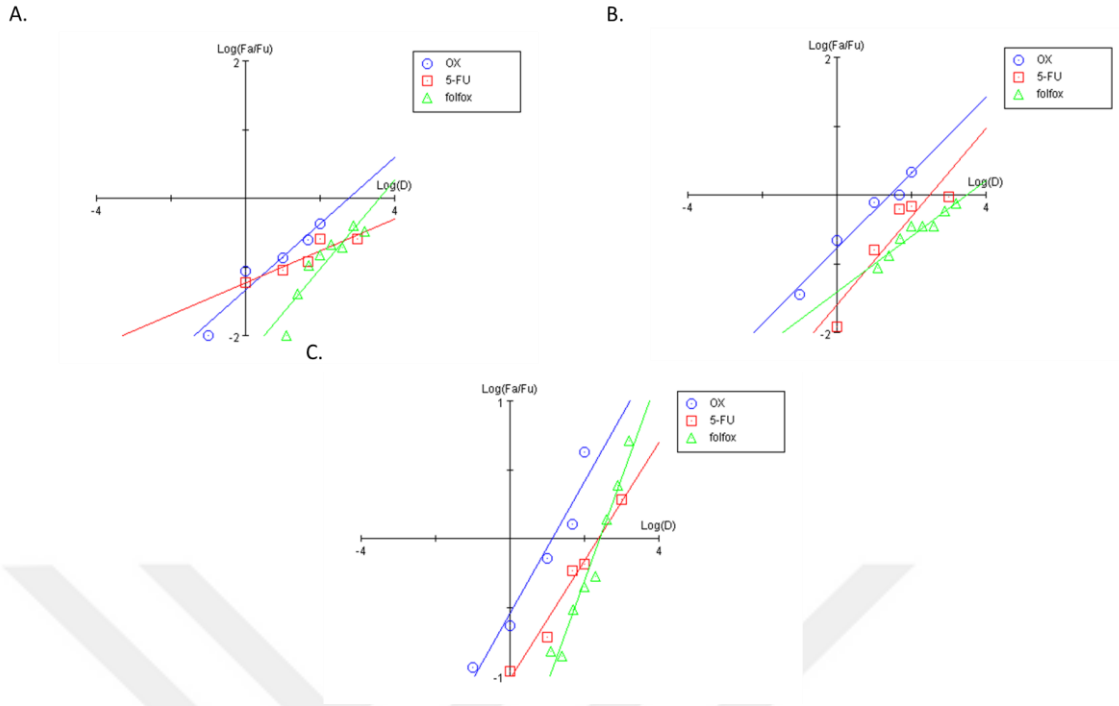
FOLFOX’un uygulanan dozlarının HT-29 hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisi, FOLFOX 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 kombinasyonları için 24. saatte sırasıyla %0,4, %9,7, %13, %17,5, %16,5, %28,5 ve %25, 48. saatte sırasıyla %8,1, %11,9, %19,2, %26,5, %26, %26,5, %37 ve %43,4, 72. saatte sırasıyla %13,2, %12,3, %23,5, %30,8, %34,7, %58,25, %71 ve %83,7 olarak bulunmuştur. FOLFOX kombinasyonunun IC50 değeri, 24 saat inkübasyon sonucu yaklaşık 189,533 μ M OX+7.581,32 μ M 5-FU bulunmuştur. 48 saat inkübasyon sonucu 70 μ M OX+2.818,92 μ M 5-FU konsantrasyonlarına ait kombinasyon ve 72 saat inkübasyon sonucu yaklaşık 6,25 μ M OX+250 μ M 5-FU konsantrasyonlar olarak bulunmuştur. FOLFOX’un HT-29 insan kolon adenokarsinom hücre modelinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür.

FOLFOX kombinasyonunun HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin doz ve zaman artışına bağlı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.12).



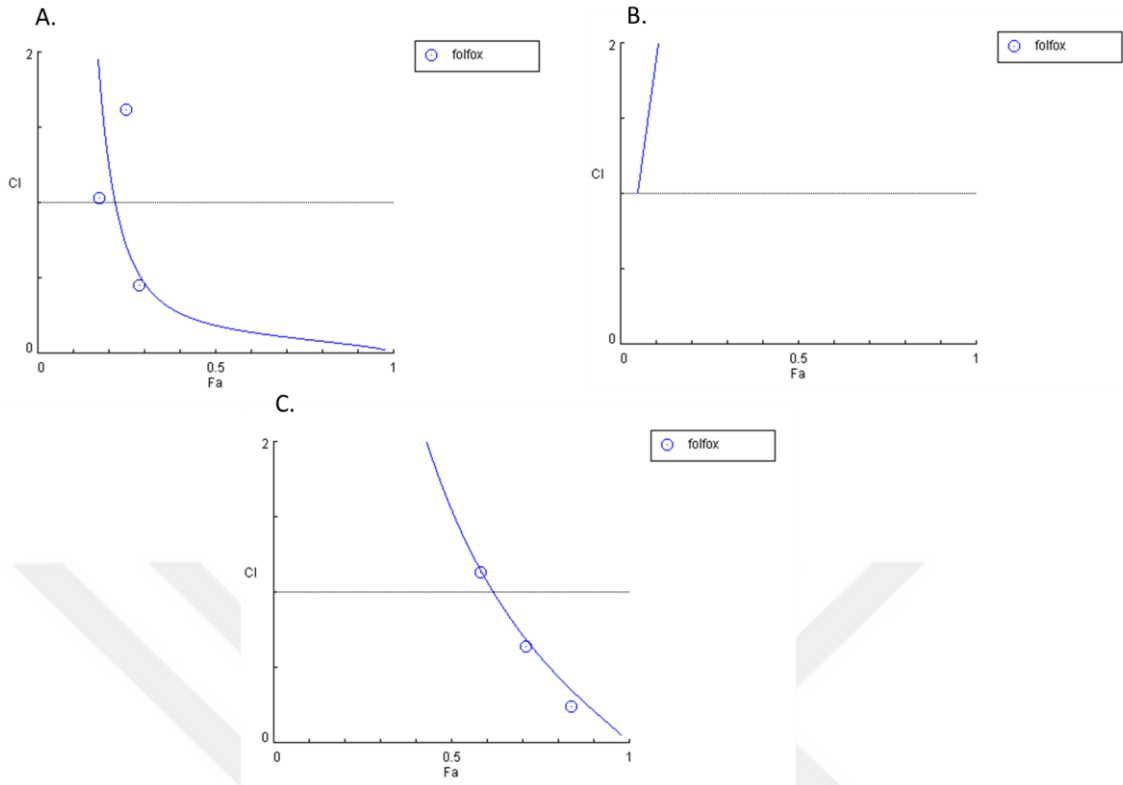
Şekil 4.12. FOLFOX kombinasyonlarına ait 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat dilimlerine ait Doz-Etki eğrileri

FOLFOX kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlerdeki Medyan Etki grafikleri Şekil 4.13'te sunulmuştur. 24 saatte medyan etki çizgisinin üstüne çıkan konsantrasyon olmamıştır (Şekil 4.13.A). 48 saatte sadece 50 ve 100 μ M OX medyan etki çizgisi üstünde kalmıştır (Şekil 4.13.B). 72 saatte ise FOLFOX 6, 7 ve 8, OX 50 ve 100 μ M ve 5-FU 1.000 μ M konsantrasyonlarında medyan etki çizgisi üstünde kalmıştır (Şekil 4.13.C).



Şekil 4.13. FOLFOX kombinasyonlarına ait 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat dilimlerine ait Medyan Etki grafikleri

FOLFOX kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlerdeki kombinasyon indeksi grafikleri Şekil 4.14'te sunulmuştur. Sadece 24. saatte 1 noktanın ve 72. saatte 2 noktanın sinerjetik etkili olduğu görülmüştür.



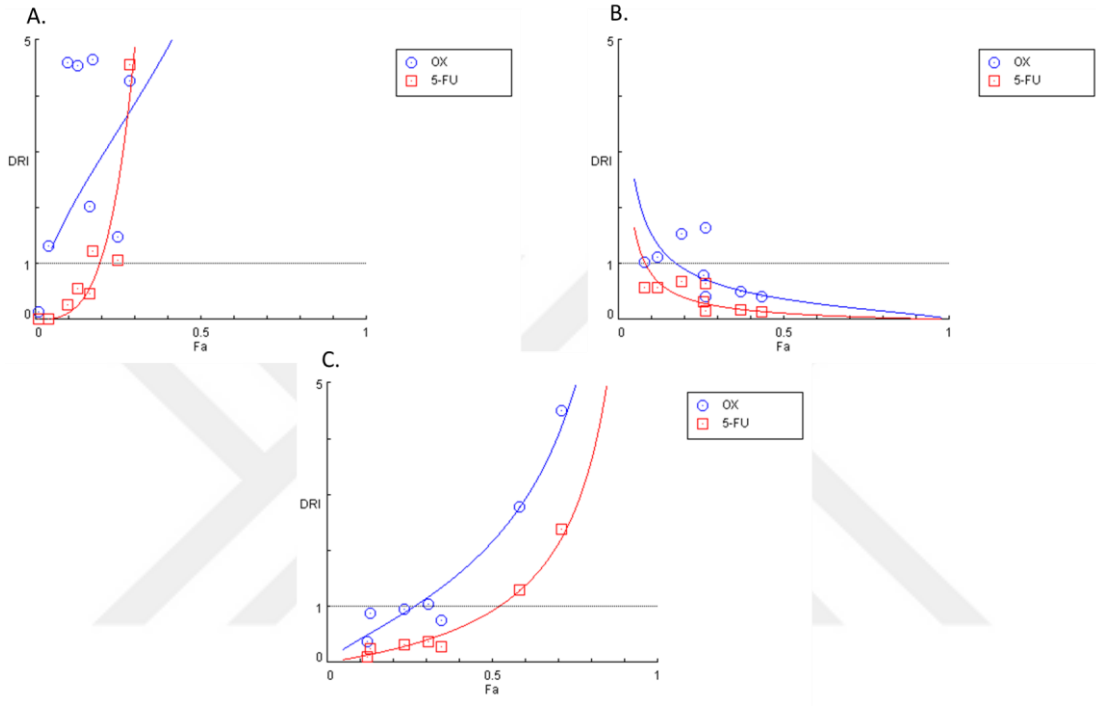
Şekil 4.14. FOLFOX kombinasyonlarına ait 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat dilimlerine ait kombinasyon indeksi grafikleri

FOLFOX kombinasyonuna ait farklı zaman dilimlerindeki CI değerleri ve etki sınıfları Tablo 4.1'te verilmiştir. Chou-Talalay sınıflandırmasına göre; FOLFOX kombinasyonlarının çoğunun kuvvetli antagonizm etkili olduğu görülmüştür. Sadece 24. saatte FOLFOX 7 ve 72. saatte FOLFOX 7 ve 8 sinerjetik etki göstermiştir.

Tablo 4.1. FOLFOX kombinasyonunun 24, 48 ve 72. saatlerde hesaplanan CI değerleri ve etki sınıflandırması

Uygulanan Süre	OX DOZ (µM)	5-FU DOZ (µM)	CI DEĞERİ	ETKİ SINIFI
24 saat	0,313	12,5	23.201,2	Çok kuvvetli antagonizm
	0,625	25	108,501	Çok kuvvetli antagonizm
	1,25	50	3,96306	Kuvvetli antagonizm
	2,5	100	2,04548	Antagonizm
	5	200	1,02978	Neredeyse aditif
	10	400	2,70458	Antagonizm
	20	800	0,45407	Sinerjizm
	40	1.600	1,62089	Antagonizm
48 saat	0,313	12,5	2,70554	Antagonizm
	0,625	25	2,68087	Antagonizm
	1,25	50	2,13021	Antagonizm
	2,5	100	2,16174	Antagonizm
	5	200	4,50877	Kuvvetli antagonizm
	10	400	8,64698	Kuvvetli antagonizm
	20	800	7,84051	Kuvvetli antagonizm
	40	1.600	10,1898	Çok kuvvetli antagonizm
72 saat	0,313	12,5	5,27955	Kuvvetli antagonizm
	0,625	25	12,6835	Çok kuvvetli antagonizm
	1,25	50	4,29303	Kuvvetli antagonizm
	2,5	100	3,71418	Kuvvetli antagonizm
	5	200	4,97934	Kuvvetli antagonizm
	10	400	1,13438	Hafif antagonizm
	20	800	0,64331	Sinerjizm
	40	1.600	0,24612	Kuvvetli sinerjizm

FOLFOX kombinasyonları için DRI grafikleri Şekil 4.15'te verilmiştir. FOLFOX kombinasyonu için bulunan DRI değerlerinin çoğu DRI=1 eksenini altında kalmıştır. Bu istenilen bir sonuç değildir. Doz kısıtlamasından ziyade doz artırımını ön görmektedir.



Şekil 4.15. FOLFOX kombinasyonuna ait OX ve 5-FU kemoterapötik ilaçlarının 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat dilimlerine ait DRI grafikleri

FOLFOX kombinasyonuna ait DRI değerleri aşağıda Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. 24, 48 ve 72 saatlik FOLFOX kombinasyonlarına ait DRI değerleri

Uygulama süresi	OX Doz (μM)	5-FU Doz (μM)	DRI (OX)	DRI (5-FU)
24 saat	0,313	12,5	0,14192	4,31E-5
	0,625	25	1,31038	0,00928
	1,25	50	4,59467	0,26699
	2,5	100	4,52921	0,54804
	5	200	4,65512	1,22704
	10	400	2,01180	0,45300
	20	800	4,25889	4,56068
	40	1.600	1,47417	1,06096
48 saat	0,313	12,5	1,02260	0,57883
	0,625	25	1,10817	0,56228
	1,25	50	1,53870	0,67553
	2,5	100	1,63504	0,64510
	5	200	0,78022	0,30988
	10	400	0,40876	0,16128
	20	800	0,49385	0,17195
	40	1.600	0,39992	0,13005
72 saat	0,313	12,5	0,88136	0,24126
	0,625	25	0,37292	0,09998
	1,25	50	0,95434	0,30815
	2,5	100	1,03288	0,36416
	5	200	0,74700	0,27468
	10	400	2,78838	1,28908
	20	800	4,49708	2,37564
	40	1.600	10,5152	6,62154

4.4. Modifiye Biyoaktif Fitokimyasal Türevlerinin Kemoterapötik İlaçlarla Kombinasyon Sonuçları

Tablo 4.3'te SI-1 ve GK-1 ile kemoterapötik ilaçların 48 saatlik zaman diliminde kullanılan kombinasyonlar gösterilmektedir. SI-1 ve GK-1'in 48 saatlik zaman dilimleri için elde edilen IC50 değerleri kombinasyonda kullanılacak dozu belirlemiştir. SI-1 ve GK-1 dozları IC50, IC50/4 ve IC50/16 oranlarında seyreltilerek uygulanmıştır. OX ve 5-FU, FOLFOX 1, 2, 3, 4, 5, 6 kombinasyonlarını oluşturan doz değerleri kullanılmıştır. Bu kombinasyonlar sabit olmayan oranlı olarak belirlenmiştir. SI-1 ile 5-FU kombinasyonu SI-1+5-FU, SI-1 ile OX kombinasyonu SI-1+OX, GK-1 ile 5-FU kombinasyonu GK-1+5-FU ve GK-1 ile OX kombinasyonu GK-1+OX ile belirtilmiştir.

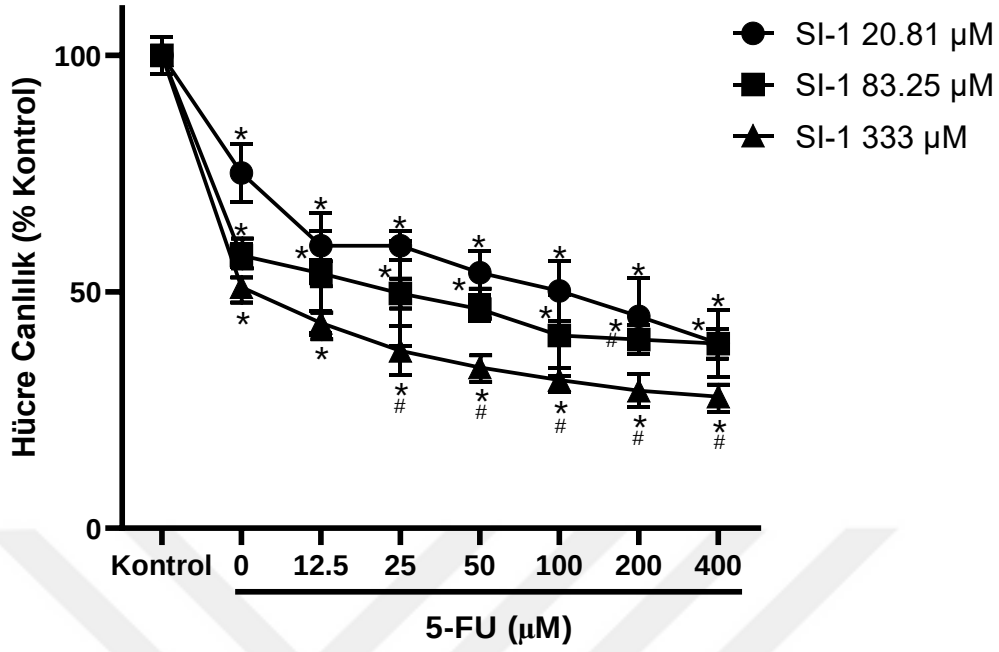
Tablo 4.3. SI-1 ve GK-1 bileşiklerinin kemoterapötik ilaçlar ile çeşitli konsantrasyonlardaki 48 saat dilimlerinde kombinasyon dozları

Fitokimyasal türevi	Konsantrasyon (uM)	Kemoterapötik ilaç	Konsantrasyon (uM)
SI-1	333	Oksaliplatin	0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10
	333	5-FU	12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400
	83,25	Oksaliplatin	0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10
	83,25	5-FU	12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400
	20,81	Oksaliplatin	0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10
	20,81	5-FU	12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400
GK-1	314,5	Oksaliplatin	0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10
	314,5	5-FU	12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400
	78,625	Oksaliplatin	0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10
	78,625	5-FU	12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400
	19,65	Oksaliplatin	0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10
	19,65	5-FU	12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400

4.4.1. SI-1 ile 5-FU Kemoterapi İlacının Kombinasyon Sonuçları

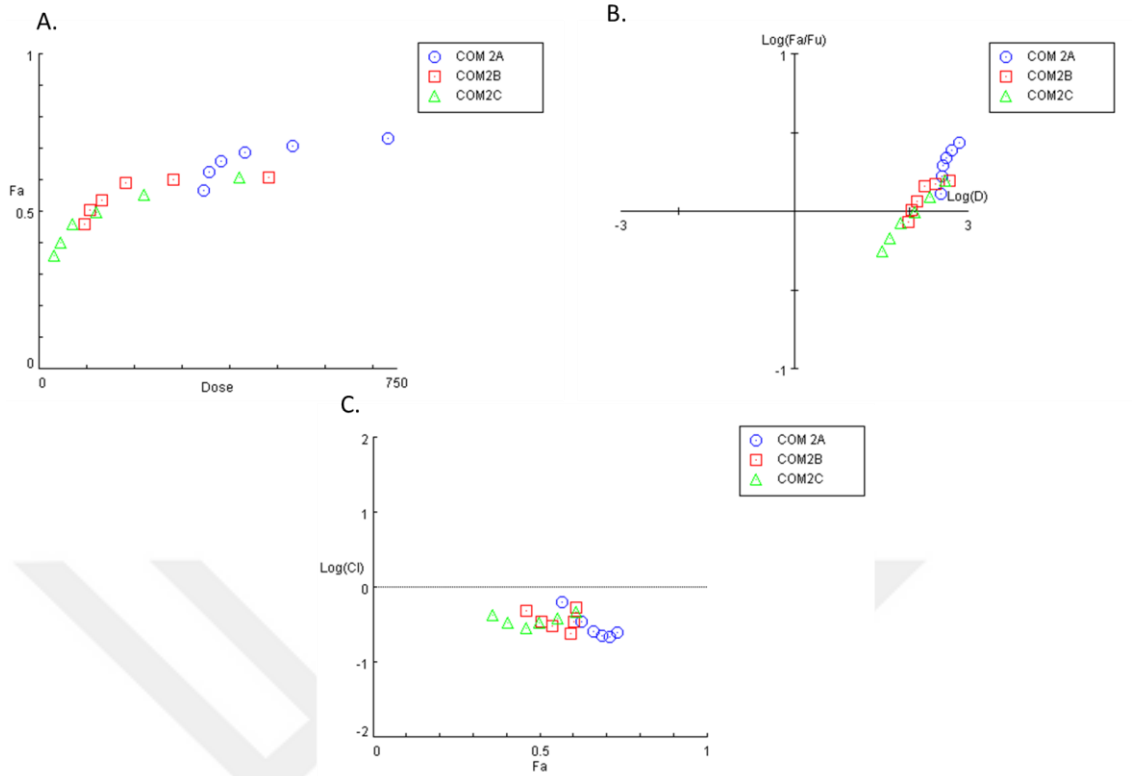
SI-1 333 (IC50), 83,25 (IC50/4) ve 20,81 (IC50/16) μ M ve 5-FU 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μ M kombinasyonunun HT-29 hücreleri ile 48 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık grafiği Şekil 4.16'da verilmiştir.

SI-1+5-FU kombinasyonlarına 48 saat maruz kalmanın HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür. 20,81 μ M SI-1+0, 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μ M 5-FU kombinasyonlarının inhibisyon etkisi sırasıyla, %24,9, %35,9, %40,3, %46, %49,9, %55,3 ve %61, 83,25 μ M SI-1+0, 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μ M 5-FU kombinasyonlarının inhibisyon etkisi sırasıyla %42,4, %46,1, %50,4, %53,7, %59,3, %60,1 ve %61 ve 333 μ M SI-1+0, 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μ M 5-FU kombinasyonlarının inhibisyon etkisi sırasıyla %50, %56,7, %62,6, %66,1, %68,7, %71 ve %73,2 olarak bulunmuştur. SI-1+5-FU kombinasyonu HT-29 hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı doz-bağımlı sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 4.16). Bununla beraber, bu kombinasyon uygulamasında SI-1'in 20,81, 83,25 ve 333 μ M konsantrasyonları ile yapılan 5-FU kombinasyon grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde SI-1+5-FU kombinasyonuna ait yüzde canlılık grafiği (*: $p<0,05$, ve kontrole karşı; #: $p<0,05$ ve 0 μM 5-FU'ya karşı)

Kombinasyonu oluşturan bileşiklerin dozlarının artımına bağlı olarak sitotoksik etkinin de arttığı görülmüştür (Şekil 4.17.A). Kombinasyonların çoğunun medyan etki çizgisinin üstünde kaldığı görülmüştür. Hücre canlılığını yarıdan fazlasını inhibe ettiğini göstermiştir (Şekil 4.17.B). Log (CI) eksenini altında kalan kombinasyon noktaları sinerjetik etki göstermektedir. Sonuçların Log (CI) eksenini altında kaldığı görülmüştür. Kombinasyonların tamamının sinerjizm etkili olduğu sonucu çıkmaktadır (Şekil 4.17.C).



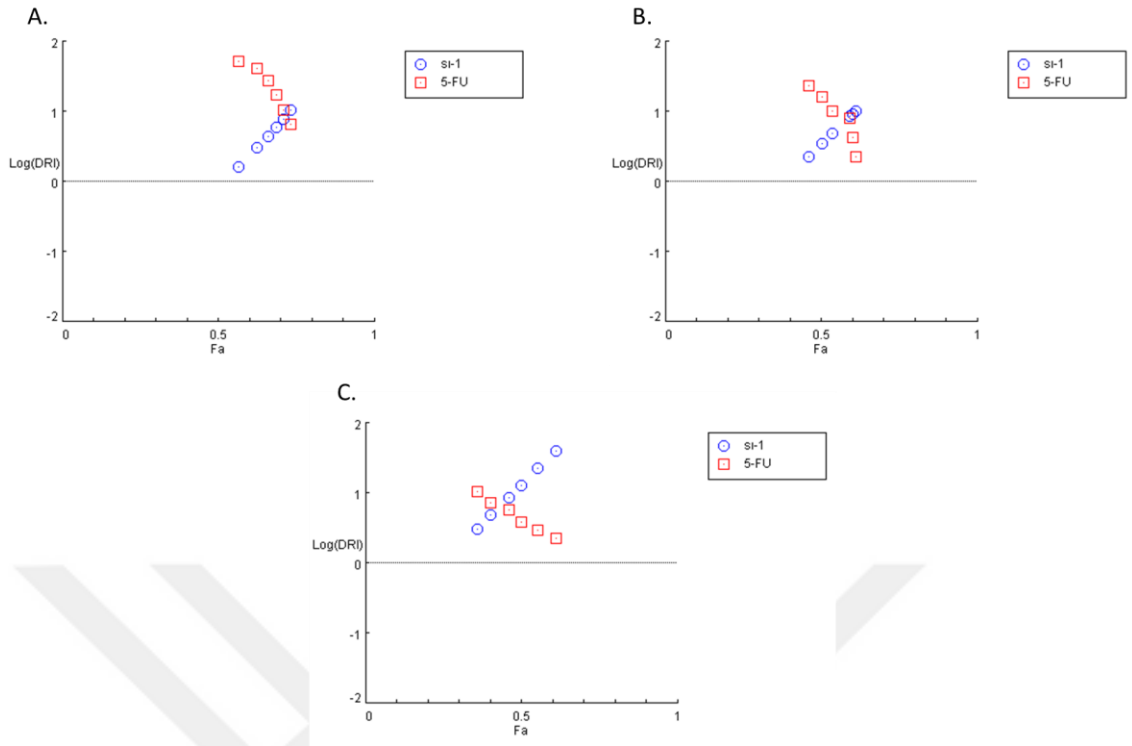
Şekil 4.17. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde SI-1+5-FU kombinasyonuna ait Doz-Etki eğrisi (A), Medyan Etki grafiği (B) ve Logaritmik kombinasyon indeksi grafiği (C) (COM 2A; 333 μM SI-1, COM2B; 83,25 μM SI-1 ve COM 2C; 20,81 μM SI-1 ile 5-FU 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarının kombinasyonlarını belirtmektedir)

Kombinasyonlara ait CI değerleri ve etki sınıfları Tablo 4.4’de verilmiştir. Chou-Talalay sınıflandırmasına göre; SI-1+5-FU kombinasyonlarının tamamının sinerjetik etkili olduğu görülmüştür. SI-1 konsantrasyonu arttıkça sinerjetik etki kuvvetinin güçlendiği görülmüştür.

Tablo 4.4. SI-1'in 20,81, 83,25 ve 333 μ M konsantrasyonları ile 5-FU'nun konsantrasyonlarının kombinasyonu sonucu 48 saatte bulunan CI değerleri ve etki sınıflandırması

SI-1 DOZ (μ M)	5-FU DOZ (μ M)	CI DEĞERİ	ETKİ SINIFI
20,81	12,5	0,42501	Sinerjizm
	25	0,34066	Sinerjizm
	50	0,28844	Kuvvetli sinerjizm
	100	0,33604	Sinerjizm
	200	0,38806	Sinerjizm
	400	0,46513	Sinerjizm
83,25	12,5	0,49062	Sinerjizm
	25	0,35227	Sinerjizm
	50	0,30484	Sinerjizm
	100	0,24296	Kuvvetli sinerjizm
	200	0,34411	Sinerjizm
	400	0,53826	Sinerjizm
333	12,5	0,63361	Sinerjizm
	25	0,35536	Sinerjizm
	50	0,26174	Kuvvetli sinerjizm
	100	0,22531	Kuvvetli sinerjizm
	200	0,22133	Kuvvetli sinerjizm
	400	0,24965	Kuvvetli sinerjizm

Kombinasyonlara ait Log (DRI) grafikleri Şekil 4.18'de verilmiştir. SI-1+5-FU kombinasyonlarının tamamı için Log(DRI) pozitif değerde olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.18. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde 333 μM (A), 83,25 μM (B) ve 20,81 μM (C) SI-1 ile 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM 5-FU kombinasyonlarına ait Log(DRI) grafikleri

Fitokimyasal türevi SI-1 ve 5-FU'nun çeşitli doz kombinasyonlarına ait DRI değerleri Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5. SI-1+5-FU kombinasyonlarına ait 48. saatte elde edilen DRI değerleri

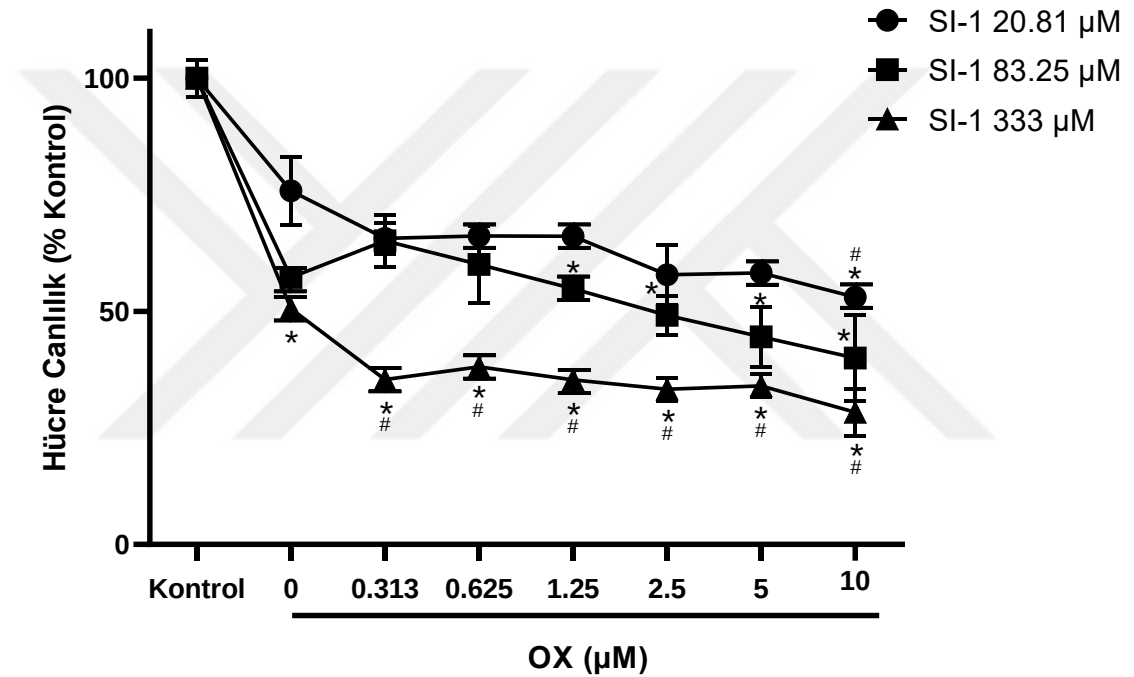
SI-1 Doz (μM)	5-FU Doz (μM)	DRI (SI-1)	DRI (5-FU)
20,81	12,5	3,04251	10,3808
	25	4,86837	7,39356
	50	8,74442	5,74456
	100	12,9617	3,86258
	200	22,3714	2,91238
	400	40,3730	2,27088
83,25	12,5	2,23498	23,1541
	25	3,44882	16,0471
	50	4,81155	10,3088
	100	8,54440	7,94120
	200	9,29046	4,22881
	400	10,2148	2,27088
333	12,5	3,04251	10,3808
	25	4,86837	7,39356
	50	8,74442	5,74456
	100	12,9617	3,86258
	200	22,3714	2,91238
	400	40,3730	2,27088

4.4.2. SI-1 ile OX Kemoterapi İlacının Kombinasyon Sonuçları

SI-1 333 (IC₅₀), 83,25 (IC₅₀/4) ve 20,81 (IC₅₀/16) μM ile OX 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μM kombinasyonunun HT-29 hücreleri ile 48 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık grafikleri Şekil 4.19’da verilmiştir.

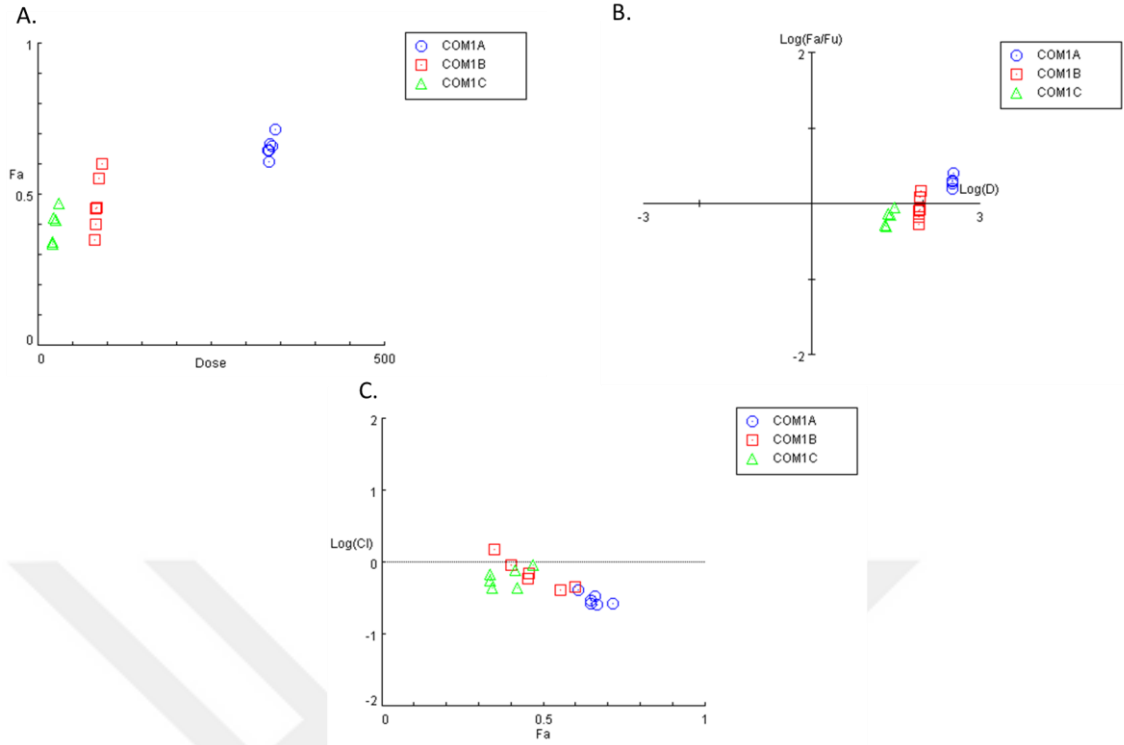
SI-1+OX kombinasyonlarına 48 saat maruz kalmanın HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür. 20,81 μM SI-1+0, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μM OX kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının inhibisyon etkisi sırasıyla %24,2, %34,4, %33,5, %33,7, %42,2, %41,4 ve %47, 83.25 μM SI-1+0, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μM OX kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının inhibisyon etkisi sırasıyla

%42,8, %34,9, %40, %45,2, %45,6, %55,5 ve %60 ve 333 μM SI-1+0, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μM OX kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının inhibisyon etkisi sırasıyla %50, %64,7, %62, %64,7, %66,8, %66,1 ve %71,7 olarak bulunmuştur. SI-1+OX kombinasyonu HT-29 hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı doz-bağımlı sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 4.19). Bununla beraber, bu kombinasyon uygulamasında 20,81, 83,25 ve 333 μM SI-1 ile yapılan OX kombinasyon grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde SI-1+OX kombinasyonuna ait yüzde canlılık grafiği (*: $p < 0,05$, ve kontrole karşı; #: $p < 0.05$ ve 0 μM OX'a karşı)

Kombinasyonu oluşturan bileşenlerin dozu arttıkça etkinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.20.A). Kombinasyon dozlarının çoğu medyan etki çizgisinin üstünde kalmıştır. (Şekil 4.20.B). Elde edilen değerlerin Log (CI) eksenine altında kaldığı görülmüştür. Kombinasyonların sinerjizm etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.20.C).



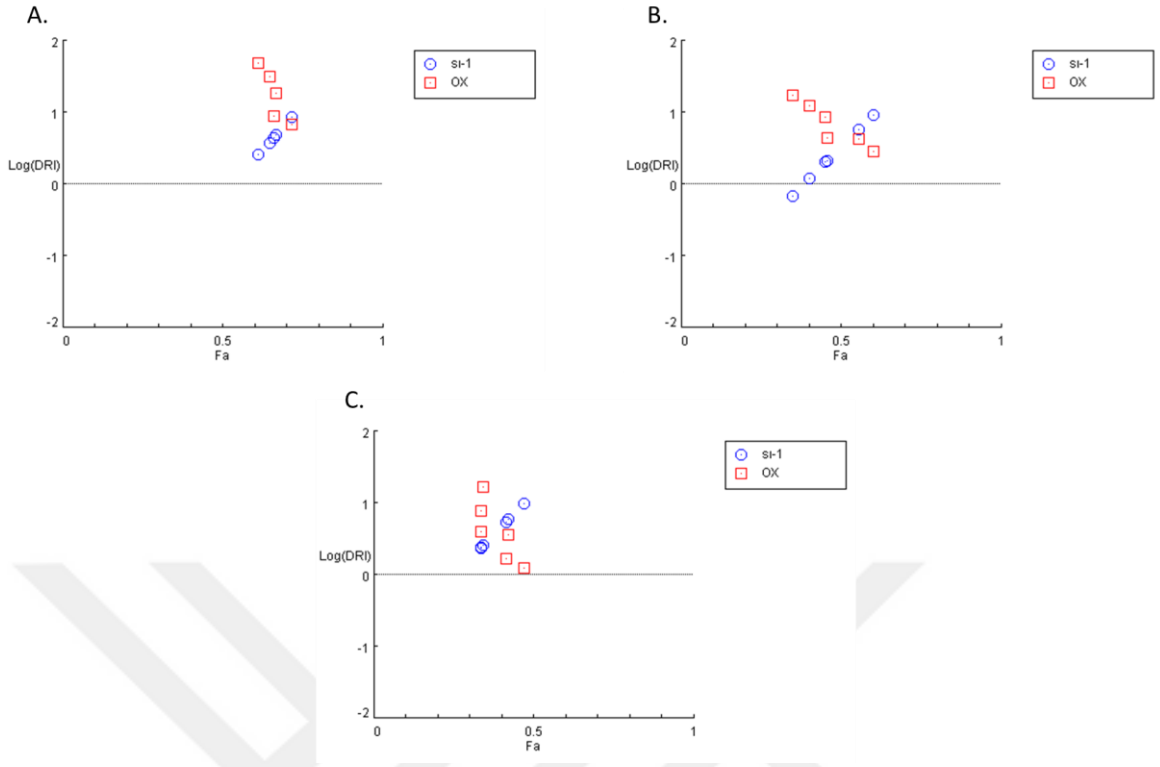
Şekil 4.20. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde SI-1+OX kombinasyonuna ait Doz-Etki eğrisi (A), Medyan Etki grafiği (B) ve Logaritmik kombinasyon indeksi grafiği (C) [COM 1A; SI-1 333 μ M, COM1B; SI-1 83,25 μ M ve COM 1C; SI-1 20,81 μ M ile OX konsantrasyonlarının (0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 μ M) kombinasyonunu belirtmektedir.]

Kombinasyonlara ait CI değerleri ve etki sınıfları Tablo 4.6’da verilmiştir. Chou-Talalay sınıflandırmasına göre; SI-1+OX kombinasyonunun 20,81 μ M SI-1+10 μ M OX ve 83,25 μ M SI-1+0,313 ve 0,625 μ M OX kombinasyonları dışındaki tüm kombinasyonların sinerjetik etkili olduğu görülmüştür.

Tablo 4.6. SI-1'in 20,81, 83,25 ve 333 μ M konsantrasyonları ile OX konsantrasyonlarının kombinasyonu sonucu 48. saatte bulunan CI değerleri ve etki sınıflandırması

SI-1 DOZ (μ M)	OX DOZ (μ M)	CI DEĞERİ	ETKİ SINIFI
20,81	0,313	0,44760	Sinerjizm
	0,625	0,55638	Sinerjizm
	1,25	0,67036	Sinerjizm
	2,5	0,44744	Sinerjizm
	5	0,77137	İlımlı sinerjizm
	10	0,91711	Neredeyse aditif
83,25	0,313	1,50784	Antagonizm
	0,625	0,91855	Neredeyse aditif
	1,25	0,60462	Sinerjizm
	2,5	0,69359	Sinerjizm
	5	0,40716	Sinerjizm
	10	0,45581	Sinerjizm
333	0,313	0,27134	Kuvvetli sinerjizm
	0,625	0,41218	Sinerjizm
	1,25	0,29484	Kuvvetli sinerjizm
	2,5	0,26224	Kuvvetli sinerjizm
	5	0,33890	Sinerjizm
	10	0,26497	Kuvvetli sinerjizm

Kombinasyonlara ait Log(DRI) grafikleri Şekil 4.21'de verilmiştir. SI-1+OX kombinasyonlarının tamamı için doz azaltımı istenilen OX kemoterapötik ilacının Log(DRI) değerlerinin pozitif olduğu görülmüştür. Bu kombinasyonlarla OX'un kullanılan dozunun azaltılabileceği bulunmuştur.



Şekil 4.21. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde 333 µM (A), 83,25 µM (B) ve 20,81 µM (C) SI-1 ile 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 µM OX kombinasyonlarına ait Log(DRI) grafikleri

SI-1+OX kombinasyonuna ait DRI değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre OX kemoterapötik ajanının DRI değerinin, SI-1 konsantrasyonunda artışa bağlı olarak arttığı görülmüştür.

Tablo 4.7. SI-1+OX kombinasyonlarına ait 48. saatte elde edilen DRI değerleri

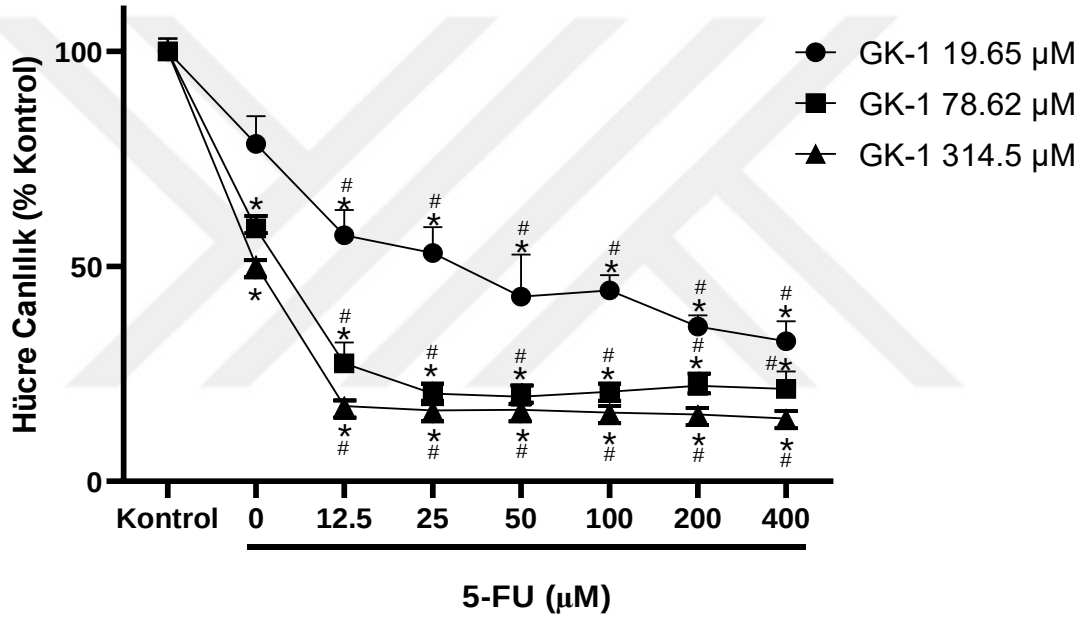
SI-1 Doz (μM)	OX Doz (μM)	DRI (SI-1)	DRI (OX)
20,81	0,313	2,57798	16,7496
	0,625	2,33022	7,85970
	1,25	2,38340	3,98739
	2,5	5,93080	3,58638
	5	2,45958	1,70008
	10	9,67566	1,22887
83,25	0,313	0,68954	17,3602
	0,625	1,19365	12,3797
	1,25	2,03992	8,74135
	2,5	2,12449	4,48654
	5	5,77677	4,27253
	10	9,19348	2,88154
333	0,313	3,79515	127,411
	0,625	2,55144	49,4088
	1,25	3,79515	31,9037
	2,5	4,79963	18,5563
	5	4,43484	8,81763
	10	8,57415	6,74105

4.4.3. GK-1 ile 5-FU Kemoterapi İlacının Kombinasyon Sonuçları

GK-1 314,5 (IC₅₀), 78,625 (IC₅₀/4) ve 19,65 (IC₅₀/16) μM konsantrasyonları ile 5-FU 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM kombinasyonunun 48 saat maruziyet sonucunda bulunan yüzde canlılık grafikleri Şekil 4.22’de verilmiştir.

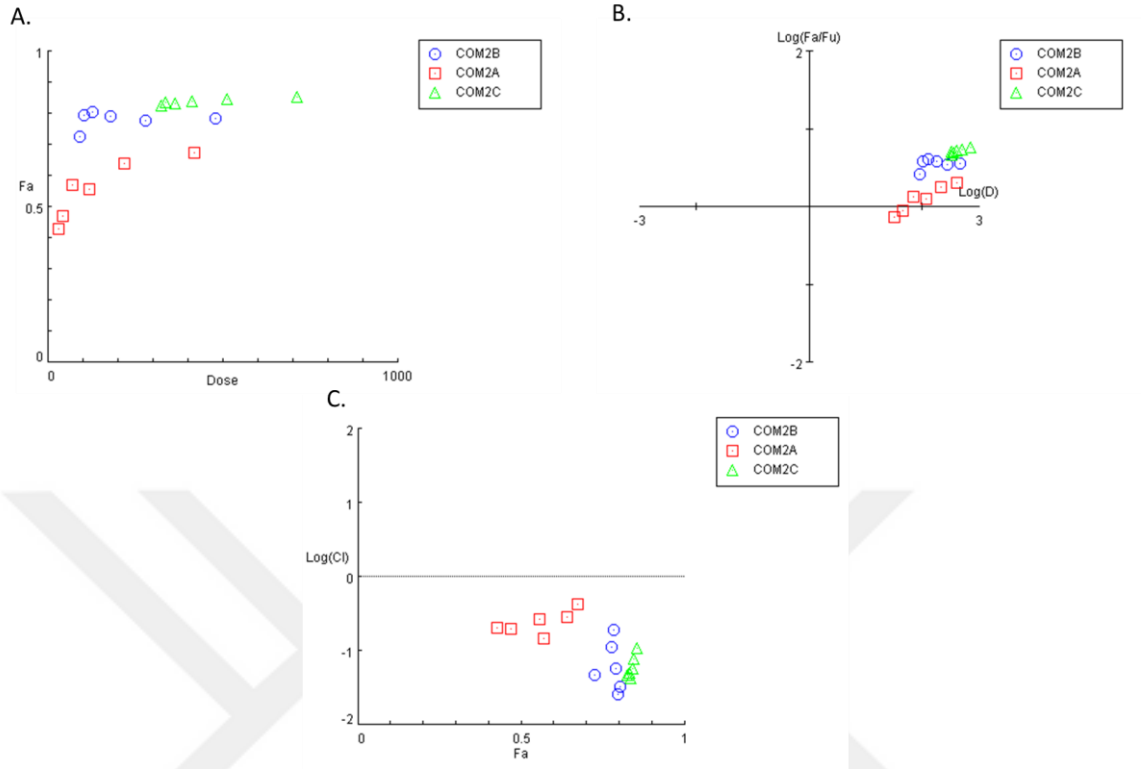
GK-1+5-FU kombinasyonunun HT-29 hücreleri ile 48 saat muamele edilmesinin sitotoksik etkili olduğu görülmüştür. 19,65 μM GK-1+0, 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM 5-FU kombinasyonlarının inhibisyon etkileri sırasıyla %21,6, %42,8, %47, %57,1, %55,7, %64 ve %67,4, 78,625 μM GK-1+0, 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM 5-FU kombinasyonlarının inhibisyon etkileri sırasıyla %41,2, %72,6, %79,6,

%80,4, %79,2, %77,9 ve %78,5 ve 314 μM GK-1+0, 12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM 5-FU kombinasyonlarının inhibisyon etkileri sırasıyla %50, %82,5, %83,6, %83,4, %84,1, %84,5 ve %85,4 olarak bulunmuştur. Hücre canlılığının GK-1 ve 5-FU'nun en düşük dozlarında yapılan kombinasyonlarda dahi yarıya yakın bir inhibisyon oranı olduğu görülmüştür. GK-1+5-FU kombinasyonları HT-29 hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı doz-bağımlı sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 4.19). Bununla beraber, bu kombinasyon uygulamasında GK-1'in 19,65 μM , 78,65 μM ve 314,5 μM konsantrasyonları ile yapılan 5-FU kombinasyon grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde GK-1+5-FU kombinasyonuna ait yüzde canlılık grafiği (*: $p<0,05$, ve kontrole karşı; #: $p<0.05$ ve 0 μM 5-FU'ya karşı)

Kombinasyonu oluşturan bileşiklerin doz artımına bağlı olarak sitotoksik etkinin de arttığı görülmüştür (Şekil 4.23.A). Kombinasyon dozlarının çoğu medyan etki çizgisinin üstünde kalmıştır. Kombinasyon değerlerinin büyük çoğunluğu hücre canlılığının yarısından fazlasını inhibe etmiştir (Şekil 4.23.B). Elde edilen değerlerin Log(CI) eksenini altında kaldığı görülmüştür. Kombinasyonlar sinerjetik etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.23.C).



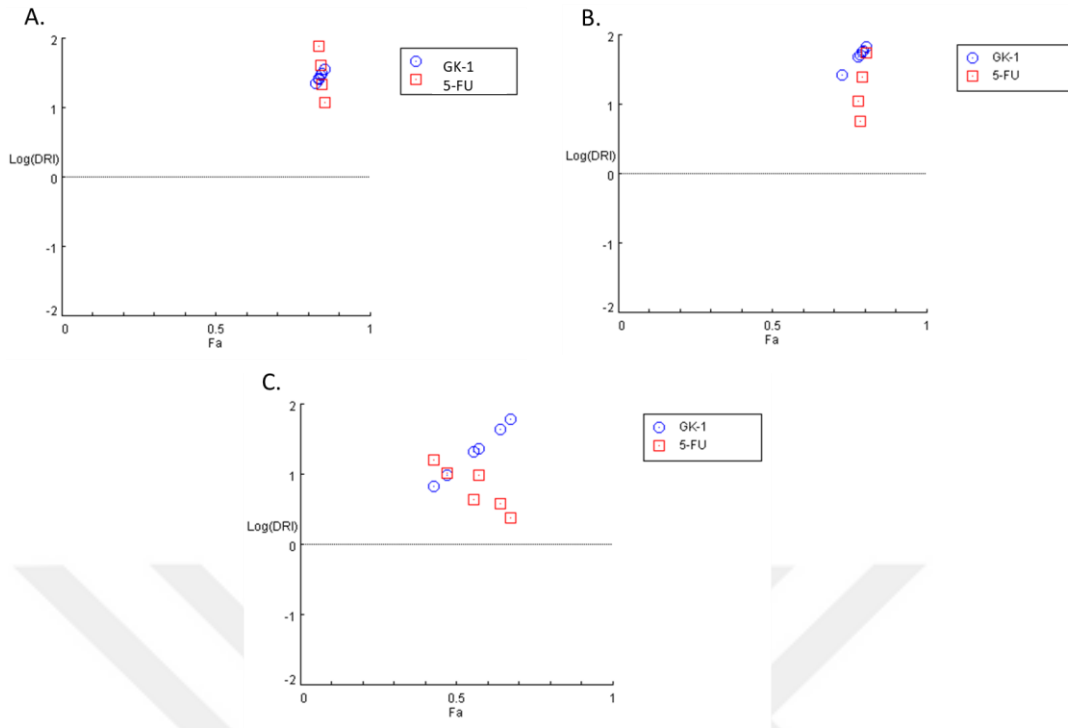
Şekil 4.23. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde GK-1+5-FU kombinasyonuna ait Doz-Etki eğrisi (A), Medyan Etki grafiği (B) ve Logaritmik kombinasyon indeksi grafiği (C) [COM 2A; 19,65 μ M GK-1, COM2B; 78,625 μ M GK-1 ve COM 2C; 314,5 μ M GK-1 ile 5-FU konsantrasyonlarının (12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μ M) kombinasyonlarını belirtmektedir.]

Kombinasyonların CI değerleri ve etki sınıfları Tablo 4.8’de verilmiştir. Chou-Talalay sınıflandırmasına göre; GK-1+5-FU kombinasyonlarının kuvvetli veya çok kuvvetli sinerjizm etkili olduğu görülmüştür.

Tablo 4.8. GK-1'in 19,65, 78,625 ve 314,5 μ M konsantrasyonları ile 5-FU'nun konsantrasyonlarının kombinasyonu sonucu 48 saatte bulunan CI değerleri ve etki sınıflandırması

GK-1 DOZ (μ M)	5-FU DOZ (μ M)	CI DEĞERİ	ETKİ SINIFI
19,65	12,5	0,20837	Kuvvetli sinerjizm
	25	0,19717	Kuvvetli sinerjizm
	50	0,14439	Kuvvetli sinerjizm
	100	0,27087	Kuvvetli sinerjizm
	200	0,28331	Kuvvetli sinerjizm
	400	0,42877	Sinerjizm
78,625	12,5	0,04676	Çok kuvvetli sinerjizm
	25	0,02614	Çok kuvvetli sinerjizm
	50	0,03264	Çok kuvvetli sinerjizm
	100	0,05738	Çok kuvvetli sinerjizm
	200	0,11065	Kuvvetli sinerjizm
	400	0,18966	Kuvvetli sinerjizm
314,5	12,5	0,04731	Çok kuvvetli sinerjizm
	25	0,04331	Çok kuvvetli sinerjizm
	50	0,05113	Çok kuvvetli sinerjizm
	100	0,05813	Çok kuvvetli sinerjizm
	200	0,07778	Çok kuvvetli sinerjizm
	400	0,10959	Kuvvetli sinerjizm

Kombinasyonlara ait Log(DRI) grafikleri Şekil 4.24'te verilmiştir. GK-1+5-FU kombinasyonlarının tamamı için Log(DRI) pozitif değerde olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.24. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde 314,5 μM (A), 78,625 μM (B) ve 19,65 μM (C) GK-1 ile 5-FU kombinasyonlarına ait Log(DRI) grafikleri

GK-1+5-FU'nun çeşitli kombinasyonlarına ait DRI değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir. Kombinasyonu oluşturan GK-1 doz artışına bağlı olarak 5-FU'nun DRI değerinin arttığı görülmüştür. Fakat kombinasyonu oluşturan 5-FU dozu artışına bağlı olarak DRI değerinin azaldığı görülmüştür.

Tablo 4.9. GK-1+5-FU Kombinasyonlarına ait 48. saate elde edilen DRI değerleri

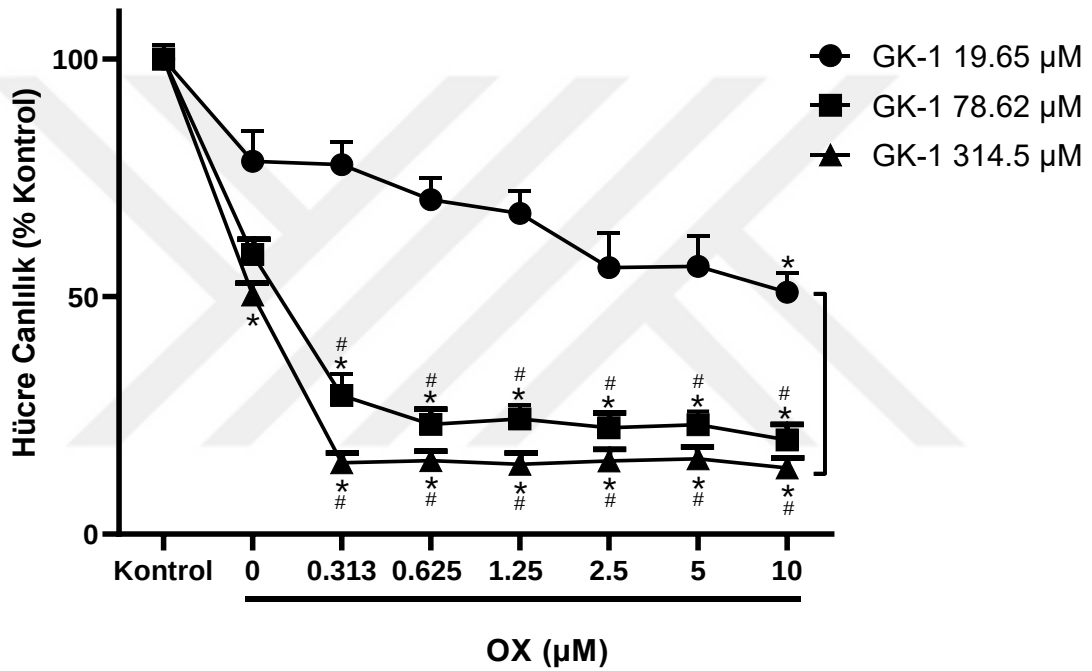
GK-1 Doz (μM)	5-FU Doz (μM)	DRI (GK-1)	DRI (5-FU)
19,65	12,5	6,85077	16,0263
	25	9,87244	10,4303
	50	23,6461	9,79419
	100	20,9205	4,48293
	200	44,0688	3,83698
	400	60,9759	2,42501
78,625	12,5	26,3217	114,046
	25	60,5176	103,975
	50	67,3898	56,1829
	100	57,4164	25,0257
	200	48,6344	11,1004
	400	52,4593	5,86183
314,5	12,5	22,8688	278,887
	25	27,0558	157,428
	50	26,2241	76,9604
	100	29,2923	41,6783
	200	31,2599	21,8399
	400	36,3717	12,1809

4.4.4. GK-1 ile OX Kemoterapi İlacının Kombinasyon Sonuçları

GK-1 314,5 (IC50), 78,625 (IC50/4) ve 19,65 (IC50/16) μM konsantrasyonları ile OX 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarının kombinasyonlarının HT-29 hücreleri ile 48 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık grafiği Şekil 4.25'te verilmiştir.

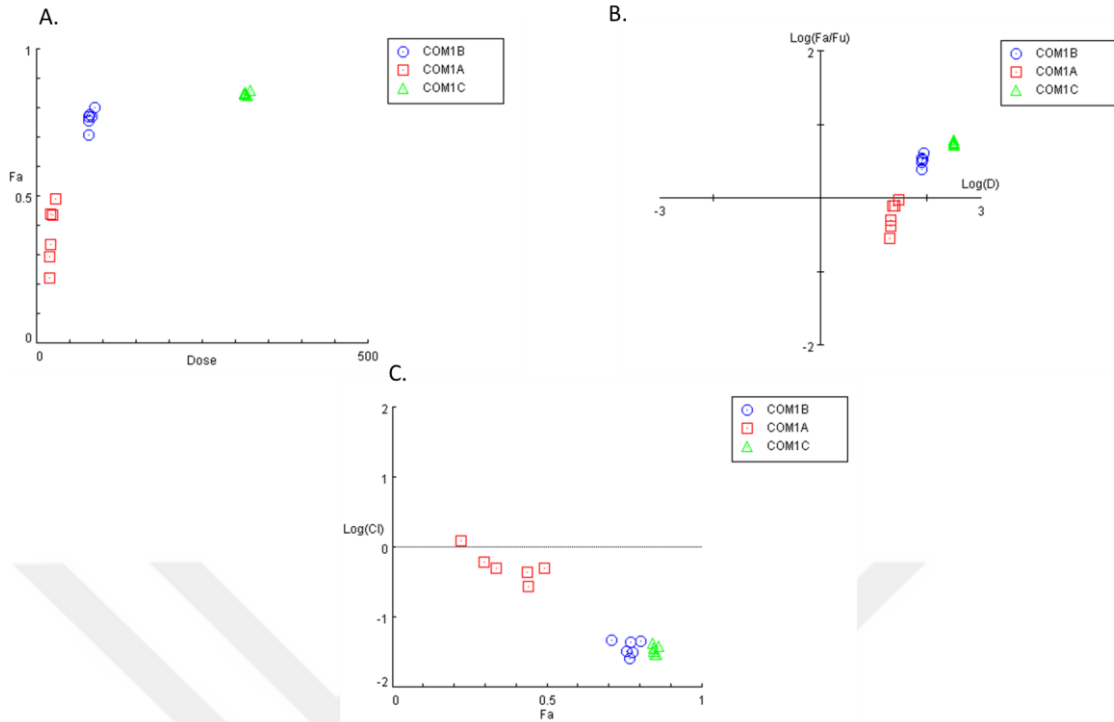
GK-1+OX kombinasyonlarının 48 saat maruz kalmanın HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür. 19,65 μM GK-1+0, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μM OX kombinasyonlarının inhibisyon etkisi sırasıyla %21,6, %22,3,

%29,6, %33,5, %44, %43,7 ve %49,1, 78,625 μ M GK-1+0, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μ M OX kombinasyonlarının inhibisyon etkisi sırasıyla %41,2, %70,9, %76,9, %75,8, %77,6, %77 ve %80,2 ve 314,5 μ M GK-1+0, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μ M OX kombinasyonlarının inhibisyon etkisi sırasıyla %50, %85, %84,6, %85,4, %84,6, %84,2 ve %86,1 olarak bulunmuştur. GK-1+OX kombinasyonu HT-29 hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı doz-bağımlı sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 4.25). 19,65 μ M GK-1+OX kombinasyon grubu ile 314,5 μ M GK-1+OX kombinasyon grubunun arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,01$)(Şekil 4.25).



Şekil 4.25. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde GK-1+OX kombinasyonuna ait yüzde canlılık grafiği (*: $p<0,05$, ve kontrole karşı; #: $p<0,05$ ve 0 μ M OX'a karşı)

Kombinasyonu oluşturan GK-1 dozu arttıkça sitotoksik etkinin de arttığı görülmüştür (Şekil 4.26.A). 78,625 μ M ve 314,5 μ M GK-1+OX kombinasyon gruplarının tamamı medyan etki çizgisinin üstüne kalmıştır (Şekil 4.26.B). Kombinasyon değerlerinin tamamının Log (CI) eksenini altında kaldığı bulunmuştur. Kombinasyonların sinerjetik etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.26.C).



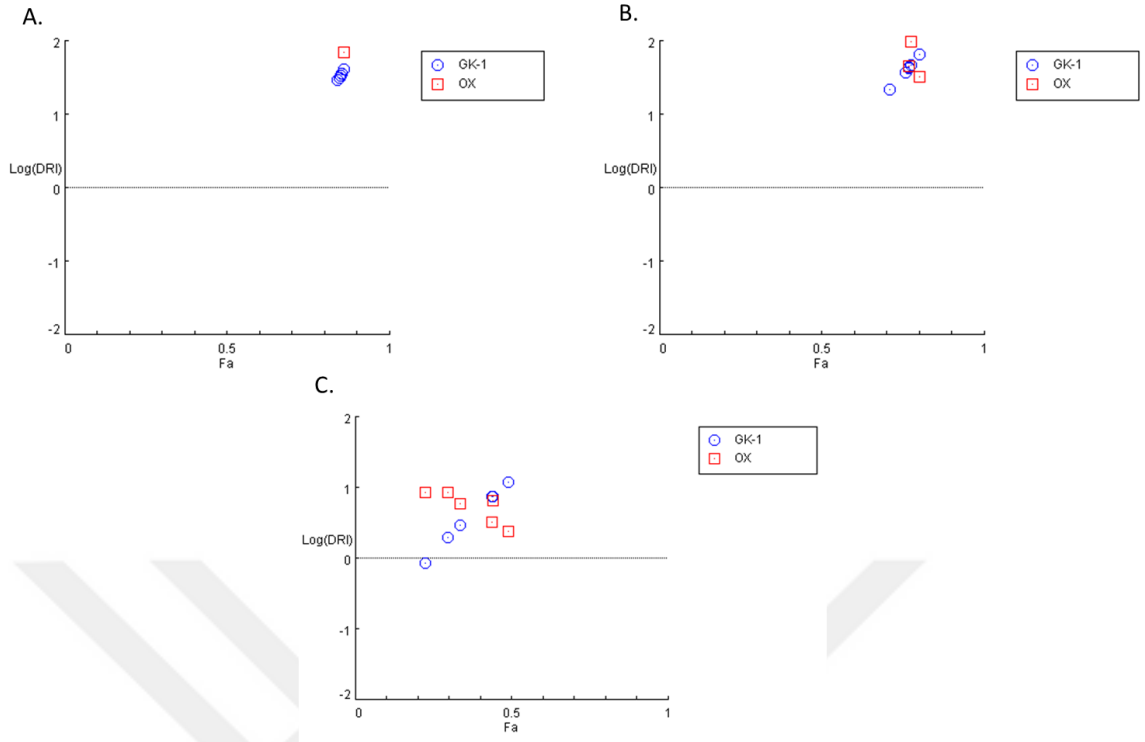
Şekil 4.26. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde GK-1+OX kombinasyonuna ait Doz-Etki eğrisi (A), Medyan Etki grafiği (B) ve Logaritmik kombinasyon indeksi grafiği (C) [COM 1A; 19,65 μM GK-1, COM1B; 78,625 μM GK-1 ve COM 1C; 314,5 μM GK-1 ile OX konsantrasyonlarının (0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μM) kombinasyonlarını belirtmektedir.]

Kombinasyonlara ait CI değerleri ve etki sınıfları Tablo 4.10'da verilmiştir. Chou-Talalay sınıflandırmasına göre; 19,65 μM GK-1+0,313 μM OX kombinasyonu dışındaki kombinasyonların tamamının sinerjetik etkili olduğu görülmüştür. 314,5 μM ve 78,625 μM GK-1+OX kombinasyon gruplarının tamamının çok kuvvetli sinerjizm etkili olduğu görülmüştür.

Tablo 4.10. GK-1'in 19,65, 78,625, 314,5 μ M konsantrasyonları ile OX'un konsantrasyonlarının kombinasyonu sonucu 48 saatte bulunan CI değerleri ve etki sınıflandırması

GK-1 DOZ (μ M)	OX DOZ (μ M)	CI DEĞERİ	ETKİ SINIFI
19,65	0,313	1,26226	İlımlı antagonizm
	0,625	0,62012	Sinerjizm
	1,25	0,50888	Sinerjizm
	2,5	0,28095	Kuvvetli sinerjizm
	5	0,44064	Sinerjizm
	10	0,49730	Sinerjizm
78,625	0,313	0,04792	Çok kuvvetli sinerjizm
	0,625	0,02600	Çok kuvvetli sinerjizm
	1,25	0,03264	Çok kuvvetli sinerjizm
	2,5	0,03157	Çok kuvvetli sinerjizm
	5	0,04473	Çok kuvvetli sinerjizm
	10	0,04608	Çok kuvvetli sinerjizm
314,5	0,313	0,02996	Çok kuvvetli sinerjizm
	0,625	0,03258	Çok kuvvetli sinerjizm
	1,25	0,02948	Çok kuvvetli sinerjizm
	2,5	0,03591	Çok kuvvetli sinerjizm
	5	0,04298	Çok kuvvetli sinerjizm
	10	0,03861	Çok kuvvetli sinerjizm

GK-1+OX kombinasyonlarına ait Log(DRI) grafikleri Şekil 4.27'de verilmiştir. GK-1+OX kombinasyonlarının tamamı için DRI değerleri, Log(DRI) ekseninin üstünde kalmıştır.



Şekil 4.27. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerinde 314,5 μM (A), 78,625 μM (B) ve 19,65 μM (C) GK-1 ile OX kombinasyonlarına ait Log(DRI) grafikleri

GK-1+OX kombinasyonlarına ait DRI değerleri Tablo 4.11’de verilmiştir. GK-1+OX kombinasyon gruplarında GK-1 doz artışına bağlı olarak OX’un DRI değerinin arttığı bulunmuştur. Bu kombinasyon ile klinikte kullanılan ve ciddi yan etkileri bulunan OX’un doz azaltımına olanak sağlayabileceği bulunmuştur.

Tablo 4.11. GK-1+OX kombinasyonlarına ait 48. saatte elde edilen DRI değerleri

GK-1 Doz (μM)	OX Doz (μM)	DRI (GK-1)	DRI (OX)
19,65	0,313	0,87215	8,64529
	0,625	1,98287	8,63578
	1,25	2,92518	5,98715
	2,5	7,60985	6,68716
	5	7,41300	3,27072
	10	11,8311	2,42263
78,625	0,313	21,9760	413,362
	0,625	43,0064	364,009
	1,25	37,7240	163,019
	2,5	46,8537	97,7985
	5	43,5311	45,9674
	10	65,5818	32,4369
314,5	0,313	33,9727	1.901,77
	0,625	31,7789	900,435
	1,25	36,3717	504,318
	2,5	31,7789	225,109
	5	29,7686	106,538
	10	41,1421	69,9210

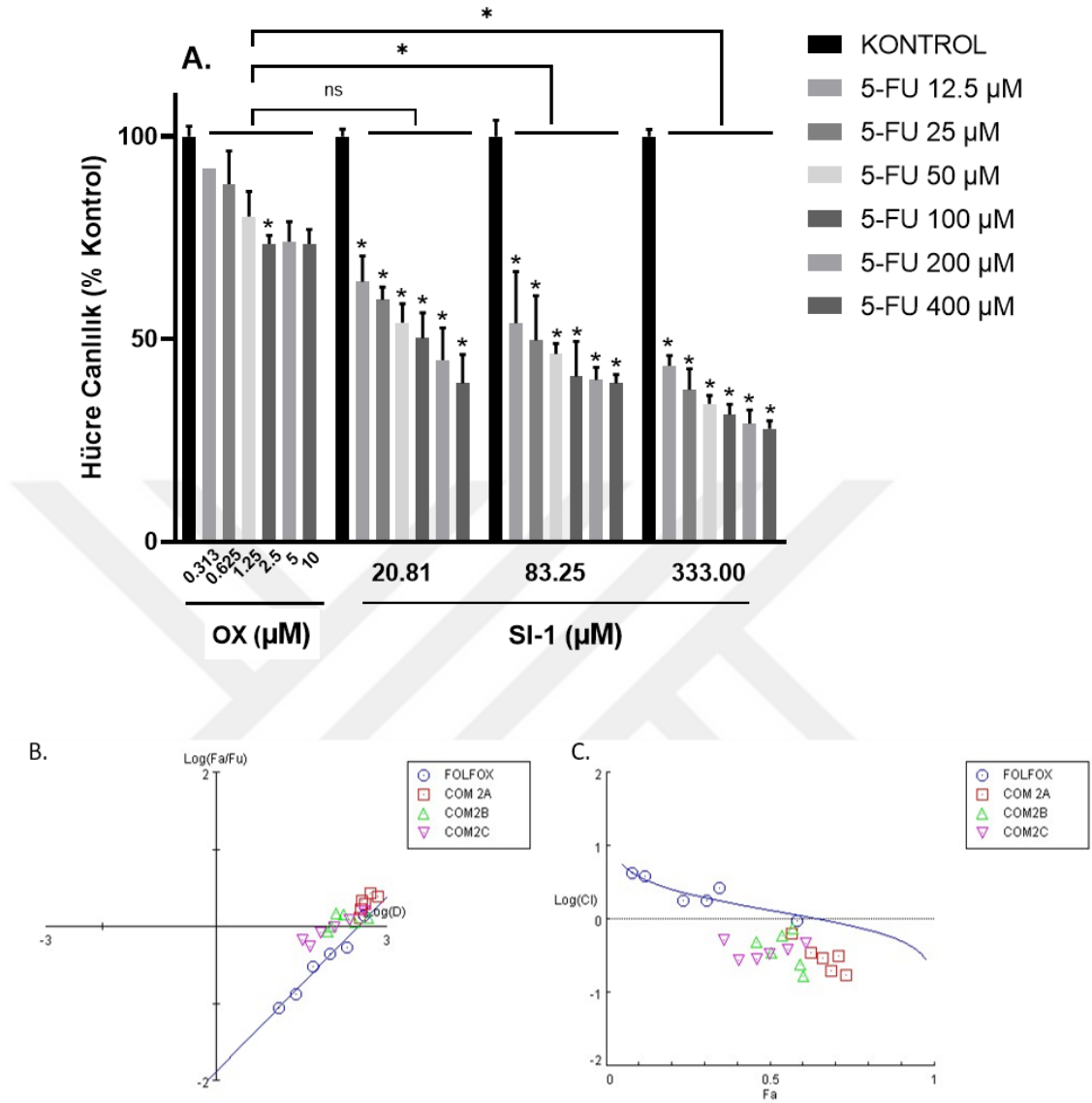
4.5. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Yapıların 5-FU veya OX ile Kombinasyonlarının Terapötik Etkilerinin FOLFOX ile Karşılaştırılması

Modifiye edilmiş biyoaktif fitokimyasal türevlerin, FOLFOX kombinasyonunu oluşturan kemoterapötik ilaçlarla ve aynı dozlarda kombinlenerek uygulanmıştır. Bu bölümde uygulanan ilaç kombinasyonlarının HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, medyan etkileri, DRI ve CI değerleri karşılaştırılmıştır.

4.5.1. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Yapı SI-1 ile 5-FU veya OX Kombinasyonunun Terapötik Etkinliklerinin FOLFOX Kombinasyonunun Karşılaştırılması

SI-1+5-FU ve FOLFOX kombinasyonlarının HT-29 hücreleri üzerinde 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırılması Şekil 4.28'de verilmiştir.

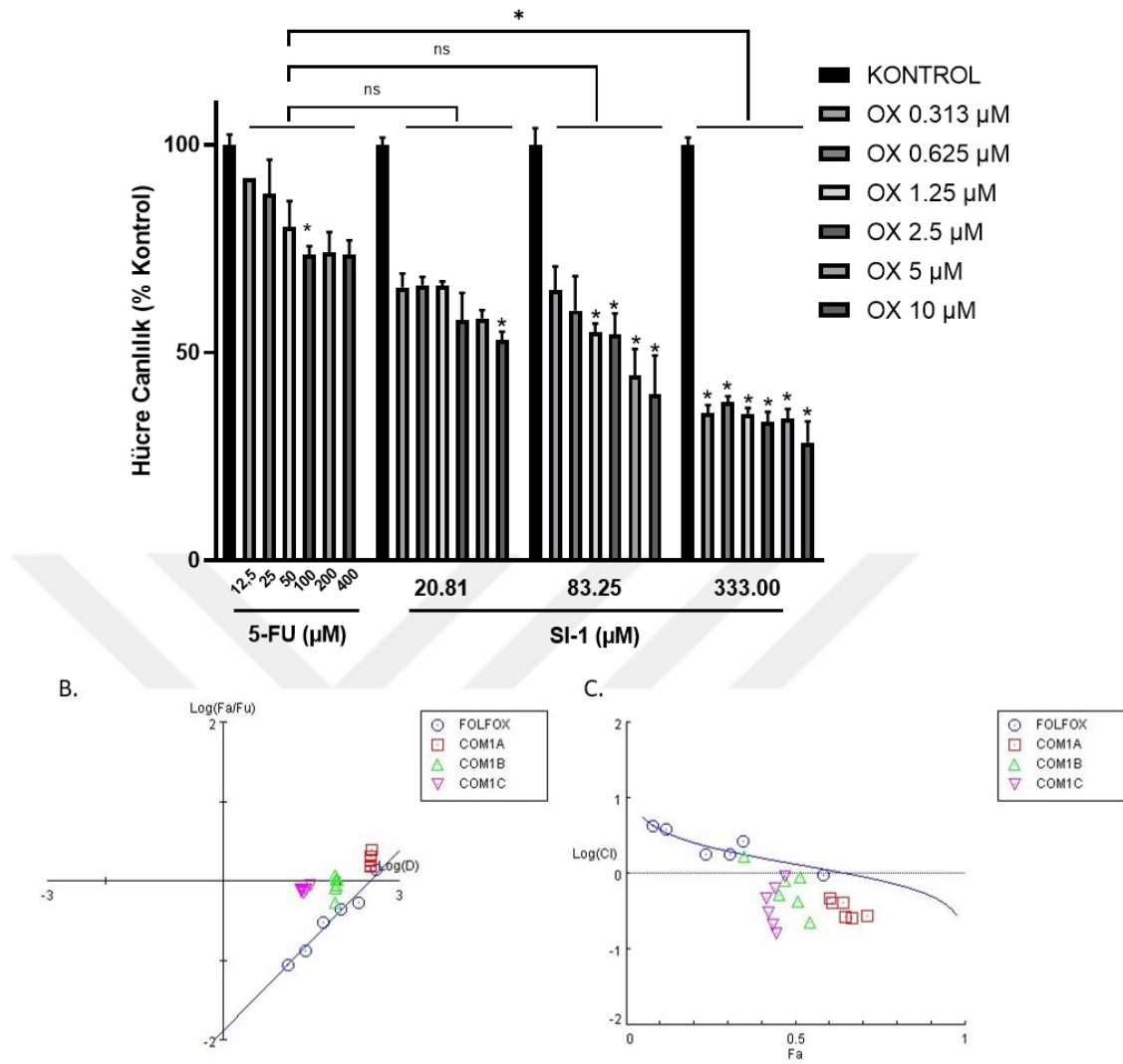
SI-1+5-FU kombinasyonlarına 48 saat maruz kalmanın sonucu HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin FOLFOX kombinasyonlarına kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür. FOLFOX kombinasyonu ile 83,25 μ M SI-1+5-FU ve 333 μ M SI-1+5-FU kombinasyonları arasında hücre canlılık oranı açısından anlamlı bir fark (sırasıyla $p=0,04$ ve $p=0,005$) olduğu bulunmuştur (Şekil 4.28.A). FOLFOX kombinasyonlarının tamamı medyan etki çizgisinin altında kalırken 333 μ M SI-1+5-FU kombinasyon grubunun tamamı, 83,25 μ M SI-1+5-FU ve 20,81 μ M SI-1+5-FU kombinasyon gruplarının çoğu medyan etki çizgisinin üstünde kalmıştır (Şekil 4.28.B). FOLFOX kombinasyonları ve SI-1+5-FU kombinasyonlarının CI değerleri karşılaştırıldığında FOLFOX kombinasyonlarının tamamının Log(CI) çizgisinin üstünde kaldığı, antagonistik etki gösterdiği SI-1+5-FU kombinasyonlarının ise tamamının Log(CI) çizgisinin altında kaldığı sinerjetik etki gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.28.C). SI-1+5-FU kombinasyonlarının tamamında 5-FU'nun Log(DRI) değeri ekseninin üstünde kalırken FOLFOX kombinasyonlarının tamamında 5-FU'nun Log(DRI) değeri eksenin altında kalmıştır. HT-29 insan kolon adenokarsinom hücrelerinde 48 maruziyeti sonucu, SI-1+5-FU kombinasyonu 5-FU'nun doz azaltımına olanak sağlarken FOLFOX kombinasyonunun aynı etkiyi göstermediği görülmüştür.



Şekil 4.28. 48 saatlik *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücre modeli HT-29 üzerine SI-1+5-FU kombinasyonunun konvensiyonel ilaç kombinasyonu FOLFOX ile karşılaştırılması: A- Yüzde canlılık, B- Medyan etki grafiği ve C- Logaritmik kombinasyon indeks grafiği [COM 2A: 333 μM SI-1, COM2B: 83,25 μM SI-1 ve COM 2C: 20,81 μM SI-1 ile 5-FU konsantrasyonlarının (12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM) ve FOLFOX: FOLFOX 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 kombinasyonlarını belirtmektedir.) (*: $p < 0.05$; ns: istatistiksel olarak anlamsız)

SI-1+OX ve FOLFOX kombinasyonlarının HT-29 hücreleri üzerinde 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması Şekil 4.29'da verilmiştir.

SI-1+OX kombinasyonlarına 48 saat süreyle maruz kalmanın HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin FOLFOX kombinasyonlarına kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür. FOLFOX kombinasyonu ile 333 μ M SI-1+OX kombinasyon grubu arasında hücre canlılık oranı açısından anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,003$) (Şekil 4.29.A). FOLFOX kombinasyonlarının tamamı medyan etki çizgisinin altında kalırken 333 μ M SI-1+OX kombinasyon grubunun tamamı ve 83,25 μ M SI-1+OX kombinasyon grubunun çoğu medyan etki çizgisinin üstünde kalmıştır (Şekil 4.29.B). FOLFOX kombinasyonlarının ile SI-1+OX kombinasyonlarının CI değerleri karşılaştırıldığında FOLFOX kombinasyonlarının tamamının Log(CI) çizgisinin üstünde kaldığı antagonistik etki gösterdiği SI-1+OX kombinasyonlarının ise tamamının Log(CI) çizgisinin altında kaldığı sinerjetik etki gösterdiği görülmüştür. (Şekil 4.29.C). OX'un Log(DRI) değeri, SI-1+OX kombinasyonlarının tamamında pozitif değerli iken FOLFOX kombinasyonlarının çoğunda negatif değerli olduğu görülmüştür. HT-29 insan kolon adenokarsinom hücrelerinde SI-1+OX kombinasyonunun OX'un doz azaltmasına yüksek katsayı ile olanak sağlarken FOLFOX kombinasyonlarında aynı etki görülememiştir.

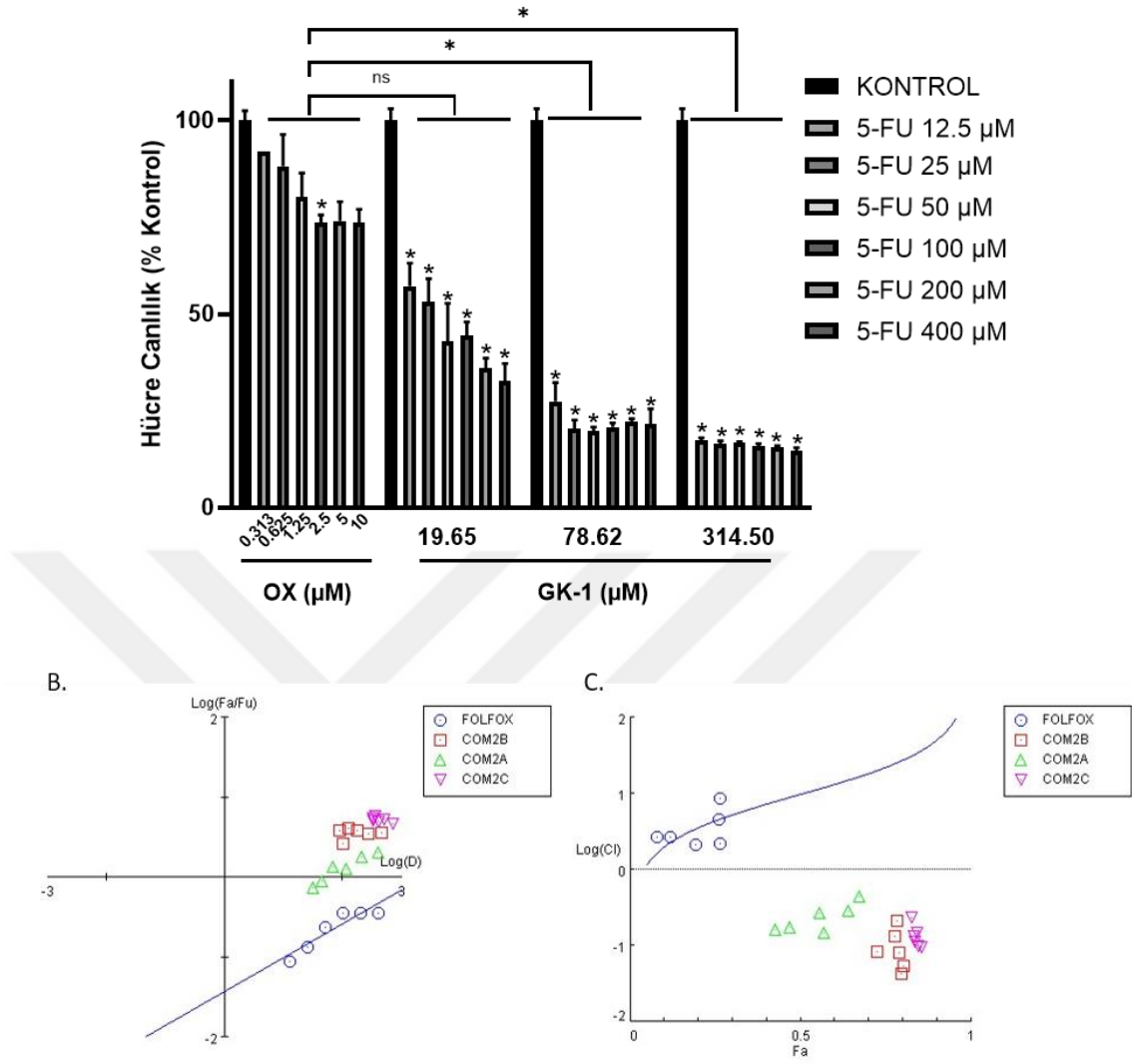


Şekil 4.29. 48 saatlik *in vitro* insan kolon kansinom hücre modeli HT-29 üzerine SI-1-OX kombinasyonunun konvansiyonel ilaç kombinasyonu FOLFOX ile karşılaştırılması: A- Yüzde canlılık, B- Medyan etki grafiği ve C- Logaritmik kombinasyon indeksi grafiği [COM 1A: 333 μM SI-1, COM1B: 83,25 μM SI-1 ve COM 1C: 20,81 μM SI-1 ile OX konsantrasyonlarının (0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μM) ve FOLFOX: FOLFOX 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 kombinasyonlarını belirtmektedir.) (*: $p < 0.05$; ns: istatistiksel olarak anlamsız)

4.5.2. Modifiye Edilmiş Biyoaktif Fitokimyasal Yapı GK-1 ile 5-FU veya OX Kombinasyonunun Terapötik Etkinliklerinin FOLFOX Karşılaştırılması

Modifiye edilmiş fitokimyasal türevi GK-1+5-FU ve FOLFOX kombinasyonlarının HT-29 insan kolon adenokarsinom hücreleri üzerinde 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması Şekil 4.30'da verilmiştir.

GK-1+5-FU kombinasyonlarına 48 saat maruz kalmanın HT-29 hücreleri üstündeki sitotoksitesinin FOLFOX kombinasyonlarına kıyasla daha etkili olduğu görülmüştür. FOLFOX kombinasyonu ile 78,625 μ M GK-1+5-FU kombinasyon grubu ve 314,5 μ M GK-1+5-FU kombinasyon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,002$). FOLFOX kombinasyonu ile 19,65 μ M GK-1+5-FU kombinasyon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.30.A). FOLFOX kombinasyonları medyan etki çizgisinin altında kalırken 78,625 μ M GK-1+5-FU ve 314,5 μ M GK-1+5-FU kombinasyon grupları medyan etki çizgisinin üstünde kalmıştır (Şekil 4.30.B). FOLFOX ve GK-1+5-FU kombinasyonlarının CI değerleri karşılaştırıldığında FOLFOX kombinasyonlarının Log(CI) çizgisinin üstünde kaldığı GK-1+5-FU kombinasyonlarının ise tamamının Log(CI) çizgisinin altında kaldığı görülmüştür. GK-1+5-FU kombinasyonları sinerjetik etki gösterirken FOLFOX kombinasyonlarının antagonistik etki gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.30.C). 5-FU'nun Log(DRI) değerinin, GK-1+5-FU kombinasyonlarında pozitif iken FOLFOX kombinasyonlarında negatif olduğu görülmüştür. 5-FU'nun DRI değerinin, kombinasyonu oluşturan GK-1 konsantrasyonu yükseldikçe arttığının aksine 5-FU konsantrasyonu arttıkça azaldığı görülmüştür. GK-1 ile kombinasyonlarında 5-FU'nun DRI değerinin yüksek bir kat sayıya sahip olduğu görülmüştür.

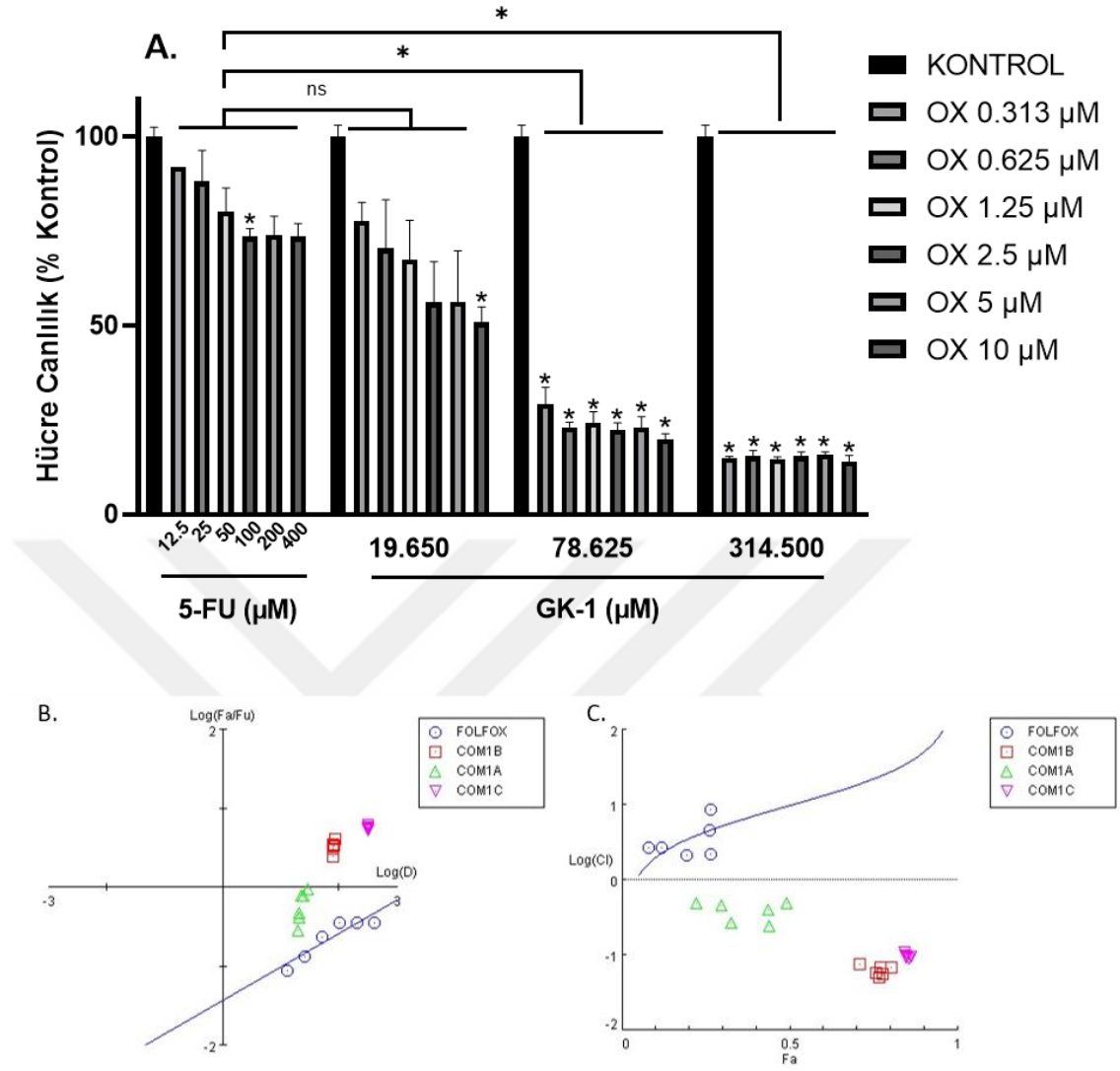


Şekil 4.30. 48 saatlik *in vitro* insan kolon kansinom hücre modeli HT-29 üzerine GK-1+5-FU kombinasyonunun konvansiyonel ilaç kombinasyonu FOLFOX ile karşılaştırılması: A- Yüzde canlılık, B- Medyan etki grafiği ve C- Logaritmik kombinasyon indeksi grafiği [COM 1A; 19,65 μM GK-1, COM1B; 78,625 μM GK-1 ve COM 1C; 314,5 μM GK-1 ile 5-FU konsantrasyonlarının (12,5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM) ve FOLFOX; FOLFOX 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 kombinasyonlarını belirtmektedir.] (*: $p<0.05$; ns: istatistiksel olarak anlamsız)

GK-1+OX ve FOLFOX kombinasyonlarının HT-29 insan kolon adenokarsinom hücreleri üzerinde 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması Şekil 4.31’de verilmiştir.

48 saat GK-1+OX kombinasyonlarına maruz kalmanın HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksitenin FOLFOX kombinasyonlarına kıyasla daha etkili olduğu görülmüştür. FOLFOX kombinasyonu ile 78,625 μM GK-1+OX ve 314,5 μM GK-1+OX

kombinasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (sırasıyla $p=0,004$ ve $p=0,001$). FOLFOX kombinasyonu ile $19,65 \mu\text{M}$ GK-1+OX kombinasyon grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.31.A). FOLFOX ve $19,65 \mu\text{M}$ GK-1+OX kombinasyon grupları medyan etki çizgisinin altında kalırken $78,625 \mu\text{M}$ GK-1+OX ve $314,5 \mu\text{M}$ GK-1+OX kombinasyon grupları bu çizginin üstünde kalmıştır. GK-1+OX kombinasyonunun FOLFOX'tan hücre canlılığını inhibe etmede daha etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.31.B). FOLFOX kombinasyonları ve GK-1+OX kombinasyonları CI değerleri karşılaştırıldığında FOLFOX kombinasyonlarının Log(CI) çizgisinin üstünde kaldığı GK-1+OX kombinasyonlarının ise bu çizginin altında kaldığı görülmüştür. GK-1+OX kombinasyonlarının tamamı sinerjetik etki gösterirken FOLFOX kombinasyonlarının antagonistik etki gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.31.C). OX'un Log(DRI) değeri, GK-1+OX kombinasyonlarında pozitif değer alırken FOLFOX 1, 2, 3 ve 4 dışındaki kombinasyonlarda negatif değerlikli olduğu görülmüştür. OX'un DRI değerleri, GK-1+OX kombinasyonunda oldukça yüksek bulunmuşken FOLFOX zayıf etkili olduğu görülmüştür. FOLFOX kombinasyonlarının aksine GK-1+OX kombinasyonu OX doz azaltımını kuvvetli bir şekilde desteklemektedir.



Şekil 4.31. 48 saatlik *in vitro* insan kolon kansinom hücre modeli HT-29 üzerine GK-1+OX kombinasyonunun konvansiyonel ilaç kombinasyonu FOLFOX ile karşılaştırılması: A- Yüzde canlılık, B- Medyan etki grafiği ve C- Logaritmik kombinasyon indeks grafiği [COM 1A: : 19,65 μM GK-1, COM1B: 78,625 μM GK-1 ve COM 1C: 314,5 μM GK-1 ile OX konsantrasyonlarının (0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5 ve 10 μM) ve FOLFOX: FOLFOX 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 kombinasyonlarını belirtmektedir.] (*: $p < 0.05$; ns: istatistiksel olarak anlamsız)

5. TARTIŞMA

Sağlıklı hücreler üzerinde anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkileri ön plana çıkan doğal biyoaktif fitokimyasalların kemoterapötik ajanlardan farklı olarak sadece kanser hücrelerine sitotoksik etki gösterirler (44,46,62,197). Bu bileşiklerin kanser hücrelerine karşı spesifik toksik etki göstermeleri ve yan etkilerinin oldukça az olması onları potansiyel anti kanser ilaç adayı yapmaktadır (198). Aynı zamanda tedavide kullanılan kemoterapötik ajanların neden olduğu yan etkileri de azalttıkları gösterilmiştir (198).

İlaç keşfinde öncü bir molekül tanımlamak ilk basamaktır (22). Bu molekülün seçiminde ise en iyi kaynak doğal biyoaktif ürünlerdir (168). Gelişmiş terapötik etkinliği olan bir öncü molekül tasarlamak için hibrit yapılardan sıklıkla yararlanılmaktadır. Hibrit yapı, doğal bileşikler, küçük moleküller, antikorlar ve peptidler gibi iki farklı veya aynı bileşenden oluşturulan aktif bir moleküldür (96). Bu kompleks yapıyı oluşturan bileşenlerin tek başlarına kıyasla daha etkili olduğu ve konvansiyonel tedavilerle güçlü sinerjizm gösterdikleri belirtilmektedir (197, 199). Doğal biyoaktif bileşiklerden oluşturulan hibrit yapılar, aynı anda birden çok hedef üzerinde etki gösterdikleri için daha güçlü ve gelişmiş anti-kanser özellik kazanabilmektedir (200). Ayrıca hibrit yapıyı oluşturan bileşenlerin, eğer varsa toksik etkilerinin bu yapıyla ortadan kalktığı, biyoyararlanımlarının arttığı ve tek başlarına etkili olmadıkları kanser metabolizmasında önemli proteinler, yolaklar veya ekspresyonlar üzerinde yeni etkilerinin ortaya çıktığı bulunmuştur (176). Literatürde kumarin ve formononetin antikanser etkinlik gösteren iki doğal biyoaktif bileşeninden hibrit yapı sentezlenmiş ve yapıdaki kumarin ekinin formonentinin gastrik kanser hücre hatlarındaki sitotoksitesine sinerjetik etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca kanser hücrelerinde, Wnt/ β -katenin yolağı elemanlarının ekspresyonlarını, fosforile AKT ve mTOR düzeylerini, SIRT1 proteininin ekspresyonunu ve p53 ekspresyonu düzenleyerek hücre göçünü ve büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (177). Çalışmamızın hibrit yapı tasarımında, glikozamin ile doğal biyoaktif fitokimyasal bileşikler olan gallik asit ve kurkuminin modifiye edilmesi sonucu SI-1 ve GK-1 iki yeni hibrit molekül sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapı karakterizasyonu ¹H-NMR, FTIR ve LC/MS analizleriyle doğrulanmıştır. SI-1'in FTIR yapı analizinde, -COOH yapısına

spesifik olarak 3000cm^{-1} civarında oluşan O-H gerilim bandının kaybolması, -CONH gerilim bandının 1684cm^{-1} oluşması, NH gerilim bandının 3344cm^{-1} oluşması ve $-\text{NH}_2$ yapısını belirten $3400\text{-}3300\text{cm}^{-1}$ arasında belirgin iki uçlu gerilim bandının kaybolması; NMR analizinde 2,55 ppm'de piran halkasına ait hidrojenlerin, 3,75 ppm'de $-\text{CH}_2$ yapısındaki hidrojenlerin, 6,90-6,92 ppm'de aromatik hidrojenlerin ve 9,15 ppm'de amid yapısındaki -NH hidrojeninin gözlenmesi; LC/MS analizinde molekül ağırlığında ve fragmanlara ait piklerin gözlenmesi molekülün sentezinin başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir. GK-1'in FTIR yapı analizinde, $-\text{NH}_2$ yapısını belirten $3400\text{-}3300\text{cm}^{-1}$ arasında belirgin iki uçlu gerilim bandının kaybolması, 1730-1700 arasında pik veren $\text{C}=\text{O}$ gerilim bandının kaybolması ve $\text{C}=\text{N}$ gerilim bandı 1627cm^{-1} oluşması ; NMR analizinde 2,51-3,72 ppm arasında piran halkasındaki alifatik hidrojenlerin 3,84 ppm'de $-\text{OCH}_3$ gruplarındaki hidrojenlerin, 4,54-4,65 ppm'de -OH gruplarına ait hidrojenlerin, 5,21-6,07 ppm'de alken yapısındaki hidrojenlerin, 6,71-7,57 ppm'de aromatik hidrojenlerin, 9,70 ppm'de aromatik -OH gruplarına ait hidrojenlerin ve 10,1 ppm'de amin yapısına komşu $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ hidrojeninin gözlenmesi; LC/MS analizinde molekül ağırlığında ve fragmanlara ait piklerin gözlenmesi molekülün sentezinin başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir.

Modifiye edilmiş biyoaktif fitokimyasal türevi SI-1 ve GK-1 moleküllerinin HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri MTT analiziyle incelenmiş ve sentezlenen özgün moleküllerin HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Hücre proliferasyon analizleri sonucu elde edilen verilerin Prism GraphPad 8 aracılığıyla IC50 değerleri hesaplanmış ve SI-1 bileşiği için 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda sırasıyla $1393\text{ }\mu\text{M}$, $333\text{ }\mu\text{M}$ ve $56,65\text{ }\mu\text{M}$ olarak GK-1 bileşiği için ise sırasıyla $910,4\text{ }\mu\text{M}$, $314,5\text{ }\mu\text{M}$ ve $178,8\text{ }\mu\text{M}$ olarak bulunmuştur.

Literatürde 5-FU ve OX kemoterapötik ilaçlarının HT-29 insan kolon adenokarsinom hücre modelinde bulunan IC50 değerlerinin oldukça geniş aralıklara sahip olduğu görülmüştür. OX'in IC50 değerleri 48 saat inkübasyon sonucu $4\text{-}8\text{ }\mu\text{M}$ aralığında ve 72 saat inkübasyon sonucu $4\text{-}12\text{ }\mu\text{M}$ aralığında bulunmuştur. (191, 201-205). 5-FU'in IC50 değerleri 24 saat inkübasyon sonucu $1.845\text{ }\mu\text{M}\text{-}26\text{ mM}$, 48 saatlik inkübasyon sonucu $1\text{ }\mu\text{M}\text{-}1,4\text{ mM}$ ve 72 saat inkübasyon sonucunda $0,15\text{-}149\text{ }\mu\text{M}$ aralığında bulunmuştur (201,203,204,206-208). Deneylerimizi takiben yaptığımız analizlerde ise 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda OX'in IC50 değerleri

sırasıyla 887 μM , 26 μM ve 17 μM olarak hesaplanmıştır. 5-FU için ise 24 saat inkübasyon sonucunda anlamlı IC50 değerleri elde edilemezken 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda bu değer sırası ile 420 μM ve 144 μM olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki IC50 değerlerinin geniş bir aralıkta olmasının kullanılan hücre sayısı ve deneysel metotlardaki farklılıklarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Yin ve ark. tarafından yapılan MTT analizinde 2.500-40.000 arasında farklı HT-29 hücre konsantrasyonları ile çalışılmış ve IC50 elde edilmesi için en uygun hücre yoğunluğu bizim de çalışmamızda kullandığımız yoğunluk olan 10.000 olarak bulunmuştur (209). Bu çalışmada 10.000 hücre yoğunluğunda 24 saatlik inkübasyon süresince hem OX ve hem de 5-FU için bir IC50 değeri elde edilememiştir. Yapılan deneyler 48 ve 72 saatlik inkübasyonda sırası ile OX için 30 μM ve 18 μM , 5-FU için ise 600 μM ve 250 μM IC50 değerine işaret etmiştir. Deneylerimizde bulduğumuz 5-FU ve OX'in IC50 değerleri Yin ve ark.'nın bulguları ile uyuşmaktadır.

Literatürde HT-29 insan kolon kanser modelinde, OX ve 5-FU'dan oluşan FOLFOX uygulamasına yönelik *in vitro* IC50 değeri üzerine yapılmış yeterli miktarda yayın bulunmamaktadır. 2009 ve 2020 yıllarında, iki farklı grup tarafından yapılan çalışmalarda 48 saatlik inkübasyon sonrası FOLFOX'a ait IC50 değeri 0,363 μM OX+14,5 μM 5-FU ve 5,40 μM OX+220 μM 5-FU olarak hesaplanmıştır (192,210). Bu değerler arasında anlamlı ölçüde uyumsuzluk olması ile birlikte bizim verilerimiz de literatür verilerinden farklıdır. Deneylerimizde ise FOLFOX kombinasyonuna ait IC50 değeri 24 saat inkübasyon sonucu 190 μM OX+7.581 μM 5-FU, 48 saat inkübasyon sonucu 70 μM OX+2.819 μM 5-FU ve 72 saat inkübasyon sonucu 6,25 μM OX+250 μM 5-FU konsantrasyonlarına ait kombinasyonlar olarak hesaplanmıştır. Literatür verilerinin birbirleri ile ve bizim verilerimizin literatür ile uyuşmamasının nedeni deney koşullarından kaynaklanabilir.

Bilimsel çalışmalarda iki ilaç arasındaki etkileşimler genellikle Chou-Talalay metodu ile geliştirilen CompuSyn Software aracılığıyla elde edilen CI ve DRI değerleri üzerinden yorumlanır. Farklı araştırmacılar tarafından HT-29 hücreleri üzerinde Chou-Talalay metodu ile yapılan çalışmalarda FOLFOX kombinasyonlarının additif veya antagonistik etkili olduğu görülmüştür (193,210,211). Deneylerimizde ise HT-29 hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde uyguladığımız 5-FU+OX kombinasyonlarının çoğunun antagonistik etkili olduğu bulunmuştur. Sadece 72 saat

dilimdeki en yüksek iki doza sahip kombinasyonların sinerjetik etkili olduğu görölmüştür. Bu sonuç kemoterapötik ilaçların artan tedavi dozuna ve süresine bağımlı olarak gelişebilecek yan etkileri temelinde olumlu bir veri değildir. Zoetemelk ve ark. tarafından *in vitro* kolon kanser hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada LV ile 5-FU kombinasyonunun sinerjetik etki gösterdiği fakat LV+5-FU'ya OX eklenmesinin antagonistik etkili olduğunu gösterilmiştir (212). Çalışmamızda FOLFOX kombinasyonunda LV bulunmamakla beraber bulduğumuz antagonistik etki literatürle uyumludur.

Ayrıca elde edilen *in vitro* FOLFOX uygulamasında elde edilen DRI değerlerinin çoğunun 1'den küçük olması kombinasyonu oluşturan 5-FU ve OX kemoterapötik ilaçlarının tedavi temelinde doz azaltımına olanak vermediğine işaret etmektedir.

Biyoaktif fitokimyasalların ve türevleri hibrit moleküllerin kanser tedavisinde kullanılan çeşitli kemoterapi ilaçları ile kombine edildiğinde sinerjetik etkili oldukları birçok çalışmada gösterilmiştir (213–217). Yapılan bir çalışmada 87 kolorektal kanser hastasının ilaç direnci açısından değerlendirilmesi sonucu daha önce FOLFOX ve CAPEOX tedavisi almış olanların kemoterapötik tedavi görmemiş olanlara kıyasla OX ve 5-FU'ya dirençlerinin anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulunmuştur (218). Sinerjetik etki fitokimyasalın kanser hücresi üzerinde, kullanılan ilaca karşı gelişen direncin azaltılması, ilacın etkinliğinin artırılması veya ilaç kullanımına bağlı gelişen yan etkilerin azaltılması ile gösterilebilir (219). HT-29 hücreleri ile yapılan bir çalışmada kurkumin ve 5-FU kemoterapötik ilacının sinerjizm ilişkisi olduğu gösterilmiştir (220). HT-29 hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada platin bazlı anti kanser ilaçları ile kurkuminin kombine edilmesi tek başlarına kullanımına kıyasla apoptozisi arttırdığı, hücre inhibisyonunu arttırdığı ve kemoterapiye duyarlılığı geliştirdiği görölmüştür (221). HCT-116 ve HT-29 hücreleri ile yapılan bir çalışmada FOLFOX kombinasyonuna ve 5-FU ilacına ek olarak kurkuminin eklenmesinin tek başlarına kullanıma kıyasla hücre çoğalmasını önlediği, apoptozisi arttırdığı, EGFR, COX-2 ve AKT ekspresyonunu azalttığı ve oluşturulan kurkumin+FOLFOX ve kurkumin+5-FU kombinasyonların sinerjetik etkili oldukları bulunmuştur.(222). Platin bazlı kemoterapötik ajan cisplatin ile gallik asidin kombine edilmesi bu maddelerin akciğer kanseri hücrelerinde tek başlarına kullanılmasına kıyasla hücre inhibisyonunu

arttırdığı, apoptozisi arttırdığı ve hücre içi ROS birikimini arttırdığı gözlemlenmiştir(223). Doğal bileşiklerden elde edilen hibrit molekül ile 5-FU kombinasyonu HT-29 hücrelerinde sinerjetik etki gösterdiği, kombinasyonu oluşturan bileşiklerden daha fazla sitotoksosite gösterdiği ve DRI değerinin pozitif olduğu gösterilmiştir (224).

Kombinasyon çalışmalarımızda hibrit SI-1 ve GK-1 moleküllerinin 48. saatte elde edilen IC50, IC50/4 ve IC50/16 değerleri ile 1-6 nolu FOLFOX kombinasyonlarını oluşturan OX ve 5-FU konsantrasyonları kullanılmıştır. Kombinasyonlarda kullanılan SI-1 dozlarına 5-FU eklenmesinin HT-29 hücre proliferasyonunun inhibisyonunda istatistiksel anlamlı bir etki oluşturma olasılığı tek yönlü varyans (ANOVA) analizi kullanılarak değerlendirildiğinde, SI-1'in IC50'si 333 μ M'ın tek başına uygulanmasına kıyasla 5-FU'nun 12,5 μ M dışındaki dozları ile kombine edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. Ayrıca, SI-1'in $\frac{1}{4}$ IC50 değeri olan 83,25 μ M tek başına oluşturduğu etki ile 400 μ M 5-FU kombinasyonunda da anlamlı bir fark bulunmuştur. Aksine bu anlamlı etki SI-1'in $\frac{1}{16}$ IC50 değeri olan 20,81 μ M kombinasyonunda gözlenmemiştir (Şekil.4.16). SI-1 ve 5-FU ile oluşturulan kombinasyonların tamamında Chou-Talalay metoduna göre sinerjistik etki tespit edilmiştir. Bu da SI-1 ve 5-FU ile terapötik yaklaşımda 5-FU'nun doz azaltımının oluşturulabileceğini göstermektedir. Bu klinik temelde SI-1 toksisitesinden bağımsız olarak 5-FU yan etkisinin minimize edilmesi açısından değerlidir.

Kombinasyonlarda kullanılan SI-1 dozlarına OX eklenmesinin HT-29 hücre proliferasyonunun inhibisyonuna etkisi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, SI-1'in IC50 dozuna OX'un kullanılan konsantrasyonlarının eklenmesinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark yarattığı görülmüştür. Aksine OX'un, SI-1'in IC50/4 dozu ile kombine edilerek uygulandığında aynı etki bulunamamıştır. SI-1'in IC50/16 konsantrasyonuna ek olarak OX ilave edilmesi 10 μ M konsantrasyonu dışında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın oluşmadığı görülmüştür (Şekil 4.19). SI-1 ile OX'tan oluşan kombinasyonların çoğunda sinerjetik etki olduğu bulunmuştur. Sinerjizm etkilerine paralel olarak OX'un doz azaltımını SI-1'in artan dozuna bağlı artan DRI değerleri ile desteklemektedir. Bu da kemoterapide kullanımı ciddi nöropati ile ilişkilendirilen OX kemoterapötik ilacının klinik açıdan daha düşük dozlarda uygulanmasına olanak sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Kombinasyon çalışmalarımızda kullandığımız GK-1'in IC50, IC50/4 ve IC50/16 konsantrasyonlarına 5-FU eklenmesinin HT-29 hücre proliferasyonunun inhibisyonuna etkisi istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturma olasılığı değerlendirildiğinde, GK-1 dozlarının tek başlarına kullanılmasına kıyasla 5-FU ile kombine edilerek uygulanması arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (Şekil 4.22). Aynı zamanda bu etki GK-1 ile 5-FU kombinasyonlarının tüm noktalarda sinerjetik etki göstermesi ile açıklanabilir. GK-1'in konsantrasyonundaki artışa bağımlı olarak sinerjizm kuvvetinin de arttığı görülmüştür. Bu kuvvetli etkileşim 5-FU'nun doz azaltımına yüksek DRI değerleri ile destekleyebileceğini göstermiştir. Sonuçlar kemoterapide kullanılan 5-FU'nun yan etkilerinin azaltılması bakımında önemlidir.

Sentezlenen GK-1'in HT-29 hücreleri üzerine uygulanan dozlarına ek olarak OX ilavesinin proliferasyonu inhibe etmede anlamlı bir fark yaratma olasılığı değerlendirildiğinde, GK-1'in, IC50 ve IC50/4 konsantrasyonlarının tek başına uygulanmasına kıyasla OX ile kombine edilerek kullanılmasının istatistiksel olarak anlamlı derecede daha etkili olduğu görülmüştür. Aksine IC50/16 dozu ile OX'un birleştirilmesi anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Şekil 4.25). Chou-Talalay metoduna göre hesaplanan GK-1 ile OX arasındaki etkileşimlere bakıldığında, kullanılan en düşük GK-1 dozu ile en düşük OX dozunun kombine edilmesi haricinde tüm kombinasyonların sinerjetik etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca IC50/4 ve IC50 GK-1 dozları ile OX arasındaki sinerjizm sınıfının çok kuvvetli olduğu dikkat çekicidir. Bu sonuçlara paralel olarak bu kombinasyonlarda OX'un DRI değerlerinin oldukça yüksek bulunması ve GK-1'in olası toksisitesinden bağımsız olarak klinik açıdan OX'un ortaya çıkardığı yan etkileri minimize etme bakımından kıymetlidir.

SI-1 ve GK-1'in 5-FU ile OX ile kombinasyonlarında CompuSyn'den elde edilen etkileşim verileri karşılaştırıldığında, sentezlenen her iki hibrit molekülün de OX'a kıyasla 5-FU ile daha kuvvetli sinerjistik etki oluşturdıkları ve her iki kemoterapötik de bu birleşimler sonucu dozlarının azaltılabileceği görülmüştür. Ayrıca OX ve 5-FU'nun SI-1'e kıyasla GK-1 ile kombine edilmesi klinikte kullanılan bu sitotoksik ilaçların dozlarının azaltılabileceğini göstermektedir.

Oluşturulan 4 farklı kombinasyon grubunun her biri FOLFOX kombinasyonları ile HT-29 kolon kanser hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe etme açısından anlamlı bir fark oluşturma olasılıkları tek yönlü varyans analizi kullanılarak değerlendirilmiştir.

FOLFOX uygulaması ile karşılaştırıldığında HT-29 kolon kanser hücrelerinin proliferasyonlarının inhibisyon yanıtları 5-FU konsantrasyon panelinin SI-1'in ve GK-1'in $\frac{1}{4}$ IC50 ve IC50 dozları ile kombine edildiğinde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,002$). SI-1'in IC50 değeri ile OX'un kombine edilerek uygulanması sonucu alınan hücre proliferasyonlarının inhibisyon yanıtları aynı OX paneli ile oluşturulan FOLFOX tedavisinden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,003$). GK-1 bileşiğinde ise IC50 değerine ek olarak IC50/4 dozunun da OX ile kombine edilmesinin hücre proliferasyonunu inhibe etmede FOLFOX'a göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha etkin olduğu bulunmuştur (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,004$).

FOLFOX'u oluşturan OX ve 5-FU kemoterapötik ilaç etkileşimleri Chou-Talalay metodu ile yorumlanmıştır. CompuSyn aracılığıyla elde edilen veriler değerlendirildiğinde, 48 saatlik zaman diliminde HT-29 hücreleri üzerine 5-FU'nun, OX ile birlikte uygulanması tüm kombinasyon noktalarında antagonistik etki gösterirken SI-1 ve GK-1'in IC50, IC50/4 ve IC50/16 doz değerleri ile kombine edilmesinin sinerjetik etkili olduğu bulunmuştur. OX ve 5-FU'nun birbirleri ile kombine edilmesine kıyasla çalışmamızda sentezlenen fitokimyasal türevi hibrit moleküller ile kombine edilmesinin HT-29 hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe etmede daha üstün olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda hem yüksek DRI değerleri ile kullanılan ilaç dozlarının azaltımına olanak sağlayabilmesi hem de tedavi süresinin kısaltılabilmesi ihtimaline bağlı olarak OX ve 5-FU'nun neden olduğu yan etkileri minimize edilebilmesi açısından da değerlidir.

Sonuç olarak, KRK tedavisinde sıklıkla kullanılan FOLFOX bileşenleri OX ve 5-FU kemoterapötik ilaçlarına kıyasla sentezlediğimiz modifiye edilmiş doğal biyoaktif fitokimyasal türevleri SI-1 ve GK-1 hibrit moleküllerinin 24, 48 ve 72 saatlik süreçte HT-29 insan kolon adenokarsinom hücrelerinin *in vitro* proliferasyonlarını inhibe etmede daha etkili olduğu bulunmuştur. Çoğu antagonist ilişkide olduğu bulunan 5-FU+OX kombinasyonunun aksine OX ve 5-FU'nun modifiye edilmiş biyoaktif bileşiklerimiz SI-1 ve GK-1 ile kombine edilmesi sinerjistik etki göstermiştir. *In vitro* deneylerimiz FOLFOX'a kıyasla SI-1 ve GK-1 molekülleri ile OX ve 5-FU ilaçlarının kombinasyonu klinikte kullanıldığında ciddi yan etkilere sebep olan OX ve 5-FU'nun

tedavide kullanılacak dozlarının azaltımına potansiyel olarak sağlayabileceği görölmüştür.

Geçmiştten günümüze kullanılan ve yakın tarihte onay almış anti-kanser ilaçlara bakıldığında %60'ından fazlasının doğal biyoaktif madde türevi olduğu görölmektedir. Modifiye edilmiş biyoaktif fitokimyasal türevi olan SI-1 ve GK-1 hibrit moleküllerinin HT-29 hücreleri üzerinde anti-kanser etki göstermesi üniversitemizin ilaç keşfinde önemli bir adım ve moleküllerimizin potansiyel ilaç adayı olabilmesi açısından stratejik açıdan önemlidir.



Öneriler

Modifiye edilmiş biyoaktif fitokimyasal türevi SI-1 ve GK-1 ile 5-FU ve OX kombinasyonlarının mali bütçe kısıtlılığı yüzünden değerlendirememiş olduğumuz 24 ve 72 saat dilimlerine ait sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

HT-29 kolon adenokarsinom hücre modeli dışında diğer KRK hücreleri, farklı kanser hücre türleri ve sağlıklı insan hücreleri üzerindeki olası etkileri öncelikle *in vitro* olarak değerlendirilmelidir.

Sentezlenen özgün bileşiklerin KRK hücrelerinde işlevsel oldukları yolların tespit edilmesi ve etki mekanizmalarının belirlenmelidir.

Sentezlenen özgün bileşiklerin yan etkilerinin olup olmadığı *in vivo* olarak değerlendirilmelidir.

Sentezlenen bileşiklerin OX ve 5-FU dışında diğer kolorektal olduğu kadar diğer kanser türlerinde tek başlarına ve antikanser ilaçlarla kombinasyonları denenerek olası etki, sinerjik ve antagonist ilişkileri test edilmelidir.

Sentezlenen özgün bileşiklerin hedeflenen tespitlerine göre modifiye formları oluşturularak etki ve yan etkileri *in vitro* ve *in vivo* metodlarla incelenmelidir.

Akıllı ilaç taşıma sistemleri temelinde, SI-1, GK-1 ve oluşturulacak türevleri ayrı ayrı tek başlarına olduğu kadar konvansiyonel tedavi, molekül veya yöntemleri ile kombine edilerek hedefe odaklı terapi geliştirilmesinde değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. WHO. Cancer Over Time. [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date: 15.09.2023]. Available from: https://gco.iarc.fr/overtime/en/dataviz/trends?populations=75200_79200_82610_84000_12400_15600_25000_27600_39200_57800&sexes=1_2&types=0&multiple_populations=1&cancers=5
2. WHO. Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2022, World, both sexes, all ages (excl. NMSC) [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date: 15.09.2023]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=population&types=0_1&sort_by=value1
3. Davidson KW, Barry MJ, Mangione CM, Cabana M, Caughey AB, Davis EM, et al. Screening for colorectal cancer: US preventive services task force recommendation statement. JAMA. 2021;325:1965–77. doi: 10.1001/jama.2021.6238
4. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK, et al. Colon cancer, Version 2.2021. JNCCN. 2021;19:329–59. doi: 10.6004/jnccn.2021.0012
5. WHO. Cancer [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date: 15.09.2023]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
6. Kei Chan C, Ying Tang L, Hing Goh B, Abdul Kadir H, Goh BH. Targeting apoptosis via inactivation of PI3K/Akt/mTOR signaling path-way involving NF-κB by geraniin in HT-29 human colorectal adenocarcinoma cells. PDDBS 2019;2:a0000030. doi: 10.36877/pddbs.a0000030
7. Kulbay M, Paimboeuf A, Ozdemir D, Bernier J. Review of cancer cell resistance mechanisms to apoptosis and actual targeted therapies. JCB. 2022;123:1736–61. doi: 10.1002/jcb.30173
8. Kheirelseid EAH, Miller N, Kerin MJ. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. Am J Mol Biol. 2013;03:72–80. doi: 10.4236/ajmb.2013.32010
9. Malki A, Elruz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular mechanisms of colon cancer progression and metastasis: Recent insights and advancements. Int. J. Mol. Sci. 2021;22:1–24. doi: 10.3390/ijms22010130
10. WHO. Colorectal Cancer [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date: 15.09.2023]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer?gad_source=1&gclid=CjwKCAjwz42xBhB9EiwA48pT76THhtwQzwWeWHBUm2NHBeil6GR6Uu6esG83xRWjgm6XC�8_aNNvfBoCh_AQAvD_BwE
11. Buikhuisen JY, Torang A, Medema JP. Exploring and modelling colon cancer inter-tumour heterogeneity: opportunities and challenges. Oncogenesis. Springer Nature; 2020;9. doi: 10.1038/s41389-020-00250-6
12. André T, De Gramont A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: Updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and

mismatch repair status of the MOSAIC study. *JCO*. 2015;33:4176–87. doi: 10.1200/JCO.2015.63.4238

13. Vogel JD, Felder SI, Bhama AR, Hawkins AT, Langenfeld SJ, Shaffer VO, et al. The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Colon Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2022;65:148–77. doi: 10.1097/DCR.0000000000002323

14. di Valentin T, Alam Y, Ali Alsharm A, Arif S, Aubin F, Biagi J, et al. Eastern Canadian Colorectal Cancer Consensus Conference: Application of new modalities of staging and treatment of gastrointestinal cancers. *JCO*. 2012;19:169–74. doi: 10.3747/co.19.931

15. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *JPP*. 2020;206. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107447

16. Sun Z, Zhou N, Han Q, Zhao L, Bai C, Chen Y, et al. MicroRNA-197 influences 5-fluorouracil resistance via thymidylate synthase in colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2015;17:876–83. doi: 10.1007/s12094-015-1318-7

17. Rejhová A, Opattová A, Čumová A, Slíva D, Vodička P. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *EJMECH*. 2018;144:582–94. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.12.039

18. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer for the Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. *NEJM*. 2004;350:43-51 doi: 10.1056/NEJMoa03270

19. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *JCO*. 2009;27:3109–16. doi: 10.1200/JCO.2008.20.6771

20. Pereira AAL, Fernandes GDS, Braga GTP, Marchetti KR, Mascarenhas C do C, Gumz B, et al. Differences in Pathology and Mutation Status Among Colorectal Cancer Patients Younger Than, Older Than, and of Screening Age. *Clin. Colorectal Cancer*. 2020;19:264–71. doi: 10.1016/j.clcc.2020.06.004

21. de Voer RM, Diets IJ, van der Post RS, Weren RDA, Kamping EJ, de Bitter TJJ, et al. Clinical, Pathology, Genetic, and Molecular Features of Colorectal Tumors in Adolescents and Adults 25 Years or Younger. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2021;19:1642-1651. doi: 10.1016/j.cgh.2020.06.034

22. Singh N, Vayer P, Tanwar S, Poyet JL, Tsaioun K, Villoutreix BO. Drug discovery and development: introduction to the general public and patient groups. *Front. Drug Discov*. 2023;3. doi: 10.3389/fddsv.2023.1201419

23. Borsari C, Trader DJ, Tait A, Costi MP. Designing Chimeric Molecules for Drug Discovery by Leveraging Chemical Biology. *J. Med. Chem*. 2020;63:1908–28. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01456

24. Sflakidou E, Leonidis G, Foroglou E, Siokatas C, Sarli V. Recent Advances in Natural Product-Based Hybrids as Anti-Cancer Agents. *Molecules*. 2022;27. doi: 10.3390/molecules27196632
25. Siddiqui A, Iram F. Role of Natural Products in Drug Discovery Process. *IJDDR*. 2014;6:172-204 ISSN 0975-9344
26. Chopra B, Dhingra AK. Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phytother. Res*. 2021;35:4660–702. doi: 10.1002/ptr.7099
27. Esmeeta A, Adhikary S, Dharshnaa V, Swarnamughi P, Ummul Maqsummiya Z, Banerjee A, et al. Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. *Biomed. Pharmacother*. 2022;153:113384. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113384
28. Khan T, Ali M, Khan A, Nisar P, Jan SA, Afridi S, et al. Anticancer plants: A review of the active phytochemicals, applications in animal models, and regulatory aspects. *Biomolecules*. 2020;10:47 doi: 10.3390/biom10010047
29. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol. Res*. 2009;59:365–78. doi: 10.1016/j.phrs.2009.01.017
30. Pistollato F, Giampieri F, Battino M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment., *Food Chem. Toxicol*. 2015;75:58–70. doi: 10.1016/j.fct.2014.11.004
31. Filippini T, Malavolti M, Borrelli F, Izzo AA, Fairweather-Tait SJ, Horneber M, et al. Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *CDSR*. 2020.;3. doi: 10.1002/14651858.CD005004.pub3
32. Almatrood SA, Almatroudi A, Khan AA, Alhumaydh FA, Alsahl MA, Rahmani AH. Potential therapeutic targets of epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechin in green tea, and its role in the therapy of various types of cancer. *Molecules*. 2020;25. doi: 10.3390/molecules25143146
33. Ren B, Kwah MXY, Liu C, Ma Z, Shanmugam MK, Ding L, et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Lett*. 2021;515:63–72. doi: 10.1016/j.canlet.2021.05.001
34. Joshi P, Joshi S, Semwal D, Bisht A, Paliwal S, Dwivedi J, et al. Curcumin: An Insight into Molecular Pathways Involved in Anticancer Activity. *Mini-Rev. Med. Chem*. 2021;21:2420–57. doi: 10.2174/1389557521666210122153823
35. Chan L, Pang Y, Wang Y, Zhu D, Taledaohan A, Jia Y, et al. Genistein-induced mitochondrial dysfunction and FOXO3a/PUMA expression in non-small lung cancer cells. *Pharm Biol*. 2022;60:1876–83. doi: 10.1080/13880209.2022.2123933
36. Jiang Y, Pei J, Zheng Y, Miao Y jing, Duan B zhong, Huang L fang. Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. *Chinese J. Integr. Med*. 2022;28:661–71. doi: 10.1007/s11655-021-3345-2
37. Ward AB, Mir H, Kapur N, Gales DN, Carriere PP, Singh S. Quercetin inhibits prostate cancer by attenuating cell survival and inhibiting anti-apoptotic pathways. *World J Surg Onc*. 2018;16. doi: 10.1186/s12957-018-1400-z

38. Banik K, Ranaware AM, Deshpande V, Nalawade SP, Padmavathi G, Bordoloi D, et al. Honokiol for cancer therapeutics: A traditional medicine that can modulate multiple oncogenic targets. *Pharmacol. Res.* 2019;144:192–209. doi: 10.1016/j.phrs.2019.04.004
39. Chirumamilla CS, Pérez-Novo C, Van Ostade X, Vanden Berghe W. Molecular insights into cancer therapeutic effects of the dietary medicinal phytochemical withaferin A. In: *Proc. Nutr. Soc.* 2017;76:96-105. doi: 10.1017/S0029665116002937.
40. Papakonstantinou A, Koumariou P, Rigakou A, Diamantakos P, Frakolaki E, Vassilaki N, et al. New Affordable Methods for Large-Scale Isolation of Major Olive Secoiridoids and Systematic Comparative Study of Their Antiproliferative/Cytotoxic Effect on Multiple Cancer Cell Lines of Different Cancer Origins. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24. doi: 10.3390/ijms24010003
41. Lin SR, Chang CH, Hsu CF, Tsai MJ, Cheng H, Leong MK, et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *Br. J. Pharmacol.* 2020;177:1409-1423. doi: 10.1111/bph.14816.
42. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 2020;83:770–803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285
43. Ma SC, Zhang JQ, Yan TH, Miao MX, Cao YM, Cao YB, et al. Novel strategies to reverse chemoresistance in colorectal cancer. *Cancer Med.* 2023;12:11073-96. doi: 10.1002/cam4.5594
44. Devi YP, Uma A, Lakshmi Narasu M, Kalyani C. A Comparative Study of the Effect of Gallic Acid on Cancer Cells and Normal Cells. *RJPBCS.* 2015;6:460-4. ISSN: 0975-8585
45. Ruvinov I, Nguyen C, Scaria B, Vegh C, Zaitoon O, Baskaran K, et al. Lemongrass Extract Possesses Potent Anticancer Activity Against Human Colon Cancers, Inhibits Tumorigenesis, Enhances Efficacy of FOLFOX, and Reduces Its Adverse Effects. *Integr. Cancer Ther.* 2019;18:1534735419889150. doi: 10.1177/1534735419889150
46. Hussein HA, Khaphi FL. The Apoptotic Activity of Curcumin Against Oral Cancer Cells Without Affecting Normal Cells in Comparison to Paclitaxel Activity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2023;195:5019–33. doi: 10.1007/s12010-023-04454-5
47. Kane AM, Liu C, Akhter DT, McKeone DM, Bell CA, Thurecht KJ, et al. Curcumin Chemoprevention Reduces the Incidence of Braf Mutant Colorectal Cancer in a Preclinical Study. *Dig. Dis. Sci.* 2021;66:4326–32. doi: 10.1007/s10620-020-06752-y
48. Benameur T, Soleti R, Panaro MA, La Torre ME, Monda V, Messina G, et al. Curcumin as prospective anti-aging natural compound: Focus on brain. *Molecules.* 2021;26:4794. doi: 10.3390/molecules26164794.
49. Xia Z hong, Zhang S ya, Chen Y si, Li K, Chen W bo, Liu Y qiang. Curcumin anti-diabetic effect mainly correlates with its anti-apoptotic actions and PI3K/Akt signal pathway regulation in the liver. *Food Chem. Toxicol.* 2020;146:111803. doi: 10.1016/j.fct.2020.111803.

50. Sun M, Liu N, Sun J, Li X, Wang H, Zhang W, et al. Curcumin regulates anti-inflammatory responses by AXL/JAK2/STAT3 signaling pathway in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci. Lett.* 2022;787:136821. doi: 10.1016/j.neulet.2022.136821.
51. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Hushmandi K, Zarrin V, Moghadam ER, Hashemi F, et al. Toward Regulatory Effects of Curcumin on Transforming Growth Factor-Beta Across Different Diseases: A Review. *Front Pharmacol.* 2020;11:585413. doi: 10.3389/fphar.2020.585413.
52. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *IJBCB.* 2009;41:40-59. doi: 10.1016/j.biocel.2008.06.010.
53. Ismail NI, Othman I, Abas F, Lajis NH, Naidu R. Mechanism of apoptosis induced by curcumin in colorectal cancer. *IJMS.* 2019;20:2454. doi: 10.3390/ijms20102454.
54. Hao J, Dai X, Gao J, Li Y, Hou Z, Chang Z, et al. Curcumin suppresses colorectal tumorigenesis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway by downregulating Axin2. *Oncol Lett.* 2021;21:186. doi: 10.3892/ol.2021.12447
55. Wang X, Hang Y, Liu J, Hou Y, Wang N, Wang M. Anticancer effect of curcumin inhibits cell growth through miR-21/PTEN/Akt pathway in breast cancer cell. *Oncol. Lett.* 2017;13:4825–31. doi: 10.3892/ol.2017.6053
56. Choi H, Chun YS, Kim SW, Kim MS, Park JW. Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: A mechanism of tumor growth inhibition. *Mol. Pharmacol.* 2006;70:1664–71. doi: 10.1124/mol.106.025817
57. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: How many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS Journal.* 2009;11(3):495–510.
58. Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (Vegetable tannins): Gallic acid metabolism. *Natural Product Reports.* 1994;11:41–66. doi: 10.1039/NP9941100041
59. Konishi Y, Hitomi Y, Yoshioka E. Intestinal Absorption of p-Coumaric and Gallic Acids in Rats after Oral Administration. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:2527–32. doi: 10.1021/jf035366k
60. Guo L, Cao J hui, Wei T ting, Li J han, Feng Y kang, Wang L ping, et al. Gallic acid attenuates thymic involution in the D-galactose induced accelerated aging mice. *Immunobiology.* 2020;225:151870 doi: 10.1016/j.imbio.2019.11.005
61. Keyvani-Ghamsari S, Rahimi M, Khorsandi K. An update on the potential mechanism of gallic acid as an antibacterial and anticancer agent. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2023;11:5856–72. doi: 10.1002/fsn3.3615
62. Pereira MM, de Moraes H, dos Santos Silva E, Corso CR, Adami ER, Carlos RM, et al. The antioxidant gallic acid induces anxiolytic-, but not antidepressant-like effect, in streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis.* 2018;33:1573–84. doi: 10.1007/s11011-018-0264-9

63. Buchmann D, Schultze N, Borchardt J, Böttcher I, Schaufler K, Guenther S. Synergistic antimicrobial activities of epigallocatechin gallate, myricetin, daidzein, gallic acid, epicatechin, 3-hydroxy-6-methoxyflavone and genistein combined with antibiotics against ESKAPE pathogens. *J Appl Microbiol.* 2022;132:949–63. doi: 10.1111/jam.15253
64. Al Balushi N, Hassan SI, Abdullah N, Al Dhahli B, Al Bahlani S, Ahmed I, et al. Addition of Gallic Acid Overcomes Resistance to Cisplatin in Ovarian Cancer Cell Lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2022;23:2661–9. doi: 10.31557/APJCP.2022.23.8.2661
65. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Mirzaei S, Hashemi F, Samarghandian S, Zabolian A, et al. Gallic acid for cancer therapy: Molecular mechanisms and boosting efficacy by nanoscopical delivery. *Food Chem. Toxicol.* 2021;157:112576. doi: 10.1016/j.fct.2021.112576.
66. Zeng M, Su Y, Li K, Jin D, Li Q, Li Y, et al. Gallic Acid Inhibits Bladder Cancer T24 Cell Progression Through Mitochondrial Dysfunction and PI3K/Akt/NF-κB Signaling Suppression. *Front Pharmacol.* 2020;11:1222. doi: 10.3389/fphar.2020.01222
67. Chen YJ, Lin KN, Jhang LM, Huang CH, Lee YC, Chang L Sen. Gallic acid abolishes the EGFR/Src/Akt/Erk-mediated expression of matrix metalloproteinase-9 in MCF-7 breast cancer cells. *Chem.-Biol. Interact.* 2016;252:131–40. doi: 10.1016/j.cbi.2016.04.025
68. Ko EB, Jang YG, Kim CW, Go RE, Lee HK, Choi KC. Gallic Acid Hindered Lung Cancer Progression by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells via PI3K/Akt Pathway. *Biomol. Ther.* 2022;30:151–61. doi: 10.4062/biomolther.2021.074
69. Yang JT, Lee IN, Chen CH, Lu FJ, Chung CY, Lee MH, et al. Gallic Acid Enhances the Anti-Cancer Effect of Temozolomide in Human Glioma Cell Line via Inhibition of Akt and p38-MAPK Pathway. *Processes.* 2022;10:448. doi: 10.3390/pr10030448
70. Zerkak D, Dougados M. The Use of Glucosamine Therapy in Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2004;6:41-5 doi: <https://doi.org/10.1007/s11926-004-0082-4>
71. Zahedipour F, Dalirfardouei R, Karimi G, Jamialahmadi K. Molecular mechanisms of anticancer effects of Glucosamine. *Biomed Pharmacother.* 2017;95:1051–8. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.122
72. Masuda S, Azuma K, Kurozumi S, Kiyose M, Osaki T, Tsuka T, et al. Anti-tumor properties of orally administered glucosamine and N-acetyl-d-glucosamine oligomers in a mouse model. *Carbohydr. Polym.* 2014;111:783–7. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.102
73. Shintani T, Yamazaki F, Katoh T, Umekawa M, Matahira Y, Hori S, et al. Glucosamine induces autophagy via an mTOR-independent pathway. *BBRC.* 2010;391:1775–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.154
74. Zhou J, Wu Z, Lin Z, Wang W, Wan R, Liu T. Association between glucosamine use and cancer mortality: A large prospective cohort study. *Front. nutr.* 2022;9:947818. doi: 10.3389/fnut.2022.947818.

75. Suissa K, Hudson M, Suissa S. Glucosamine and lower mortality and cancer incidence: Selection bias in the observational studies. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2022;31:1272–9. doi: 10.1002/pds.5535
76. Liu B, Yang W, Zhang K. Role of Glucosamine and Chondroitin in the Prevention of Cancer: A Meta-Analysis. *Nutr Cancer.* 2023;75(3):785-794. doi: 10.1080/01635581.2023.2173258.
77. Li G, Zhang X, Liu Y, Zhang J, Li L, Huang X, et al. Relationship between glucosamine use and the risk of lung cancer: data from a nationwide prospective cohort study. *Eur. Respir. J.* 2022;59:2101399. doi: 10.1183/13993003.01399-2021
78. WHO. All cancers [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date: 16.09.2023]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=population>
79. WHO. Turkey [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date:16.09.2023]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars-compare-populations?mode=cancer&key=asr&types=0_1&sort_by=value1&populations=792&group_populations=1
80. WHO. Net survival based on ICSS standards, 5-year, both sexes, cases diagnosed 2008–2012 [Web Page]. [Cited Date:15.09.2023]. Available from: https://gco.iarc.fr/survival/survcan/dataviz/bars?multiple_populations=0&sort_by=value1&survival=5&cancers=90&indicator=ICSS
81. WHO. Colon Cancer [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date: 16.09.2023]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/8-colon-fact-sheet.pdf>
82. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2021;18:663–72. doi: 10.1038/s41571-021-00514-z
83. WHO. Estimated number of new cases from 2020 to 2040, Both sexes, age [0-85+] [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date: 15.09.2023]. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars?cancers=39&key=total&show_bar_mode_prop=1&types=0
84. WHO. Estimated number of deaths from 2020 to 2040, Both sexes, age [0-85+] [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date: 15.09.2023]. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars?cancers=39&key=total&show_bar_mode_prop=1&types=1
85. McCarthy N, Manieri E, Storm EE, Saadatpour A, Luoma AM, Kapoor VN, et al. Distinct Mesenchymal Cell Populations Generate the Essential Intestinal BMP Signaling Gradient. *Cell Stem Cell.* 2020;26:391-402. doi: 10.1016/j.stem.2020.01.008
86. Orlandi G, Roncucci L, Carnevale G, Sena P. Different Roles of Apoptosis and Autophagy in the Development of Human Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:10201. doi: 10.3390/ijms241210201
87. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers.* MDPI AG; 2021;13:2025. doi: 10.3390/cancers13092025

88. Harada S, Morlote D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020;27:20-26. doi: 10.1097/PAP.0000000000000247.
89. Grady WM, Markowitz SD. The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening. *DDS*. 2015;60:762–72. doi: 10.1007/s10620-014-3444-4
90. Wu Y, Yao J, Xie J, Liu Z, Zhou Y, Pan H, et al. The role of autophagy in colitis-associated colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2018;3:31. doi: 10.1038/s41392-018-0031-8
91. Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *J. Hematol. Oncol*. 2020;13:165. doi: 10.1186/s13045-020-00990-3.
92. Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol*. 2014;27:9-14. PMID: 24714764;
93. Liebl MC, Hofmann TG. The role of p53 signaling in colorectal cancer. *Cancers*. MDPI; 2021;13:2125. doi: 10.3390/cancers13092125
94. Khan AA, Mannan V, Pervaiz MA, Akram A, Momin ES, Sanusi M, et al. The Role of Glucosamine and Chondroitin Sulfate in the Prevention of Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Cureus*. 2022;14. doi: 10.7759/cureus.25401.
95. Wani AK, Akhtar N, Mir T ul G, Singh R, Jha PK, Mallik SK, et al. Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials. *Biomolecules*. MDPI; 2023;13:194. doi: 10.3390/biom13020194
96. BioRender. 2024. [Web Page]. [Cited Date: 11.02.2024]. Available from: <https://www.biorender.com/>
97. Koehler BC, Scherr AL, Lorenz S, Urbanik T, Kautz N, Elssner C, et al. Beyond Cell Death-Antiapoptotic Bcl-2 Proteins Regulate Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells In Vitro. *PLoS One*. 2013;8. doi: 10.1371/journal.pone.0076446
98. Carberry S, D’Orsi B, Monsefi N, Salvucci M, Bacon O, Fay J, et al. The BAX/BAK-like protein BOK is a prognostic marker in colorectal cancer article. *CDDis*. 2018;9:125. doi: 10.1038/s41419-017-0140-2
99. Soung YH, Lee JW, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee JH, et al. Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene*. 2003;22:8048–52. doi: 10.1038/sj.onc.1206727
100. Soung YH, Lee JW, Kim SY, Park WS, Nam SW, Lee JY, et al. Mutational analysis of proapoptotic caspase-9 gene in common human carcinomas. *APMIS*. 2006;114:292–7. doi: 10.1111/j.1600-0463.2006.apm_364.x
101. Soung YH, Lee JW, Kim SY, Park WS, Nam SW, Lee JY, et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet*. 2004;115:112–5. doi: 10.1007/s00439-004-1129-3
102. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Kim CJ, Cho YG, et al. Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. *J. Carcinog*. 2004;25:1371–6. doi: 10.1093/carcin/bgh145
103. Alonso S, Saltz L. The Landmark Series: Chemotherapy for Non-Metastatic Colon Cancer. *Ann. Surg. Oncol*. 2021;28:995–1001. doi: 10.1245/s10434-020-09375-9

104. Morton D, Seymour M, Magill L, Handley K, Glasbey J, Glimelius B, et al. Preoperative Chemotherapy for Operable Colon Cancer: Mature Results of an International Randomized Controlled Trial. *J. Clin. Oncol.* 2023;41:1541–52. doi: 10.1200/JCO.22.00046
105. McQuade RM, Bornstein JC, Nurgali K. Anti-Colorectal Cancer Chemotherapy-Induced Diarrhoea: Current Treatments and Side-Effects. *Int. J. Clin. Med.* 2014;05:393–406. doi: 10.4236/ijcm.2014.57054
106. Vaghari-Tabari M, Majidinia M, Moein S, Qujeq D, Asemi Z, Alemi F, et al. MicroRNAs and colorectal cancer chemoresistance: New solution for old problem. *Life Sci.* 2020;259. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118255
107. Martz CA, Ottina KA, Singleton KR, Jasper JS, Wardell SE, Peraza-Penton A, et al. Systematic identification of signaling pathways with potential to confer anticancer drug resistance. *Sci. Signal.* 2014;7:121. doi: 10.1126/scisignal.aaa1877.
108. Levantini E, Maroni G, Del Re M, Tenen DG. EGFR signaling pathway as therapeutic target in human cancers. *YSCBI.* 2022;85:253–75. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.04.002
109. Li K, Guo Q, Yang J, Chen H, Hu K, Zhao J, et al. FOXD3 is a tumor suppressor of colon cancer by inhibiting EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK signal pathway. *Oncotarget.* 2017;8:5048-5056. doi: 10.18632/oncotarget.13790.
110. Jung KH, Lee EJ, Park JW, Lee JH, Moon SH, Cho YS, et al. EGF receptor stimulation shifts breast cancer cell glucose metabolism toward glycolytic flux through PI3 kinase signaling. *PLoS One.* 2019;14. doi: 10.1371/journal.pone.0221294
111. Ru P, Hu P, Geng F, Mo X, Cheng C, Yoo JY, et al. Feedback Loop Regulation of SCAP/SREBP-1 by miR-29 Modulates EGFR Signaling-Driven Glioblastoma Growth. *Cell Rep.* 2016;16:1527–35. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.017
112. Cheng WL, Feng PH, Lee KY, Chen KY, Sun WL, Van Hiep N, et al. The role of ereg/egfr pathway in tumor progression. *Int. J. Mol. Sci. MDPI;* 2021;22. doi: 10.3390/ijms222312828
113. Wang Y, Jing Y, Ding L, Zhang X, Song Y, Chen S, et al. Epiregulin reprograms cancer-associated fibroblasts and facilitates oral squamous cell carcinoma invasion via JAK2-STAT3 pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019;38. doi: 10.1186/s13046-019-1277-x
114. Stahler A, Heinemann V, Giessen-Jung C, Crispin A, Schalhorn A, Stintzing S, et al. Influence of mRNA expression of epiregulin and amphiregulin on outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-FU/LV plus irinotecan or irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment (FIRE 1-trial). *IJC.* 2016;138:739–46. doi: 10.1002/ijc.29807
115. Ma S, Zhang L, Ren Y, Dai W, Chen T, Luo L, et al. Epiregulin confers EGFR-TKI resistance via EGFR/ErbB2 heterodimer in non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2021;40:2596–609. doi: 10.1038/s41388-021-01734-4
116. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol. Oncol.* 2018;12:3–20. doi: 10.1002/1878-0261.12155

117. Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism: Clin. Nutr. Exp.* 2016;65:124–39. doi: 10.1016/j.metabol.2015.10.007
118. Tsunokake S, Iwabuchi E, Miki Y, Kanai A, Onodera Y, Sasano H, et al. SGLT1 as an adverse prognostic factor in invasive ductal carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2023;201:499–513. doi: 10.1007/s10549-023-07024-9
119. Hrustanovic G, Lee BJ, Bivona TG. Mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies. *Cancer Biol Ther.* 2013;14:304–14. doi: 10.4161/cbt.23627
120. Siddiqui AD, Piperdi B. KRAS mutation in colon cancer: A marker of resistance to EGFR-I therapy. *Ann. Surg. Oncol.* 2010;17:1168–76. doi: 10.1245/s10434-009-0811-z
121. Heidelberger C, Chaudhuri Nk, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer Rj, Plevin E, Scheiner J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature.* 1957;179:663–6. doi: 10.1038/179663a0.
122. Daher GC, Harris BE, Diasio RB. Metabolism of Pyrimidine Analogues and Their Nucleosides. *Pharmacol. Ther.* 1990;48:189–222. doi: 10.1016/0163-7258(90)90080-1
123. Horowitz J, Chargaff E. Massive Incorporation of 5-Fluorouracil into a Bacterial Ribonucleic Acid. *Nature.* 1959;184:1213–5. doi: 10.1038/1841213a0
124. De La Cruz-Morcillo MA, Valero MLL, Callejas-Valera JL, Arias-González L, Melgar-Rojas P, Galán-Moya EM, et al. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: Implication in resistance. *Oncogene.* 2012;31:1073–85. doi: 10.1038/onc.2011.321
125. Hu T, Wang L, Zhang L, Lu L, Shen J, Chan RLY, et al. Sensitivity of apoptosis-resistant colon cancer cells to tanshinones is mediated by autophagic cell death and p53-independent cytotoxicity. *Phytomedicine.* 2015;22:536–44. doi: 10.1016/j.phymed.2015.03.010
126. Benhattar J, Cerottini JP, Saraga E, Mettetz G, Givel JC. p53 mutations as a possible predictor of response to chemotherapy in metastatic colorectal carcinomas. *International J. Cancer.* 1996;69:190–2. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960621)69:3<190::AID-IJC7>3.0.CO;2-V
127. Zhang L, Xing X, Meng F, Wang Y, Zhong D. Oral fluoropyrimidine versus intravenous 5-fluorouracil for the treatment of advanced gastric and colorectal cancer: Meta-analysis. *JGH.* 2018;33:209–25. doi: 10.1111/jgh.13845
128. Alotayk LI, Aldubayan MA, Alenezi SK, Anwar MJ, Alhowail AH. Comparative evaluation of doxorubicin, cyclophosphamide, 5-fluorouracil, and cisplatin on cognitive dysfunction in rats: Delineating the role of inflammation of hippocampal neurons and hypothyroidism. *Biomed Pharmacother.* 2023;165:115245. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115245
129. Cordier PY, Nau A, Ciccolini J, Oliver M, Mercier C, Lacarelle B, et al. 5-FU-induced neurotoxicity in cancer patients with profound DPD deficiency syndrome: A report of two cases. *Chemother Pharmacol.* 2011;68:823–6. doi: 10.1007/s00280-011-1666-0

130. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr. Oncol.* 2011;18:18-25. doi: <https://doi.org/10.3747/co.v18i1.708>
131. Dembic Z. Antitumor drugs and their targets. *Molecules.* 2020;25. doi: 10.3390/molecules25235776
132. Danyelle Townsend. Oxaliplatin. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier. 2007;1-4. doi:10.1016/B978-008055232-3.62973-3
133. Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr.* 2007;157:315–9. doi: 10.1007/s10354-007-0428-4
134. Pramanik KC, Srivastava SK. Apoptosis signal-regulating kinase 1-thioredoxin complex dissociation by capsaicin causes pancreatic tumor growth suppression by inducing apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17:1417–32. doi: 10.1089/ars.2011.4369
135. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Mirzaei S, Hashemi F, Samarghandian S, Zabolian A, et al. Gallic acid for cancer therapy: Molecular mechanisms and boosting efficacy by nanoscopical delivery. *Food and Chemical Toxicology.* Elsevier Ltd; 2021;157. doi: 10.1016/j.fct.2021.112576
136. Al-Abdallat K, Obeidat M, Ababneh NA, Zalloum S, Al Hadidi S, Al-Abdallat Y, et al. Phytochemical Analysis and Anticancer Properties of *Drimys maritima* Bulb Extracts on Colorectal Cancer Cells. *Molecules.* 2023;28. doi: 10.3390/molecules28031215
137. Delgado-Gonzalez P, Garza-Treviño EN, de la Garza Kalife DA, Quiroz Reyes A, Hernández-Tobías EA. Bioactive Compounds of Dietary Origin and Their Influence on Colorectal Cancer as Chemoprevention. *Life.* 2023;13:1977. doi: 10.3390/life13101977
138. Han M, Song Y, Zhang X. Quercetin suppresses the migration and invasion in human colon cancer caco-2 cells through regulating toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway. *Pharmacogn Mag.* 2016;12. doi: 10.4103/0973-1296.182154
139. Dal Z, Aru B. The role of curcumin on apoptosis and NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis on colorectal cancer in vitro. *Turk. J. Med. Sci.* 2023;53:883–93. doi: 10.55730/1300-0144.5652
140. Jiang Y, Fang Y, Ye Y, Xu X, Wang B, Gu J, et al. Anti-cancer effects of 3, 3'-diindolylmethane on human hepatocellular carcinoma cells is enhanced by calcium ionophore: The role of cytosolic Ca²⁺ and P38 mapk. *Front. pharmacol.* 2019;10. doi: 10.3389/fphar.2019.01167
141. Heo JR, Lee GA, Kim GS, Hwang KA, Choi KC. Phytochemical-induced reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and differentiation in malignant melanoma cells. *Phytomedicine.* 2018;39:100–10. doi: 10.1016/j.phymed.2017.12.006
142. Joshi P, Joshi S, Semwal D, Bisht A, Paliwal S, Dwivedi J, et al. Curcumin: An Insight into Molecular Pathways Involved in Anticancer Activity. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2021;21:2420–57. doi: 10.2174/1389557521666210122153823

143. Amalraj A, Pius A, Gopi S, Gopi S. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review. *J Tradit Complement Med.* 2017;7:205–33. doi: 10.1016/j.jtcme.2016.05.005
144. Teiten MH, Dicato M, Diederich M. Hybrid curcumin compounds: A new strategy for cancer treatment. *Molecules.* MDPI AG; 2014;19:20839–63. doi: 10.3390/molecules191220839
145. Lv ZD, Liu XP, Zhao WJ, Dong Q, Li FN, Wang HB, et al. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *International Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014;7:2818-24. PMC4097278.
146. Goel A, Boland CR, Chauhan DP. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2001;172:111–8. doi: 10.1016/s0304-3835(01)00655-3
147. Majumdar APN, Banerjee S, Nautiyal J, Patel BB, Patel V, Du J, et al. Curcumin synergizes with resveratrol to inhibit colon cancer. *Nutr Cancer.* 2009;61:544–53. doi: 10.1080/01635580902752262
148. Pricci M, Girardi B, Giorgio F, Losurdo G, Ierardi E, Di Leo A. Curcumin and colorectal cancer: From basic to clinical evidences. *Int. J. Mol. Sci.* MDPI AG; 2020;21. doi: 10.3390/ijms21072364
149. Ismail NI, Othman I, Abas F, Lajis NH, Naidu R. Mechanism of apoptosis induced by curcumin in colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* MDPI AG; 2019;20. doi: 10.3390/ijms20102454
150. Zheng X, Yang X, Lin J, Song F, Shao Y. Low curcumin concentration enhances the anticancer effect of 5-fluorouracil against colorectal cancer. *Phytomedicine.* 2021;85. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153547
151. Toden S, Okugawa Y, Jascur T, Wodarz D, Komarova NL, Buhrmann C, et al. Curcumin mediates chemosensitization to 5-fluorouracil through miRNA-induced suppression of epithelial-to-mesenchymal transition in chemoresistant colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2014;36:355–67. doi: 10.1093/carcin/bgv006
152. Hassani S, Ghanbari F, Lotfi M, Alam W, Aschner M, Popović-Djordjević J, et al. How gallic acid regulates molecular signaling: role in cancer drug resistance. *Med Oncol.* 2023;40. doi: 10.1007/s12032-023-02178-4
153. Varela-Rodríguez L, Sánchez-Ramírez B, Hernández-Ramírez VI, Varela-Rodríguez H, Castellanos-Mijangos RD, González-Horta C, et al. Effect of gallic acid and myricetin on ovarian cancer models: A possible alternative antitumoral treatment. *BMC complement. med. ther.* 2020;20. doi: 10.1186/s12906-020-02900-z
154. Tsai CL, Chiu YM, Ho TY, Hsieh CT, Shieh DC, Lee YJ, et al. Gallic acid induces apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Anticancer Res.* 2018;38:2057–67. doi: 10.21873/anticancer.12445
155. Lin X, Wang G, Liu P, Han L, Wang T, Chen K, et al. Gallic acid suppresses colon cancer proliferation by inhibiting SRC and EGFR phosphorylation. *Exp Ther Med.* 2021;21. doi: 10.3892/etm.2021.10070

156. Subramanian AP, John AA, Vellayappan M V., Balaji A, Jaganathan SK, Supriyanto E, et al. Gallic acid: Prospects and molecular mechanisms of its anticancer activity. *RSC Adv.* 2015;5:35608–21. doi: 10.1039/c5ra02727f
157. Bulbul MV, Karabulut S, Kalender M, Keskin I. Effects of Gallic Acid on Endometrial Cancer Cells in Two and Three Dimensional Cell Culture Models. *APJCP.* 2021;22:1745–51. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.6.1745
158. ACS. Molecule of the Week Archive:D-Glucosamine [Web Page]. American Chemical Society; [Cited Date: 08.12.2023]. Available from: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/g/d-glucosamine.html>
159. Kirkham SG, Samarasinghe RK. Review article: Glucosamine. *Orthop. Surg.* 2009;17:72-6. doi: 10.1177/230949900901700116.
160. Liang Y, Xu W, Liu S, Chi J, Zhang J, Sui A, et al. N-Acetyl-Glucosamine Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Activating Death Receptor 5. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45:2054–70. doi: 10.1159/000488042
161. Hwang MS, Baek WK. Glucosamine induces autophagic cell death through the stimulation of ER stress in human glioma cancer cells. *BBRC.* 2010;399:111–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.050
162. Yu Z, Ju Y, Liu H. Anti-lung cancer effect of glucosamine by suppressing the phosphorylation of FOXO. *Mol. Med. Rep.* 2017;16:3395–400. doi: 10.3892/mmr.2017.6976
163. Duelen R, Corvelyn M, Tortorella I, Leonardi L, Chai YC, Sampaolesi M. Introduction to Biotech Entrepreneurship: From Idea to Business: A European Perspective. Switzerland AG. Springer, Cham. 2019. p.89–128.
164. Elvis A. Martis and Rakesh R. Somani. Promising Pharmaceuticals. Croatia. Books on Demand. 2016. p.19–36
165. Sinha S, Vohora D. An Overview. *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Academic Pres.* Elsevier. 2017. p.19–32.
166. Xu Z, Eichler B, Klausner EA, Duffy-Matzner J, Zheng W. Lead/Drug Discovery from Natural Resources. *Molecules.* 2022;27 doi: 10.3390/molecules27238280
167. Verma S, Pathak RK. Bioinformatics: Methods and Applications. Academic Press. Elsevier. 2021. p.253–67. doi: 10.1016/B978-0-323-89775-4.00004-3
168. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today.* 2008;13:894–901. doi: 10.1016/j.drudis.2008.07.004
169. Roman G, Popek T, Lazar C, Kiyota T, Kluczyk A, Konishi Y. Drug Evolution Concept in Drug Design: 2. Chimera Method. *Med. Chem.* 2006;2:175–89. doi: 10.2174/157340606776056214
170. Ripoll C, Herrero-Foncubierta P, Puente-Muñoz V, Carmen Gonzalez-Garcia M, Miguel D, Resa S, et al. Chimeric Drug Design with a Noncharged Carrier for Mitochondrial Delivery. *Pharmaceutics.* 2021;13:254. doi: 10.3390/pharmaceutics13020254.

171. Jampilek J. Heterocycles in medicinal chemistry. *Molecules*. 2019;24.
172. Mü Ller-Schiffmann A, Sticht H, Korth C. Hybrid Compounds From Simple Combinations to Nanomachines. *BioDrugs* 2012;26:21-31. doi: 10.2165/11597630-000000000-00000
173. Micale N, Molonia MS, Citarella A, Cimino F, Saija A, Cristani M, et al. Natural product-based hybrids as potential candidates for the treatment of cancer: Focus on curcumin and resveratrol. *Molecules*. 2021;26. doi: 10.3390/molecules26154665
174. Bérubé G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2016;11:281–305. doi: 10.1517/17460441.2016.1135125
175. Li S, Zhang W, Yang Y, Ma T, Guo J, Wang S, et al. Discovery of oral-available resveratrol-caffeic acid based hybrids inhibiting acetylated and phosphorylated STAT3 protein *EJMECH*. 2016;124:1006–18. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.10.028
176. Carullo G, Mazzotta S, Koch A, Hartmann KM, Friedrich O, Gilbert DF, et al. New oleoyl hybrids of natural antioxidants: Synthesis and in vitro evaluation as inducers of apoptosis in colorectal cancer cells. *Antioxidants*. 2020;9:1–16. doi: 10.3390/antiox9111077
177. Yao JN, Zhang XX, Zhang YZ, Li JH, Zhao DY, Gao B, et al. Discovery and anticancer evaluation of a formononetin derivative against gastric cancer SGC7901 cells. *Invest New Drugs*. 2019;37:1300–8 doi:10.1007/s10637-019-00767-7
178. Tao C, Chen J, Huang X, Chen Z, Li X, Li Y, et al. CT1-3, a novel magnolol-sulforaphane hybrid suppresses tumorigenesis through inducing mitochondria-mediated apoptosis and inhibiting epithelial mesenchymal transition. *EJMECH*. 2020;199. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112441
179. Singh H, Kumar M, Nepali K, Gupta MK, Saxena AK, Sharma S, et al. Triazole tethered C5-curcuminoid-coumarin based molecular hybrids as novel antitubulin agents: Design, synthesis, biological investigation and docking studies. *EJMECH*. 2016;116:102–15. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.03.050
180. Ai Y, Zhu B, Ren C, Kang F, Li J, Huang Z, et al. Discovery of New Monocarbonyl Ligustrazine-Curcumin Hybrids for Intervention of Drug-Sensitive and Drug-Resistant Lung Cancer. *J. Med. Chem.* 2016;59:1747–60. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01203
181. Dubey SK, Sharma AK, Narain U, Misra K, Pati U. Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylenated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties. *EJMECH*. 2008;43:1837–46. doi: 10.1016/j.ejmech.2007.11.027
182. Singh D, Agarwal S, Singh P, Godbole M, Misra K. Curcumin conjugates induce apoptosis via a mitochondrion dependent pathway in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *APJCP*. 2013;14:5797–804. doi: 10.7314/APJCP.2013.14.10.5797
183. AL Zahrani NA, El-Shishtawy RM, Asiri AM. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *EJMECH*. 2020;204. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112609

184. Chapado L, Linares-Palomino PJ, Salido S, Altarejos J, Rosado JA, Salido GM. Synthesis and evaluation of the platelet antiaggregant properties of phenolic antioxidants structurally related to rosmarinic acid. *Bioorg Chem.* 2010;38:108–14. doi: 10.1016/j.bioorg.2009.12.001
185. Hejchman E, Taciak P, Kowalski S, Maciejewska D, Czajkowska A, Borowska J, et al. Synthesis and anticancer activity of 7-hydroxycoumarinyl gallates. *Pharmacol. Rep.* 2015;67:236–44. doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.008
186. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* 2006;58:621–81. doi: 10.1124/pr.58.3.10
187. Chou TC. Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:2059–80. doi: 10.1080/10428190802353591
188. Thermo Fisher Scientific. Counting Cells in a Hemocytometer [Web Page]. Thermo Fisher Scientific [Cited Date: 10.03.2024]. Available from: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/counting-cells-in-a-hemocytometer.html>
189. Kase S. The Modulation by L-Leucovorin of 5-Fluorouracil Antitumor Activity on Human Colon Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. *Surg. Today.* 1993;23:615–620. <https://doi.org/10.1007/BF00311910>
190. Yong Shim B, Moon Lee K, Cho HM, Jin Kim H, Joo Cho H, Yang J, et al. Oxaliplatin/5-FU without Leucovorin Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Res Treat.* 2005;37:212–215. doi: 10.4143/crt.2005.37.4.212
191. Arnould SÂ, Guichard S, Hennebelle I, Cassar G, Bugat R, Canal P. Contribution of apoptosis in the cytotoxicity of the oxaliplatin±irinotecan combination in the HT29 human colon adenocarcinoma cell line. *Biochem. Pharmacol.* 2002;64:1215–1226. doi:10.1016/s0006-2952(02)01291-1
192. Soltanian S, Riahirad H, Pabarja A, Jafari E, Khandani BK. Effect of Cinnamic acid and FOLFOX in diminishing side population and downregulating cancer stem cell markers in colon cancer cell line HT-29. *J. Pharm. Sci.* 2018;26:19–29. doi: 10.1007/s40199-018-0210-8
193. Genovese S, Epifano F, Prezioso F, Slater J, Nangia-Makker P, Majumdar APN, et al. Gercumin synergizes the action of 5-fluorouracil and oxaliplatin against chemoresistant human cancer colon cells. *BBRC.* 2020;522:95–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.068
194. Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, Oh PS, Nautiyal J, Sarkar FH, et al. MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGFβr2) in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2012;33:68–76. doi: 10.1093/carcin/bgr246
195. Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, Nautiyal J, Sarkar FH, Majumdar APN. Elimination of colon cancer stem-like cells by the combination of curcumin and FOLFOX. *Transl. Oncol.* 2009;2:321–8. doi: 10.1593/tlo.09193
196. Oh PS, Patel VB, Sanders MA, Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, et al. Schlafen-3 decreases cancer stem cell marker expression and autocrine/juxtacrine signaling in

FOLFOX-resistant colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301:347–55. doi:10.1152/ajpgi.00403.2010.

197. Zhang L, Virgous C, Si H. Synergistic anti-inflammatory effects and mechanisms of combined phytochemicals. *JNB*. 2019;69:19–30. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.03.009

198. Liu YQ, Wang XL, He DH, Cheng YX. Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals., *Phytomedicine*. 2021;80. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153402>.

199. Persiani S, Rotini R, Trisolino G, Rovati LC, Locatelli M, Paganini D, et al. Synovial and plasma glucosamine concentrations in osteoarthritic patients following oral crystalline glucosamine sulphate at therapeutic dose. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:764–72. doi: 10.1016/j.joca.2007.01.019

200. Rizeq B, Gupta I, Ilesanmi J, AlSafran M, Rahman MDM, Ouhtit A. The power of phytochemicals combination in cancer chemoprevention. *J. Cancer*. 2020;11:4521–33. doi: 10.7150/jca.34374

201. Sun X, Hou W, Liu X, Chai J, Guo H, Yu J. Targeting REV7 effectively reverses 5-FU and oxaliplatin resistance in colorectal cancer. *Cancer Cell Int*. 2020;20. doi: 10.1186/s12935-020-01668-z

202. Fahmy SA, Ponte F, Fawzy IM, Sicilia E, Bakowsky U, Azzazy HMES. Host-guest complexation of oxaliplatin and para-sulfonatocalix[n]arenes for potential use in cancer therapy. *Molecules*. 2020;25. doi: 10.3390/molecules25245926

203. Flis S, Sptwiński J. Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *Anticancer Res*. 2009;29:435–41. PMID: 19331183.

204. Al-Keilani MS, Alsmadi DH, Darweesh RS, Alzoubi KH. Pramlintide, an antidiabetic, is antineoplastic in colorectal cancer and synergizes with conventional chemotherapy. *Clin Pharmacol*. 2018;10:23–9. doi: 10.2147/CPAA.S153780

205. Guo J, Zheng J, Mu M, Chen Z, Xu Z, Zhao C, et al. GW4064 enhances the chemosensitivity of colorectal cancer to oxaliplatin by inducing pyroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;548:60–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.02.043

206. Ardil B, Alper M. Potential cancer treatment effects of brusatol or eriodictyol combined with 5-fluorouracil (5-FU) in colorectal cancer cell. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2022;395:1109–23. doi: 10.1007/s00210-022-02270-y

207. Leong KH, Looi CY, Loong XM, Cheah FK, Supratman U, Litaudon M, et al. Cycloart-24-ene-26-ol-3-one, a new cycloartane isolated from leaves of *Aglaia exima* triggers tumour necrosis factor-receptor 1-mediated caspase-dependent apoptosis in colon cancer cell line. *PLoS One*. 2016;11. doi: 10.1371/journal.pone.0152652

208. Ng PL, Rajab NF, Then SM, Mohd Yusof YA, Wan Ngah WZ, Pin KY, et al. Piper betle leaf extract enhances the cytotoxicity effect of 5-fluorouracil in inhibiting the growth of HT29 and HCT116 colon cancer cells. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2014;15:692–700. doi: 10.1631/jzus.B1300303

209. Yin H, Li C, Wang S, Guo Q, Ren X, Jiang G. Silencing of CD59 enhanced the sensitivity of HT29 cells to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin. *JIC*. 2015;21:8–15. doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.020
210. Žilinskas J, Stukas D, Jasukaitienė A, Žievytė I, Balion Z, Šapauskienė J, et al. Assessing the Therapeutic Impacts of HAMLET and FOLFOX on BRAF-Mutated Colorectal Cancer: A Study of Cancer Cell Survival and Mitochondrial Dynamics In Vitro and Ex Vivo. *Medicina (Lithuania)*. 2024;60. doi: 10.3390/medicina60010142
211. Yıldız F, Eciroğlu H, Övey İ, Avnioğlu S. Effect of combination treatment of protocatechuic acid with 5-fluorouracil and oxaliplatin on colon cancer Caco-2 cell line. *Indian J Exp Biol*. 2023;61:151-158. doi: 10.56042/ijeb.v61i03.65610
212. Zoetemelk M, Ramzy GM, Rausch M, Nowak-Sliwinska P. Drug-drug interactions of irinotecan, 5-fluorouracil, folinic acid and oxaliplatin and its activity in colorectal carcinoma treatment. *Molecules*. 2020;25. doi: 10.3390/molecules25112614
213. Elkashty OA, Tran SD. Broccoli extract increases drug-mediated cytotoxicity towards cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2020;123:1395–403. doi: 10.1038/s41416-020-1025-1
214. Yang C, Song J, Hwang S, Choi J, Song G, Lim W. Apigenin enhances apoptosis induction by 5-fluorouracil through regulation of thymidylate synthase in colorectal cancer cells. *Redox Biol*. 2021;47. doi: 10.1016/j.redox.2021.102144
215. Mitra D, Saha D, Das G, Mukherjee R, Banerjee S, Alam N, et al. Lupeol synergizes with 5-fluorouracil to combat c-MET/EphA2 mediated chemoresistance in triple negative breast cancer. *iScience*. 2023;26. doi: 10.1016/j.isci.2023.108395
216. Chanu KD, Thoithoisana S, Kar A, Mukherjee PK, Radhakrishnanand P, Parmar K, et al. Phytochemically analysed extract of *Ageratina adenophora* (Sprengel) R.M.King & H. Rob. initiates caspase 3-dependant apoptosis in colorectal cancer cell: A synergistic approach with chemotherapeutic drugs. *J. Ethnopharmacology*. 2024;322. doi: 10.1016/j.jep.2023.117591
217. Patra S, Pradhan B, Nayak R, Behera C, Rout L, Jena M, et al. Chemotherapeutic efficacy of curcumin and resveratrol against cancer: Chemoprevention, chemoprotection, drug synergism and clinical pharmacokinetics. *Semin Cancer Biol*. 2021;73:310–20. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.10.010
218. Nagourney RA, Evans S, Tran PH, Nagourney AJ, Sugarbaker PH. Colorectal cancer cells from patients treated with FOLFOX or CAPOX are resistant to oxaliplatin. *EJSO*. 2021;47:738–42. doi: 10.1016/j.ejso.2020.09.017
219. Pezzani R, Salehi B, Vitalini S, Iriti M, Zuñiga FA, Sharifi-Rad J, et al. Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: An update on the cancer perspective. *Medicina (Lithuania)*. 2019;55. doi: 10.3390/medicina55040110
220. Du B, Jiang L, Xia Q, Zhong L. Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy*. 2005;52:23–8. doi: 10.1159/000090238
221. Wang YT, Liu HS, Su CL. Curcumin-enhanced chemosensitivity of FDA-approved platinum (II)-based anti-cancer drugs involves downregulation of nuclear

endonuclease G and NF- κ B as well as induction of apoptosis and G2/M arrest. *Int J Food Sci Nutr*. 2014;65:368–74. doi: 10.3109/09637486.2013.871694

222. Patel BB, Sengupta R, Qazi S, Vachhani H, Yu Y, Rishi AK, et al. Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *Int J. Cancer*. 2008;122:267–73. doi: 10.1002/ijc.23097

223. Wang R, Ma L, Weng D, Yao J, Liu X, Jin F. Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446 cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway. *Oncol Rep*. 2016;35:3075-83. doi: 10.3892/or.2016.4690

224. Chen XX, Lam KKH, Feng Y Bin, Xu K, Sze SCW, Tang SCW, et al. Ellagitannins from Pomegranate Ameliorates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Rats while Enhancing Its Chemotoxicity against HT-29 Colorectal Cancer Cells through Intrinsic Apoptosis Induction. *J Agric Food Chem*. 2018;66:7054–64. doi: 10.1021/acs.jafc.8b02458

ÖZGEÇMİŞ



BENZERLİK RAPORU

TEZ 21 NİSAN-turnitin.docx

ORJİNALLIK RAPORU

% 4	% 3	% 2	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	% 1
2	dspace.trakya.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	tr.intermediapub.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.ybu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	Priyanka Joshi, Sushil Joshi, Deepak Semwal, Akansha Bisht, Sarvesh Paliwal, Jaya Dwivedi, Swapnil Sharma. "Curcumin: An Insight into Molecular Pathways Involved in Anticancer Activity", Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2021 Yayın	<% 1