



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**OKSALİPLATİN VE 5-FLOROURASİLİN CACO-2 KANSER
HÜCRELERİNDE TOKSİSİTE VE ANTİTÜMÖR
AKTİVİTELERİNE RUTİN FLAVONOİDİNİN ETKİLERİ**

Farnoud NASIRI

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Tevhide SEL**

2015-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OKSALİPLATİN VE 5-FLOROURASİLİN CACO-2 KANSER
HÜCRELERİNDE TOKSİSİTE VE ANTİTÜMÖR
AKTİVİTELERİNE RUTİN FLAVONOİDİNİN ETKİLERİ**

Farnoud NASIRI

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof.Dr. Tevhide SEL

**Bu tez, Ankara Üniversitesi BAP komisyonu tarafından
13L3338008 proje no ile desteklenmiştir.**

2015-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.09.2015

Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU
Ankara Üniversitesi
(Jüri Başkanı)

Prof. Dr. Tevhide SEL
Ankara Üniversitesi
(Danışman)

Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Funda KOSOVA
Celal Bayar Üniversitesi

Doç. Dr. Gülcan AVCI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----------|
| Kabul ve Onay | ii |
| İçindekiler | iii |
| Önsöz | vii |
| Simgeler ve kısaltmalar | ix |
| Şekiller | xii |
| Çizelgeler | xiv |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Malign ve benign tümörler | 2 |
| 1.2. Apoptozis | 4 |
| 1.2.1. Apoptozis Mekanizmaları | 5 |
| 1.2.1.1. İntrinsik yolak | 6 |
| 1.2.1.2. Ekstrinsik yolak | 6 |
| 1.2.1.3. Genel (ortak) yolak | 7 |
| 1.2.2. Apoptotik sinyal indükleyicileri | 7 |
| 1.2.3. Fas ve TNF α reseptör aracılı apoptotik sinyalizasyon | 8 |
| 1.2.4. p53 | 9 |
| 1.2.5. Reseptör aracılı apoptoziste NF-kB nin rolü | 11 |
| 1.2.6. Kaspazlar | 12 |
| 1.2.7. Siklooksijenaz enzimi (cox) | 14 |
| 1.2.8. poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) | 15 |
| 1.2.9. Bad | 16 |
| 1.3. Kolorektal kanser | 16 |
| 1.3.1. Tümör biyomarkırları | 17 |
| 1.3.2. Kolorektal kanser biyomarkırları | 18 |
| 1.3.2.1. Doku temelli markırlar | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.2.2. Gaita temelli markırlar | 20 |
| 1.3.2.3. Serum temelli markırlar | 20 |
| 1.3.3. Kolon kanser tedavi yöntemleri | 21 |
| 1.3.3.1 Kullanılan ilaç kombinasyonları | 23 |
| 1.3.4. 5-Fluorourasil | 23 |
| 1.3.4.1. Etki mekanizması | 24 |
| 1.3.4.2. İnterferonlar | 25 |
| 1.3.5. Oksaliplatin (OX) | 26 |
| 1.3.5.1. Etki mekanizması | 27 |
| 1.3.6. Flavonoidler | 28 |
| 1.3.6.1. Başlıca Moleküler Mekanizma | 30 |
| 1.3.6.2. Flavonoidlerin antikarsinojenik etki mekanizması | 31 |
| 1.3.6.3. Rutin | 35 |
| 1.4. Amaç | 37 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 38 |
| 2.1. Gereç | 38 |
| 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 38 |
| 2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler | 38 |
| 2.1.3. Kullanılan Cihazlar | 39 |
| 2.2. Yöntem | 39 |
| 2.2.1. Caco-2 Hücre Kültürünün Hazırlanması | 39 |
| 2.2.2. MTT hücre canlılık testi | 40 |
| 2.2.3. Kaspaz 8 kolorimetrik analizi | 41 |
| 2.2.4. Kaspaz 9 kolorimetrik analizi | 42 |
| 2.2.5. İnflamasyon ve apoptozis belirteçleri analizi için hücre lizatı hazırlaması | 43 |
| 2.2.5.1. Sandwich ELISA yöntemi | 43 |
| 2.2.6. İnflamasyon belirteçleri analizi | 43 |
| 2.2.6.1. Test prosedürü | 44 |
| 2.2.7. Apoptozis belirteçleri analizi | 44 |
| 2.2.7.1. Test prosedürü | 45 |

| | |
|--|----|
| 2.2.7.2. Cox2 analizi | 45 |
| 2.2.8. DNA ladering | 46 |
| 2.2.8.1. Agaroz Jelin hazırlanışı | 46 |
| 2.2.9. İstatistik analiz | 46 |
| 3. BULGULAR | 47 |
| 3.1. Caco-2 Hücrelerinde sitotoksisite ve hücre canlılık testi | 47 |
| 3.1.1. 5-florourasilin Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkisi | 47 |
| 3.1.2. Oksaliplatinin Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkisi | 48 |
| 3.1.3. Rutinin Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkisi | 49 |
| 3.1.4. 5-florourasil ve Oksaliplatinin birlikte uygulamalarında Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkileri | 51 |
| 3.1.5. 5-florourasil ve Rutinin birlikte uygulamalarında Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkileri | 52 |
| 3.1.6. Oksaliplatin ve Rutinin birlikte uygulamalarında Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkileri | 53 |
| 3.1.7. 5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin birlikte uygulamalarında Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkileri | 54 |
| 3.2. Caco-2 hücrelerinde 5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin ayrı ve birlikte kullanımlarında inflamasyon belirteçlerine etkileri | 55 |
| 3.3. 5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin birlikte ve ayrı olarak Caco-2 hücrelerine 48 saatlik uygulama sonrası apoptozis belirteçlerine etkileri | 60 |
| 3.4. DNA laddering sonuçları | 66 |
| 4. TARTIŞMA | 68 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 77 |
| ÖZET | 79 |
| SUMMARY | 81 |
| KAYNAKLAR | 83 |

| | |
|-----------------|-----|
| EKLER | 109 |
| ÖZGEÇMİŞ | 125 |

ÖNSÖZ

Flavonoidlerin anti-oksidan, serbest radikal süpürücü aktiviteleri, anti-inflamatuar, anti-viral özellikle de anti-kanser özellikleri vardır ve çeşitli hücrel hedeflerle etkileşimde bulunarak insan sağlığını olumlu yönde etkilerler. Diyete doğal veya sentetik maddelerin eklenmesi ve diyet değişikliği ile kanserin önlenmesi günümüzde önemli bir konu haline gelmiştir.

Rutin (quersetin rutinosid) flavonoid quersetinin bir glikozididir. Rutin diyetinde büyük oranda mevcuttur ve çeşitli hastalıkların tedavisinde ampirik olarak kullanılmaktadır. Rutin, fenolik bir antioksidandır ve süperoksit radikallerini süpürdüğü ispatlanmıştır. Rutin, demir katyonları gibi metal iyonlarıyla şelat oluşturabilir. Rutinin in vivo antioksidan aktivitesi, ileri sindirim aşamasında oluşan metaboliti ve aynı zamanda ağırlıklı olan quersetinden ileri gelmektedir. Polifenolik bileşikler kanser gelişimi sırasında bozulmuş olan süreçleri etkileyerek biyolojik faaliyetlerde dikkate değer bir spektrum açığa çıkarırlar. Bu supresyon, blokaj ve transformasyonu içeren çeşitli yollarla kontrol edilebilir. Bu nedenlerle sağlığa yararlı etkileri olabilir ve kansere karşı kemopreventif veya terapotik ajan olarak değerlendirilebilirler .

Bu çalışmada, farklı kanser hücrelerinde etkinliği bildirilen, sağlıklı hücrelerde düşük toksik etkinliği olan Rutin flavonoid molekülünün, kolorektal kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisi, sitotoksitesi, apoptozis ve inflamasyon belirteçleri üzerine etkinliği araştırılmıştır. Çalışma ile rutin molekülünün selektif etkinliği ile oksaliplatin ve 5-Florourasil kemorepötik ajanlar ile birlikte kullanım (kemosensitizasyon) etkinliği tartışılmıştır.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalında doktora eğitimi yapma olanağı sağlayan Sayın Prof. Dr. Hilal KARAGÜL'e ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Arif ALTINTAŞ'a desteklerinden dolayı teşekkür eder, saygılar sunarım. Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana her türlü desteği sağlayan Biyokimya Anabilim Dalının saygıdeğer öğretim üyelerine, tez izleme komitesi üyelerine, katkılarını ve

yardımlarını her daim hissettiren Doç. Dr. Görkem KISMALI'ya, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma, hayatımın her aşamasında sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen, eşlerini, benzerlerini bulamayacağım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 13L3338008.

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------------|--|
| 5-FU | 5-florourasil |
| ACS | American Cancer Society |
| ADP | Adenozin difosfat |
| AFB1 | Alfatoksin B1 |
| AICR | American Institute for Cancer Research |
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| AMPK | 5' AMP-activated protein kinase |
| Apaf | Apoptotic protease activating factor |
| APC | Adenomatöz Polipozis Koli |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATM | Ataksi telenjipektazi hastalık geni |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| BAX | Bcl-2-associated X protein |
| BCL-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BMI-1 | Polycomb ring finger oncogene |
| CapeOx | Capecitabine ve Oksaliptatin |
| CDK | Siklin bağımlı kinaz |
| CEA | Karsinoembriyonik antijen |
| CH ₂ THF | 5,10-Methylenetetrahydrofolate |
| CO ₂ | Karbondioksit |
| COX | Sikloksijenaz enzimi |
| CrmA | Sitokin yanıt değiştirici A |
| dATP | Deoksi-ATP |
| DHFU | Dihidroflorourasil |
| DISK | Ölüm indükleyici sinyalizasyon kompleksi |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribonukleik Asit |
| DPD | Dihidroprimidin dehidrogenaz |

| | |
|-------------------|--|
| dTMP | Deoksitimidin monofosfat |
| dUMP | Deoksiuridin monofosfat |
| EDTA | Etilen diamin tetra asetik asit |
| ELIZA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent |
| FADD | Fas-Associated Protein with Death Domain |
| FBS | Fetal borine Serum |
| FdUMP | Monofosfat florodeoksiüridin |
| FOBT | Dışkıda gizli kan testi |
| GSH | Reduced Glutathione |
| GST | Glutation S-transferaz |
| GT | Glutasyon transferaz |
| H | Hidrojen |
| HIV | İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| HTLV-I | İnsan T hücre lösemi virüsü |
| IAP | Apoptoz inhibitörü |
| IC50 | half maximal inhibitory concentration |
| IFN-A/BR | Interferon-alpha/beta receptor |
| IFN-g | Interferon gamma |
| IFN- α | Interferon-alpha |
| IFNs | İnterferonlar |
| IL-18 | Interleukin-18 |
| Kas 8 | Kaspaz 8 |
| Kas 9 | Kaspaz 9 |
| LC _{50s} | Lethal Concentration |
| LV | Mitojenle aktive protein kinaz |
| MAPK | Mitojenle aktive protein kinaz |
| MDM2 | Mouse double minute 2 homolog |
| mg/ml | miligram per mililitre |
| Min/Max | Min/Max |
| MMPs | Matriks metalloproteazlar |
| NAD ⁺ | Nikotinamid adenin dinükleotid |

| | |
|------------------|--|
| NF-KB | Nükleer faktör- kappa B |
| NGF | Nerve Growth Factor |
| nm | Nanometre |
| NNK | Nicotine-derived nitrosamine ketone |
| NSAID | Non steroidal antiinflamatuvar ilaçlar |
| OX | Oksaliplatin |
| PARP | Poly ADP-ribose polymerase |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| Phospho-SAPK/JNK | Phospho-Stress-activated protein kinase/c-Jun NH(2)-terminal kinase |
| PI3K/AKT | Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B |
| R | Rutin |
| RNA | Ribonükleik asit |
| ROS | Reaktif oksijen türleri |
| SDS | Sodyum Dodesil Sulfat |
| TBE | Tris-borate-EDTA |
| TGFβ | Transforming growth factor beta |
| TIMP-1 | Tissue inhibitor of metalloproteinases |
| TNF | Tümör nekrozu faktörü |
| TNFR1 | Tumor necrosis factor receptor I |
| TNFα | Tümör Nekroz Factor Alfa |
| TPA | Tissue polipeptide antigen |
| TPS | Tissue polipeptide specific antigen |
| TRADD | TNFR adaptör protein with a death domain |
| TS | Timidilat sentaz |
| TSP-1 | Trombospondin-1 |
| UDP | Uridine diphosphate |
| WCRF | World cancer research fund |
| μM | MikroMolar |
| °C | Santigrat derece |

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. Kanser hücresi | 2 |
| Şekil 1.2. Benign ve malign tümör hücre tipleri | 3 |
| Şekil 1.3. Kanser gelişimi ve ilerlemesinin üç evresi | 4 |
| Şekil 1.4. Apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik yolakları | 7 |
| Şekil 1.5. p53 tarafından apoptozis aktivasyonu | 10 |
| Şekil 1.6. 5-florourasil ve Kimyasal yapısı | 23 |
| Şekil 1.7. Oksaliplatin ve Kimyasal yapısı | 26 |
| Şekil 1.8. Flavonoidlerin temel yapısı | 29 |
| Şekil 1.9. Flavonoid kaynaklı hücre ölümünün muhtemel Mekanizması | 30 |
| Şekil 1.10. Rutin ve Kimyasal yapısı | 36 |
| Şekil 2.1. Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA analiz kiti | 44 |
| Şekil 3.1. 5-florourasil uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları | 47 |
| Şekil 3.2. Oksaliplatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları | 48 |
| Şekil 3.3. Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları | 50 |
| Şekil 3.4. 5-florourasil ve Oksaliplatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları | 51 |
| Şekil 3.5. 5-florourasil ve Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları | 52 |
| Şekil 3.6. Oksaliplatin ve Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları | 53 |
| Şekil 3.7. 5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) Sonuçları | 54 |

| | |
|---|----|
| Şekil 3.8. NFκB p65 düzeyleri | 55 |
| Şekil 3.9. Phospho-NFκB p65 düzeyleri | 56 |
| Şekil 3.10. Phospho-SAPK/JNK düzeyleri | 57 |
| Şekil 3.11. Phospho-p38 düzeyleri | 57 |
| Şekil 3.12. Phospho-Stat3 düzeyleri | 58 |
| Şekil 3.13. Phospho-IκB-α düzeyleri | 59 |
| Şekil 3.14. COX-2 düzeyleri | 60 |
| Şekil 3.15. Oksaliplatin, 5-florourasil ve Rutinin ayrı ayrı ve birlikte uygulanan Caco-2 hücre grubunda kaspaz 8 aktiviteleri | 61 |
| Şekil 3.16. Oksaliplatin, 5-florourasil ve Rutinin ayrı ayrı ve birlikte uygulanan Caco-2 hücre grubunda kaspaz 9 aktiviteleri | 61 |
| Şekil 3.17. Cleaved Caspase3 düzeyleri | 62 |
| Şekil 3.18. p53 düzeyleri | 63 |
| Şekil 3.19. Phospho-p53 düzeyleri | 64 |
| Şekil 3.20. Bad düzeyleri | 64 |
| Şekil 3.21. Phospho-Bad düzeyleri | 65 |
| Şekil 3.22. Cleaved PARP düzeyleri | 66 |
| Şekil 3.23. DNA laddering | 66 |

ÇİZELGELER

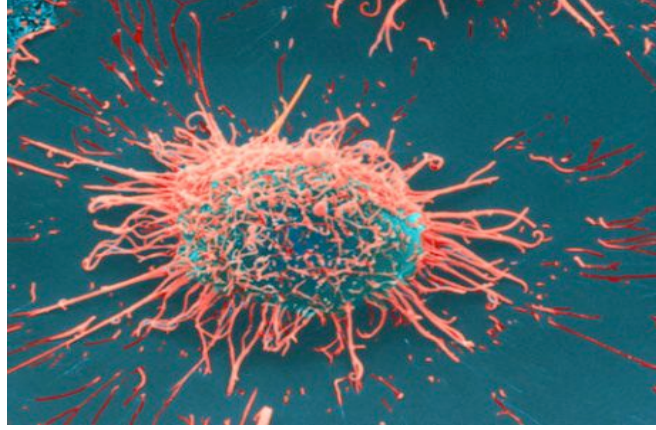
| | |
|---|----|
| Çizelge 1.1. Çeşitli kanser hücre kültürlerinde flavonoidlerin antikanser aktiviteleri | 34 |
| Çizelge 2.1. Kaspaz-8 Analiz Tablosu | 42 |
| Çizelge 2.2. Kaspaz-9 Analiz Tablosu | 42 |

1. GİRİŞ

Kanser, DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalıp büyümesidir. Sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının, normal olarak gerçekleşen hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu gerçekleşir. Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda bölünürler ve yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki sonuçta hücreler devamlı birikir. Bu dengesizlik hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanır (Nunn ve ark., 2006).

Her hücre hayatı boyunca belli bir sayıda bölünebilir. Sağlıklı bir hücre ne zaman ve nerede bölünebileceğini bilmesine karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Tümörler, kanser hücrelerin toplanması sonucu oluşurlar, normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Kanser hücreleri oluşturdukları tümörden ayrılıp, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılmasına metastaz denir. Kanserin esas nedeni hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonunun hatalı olması sonucu hücrelerin farklılaşmasıdır. DNA replikasyon anomalisine sebep olduğu sanılan birçok faktör mevcuttur ve bunlara hazırlayıcı faktörler denir. Doku tamiri ve yenilenmesini hızlandıran tüm etkenler aslında bir kanser hazırlayıcısı olabilir. Kanseler oluşmaya başladıkları organ ve görünüşlerine göre sınıflandırılırlar (Pitot ve ark., 2004).

Kanser her yaşta ortaya çıkabilir fakat genellikle bir yaşlılık hastalığı olarak kabul edilir. En yaygın kanser türleri ortalama olarak 67 yaş civarında ortaya çıkmaktadır. Çocukluk çağında kanser oluşumu görece olarak az olmasına rağmen, lösemiler en yaygın ölüm sebebidir. Bunun yanı sıra osteosarkoma, lenfoma, Wilms tümörü gibi başka kanserler de görülür (Ruddon, 2007).



Şekil 1.1. Kanser hücresi (<http://www.sciencephoto.com>)

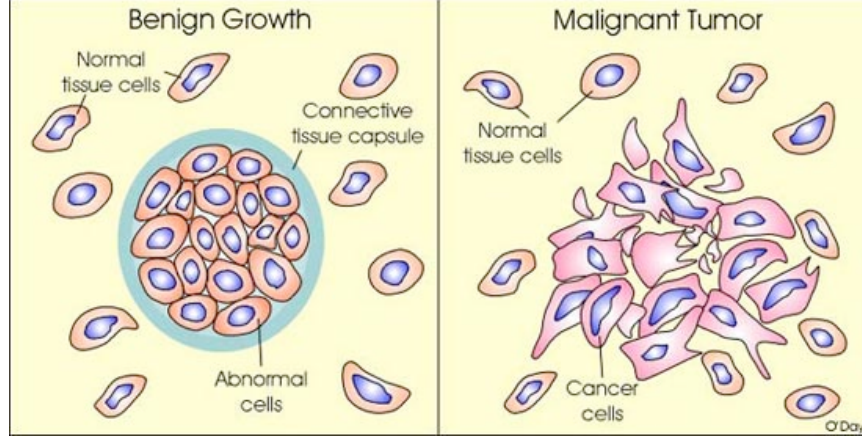
1.1 Malign ve benign tümörler

Hücreler gerek olmadığı halde bölünüp, çoğalırlarsa o bölgede bir doku kitlesi oluşur. Fazladan oluşan bu kitle ‘tümör’ olarak adlandırılır. Bu kitleler benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilirler (Nunn ve ark., 2006).

Benign tümörler, komşu dokulara ve vücudun diğer organlarına yayılmazlar. Oldukça yaygın olarak gözlenen siğil ve benler benign tümörlere örnektir. Benign tümörler genelde vücuttan çıkarılabilirler ve nadiren zararlı olabilirler. Fakat bazı benign tümörler prekanseröz olarak tanımlanırlar (National Cancer Institute (U.S.), 2006).

Polip, benign bir tümördür. Kolon veya rektum duvarında oluşabilir. Kolon ve rektumdaki bu polipler ileride kansere dönüşebilme olasılıkları nedeniyle çıkartılmalıdırlar (Nunn ve ark., 2006).

Malign tümörler kanser olarak adlandırılırlar. Bu tümörler komşu doku ve organlara sıçrayıp, onlara zarar verebilirler. Kanser hücreleri kanserli dokudan koparak kana karışabilirler veya lenf yollarına girebilirler. Kanser yayılması ve vücudun diğer bölgelerinde tümör oluşması bu yolla olur. Kanser yayılması ve yayılması “metastaz” olarak adlandırılır (Nunn ve ark., 2006).

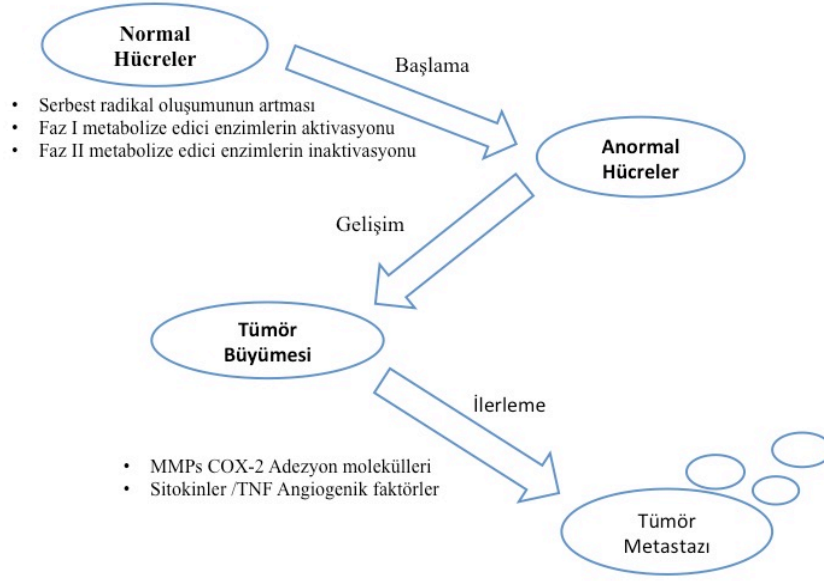


Şekil 1.2. Benign ve malign tümör hücre tipleri. (<http://www.utm.utoronto.ca>)

Kanser vücudun diğer bir bölgesine yayıldığında, o bölgede yayıldığı yerdeki türden bir tümör oluştururlar ve aynı adla anılırlar. Örneğin bağırsak kanserleri, karaciğere yayıldığında karaciğerde oluşan tümör kolorektal kanser hücrelerinden oluşmuştur. Bu durum “metastatik kolorektal kanser” veya “karaciğere metastaz yapmış kolorektal kanser” olarak adlandırılır. “Karaciğer kanseri” olarak adlandırılmaz (National Cancer Institute (U.S.), 2006).

Karsinogenezis genellikle farklı moleküler ve hüresel değişikliklerin ortaya çıktığı karmaşık ve çok aşamalı bir süreç olarak kabul edilir. Kemoprevensiyon ve kemoterapinin farklı olası seçeneklerini basitleştirmek için kanser gelişimi ve ilerlemesi üç evre olarak tanımlanmıştır (Pitot ve ark., 2004) :

- (i) İnisiyasyon (başlama) hızlı bir aşamadır, hücrenin özellikle de DNA'nın karsinojenik ajana maruz kalmasıyla oluşur.
- (ii) Promotion (gelişim) önceki aşamaya oranla daha uzundur, anormal hücreler devamlılık gösterdiğinde çoğalırlar ve preneoplastik hücre odağına sebep olabilirler.
- (iii) Progresyon (ilerleme) evresi tümör oluşumunun son aşamasıdır, premalign hücreler invazivlik metastaz potansiyelindeki artış ve yeni kan damarlarının oluşumu kapsayan aşamalarla neoplastik hücrelere dönüşürler.



Şekil 1.3. Kanser gelişimi ve ilerlemesinin üç evresi (Pitot ve ark., 2004)

1.2. Apoptozis

Apoptozis, embriyo döneminden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda izlenen programlı hücre ölümüdür. İnsan embriyosunda el ve ayak oluşurken parmaklar arasındaki bölgelerdeki hücreler erişkin parmak şeklini almak için yoğun apoptoza gider. Bu programlanmış hücre ölümü oldukça hassas yürütülür örneğin, nematodlardan *Caenorhabditis elegans* gelişiminde iyi düzenlenmiş genetik program sonucu tam olarak 131 hücre ölür (Hengartner ve Horvitz, 1994).

Apoptozis ayrıca hücre popülasyonunun korunmasında mitozun tersi bir role sahiptir. Doku homeostazını sağlamak için bir yetişkinde günde 10^{11} hücre ölür ve bir insanın tipik olarak bir yılda kaybettiği hücre kütlelerinin neredeyse bütün vücut ağırlığına eşdeğer olduğu tahmin edilmektedir. Bu hücre ölümleri doku yenilenmesi ve stres yanıtı gibi dinamik süreçlerde önemli rol oynamaktadır (Alberts ve ark., 2008). Apoptozis ayrıca, virüsle enfekte hücreler, yabancı hücreler ve başlangıç aşamasındaki neoplazileri lizise yönlendirilerek koruyucu bir mekanizma sağlar. Aşırı hücre ölümü AIDS, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar ile miyokard enfarktüsü gibi iskemik hastalıklara katkı sağlayabilir. Çok az hücre

ölümünün olması kansere, viral enfeksiyonların kalıcı hale gelmesine veya otoimmün bozukluklara neden olabilir (Judie ve ark., 2003).

Apoptozis immün sistemde merkezi bir role sahiptir. Fizyolojik koşullar altında, immature lenfositler otoantijenlere bağlanarak apoptozisle elemine edilirler ve bu durumun kendini immün yanıtı karşı koruması olduğu düşünülmektedir. Bu lenfositlerin ortadan kaldırılmasındaki bozukluklar otoimmüniteye yatkınlık yaratır. Timositlerde apoptoz, T hücrelerinin timusta gelişirken antijenlerle reaksiyona girerek oluşturduğu self reaktif klonların elemine edilmesiyle ilişkilidir. Fas ve fas ligandı ile tümör nekroz faktör (TNF) ailesindeki hücrelerin hücre yüzeyi molekülleri, bağışıklık reaksiyonlarının baskılanması yanında T hücre aracılı sitotoksiteden de sorumludur. Fas sistem bozuklukları, lenfoproliferatif bozukluklar ve otoimmün hastalıkların gelişimine katkı sağlar (Murphy ve Kenneth, 2012).

1.2.1. Apoptozis Mekanizmaları

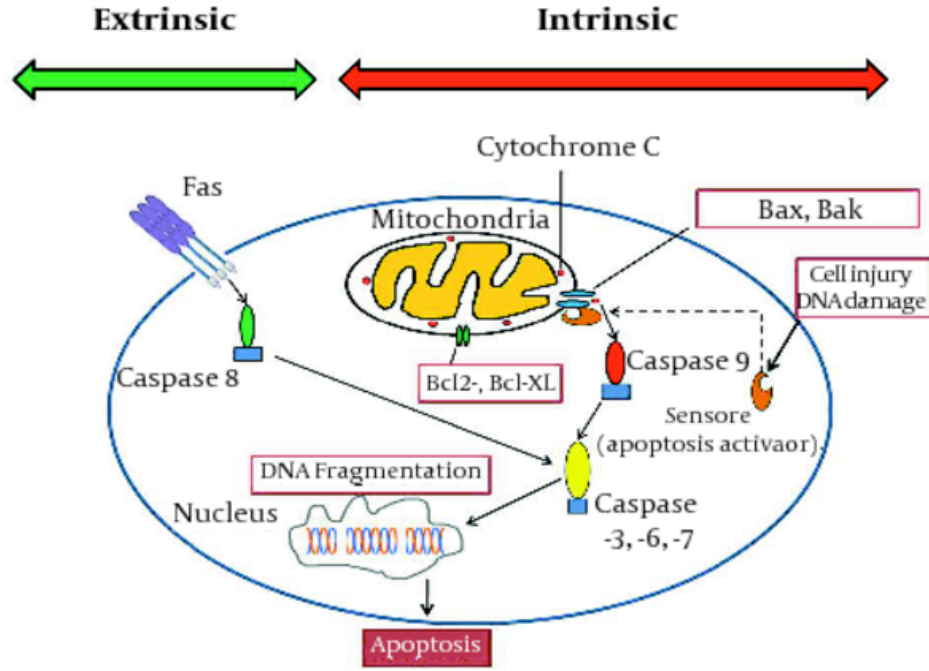
Apoptozis sıkı bir şekilde düzenlenmiş ve birçok faktörü içeren etkili bir hücre ölüm programıdır. Her hücre ölümü veya hayatta kalmasını sağlayan intrinsik bir mekanizma sinyalleri içerir. Bu sinyallerdeki herhangi bir dengesizlik apoptoza neden olabilir. Kaspazlar apoptotik mekanizmada merkezi ve büyük bir rol oynar. Kaspaz terimi sistein bağımlı aspartata özgü proteazlardan türetilmiştir. Kaspazların aktive olması üç yolla gerçekleşir (Hassen ve ark., 2012). Bunlar; intrinsik veya mitokondrial yolak; ekstrinsik veya ölüm reseptörleri bağımlı yolak ve intrinsik endoplazmik retikulum yolağıdır. İntrinsik ve ekstrinsik yolaklar apoptozisin genel olarak yürütülmesini sağlarlar (Rebecca, 2011).

1.2.1.1. İntrensik yolak

Hipoksi, genetik hasar, sitozolik kalsiyum iyonlarının yüksek konsantrasyonu, aşırı oksidatif stres gibi faktörler mitokondrial yolağın başlamasına neden olan mitokondrial geçirgenlikte artışa neden olurlar. Apoptotik uyarım sitokrom C gibi apoptojenik faktörlerin mitokondrial intermembrandan sitozole salınımını tetikler. Bu yolak hücre içinde başlatılır ve Bcl-2 ailesine ait protein grubu tarafından düzenlenir. Yolağı düzenleyen iki grup Bcl-ailesi proteinleri (pro-apoptotik ve anti-apoptotik) bulunur. Proapoptotik proteinler; Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Hrk; antiapoptotik proteinler ise; Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1'dir. Proapoptotik protein mitokondriden sitokrom C salınımını teşvik eder, antiapoptotik proteinler ise sitokrom C salınımını bloke eder. Apoptozisin başlaması pro ve antiapoptotik proteinler arasındaki dengeye bağlıdır (Rebecca, 2011; Rahman ve ark., 2012).

1.2.1.2. Ekstrinsik yolak

Bu yolak spesifik ligandlarla bağlanma sonrasında "ölüm reseptörleri" denilen apoptotik sinyallerin nakledilmesini sağlayan hücre yüzeyi reseptörlerinin aktivasyonu aracılığıyla etkisini gösterir. En iyi bilinen ölüm reseptörleri TNFR1 (tümör nekrozis faktör reseptörü 1) ilişkili proteinlerden Fas ve ligandları (TNF ve Fas ligandı) dır. Bu ölüm reseptörlerinin adaptör proteinleri kuvvetlendirdiği bir intrasellüler ölüm alanı vardır. Bunlar, TNF reseptör bağlantılı ölüm domaini (TRADD), Fas bağlantılı ölüm domaini (FADD) ve kaspaz 8 gibi sistein proteazlarıdır. Ölüm ligandı ölüm reseptörüne bağlandığında bir adaptör protein için bağlanma bölgesi oluşturur. Ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi ölüm indükleyici sinyalizasyon kompleksi (DISC) olarak bilinir. DISC kompleksi başlatır ve pro kaspaz 8 i aktive eder. Aktive kaspaz 8 daha sonra hücre ölümüne neden olan spesifik substratlara kadar metabolize olur (Rebecca, 2011).



Şekil 1.4. Apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik yolları (Dabbagh ve Rajaei, 2013)

1.2.1.3. Genel (ortak) yolak

Bu yolak bir dizi kaspaz aktivasyonu içermektedir. Başlangıç kaspazları intrinsik yolak için kaspaz 9; ekstrinsik yolak için ise kaspaz 8 dir. İntrinsik ve ekstrinsik yolak kaspaz 3 de birleşir. Daha sonra kaspaz 3 nükleer apoptozdan sorumlu olan kaspaz aktif deoksiribonükleaz inhibitörünü oluşturmak için bölünür. Bu metabolize kaspazlar protein kinazlar, sitoskeletal proteinler, DNA tamir proteinleri ve endonükleaz ailesinin inhibitör alt birimlerinin bölünmesini uyarırlar. Tüm bu etkenler apoptozdaki morfolojik değişimlere neden olur (Martinvaleet ve ark., 2005; Rebecca, 2011).

1.2.2. Apoptotik sinyal indükleyicileri

Çok sayıda çevresel faktör hücre intiharını aktive edebilir. Apoptozis aktivatörleri tümör nekrozis faktör α (TNF α), Fas ligand (FasL), tümör büyüme faktörü β (TGF β),

Bax (ve diğer proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri) ve glikokortikoidlerdir. Ayrıca, anormal onkogen ekspresyonu (c-myc gibi) yada normal tümör supresor gen fonksiyonu (p53 gibi) belirli koşullar altında apoptozu tetikleyebilir. Birçok durumda büyüme stimülasyonu ve supresyonu için üretilen sinyallerin çakışması apoptozu tetikler. Çoğu büyüme faktörü hedef hücreleri üzerinde açıkça antiapoptotik sinyal oluştururlar. Sitokinler intrasellüler sinyal kaskadını uyaran reseptörler vasıtasıyla canlılığı regüle eder. Son çalışmalarda, bazı tür hücre kayıplarının kritik büyüme faktörlerinde mutasyona neden olduğu; ancak bu durumun büyüme faktöründen yoksun hücrelerde jenerik antiapoptotik faktör Bcl-2 over ekspresyonu yoluyla büyük ölçüde önlenemediği ortaya çıkarılmıştır. Bu gibi sonuçlar canlı öncü hücreler için büyüme faktörlerinin apoptozisin baskılanmasında önemli bir fonksiyonu olduğunu ve farklılaşma yollarının temsil edilebilirliğini ortaya koymuştur. Bu anlamda, büyüme faktörleri soya özel her farklılaşma ile daha az ilgili olabilir. Güçlü bir şekilde apoptozisi suprese eden intrasellüler (nonsitokin) faktörler arasında, CD40 ligandı, adenovirus E1B geni gibi viral genler, baculovirus p35 ve Bcl-2 ailesindeki antiapoptotik genler gösterilmiştir. DNA viruslerinin büyük bir kısmının hücresel apoptotik yanıtı azaltan faktörleri kodladığı ortaya konmuştur (başarılı viral enfeksiyon/yayılma için bir önkoşul). FasL ve TNF içeren birkaç apoptotik faktör immun sistem gelişim ve düzenlenmesi ile sınırlandırılmış apoptozisi uyarır (Cory ve Adams, 2002; Zeiss, 2003).

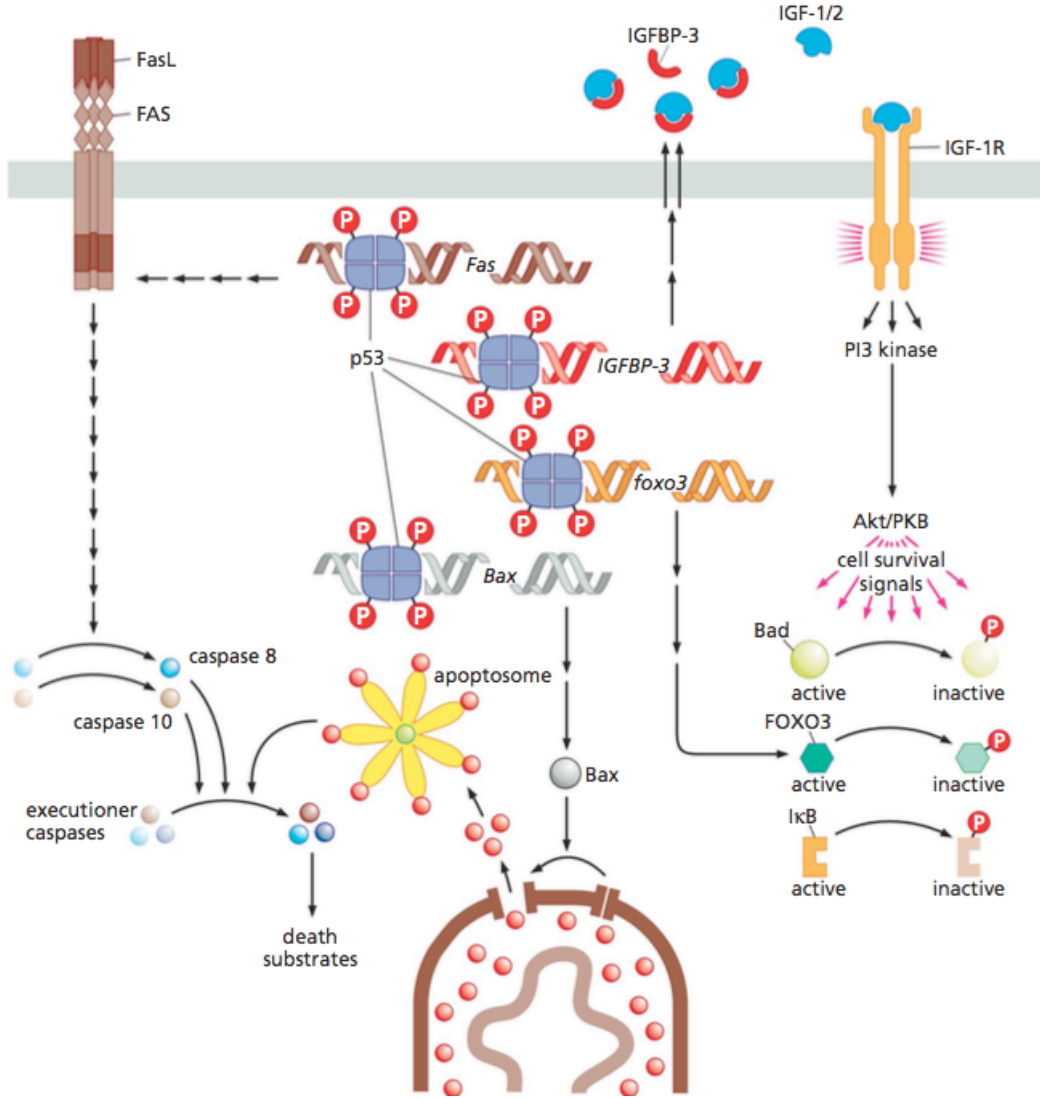
1.2.3. Fas ve TNF α reseptör aracılı apoptotik sinyalizasyon

Fas reseptörü (CD95), tümör nekrozis faktör (TNF) ve nerv büyüme faktörü (NGF) aynı reseptör ailesi içindedirler ve hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre ölümünü ilgili sinyal yolları kullanarak düzenlerler. T hücre bağlantılı toksisitede kritik rol oynayan CD95 (Fas/Apo-1) ve bir p55 TNF reseptörü olan CD120a en çok çalışılmış örneklerdir (Salvesen and Dixit, 1997). Fas hücre yüzeyinde bir ligand (FasL) için bir reseptör olarak görev yapar ve FasL nin Fas reseptörüne bağlanması hedef hücrelerde apoptozu tetikler. Fas, aktive edilmiş matur lenfositlerden ve HIV veya insan T hücre lösemi virusu (HTLV-I) ile tranforme edilmiş lenfositlerden bol

miktarda eksprese edilir; buna ek olarak bazı tümör hücrelerinden de Fas ekspresyonu söz konusudur. Fas apoptozis yolunda, istenmeyen aktive edilmiş lenfositler veya virusla enfekte hücrelerin eliminasyonun da rol oynar (Chen ve Goeddel, 2002; Wajant, 2002).

1.2.4. p53

p53 proteini bir nükleer fosfoprotein olup, hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptozis düzenlenmesi olan iki önemli proses de görev alır. p53 proteinleri viral veya sellüler onkogenler tarafından inhibe edilir veya transformasyonu azalır, p53 tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılır. Ayrıca, p53 mutasyon veya delesyonları insan tümörlerinde en sık karşılaşılan genetik anormalliklerdir. İnsan kanserlerinin %50 kadarı delesyona uğramış veya mutasyon geçirmiş p53 geni içerir, bu durum colon kanserlerinin %80 inde, akciğer kanserlerinin %50 sinde ve meme kanserlerinin %40 inda görülür. İnsanlarda karşılaşılan birçok p53 mutasyonu belirlenmiştir; birçok mutant DNA ya bağlanma yeteneğini kaybeder ve böylece transaktivasyonda başarısız olur. Wild tip ve mutant p53 mik kompleksleri p53 bölgesine bağlanmada başarısızdır, mutant p53 proteinleri negatif dominant etkili olarak hareket eder. Bu kavram ile uyumlu olarak, bazı neoplastik transform hücrelerin p53 mutant formlarının endojen wild tip p53 fonksiyonunu engellediği düşünülür (Takaoka ve Hayakawa, 2003; Boehm, 2006).



Şekil 1.5. p53 tarafından apoptozis aktivasyonu (Weinberg, 2007)

p53 ile transkripsiyonel olarak aktive edilmiş önemli hedef genlerden biri siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü; p21^{Cip/Waf1} 'dir. p53 proteini hücre hasarına bağlı olarak p21 düzeylerinde bir artışa neden olur. Kapsamlı araştırmalar DNA hasarının p53 aktivasyonuna neden olması gibi bağlantılı stres yolları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu konu ile ilgili birçok kinaz vardır (p53 bozulmasını module eden MDM2 onkoprotein ile ataksi telenjiyektazi hastalık geni (ATM) ürünü). MDM2, p16/INK4a lokusundaki alternatif bir okuma çerçevesinde kodlanan bir protein ile interaksyonu vasıtasıyla regüle edilir. p53 DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsü durdurumunu module ettiği halde, p53 geni hücre büyümesi ve farklılaşması için büyük ölçüde zorunlu değildir (Surget ve ark., 2003).

p53 proteininin apoptoziste kritik bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu durum ilk olarak sıcaklığa duyarlı p53 mutanları miyeloid lösemi hücre kültürüne eklendiğinde sıcaklığa bağlı olarak masif apoptozun tetiklenmesi ile gösterilmiştir (Yonish-Rouach ve ark., 1991). Genetik olarak tanımlanmış hücre hatlarında p53 kaybının birçok kemoterapötik ajan vasıtasıyla oluşturulan apoptozun tetiklenmesine önemli bir direnç sağlandığı kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, insanlarda klinik veriler tümör tiplerinin geniş bir yelpazesinde p53 kaybının kötüleşmiş prognoza işaret ettiğini göstermektedir (Boehm, 2006).

p53 ün önemli bir özelliği, alternatif olarak hücre döngüsünü durdurması veya apoptozisi indükleme yeteneğinin olmasıdır. Büyük oranda fibroblastlara dayalı hücre kültürü çalışmalarında, p53 ün primer hücre kültürlerinde hücre siklusunun durmasını, ancak onkogen tranforme hücrelerde ise apoptozisi tetiklediği görülmüştür. Kanser hücrelerinde p53 tarafından sağlanan DNA hasarını apoptotik sinyale çevrilen terapötik indeks duruma bağlı indüksiyonla apoptoza neden olabilir, fakat normal hücrelerde bu sinyal apoptoz yerine siklus durdurucu sinyale çevrilir. Kanser tedavileri vücutta hasarlar oluşturabilir, fakat p53 terapileri sadece kanser hücrelerinde apoptozisi tetikleyerek tedaviyi sağlayabilmektedir (Fisher, 1994). Büyük çalışmalar p53 ün apoptotik aktivitesinin altında yatan mekanizmalar konusunda kalsa da, bu yolağın daha iyi anlaşılması dirençli kanserler (genellikle p53 eksikliği nedeniyle) için tedavi seçeneklerinin geliştirilmesini sağlayabilecektir (Mraz ve ark., 2009).

1.2.5. Reseptör aracılı apoptoziste NF-κB nin rolü

Nükleer faktör-κB (NF-κB) ilk olarak immunglobulin kappa hafif zincir geni enhancer elemanına (κB bölgesi) spesifik olarak bağlanmış bir protein olarak keşfedilmiştir. NF-κB protein ailesinin başlıca üyeleri RelA (p65), c-Rel ve p50 dir, bunlar immun yanıt (Ilg hafif zinciri, IL-2 ve IL-2a), bazı viruslar (HIV-LTR, SV40, sitomegalovirus ve adenovirus) ile yangı ve akut faz cevapta (interlökin1 (IL-1), IL-6

ve serum amiloid A proteini) rol oynayan çeşitli genlerin düzenlenmesinden sorumludur (Basseres ve ark., 2006).

NF- κ B nin apoptotik rolü Baltimore ve arkadaşları (1996) tarafından ileri sürülmüştür. RelA (p65) knockout farelerde masif karaciğer hücre apoptozisi vasıtasıyla sergilenen embriyonik ölüm, RelA nın antiapoptotik rolünü düşündürmüştür. Buna ek olarak, TNF α nın NF- κ B aktivasyonuna yol açması arttırılmış apoptozisle ilişkilendirilmiştir. Bu durumda, apoptotik yanıtı hafifleten bir durum olduğunda NF- κ B aktivasyonuna rağmen apoptozis gerçekleşir. NF- κ B nin TNF- α sinyalizasyon ve anti-immunglobulin M (antiIgM) veya TGFb aracılı apoptoziside içeren birçok senaryoda hücreleri apoptozisten koruduğu gösterilmiştir. TNF α tarafından öldürülme kapasitesi, bir dominant NF- κ B inhibitör mutantı I κ B-a nın hücelere yerleştirilmesiyle ve endojen NF- κ B aktivasyonunun önlenmesiyle büyük ölçüde arttırılabilir, ayrıca wild tip NF- κ B tanıtılması TNF α tarafından başlatılan apoptozisi engeller (Baldwin, 2001).

Tüm bu bulgular antikanser tedavilerin geliştirilmesi için stratejiler sunmaktadır. NF- κ B aktive edicisi olduğunda antikanser ajanın etkinliği azalabilmesi nedeniyle, bir apoptoz tetikleyici varlığında NF- κ B inhibitör kombinasyonlarının benimsenmesi etkili olabilmektedir. Glikokortikoidler, antioksidanlar ve doğal veya sentetik olarak geliştirilmiş NF- κ B aktivasyon inhibitörlerinin aktivasyonu TNF α ile kombine halde kullanıldığında kanser hücrelerinin öldürülmesinde daha etkili olabilmektedir. Hala, kanser terapisinde seçici bir şekilde normal hücreler yerine kanser hücrelerinde güçlendirilmiş apoptozisin ortaya çıkarılması gerekliliği büyük önem taşımaktadır (Puvvada ve ark., 2010).

1.2.6. Kaspazlar

Kaspazlar (sistein aspartat-spesifik proteinazlar) aktif bölgelerinde sistein içeren proteinaz ailesidir. Bunlar, memeli interlökin dönüştürücü enzim (ICE/kaspaz-1) ve nematod apoptotik gen ürünü olan Ced-3 ile ilişkilendirilmişlerdir (Salvesen ve Dixit, 1997; Roy ve Cardone, 2002).

İlk kaspazın 1993 te keşfinden bu yana insanlarda birçok kaspaz tespit edilmiştir. Tüm bu enzimler substratları sadece C terminalden aspartik aside parçalar ve substrat özelliklerine göre alt sınıflandırmalarına da ayrılabilen temel üç gruba sınıflandırılırlar. Bu proteazların programlanmış hücre ölümünün yürütülmesinde kritik rol oynadığı kaspaz 3 knockout fareler tarafından çoğunda inrauterin ölümün gerçekleşmesiyle örneklenmiştir. Hayatta kalan fareler de ise normal gelişim sırasında apoptoza uğramaması sonucu varolan fazla ve ektopik hücre kütlelerinin nedeniyle beyin hacmi normalin iki katı büyüklüğe ulaşmıştır. Şaşırtıcı bir şekilde bu etkilerin büyük ölçüde beyinle sınırlı kalması, kaspaz-3 ün neuronal apoptozis düzenlenmesinde dominant olduğunu düşündürmektedir. Benzer bir durum kaspaz-9 knockout farelerde de görülmüştür. Kaspaz-9 eksikliği olan farelerde ise beyin gelişimi sırasındaki yetersiz apoptoza bağlı olarak genişlemiş ve deforme olmuş cerebra nedeniyle ölüm gerçekleşmiştir (Yoshida ve ark., 1998). Beklendiği gibi Kaspaz-1 eksikliği olan fareler mature IL-1b üretemez, ancak başka bir büyük gelişim anormalliği sergilemezler; bu durum ise apoptotik yollarda çok önemli olmayan gelişimsel rolü olduğunu göstermektedir. Poli-ADP riboz polimeraz da dahil olmak üzere çok sayıda kaspaz substratı tespit edilmiştir (genellikle kaspaz aktivitesi için marker olarak kullanılırlar). Herhangi tek bir substrat bölünmesinin ölümcül olabileceği veya hücre ölümünün tüm bölünmeler sonucu olup olmadığı henüz belirsizdir.

Son yıllarda kaspaz inhibitörlerinin analizi ve geliştirilmesinde çok ilerleme kaydedilmiştir (Nicholson ve Thornberry, 2000). Parçalanmayan peptid yapılı pseudosubstratlar medikal kimya için kuvvetli deneysel reaktifler ve öncü bileşikler olarak görev alırlar. Kaspaz inhibisyonu aynı zamanda virus tarafından istila edilmiş enfekte hücrenin intihar yoluyla imhası için önemli stratejilerden biridir (endonükleolitik DNA degradasyonu ile ilişkili olarak). Sitokin yanıt değiştiricisi A (CrmA) ve konakçı hücrelerde apoptozu engeller, kaspaz 1 ve kaspaz 8 için güçlü; kaspaz 3 için ise zayıf bir inhibitördür. Bakulovirus proteini olan p35 ise kaspaz inhibisyonu yoluyla apoptozu azaltır. p35 kaspazları inhibe eder, neredeyse tüm kaspaz aktivitesini ortadan kaldıracak yeteneğe sahiptir. Bununla birlikte, p53 proteinin memelilerde olan bir muadili tespit edilmemiştir. Memelilerdeki endojen kaspaz inhibitörleri; kuvvetli kaspaz-3 ve kaspaz-7 inhibitörleri olan IAP (apoptoz

inhibitörleri) ailesine ait polipeptidlerdir. En zor ve en önemli sorular kaspaz aktivasyonuna yol açarak apoptozun düzenlenmesini sağlayan kusursuz yolak/yolakların anlaşılması ile ilgilidir. Kaspazlar; zimogenler, proteolitik aktivasyona maruz kalan polienzim polipeptidler olarak canlı hücrelerde bulunurlar. Bunlar diğer prokaspaz moleküllerini otoaktive edebilir, ayrıca potansiyel olarak kaspaz aktivasyonu bir kez oluştuğunda apoptotik kaskad efektör kolunu amplifiye edebilirler. Bu aktivasyonun nasıl oluştuğunu belirlemek oldukça zordur (Fadeel ve Orrenius, 2005).

Göreceli olarak basit kısa bir yolak sitotoksik T hücreleri tarafından sağlandığında gerçekleşir. Sitotoksik T hücreleri ürünü olan granzim B prokaspaz moleküllerini parçalar, böylece imha için belirlenmiş hedef hücrelerde intihar enzimleri aktive olur (Zou ve ark., 1997). Hücre içermeyen ekstraktlar kullanılarak; deoksi-ATP (dATP) ve sitokrom c nin kaspaz-9 ve memeli Ced-4 homologu (Apaf-1 olarak isimlendirilir) ile işbirliği içinde olarak kaspazları aktive ettiği gösterilmiştir. Sitokrom c apoptozise giden hücrelerde mitokondriden salındığı, fakat öncesinde ise ölçülebilen kaspaz aktivasyonunun gerekli olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, mitokondriadan gerçekleşen sitokrom c sızıntısı prokaspaz aktivasyonu ve ölüme neden olan biyokimyasal etkilerin başlatılması için anahtar sinyal olarak rol oynamaktadır. Apaf1 knockout farelerde beyinde apoptoz azalmıştır. Gerçekleştirilen Apaf1 hiperproliferasyonunun apoptoz mitokondrial yolağında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Mitokondriadan birçok Bcl-2 aile üyeleri izole edildiğinden beri, kaspazların kaynağı yönüne düzenlenmesi mitokondriyal bütünlüğün korunması düzeyinde mümkün olabilmektedir (en azından sitokrom c kaçağında bütünlüğün korunmasında) (Yoshida ve ark., 1998).

1.2.7. Siklooksijenaz enzimi (cox)

Araşidonik asit metabolitleri normal hücre büyümesine ve karsinogeneziside içeren anormal hücre büyümesi ile proliferasyonuna katılırlar. Serbest araşidonik asidin prostaglandinlere dönüştürülmesindeki anahtar nokta siklooksijenaz enzimi (COX) tarafından katalize edilmesidir. COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki COX enzimi

vardır. COX-1 konstitütif olarak eksprese edilir ve normal hücre metabolik fonksiyonlarının bir parçasıdır. Diğer taraftan, COX-2 ise neoplastik büyümelere indüklenir ve eksprese edilir. COX ekspresyonu ile karsinogenezis arasındaki bağlantı ilk olarak insan ve hayvan kolon kanseri modellerinde yapılan aspirin ve nonsteroidal antiinflatuar ilaçların kolon kanseri rölatif riskini azalttığı ve tümör gerilemesini teşvik ettiği yönündeki çalışmalarla öne sürülmüştür. Çalışmaların moleküler düzeyde incelenmesiyle insan ve hayvan kolorektal tümörlerinde COX-2 protein düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur. Epidemiyolojik, hücresel ve tüm hayvandan toplanan çeşitli örnekler ile, düzensiz COX-2 ifadesinin tümör oluşumunda hız sınırlayıcı bir adım olduğunu; aynı zamanda karsinogenezin erken dönemlerinde COX-2 ifadesinde düzenlenme kayıpları olduğu gösterilmiştir. COX-2 spesifik inhibisyonunu sağlayan COX-2 enziminin teorik olarak; spesifik olmayan COX inhibitörleri (çoğu NSAID ler) veya COX-1 inhibitörleri kullanımında gözlenen gastrointestinal ve diğer komplikasyonları önleyebileceği düşünülmüştür. Kolon karsinogenezisinin azalmasına neden olan COX-2 inhibitörlerinin altında yatan mekanizma henüz tam anlamıyla anlaşılmış değildir, fakat COX-2 bağımlı aynı zamanda COX-2 bağımsız mekanizmalarda artış bilinmektedir (Ng ve ark., 2014; Ranger, 2014; Isidro, 2015).

1.2.8. poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)

DNA-bağlayıcı proteinlerin poli (ADP) ribozilasyonunu katalizleyen enzimdir. PARP kompetitif inhibitördür ve laboratuvar araştırmalarında kullanılan bir ajandır. Poli (ADP) ribozilasyonu DNA tamiri ve genomik stabilitenin sağlanmasında önemli bir mekanizmadır. Serbest radikallerin, reaktif oksijen türlerinin ve peroksinitritin oluşumu PARP'ın aşırı aktivasyonuna neden olmakta, bu aktivasyon da NAD⁺ ve ATP'nin tüketimi ve hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır. PARP, ayrıca çeşitli nükleer transkripsiyon faktörlerini aktive ederek birçok proinflamatuvar genin up-regülasyonunda rol oynayarak inflamatuvar hastalıkların patojenezine katılmaktadır (Virag ve Szabo, 2002; Lastra ve ark., 2007).

1.2.9. Bad

Bir bcl-2 ailesi üyesi olan Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad'ın diğer bcl-2 ailesi üyeleriyle kompleks yapması fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir. Normal koşullarda, bad yaşam faktörlerinin etkisiyle, serin-treonin kinaz yolu aracılığıyla fosforile durumda tutulur. Fosforile durumda iken antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisizleştirir. Yani, sitokrom c tutucu etkilerini antagonize edemez. Eğer defosforile olursa (örn. yaşam faktörlerinin eksikliği gibi bir nedenle) antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturarak antiapoptotik etkilerini ortadan kaldırır. Böylece sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir (Budihardjo ve ark, 1999; Chen ve ark., 2005).

1.3. Kolorektal kanser

Kolorektal kanserler gastrointestinal sistemin en sık karşılaşılan tümörlerindedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre ölüm nedeni olarak kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Bütün kanserler arasında, kolorektal kanserler %9'luk görülme oranıyla; akciğer, meme, prostat kanserinden sonra dördüncü sırada olup, bu oran ülkeler ve ırklar arasında farklılık göstermektedir. Avrupa Ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri'nde daha sık, Asya ve Afrika ülkelerinde daha nadir görülmektedir (WCRF/AICR, 2007).

ABD verilerine göre 2011 yılında 101340 kolon, 39870 rektum kanseri vakası saptanmış olup; kolorektal kanser insidansı son 20 yılda 100000'de 66,3'ten, 45,3'e gerilediği gözlenmektedir. Bu hızlı düşüşün en önemli nedeni, kanserin erken tanı ve teşhisini sağlayarak hastalığın prognozunu olumlu katkılar sağlayan kolorektal kanser tarama programlarının geliştirilerek dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmasıdır (ACS, 2011).

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın 2007-2008 yıllarında oniki ildeki kanser kayıt merkezi verilerine göre, kolorektal kanser görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde %7,8 ile kadınlarda üçüncü ve %7,5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır. Şu anda kolorektal taramaların kapsama oranı %20-30 arasındadır ve

ülkemizde teşhis edilen olguların yarısından çoğu ileri evrededir. (T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı, n.d.).

Aile veya kişisel kolorektal kanser geçmişi, polipler, veya iltihaplı bağırsak hastalıkları gibi genetik faktörler, kolorektal kanser riskini artırır. Yaş ve ırk ayrıca risk faktörleridir; 50 yaşın üstü kişiler ve Afrika-Amerika ırkına sahip kişiler kolorektal kanser gelişimine daha fazla eğilim gösterirler. Cinsiyet bir risk faktörü olarak görülmemektedir, çünkü erkek ve kadınlar neredeyse aynı kanser görülme oranı ve ölüm oranına sahiptirler (ACS, 2014). Ancak, miras alınan gen mutasyonları kolorektal kanserlerin sadece %10'una neden oluyorsa (Armstrong ve Mathers, 2000; Go ve ark., 2001), çevresel faktörlerinde bu hastalığın gelişiminde etkili olması gerekmektedir. Kolorektal kanser vakalarının görülme sıklığı dünya çapında farklı bölgelerde 20 kata kadar değişiklik gösterebilmektedir (Giovannucci, 2003; Slattery ve Caan, 2001). Buna ilaveten, göç üzerine çalışmalar, kolorektal kanserin düşük riskli bölgelerden, yüksek riskli bölgelere göç eden çeşitli nüfuslarda ortaya çıkışında dikkat çekici değişiklikler ortaya koymuştur (Gomez ve ark., 2003).

Fiziksel hareketsizlik, obezite, kırmızı et tüketimi, sigara kullanımı, alkol kullanımı, ve düşük meyve sebze tüketiminin hepsi kolorektal kanser türünde yaşam tarzıyla alakalı risk faktörleridir. Çalışmalar ayrıca tipik batı tarzı diyetin, yani yüksek yağ ve hayvan proteini, az meyve ve sebze, fiber tüketiminin kolon kanseri riskini artırabileceğini göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, Amerikalıların farklı diyet davranış kalıplarına sahip diğer milletlere göre daha yüksek kolon kanseri riskine sahip olduğunu göstermektedir (Slattery ve ark., 1998).

1.3.1. Tümör biyomarkırları

Tümör biyomarkırları tümör hücreleri veya vücudumuzdaki diğer hücreler tarafından kanser yada diğer iyi huylu koşullar karşısında üretilen kimyasallardır. Farklı tiplerdeki kanser veya tümörler farklı biyomarkırlarla ilişkili olabilir. (Bigbee ve Herberman, 2003).

Tümör biyomarkırlarını teşhis, prognoz ve kolorektal kanseri de içeren çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanabilirler. Tümör biyomarkırlarının anormal düzeyi genellikle tam kanser tanısı için yeterli değildir ve genellikle biyopsi gibi diğer testlerle birleştirilerek karar verilir. Tespit edilen biyomarkerin türü ve düzeyi mevcut kanserin çeşidi, malignant olup olmadığı ve en iyi tedavinin ne olabileceği hakkında bilgi verebilir. Tümör markırları kanser tedavi sürecinde, tedavi etkinliği ile hastanın tedaviye nasıl bir yanıt verdiği izlenmesinde de kullanılabilir. Tümör markırlarının azalması kanserin tedaviye yanıt verdiğini anlamına gelebilir. Tedavi sonrası düzeylerinin aynı kalması veya artması tedavinin çalışmadığının bir göstergesi olabilir. Tedavi sonrası tümör biyomarkır düzeylerinin sürekli izlenmesi kanser nükslerini kontrol etmek için kullanılabilir (Duffy ve ark., 2007).

Farklı tümör biyomarkırları farklı şekillerde ve farklı kaynaklardan ölçülür. Bazı markırlar kan veya idrarda bulunur, bu nedenle az miktarda kan ve idrar örneği alınmalıdır. Dışkıda gizli kan testi (FOBT) gibi fekal maddeden izolasyonu gerektiren diğer tümör biyomarkırları da dışkı örneği gerektirir. Doku örnekleri de tümör biyomarkerları içerebilir ve bunun için doku biyopsisi gereklidir ancak idrar ve dışkı örnekleme göre daha invaziv bir prosedürdür. Bir doktor numune aldıktan sonra örnekleri biyomarkır düzeylerinin çeşitli yöntemlerle tespit edilmesi için laboratuara gönderir. Kırmızı et, bazı meyve ve sebzeler tahlilleri etkileyerek yanlış pozitif sonuca neden olabilir (McLeod ve Murray, 1999).

Etkili bir tümör biyomarkır tahlili için iki önemli anahtar nokta şunlardır;

1. Tahlil doğru olarak hastalığı tespit etme yeteneğinde olmalıdır ve,
2. Özellikle maligniteye duyarlı olmalıdır.

1.3.2. Kolorektal kanser biyomarkırları

Kolorektal kanser için hastalığın erken teşhis ve taranmasında gaita tabanlı markırlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Doku tabanlı biyomarkırlar olası prognostik veya prediktif belirteçler olarak araştırılmıştır, bununla birlikte serumdan elde edilen

kolorektal kanser biyomarkırları öncelikle hastanın postoperatif gözetimi için kullanılır (Duffy ve ark., 2003).

1.3.2.1. Doku temelli markırlar

Doku tabanlı markırlar; olası prognostik belirteçler ve tedaviye yanıtın belirleyicisi olarak değerlendirilmiştir. Timidilat sentaz (TS) hücrenel genetik malzemenin işlenmesinde rol oynayan bir enzimdir ve 5-florourasil (5-FU) ve 5-florodeoksiüridin gibi ilaçlarla tedaviye yanıtın incelenmesini sağlayan bir marker olarak çalışılmıştır (Reiter ve ark., 2000). Belli antikanser ilaçlara yanıtın tahmin edilmesinde biyolojik bir marker olarak Transkripsiyon faktörü p53'ün kullanımı yaygın olarak araştırılmıştır (Hank eve ark., 2001). K-ras onkogeni genellikle kanser ilişkilidir ve birçok kanser türünde bu gende anormallikler tespit edilir. K-ras hücre büyümesi ve farklılaşmasının ne kadar olacağıyla ilgili sinyallerin gönderilmesiyle ilgilenir. K-ras mutasyonlarının tüm kolorektal kanserlerin yarısında görüldüğü ve hastalığın erken dönemlerinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalar K-ras mutasyonları ile kolorektal kanserli hastalarda hastalığın kötüye gitmesi arasında ilişki ortaya koymuştur (Ehrhardt ve ark., 2002). K-, H- ve N-ras olmak üzere memelilerde üç temel ras geni vardır. Her bir ras geni farklı hücrenel bölgeler arasında sinyallerin aktarılmasını sağlayan proteinlerin üretilmesiyle görevlidir. Bu sinyaller, hücre bölünmesi ve büyümesini de içeren biyolojik fonksiyonlarda önemli rol oynar. Daha önce de bahsedildiği gibi, K-ras onkogeni insan kanserlerinde en sık değişiklik gösteren gendir, kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %50 'si mutant K-ras içerir (Ohnston ve ark., 1992).

K-ras mutasyonları etkili bir tarama aracı olarak kullanılabilir veya kolorektal kanser hastaları için prognoz göstergesi olabilir, son çalışmalarda ise spesifik tedavilere yanıtın tahmini için bu gen marker olarak gösterilmektedir (Esteller ve ark., 2001). Araştırmalar göstermiştir ki K-ras mutasyonları ile bağlantılı kolorektal kanser vakaları belirli tedavilere cevap vermez. Örneğin, Panitumumab ve cetuxamib gibi antikanser ilaçlar K-ras anormallikleri olan hastalarda etkili değildir. Bu çalışmalar özellikle K-ras bağlantılı kolorektal kanser tedavisinde kullanılmayan

ilaçları belirlemek için değil, uygun tedavi seçimine yardımcı olmak için yapılmıştır (Amado, 2008). Kolorektal kanser hastalarında mutasyona uğradığı görülen diğer gen ise BRAF genidir. Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %15'i mutant BRAF içerir (Kalady ve ark., 2012).

1.3.2.2. Gaita temelli markırlar

Gaitada gizli kan testi (Fecal Occult Blood Test) kolorektal kanser taramasında en yaygın kullanılan testtir. FOBT'nin guaiac testi ve immunokimyasal testler olmak üzere iki ana tipi vardır. İki test de kolorektal kanser göstergesi olabilen proteinleri tespit etmek üzere yapılır. Kolorektal kanser için FOBT 'nin avantajları; testlerin kolay ve ekonomik, non-invaziv olması, hastanın çok az hazırlığa ihtiyaç duyması ve tüm kolorektal yolu inceleme yeteneğine sahip olmasıdır. Ancak bu testlerin benign (veya prekanseröz adenomalar) ile malign kolorektal kanserin ayrılmasında düşük özgünlük ve duyarlılığı vardır (Compton ve ark., 2000).

Fekal DNA testleri kanserli kolorektal lezyonlardan dökülen hücrelerin DNA'sındaki anormallikleri tespit temeline dayanır. Testte genellikle mutant genleri tanımlamak amacıyla DNA markırları paneli kullanılır (Dong ve ark., 2001). DNA markırları kullanılan diyet ve ilaçtan etkilenmeden FOBT için çok daha doğru sonuçlar sağlar. Ancak testler pahalı ve zahmetlidir ayrıca özgünlükten yoksundur. Gaita tabanlı DNA markır örnekleri K-ras, APC (adenomatöz polipozis koli) ve p53 içerir (Ahlquist ve ark., 2000).

1.3.2.3. Serum temelli markırlar

Kolorektal kanserin serum tabanlı markırları temel olarak malignan tümörlerin cerrahi metodla uzaklaştırılmasından sonraki süreçte hastanın izlenmesi için kullanılır. Hastalar herhangi bir nüks veya metastazı tespit etmek amacıyla cerrahi yaklaşım sonrasında düzenli olarak izlenmektedirler. Hastaların %50'sinde olduğu gibi cerrahi sonrası nüks veya metastaz gelişebilir bu nedenle hastaların izlenmesi

cerrahi yönetiminin önemli bir parçasıdır. CEA (karsinoembriyonik antijen) kolorektal kanserli hastalarda ilk kullanılan serum markeridir ve en eski olmasına rağmen en yaygın kullanılanıdır (Reiter ve ark., 1997). CEA esas olarak primer kolorektal kanserli hastaların cerrahi sonrası izlenmesinde kullanılır. Birçok çalışmanın gösterdiği üzere kanser cerrahisi sonrası yoğun izleme düzenli CEA ölçümleriyle ilişkilendirilirse gelişmiş sonuçlar elde edilmektedir. Kolorektal kanser için kullanılan diğer serum tabanlı tümör biyomarkırları; CA-19-9, TPA, TPS ve TIMP-1'dir (Reiter ve ark., 2000).

1.3.3. Kolon kanser tedavi yöntemleri

Radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi, kolon kanseri tedavisinde kullanılan başlıca yöntemlerdir. Biyolojik tedavi gibi yeni tedavi yaklaşımları ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Bir hasta için bu tedavi şekillerinden biri veya birkaçının kombinasyonu gerekebilir (Wang ve ark., 2009).

Cerrahi, kalın bağırsak kanseri için en sık kullanılan tedavi şeklidir. Hastaların çoğunda bağırsakların bir kısmının alınması (partial colectomy) şeklinde bir yöntem uygulanır. Cerrahi, sıklıkla erken evre bağırsak kanserlerinde gerekli tek tedavi şeklidir (Libutti ve ark., 2011).

Genelde tümör çevresindeki lenf nodlarını da çıkarmak kanserin evresi konusunda yardımcı olur. Patoloji uzmanları bu lenf nodlarını mikroskop altında inceleyerek onlara kanserin bulaşıp bulaşmadığını tespit ederler. Eğer kanser bu lenf düğümlerine sızramışsa, vücudun diğer bölümlerine de sızramış olması muhtemeldir ve bu durum daha fazla tedaviyi gerektirir (Bouvier ve ark., 2013).

Kemoterapide kanserli hücrelerin toksik etkisi bulunan ilaçlar ile öldürülmesi, kanserli hücrelerin bölünmesini sağlayan mekanizmaların ortadan kaldırılması hedeflenir (Nehru ve Singh, 2008). Klasik kemoterapi ilaçları vücutta hem kanserli hemde sağlıklı hücrelere etki etmekte ve ayrıca tedavi gören hastalarda bağışıklık sisteminin zayıflamasına sebep olmaktadır (Wang ve ark., 2009). Kemoterapi cerrahi işlemin uygulanmasından sonra bazen hastalığın yayılmasını önlemek için verilir. Bu

ek tedavi “adjuvant kemoterapi” olarak adlandırılır. Kemoterapi yeni tümörlerin oluşmasını önlemek veya tamamen çıkarılmayan tümörlerde onların oluşturduğu şikayetleri ortadan kaldırmak için de verilir (Lombardi ve ark., 2010; Bouvier ve ark., 2013).

Neo-Adjuvan Kemoterapi Tedavisi, tümörü sınırlı ve cerrahi olarak çıkarılması mümkün olan hastalarda, kitlenin küçültülüp ameliyatın kolaylaştırılması amacıyla verilir (Jackman ve ark., 2004).

Palyatif Kemoterapi Tedavisi, yaygın hastalıkta tümörü geriletmek veya kontrol altında tutmak veya tümöre bağlı semptomların giderilmesi amacıyla verilir (Power ve Lichtman, 2008).

Kolon kanseri tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri yüksek sitotoksositeye sahip olduğu bilinen 5-Fluorourasil (5-FU)'dir. Bu ilaçla beraber başka ilaçlar da tedaviye eklenebilir. Bunlardan bazıları oksaliplatin, bevazizumab, irinotekan, Capecitabine vs dir. Kalın bağırsak kanserinde kemoterapi amacı ile verilen ilaçlar günlük tedavi ünitelerinde hastayı hastaneye yatırmadan verilebilir (Nakashima ve ark., 2008; Lee, 2013).

Bu kemoterapötik ajanlar ile hedeflenen, gerek protoonkogen aktivasyonu gerekse tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu sonucu sinyal ileti mekanizmalarında meydana gelen değişimlerle çoğalma ve/veya yaşama işlevleri üzerindeki kontrollerini yitiren ve bu şekilde apoptozdan kaçan kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması ve/veya apoptoza yönlendirilmesidir (Wang ve ark., 2009).

Tekli ajanlar daha az toksik ve sinerjistik etkili ilaçlar ile kombine edildiklerinde antitümör etkileri artmaktadır. Ayrıca ilaçlar biyokimyasal etki mekanizmalarına, hücre siklusunun farklı fazlarına etkilerine göre kombine edilir. Kombinasyona gidilmesinin nedenleri, maksimum etki elde ederken, minimum toksisitede kalabilmek ve doz titrasyonu ile vücuda alınacak ilaç miktarının minimum düzeyde tutulmasıdır (Kumar ve ark., 2009; Lee, 2013).

1.3.3.1 kullanılan ilaç kombinasyonları

Adjuvant tedavi için kullanılan yaygın ilaç kombinasyonları şunlardır:

FOLFOX: 5-FU, lökovorin, ve oksaliplatin

CapeOx: Capecitabine ve oksaliplatin oksaliplatin

5-FU ve lökovorin

Kapesitabin

FOLFOX ve CapeOx güçlü ilaçlardır, ama daha fazla yan etkileri vardır (Benson ve ark., 2004; Zuckerman, 2008).

Metastaz yapmış kolon kanser tedavisinde, yukarıdaki tedavi seçeneklerine ilaveten:

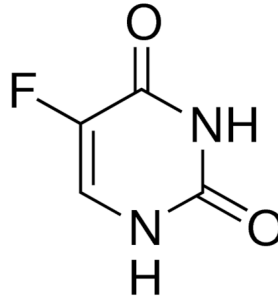
FOLFIRI: 5-FU, lökovorin, ve irinotekan

FOLFOXIRI (lökovorin, 5-FU, oksaliplatin ve irinotekan)

ve Irinotekan kullanılmaktadır (Zuckerman, 2008).

1.3.4. 5-Fluorourasil

5-florourasil (5-FU) hala yaygın olarak kullanılan bir antikanser ilaçtır. 1957'den günümüze kolon kanseri tedavisinde önemli rol oynamıştır ve meme kanseri, diğer kanserli hastalarda (baş ve boyun gibi) da kullanılır (Grem, 2000).



Şekil 1.6. 5-florourasil ve Kimyasal yapısı. (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

5-FU, DNA ve RNA'nın pirimidin moleküllerine benzer yapıya sahip heterosiklik aromatik organik bir bileşiktir; C-5 pozisyonunda hidrojen yerine bir florin içeren urasilin analogudur. Saf 5-FU için literatürde tek bir kristal yapı bildirilmiştir; burada dört birim molekül hidrojen bağlarıyla bağlanarak asimetric bir kristal oluşturur (Hulme, 2005). Yapısı nedeniyle 5-FU nükleosid metabolizmasına müdahale edebilir, RNA ve DNA içerisine dahil olabilir, sitotoksite ve hücre ölümüne yol açabilir (Noordhuis ve Holwerda, 2004). Son 50 yılda birçok avantajına rağmen ilaç direnci nedeniyle klinik uygulamalar büyük ölçüde sınırlı kalmıştır, ileri kolorektal kanserde yalnız 5-FU kullanımıyla sadece %10-15 (Giacchetti ve ark., 2000) oranında cevap alınırken, 5-FU ve diğer antitümör ilaç kombinasyonları ile %40-50 (Douillard ve ark., 2000) oranında cevap alınabilmektedir.

1.3.4.1. Etki mekanizması

Memeli hücrelerinde 5-FU; timidilat sentaz (TS) ile kararlı bir bileşik oluşturan monofosfat florodeoksiüridin (FdUMP)'e dönüştürülür ve böylece deoksitimidin mono-fosfat (dTMP) üretimini inhibe eder. dTMP DNA replikasyonu ve onarımı için esastır, yokluğunda sitotoksite gelişir (Longley ve ark., 2003). 5-FU'nun Dihidroprimidin dehidrogenaz (DPD) aracılığıyla dihydrofluorouracil (DHFU)'e dönüşümü, normal ve tümör hücrelerinde 5-FU katabolizmasının hız sınırlayıcı basamağıdır. Uygulanan 5-FU'nun %80 kadarı karaciğerde DPD tarafından parçalanır (He ve ark., 2008).

Timidilat biyosentezini katalize etmek için gerekli bir enzim olan TS, protein sentezi ve apoptozisin düzenlenmesinden sorumludur (Bruni ve ark., 2002; Chernyshev, 2007). TS, dTMP için deoksiüridin monofosfat (dUMP) metilasyonunu katalize eder (5,10-metilentetrahidrofolat (CH₂THF) metil donörüdür), sonuçta gerçekleşen reaksiyonla DNA replikasyon ve onarımı için timidilat sağlar (Roberts ve ark., 2006).

5-FU bir pirimidin analogu olarak RNA ve DNA'da urasil veya timin yerine hatalı olarak birleşebilir. Nükleik asit biyosentezi veya fonksiyonuna müdahale 5-

FU'nun olası diğer etki mekanizmaları nedeniyle gerçekleşir. 5-FU ilaç tedavisi görmüş hücresel DNA'ya yanlış bağlanabilir ve genomda 5-FU birikimi görülebilir; bu durum memeli hücrelerdeki 5-FU sitotoksitesiyile ilişkilidir (An ve ark., 2007). Ayrıca, RNA'ya da yanlış bağlanabilir ve RNA tabanlı etkileri sitotoksitede önemli rol oynar.

1.3.4.2. İnterferonlar

İnterferonlar (IFNs) in vivo ve in vitro olarak normal ve malignant hücrelerin büyümesi üzerine negatif düzenleyici etkileri olan pleiotropik sitokinlerdir. Yapılan çalışmalara göre IFNs'ler çeşitli kanser hücre kültürlerinde 5-FU'nun sitotoksitesini arttırabilir. 5-FU; Kaspaz-1 ve kaspaz-3 aktivasyonunu uyararak matür ve degrade IL-18 türlerinin salınımını indükleyebilir. 5-FU ilaveli mediumda; aktive T hücreleri vasıtasıyla IFN-g üretimi IL-18'e bağımlı olarak indüklenir. Carbone ve ark. (2005)'a göre; pankreatik kanser hücrelerinin 5-FU ile tedavisi kaspaz bağımlı pro-IL 18'in işlenmesini indükler ve böylece biyolojik aktif IL-18 salgılanması sağlanır. Sonuçlara göre; IFN-A ile 5-FU'nun kombinasyonu insan hepatosellüler karsinoma hücrelerinin büyümesinde inhibisyona neden olur ve kombinasyon terapisinin mekanizmalarından biri olarak IFN-A/BR aracılığıyla gerçekleşen apoptozis değişiklikleri gösterilebilir (Kondo ve ark., 2005). Wada ve ark. (2007)'a göre; IFN-alfa ve 5-FU kombinasyon terapisinin antiproliferatif ve antianjiyogenik etkileri vardır, ve in vivo olarak apoptozu uyarabilir.

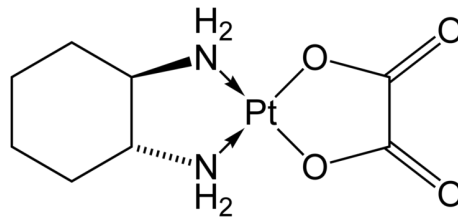
Kanser hücrelerinin ilaç kaynaklı apoptozise duyarlılığının geliştirilmesi 5-FU için önemli bir strateji haline gelmiştir. 5-FU kaspaz-6'yı aktive ederek kanser hücresi apoptozunu tetikleyebilir. p53'ün daha yüksek konsantrasyonlarından bağımsız bir şekilde 5-FU aracılı apoptozisi sinerjik olarak teşvik eder (Chan ve ark., 2008). Ayrıca 5-FU p53 bağımlı metabolizmada mitokondriyal ROS oluşumunu sağlar (Hwang ve ark., 2001). Ek olarak, BMI-1 tükenmesi PI3K/AKT yolunun engellenmesiyle ilişkili apoptozu sağlayarak NPC hücrelerinin kemosenitivitesini arttırır (Qin ve ark., 2008).

5-FU'nun G1 siklinlerin ekspresyonunda değişime neden olarak hücre siklusu düzenlenmesinde farklılıklara neden olmaktadır. İn vitro olarak oral kanser hücrelerinin 5-FU tedavi sonuçları; G1/S fazındaki hücrelerde artış ve p-21'in dikkat çekici düzeyde upregüle olmasıdır. Siklin E 'de dikkate değer bir upregülasyon ve siklin D'de ise downregülasyon görülür. Burada aynı zamanda CDK4'e artan bağlanmanın 5-FU aktivitesini engellenebileceği yönünde spekülasyonlar da vardır (Li ve ark., 2004).

Ooyama ve ark. (2008)'a göre; 5-FU trombospondin-1 (TSP-1) indüksiyonu yoluyla anjiojenezisi engelleyerek sitotoksik aktiviteyi attırır. Hwang ve ark. (2005)'a göre; 5-FU ve genistein kombinasyonunun kolon kanserleri üzerinde kemoterapotik etkisi vardır ve AMPK COX-2 ekspresyonu için yeni bir düzenleyici molekül olabilir ve genistein ile etkileşimi sitotoksitenin nedeni olabilir.

1.3.5. Oksaliplatin (OX)

Bir diaminosikloheksan platindir, sitotoksik ve antitümör etki oluşturmaktadır. İlk kez 1996 yılında metastatik kolon kanserinde kullanılmak üzere Avrupa'da ve 2002 yılında da ABD de onay almıştır. Metastatik kolorektal kanserli hastalarda birinci basamakta infüzyonel 5-FU ve Folinik asitle kombine edildiğinde kontrol grubuna göre belirgin sağkalım avantajı sağlamaktadır (Doğan ve Akbulut, 2009).



Şekil 1.7. Oksaliplatin ve Kimyasal yapısı. (Li ve ark., 2015)

Oksaliplatin (Eloxatin®, Sanofi-Aventis) kolorektal kanserlerde 5-FU ve lökovorin (LV) (Wellcoverin®, GlaxoSmithkline) ile birlikte yapılan çoklu sağaltımlarda kullanılmaktadır (Ruzzo ve ark., 2007).

1.3.5.1. Etki mekanizması

Oksaliplatin için çeşitli etki mekanizmalarından bahsedilmektedir. Diğer platin bazlı bileşikler gibi oksaliplatin de çoğunlukla DNA hasarına neden olarak sitotoksik etki gösterir (Ibrahim ve ark., 2004). Kanser hücrelerinin apoptozisi; DNA hasarlarının oluşumu, DNA sentezinin duraklaması, RNA sentezinin inhibisyonu ve immunolojik reaksiyonların tiktiklenmesi nedenleriyle gerçekleşebilir. Oksalo platin aynı zamanda diğer sitotoksik ilaçlarla sinerjizm sergiler ancak bu etkilerin altında yatan mekanizma henüz tamamen anlaşılammıştır (Raymond ve ark., 1998).

İntrasellüler HCO_3 ve H_2PO_4 fizyolojik konsantrasyonlarında dikloro(dach) platin bileşikleri plazmaya ulaşım sonrasında hücre nükleusuna girer, GC'den zengin bölgelerdeki guaninin nitrojen atomuna (N_7) bağlanır, mono-katılım ürünlerini daha sonra da di-katılım ürünlerini oluştururlar (Faivre ve ark., 2003). Oksalo platinin etkileri çoğunlukla genomik DNA'da görülmesine rağmen, katılım ürünleri nükleozomlarda oluşturulur.

Oksalo platin 3 farklı çapraz bağlanmaya neden olabilir;

1. DNA sarmalları içindeki çapraz bağlantılar
2. DNA sarmalları arasındaki çapraz bağlantılar
3. DNA ve proteinler arasında gerçekleşen çapraz bağlantılar

DNA sarmalları içindeki çapraz bağlantılar; DNA hasarındaki predominant mekanizma iki Gs 4'ün veya daha az sıklıkla bir G-A baz çiftinin arasındaki bağlanmadır (Faivre ve ark., 2003).

DNA sarmalları arasındaki çapraz bağlantılar; Önemli ölçüde cisplatin sitotoksitesine bağlı olduğu düşünülmektedir, oksaliplatin etki mekanizmasında daha az önemlidir. DNA ve proteinler arasında gerçekleşen çapraz bağlantılar; Enzimler ve diğer önemli intrasellüler proteinler üzerindeki denatüre edici etkilerine rağmen, çoğu çalışma henüz hücre ölümüne neden olduklarını kanıtlamış değildir (Woynarowski, 2000).

Deneyleer oksaliplatin ve 5-florourasil (5FU) arasındaki sinerjizm üzerine yoğunlaşmıştır, oksaliplatinin nükleik asit sentezine timin in eklenmesini önleyerek timidilat sentaz üzerinde direkt bir inhibisyona neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu antimetabolik benzeri etki mitotik proseslerin durmasına neden olur. Çünkü oksaliplatin genellikle 5FU ile kombine edilmiştir, timidilat sentaz inhibitörüdür ve oksaliplatinin in vivo olarak bu mekanizmada kendi kendine önemli bir rol oynayıp oynamadığı belirsizdir (Fischel ve ark., 2002).

DNA replikasyonunun inhibisyonu hücre ölümüne neden olmak için yeterli değildir, transkripsiyonun başlangıç ve uzama fazlarındaki inhibisyon önemli bir rol oynar. Oksaliplatinin üç önemli temel mekanizmayla transkripsiyonu inhibe ettiği öne sürülür (Todd ve Lippard, 2009).

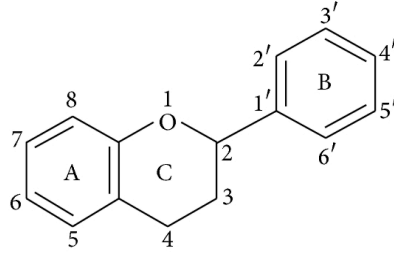
1. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanması: Başlangıç aşamasında platin-DNA katılım ürünleri transkripsiyon faktörleri için bağlantı yeri olarak hizmet verebilir ve özellikle bu faktörler platin için güçlü kimyasal ilgi gösterirler. Böylece bu transkripsiyon faktörlerinin doğal promotör bölgelerine bağlanması engellenmiş olur.
2. RNA polimeraz inhibisyonu: Bu inhibisyon cisplatin için düşünülmüşse de oksaliplatin için de geçerlidir. Platin-DNA katılım ürünlü bazlar polimeraz II gibi enzimlerde aktif bölgelere bağlantı için uygun değildir.
3. Nükleozomal DNA katılım ürünlerinin rolü: Bu katılım ürünleri RNA polimerazın DNA şablonuna erişimini engelleme potansiyeline sahiptir (Fischel ve ark., 2002).

1.3.6. Flavonoidler

Farklı 10 genel sınıfa ayrılabilen, 8000'in üzerinde polifenol bileşiği bilinmektedir (Bravo, 1998). 4000'den fazla çeşidi olan flavonoidler bu ailenin bir parçasıdır. Bunlar üç lineer karbon zinciri tarafından oluşturulmuş iki benzen halkası ile oksijenlenmiş heterohalka (C6-C3-C6) tarafından oluşturulan moleküler yapılarına

göre sınıflandırılırlar (Şekil 1.8.) ve çoklu hidroksil, metoksil ve O-glikozit gruplarının temel pirion benzo (C6-C3-C6) parçası üzerinde birbiri yerine geçmesiyle de çok sayıda çeşitli gruplar ortaya çıkar.

İnsan diyetinde Flavonoidler yaygın bir bileşendir. Bunlar, genellikle O-glikozidler ile C3 pozisyonundan bağlı şekerler olarak gıdalarda mevcuttur. Tüm flavonoidlerin ortalama alımının 1 g/gün olduğu tahmin edilmektedir (Hodek ve ark., 2002). Fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler, ve lignanlar bitkilerde en fazla miktarda görülen polifenollerdir ve dahası bunlardan flavonoidler ve fenolik asitler diyetle alınan polifenollerin sırasıyla %60 ve %30 'unu oluştururlar. Polifenollerin önemli kaynakları sebze, meyve ve tohumlardır. Flavonoidler yaygın olarak Turunçgiller ailesi, Narenciye cinsine dahil edilirler (Obdulio ve ark., 1997).



Şekil 1.8. Flavonoidlerin temel yapısı (Heim ve ark., 2002)

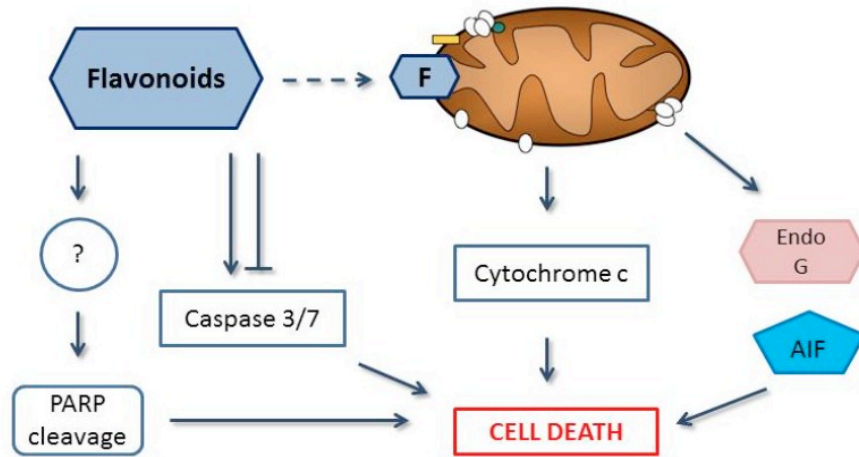
Flavonoidlerin anti-oksidan ve serbest radikal süpürücü aktiviteleri ve ayrıca anti-inflamatuar, anti-viral ve özellikle de anti-kanser özellikleri vardır ve çeşitli hücre sel hedeflerle etkileşimde bulunarak insan sağlığını olumlu yönde etkilerler. Diyetle doğal veya sentetik maddelerin eklenmesi ve diyet değişikliği ile kanserin önlenmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Bu supresyon, blokaj ve transformasyonu içeren çeşitli yollarla kontrol edilebilir. Supresyon ajanları prokarsinojenlerden yeni kanser oluşumunu önler, bloke edici ajanlar karsinojenik bileşenlerin kritik inisiyasyon alanlarına ulaşmasını engeller ve transforme edici ajanlar ise daha az toksik madde içeren karsinojenik bileşenlerin metabolizmasını kolaylaştırır veya biyolojik etkilerini önler. Flavonoidler her üç şekilde de görev yapabilir (Manthey ve ark., 2001). Diğer birçok potansiyel kemopreventif polifenoller karsinogenez sürecini kesintiye uğratar veya geriye döndürebilir (Surh, 2003).

1.3.6.1. Başlıca Moleküler Mekanizma

Polifenolik bileşikler kanser gelişimi sırasında bozulmuş olan süreçleri etkileyerek biyolojik faaliyetlerde dikkate değer bir spektrum açığa çıkarırlar. Bu, anti-allerjik, anti-inflamatuar, antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenik ve enzimsel faaliyetlerin modülasyonunu içerir (Middleton ve ark., 2000; Yang ve ark., 2001). Bu nedenlerle sağlığa yararlı etkileri olabilir ve kansere karşı kemopreventif veya terapötik ajan olarak değerlendirilebilirler (Birt ve ark., 2001).

1.3.6.2. Flavonoidlerin antikarsinojenik etki mekanizması

Antioksidan etkiler (oksijen radikallerinin inaktivasyonu, elektrofil moleküllerin bağlanması), konjuge aktivitelerle (GT, GST) koruyucu enzim indüksiyonu faz 2 de gerçekleşmesi, apoptoz oranında artış, hücre çoğalması inhibisyonu, lipid peroksidasyon inhibisyonu, anjiyojenez inhibisyonu, H-vericisi (örn. GSH-peroksidazlar) ve DNA oksidasyon inhibisyonu (GST, glutation S-transferaz; GT, glukoronosil transferaz; GSH, glutatyon.) gibi etkilerle flavonoidlerin antikarsinojenik etkileri görülür.



Şekil 1.9. Flavonoid kaynaklı hücre ölümünün muhtemel mekanizması (Lialitska, 2012)

Flavonoidler CYP1A1 ve CYP1A2 (Marchand ve ark., 2000) gibi P450 izoenzim aktivitesini engelleyerek aktif karsinojenlerden kaynaklı hücre hasara karşı koruyucu etki sergilerler. Bir başka mekanizma ise vücutta karsinogenlerin detoksifikasyon ve eliminasyonu işlevli faz II metabolize edici enzimlerin (örneğin, GST, kinon redüktaz ve UDP-GT) (Bu-Abbas ve ark., 1998; Sun ve ark., 1998) indüksiyonudur. Bu, karsinogeneze karşı flavonoidlerin kemopreventif etkisini açıklamaya yardımcı olur.

Flavonoidler ksantin oksidaz (Chang ve ark., 1993), COX veya LOX55 (Mutoh, 2000)'ın inhibisyonunda etkilidirler, böylece tümör hücre proliferasyonunu engellerler.

Ayrıca poliamin biyosentezi inhibisyon mekanizması flavonoidlerin antiproliferatif aktivitelerine katkıda bulunabilir. Ornitin dekarboksilaz poliamin biyosentezinde oran sınırlayıcı bir enzimdir, ayrıca birçok dokuda hücre proliferasyonu ve DNA sentez oranı ile ilişkilidir. Çok sayıda çalışma göstermiştir ki flavonoidler tümör promotörleri tarafından uyarılan ornitin dekarboksilazı inhibe edebilir, bu durum poliamin, DNA inhibisyonu ve protein sentezi azalmasına neden olur (Makita ve ark., 1996; Tanaka ve ark., 1997).

Hücre döngüsü ilerlemesindeki düzensizlikler flavonoidlerin antikarsinojenik etkilerini açıklayabilir. Mitojenik sinyaller, hücrelerin hücre döngü hızını düzenleyen bir safhaya girmesi ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) hücre döngüsü ilerlemesinin önemli bir düzenleyicileri olarak kabul edilirler. CDK aktivitesindeki değişiklik ve kuralsızlaşma neoplazinin patojenik ayırıcı özelliğidir. Çeşitli kanser türleri CDK genlerindeki mutasyon veya CDK inhibitör genleri nedeniyle oluşan CDK hiperaktivasyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle inhibitörler veya modülatörlere kansere karşı yeni terapötik maddeler olarak büyük ilgi duyulur (Senderowicz, 2001). Kanser hücre kültüründeki hücre döngülerinin kontrol noktaları olan G1/S ve G2/M 'in silimarin, genistein, quercetin, daidzein, luteolin, kaempferol, apigenin ve epigallocatechin3-gallate gibi flavonoidlerle işlevlerinin bozulduğu bulunmuştur (Choi ve ark., 2001; Casagrande ve Darbon, 2001). Çeşitli laboratuvarlarda yapılan

çalışmalarda flavopiridol'un tüm CDK'ların inhibisyonu vasıtasıyla G1 veya G2/M sürecinde hücre siklusunun durmasına neden olabileceği ortaya konulmuştur (Wang, 2000).

Flavonoidlerin gözlenen önemli antikanser özellikleri apoptozis nedeniyle olabilir (Sakagami ve ark., 2000; Wenzel ve ark., 2000). Apoptozis düzeninin bozulması onkogeneziste kritik bir rol oynar. Normal hücrelerden ayrılan bazı kanser hücre hatlarında flavonoidlerin apoptozisi teşvik ettiği görölmüştür. Flavonoidlerin hangi moleküler mekanizmalarla apoptozisi teşvik ettiği henüz açıklık kazanmamıştır. DNA topoizomeraz I/II etkinliğinin engellenmesi (Bailly, 2000; Sukardiman ve ark., 2000), ROS azalması (Lee ve ark., 2002), ısı şok protein ekspresyonunun düzenlenmesi (Rong ve ark., 2000), sinyal yolları modülasyonu (Yin ve ark., 1999), nükleer transkripsiyon faktörü kappa B (NF-κB)'nin baskılanması, endonükleaz aktivasyonu ve Mcl-1 protein supresyonunu içeren çeşitli mekanizmalar bu durumda söz konusu olabilir (Iwashita ve ark., 2000).

İn vitro olarak flavonoidler memelilerde enzimatik sistem aktivitesini modifiye ederler (örneğin kinazlar, fosfolipazlar, ATPase, lipooksigenazlar, siklooksigenazlar ve fosfodiesterazlar). Flavonoid yapısı ve enzimatik aktivitesi arasında bazı vakalarda bir korelasyon gözlenmiştir (Weidner ve ark., 1990; Horak ve ark., 1991). Bu etkilerin çoğu flavonoidlerin regölatör enzim nükleotid bağlanma bölgeleri ile etkileşim yeteneğine bağlı olabilir.

Birçok araştırmacı çeşitli hücre sistemlerinde flavonoidlerin potansiyel antikanser aktivitesi üzerine in vitro çalışmalar yürütmüştür. Hirano ve arkadaşları insan akut miyeloid leukemia hücre kültürü HL-60 da 28 flavonoidin antikanser etkisini ve bu bileşiklerin antiproliferatif aktivitesi ile sitotoksitesisi arasındaki farkları incelemiştir. Bu 28 flavonoid dışında, 8 flavonoidin HL-60 hücre kültüründe 10-90 ng/ml arasında değişen dozlarının hücre büyümesi ile IC₅₀ (maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı) üzerine önemli baskılayıcı etkileri olduğunu kanıtlamışlardır. Bu bileşikler arasındaki genistein, honokipl, machilin A, matairesinol ve arctigeninin 100 ng/ml den daha az düzeyde kullanıldıklarında dahi IC₅₀ düzeyinde en güçlü etkilerini gösterdikleri bulunmuştur ki bu durum neredeyse mevcut antikanser ajanlarla hemen hemen aynı etkinliği ifade eder. Flavonoid

jenistein ve lignanlar boya dışlama testleriyle ($LC_{50s} > 2,900$ ng/ml) değerlendirildiği üzere HL-60 hücresine karşı çok az veya hiç sitotoksisite göstermiş, bununla birlikte regular antikanser ajanlar kuvvetli bir sitotoksisite göstermiş (Hirano ve ark., 1994; Kuntz ve ark., 1999) ve 30'dan fazla flavonoid insan kolon kanser HT-29 hücre kültüründe hücre proliferasyonu ve potansiyel sitotoksisite üzerindeki etkileri için incelenmiştir. Antiproliferatif etki bakımından türlerin alt sınıfları veya bir sınıf içerisindeki süstitüentlerde yapı aktivite ilişkisi saptanmamıştır (Kuntz ve ark., 1999).

Flavonoidler in vitro olarak karsinogenezisi inhibe eder, fakat önemli bulgular bu durumun in vivo olarak da olabileceğini göstermektedir (Caltagirone ve ark., 2000). Çeşitli hayvansal hücre modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar bazı flavonoidlerin tümör inisiasyonu (başlaması) yanısıra tümör progresyonunuda inhibe edebildiğini göstermiştir (Makita ve ark., 1996; Tanaka ve ark., 1997). Siess ve arkadaşları (2000), Aflatoksin B1 (AFB1)-kaynaklı hepatokarsinogenez (başlangıç ve gelişme safhaları) geliştirilen ratlarda flavone, flavanone, tangeretin ve quercetin ile beslenme etkilerini çalışmışlar ve inisiasyon (başlangıç) periyodu boyunca kullanılan flavone, flavanone ve tangeretin γ -glutamil transferaz-preneoplastik odakların sayısını azalttığını bulunmuşlardır.

Çizelge 1.1. Çeşitli kanser hücre kültürlerinde flavonoidlerin antikanser aktiviteleri (Sak, 2014).

| Kanser | Hücre | Flavonoid | Ref. |
|-----------------|---|---|--|
| Ağız kanseri | HSC-2, HSG, SCC-25 | Flavanones, isoflavones, EGC, chalcones, EGCG, curcumin, genistein, ECG, quercetin, cisplatin | (Elattar TM ve Virji, 2000) (Shi ve ark., 2001) |
| Meme kanseri | MCF-7 | Flavanones, daidzein, genistein, quercetin, luteolin | (Han ve ark., 2001) (Pouget ve ark., 2001) |
| Tiroid kanseri | ARO, NPA, WRO | Genistein, apigenin, kaempferol, chrysin, luteolin, biochanin A | (Wenzel ve ark., 2000) |
| Akciğer kanseri | SK-LU1, SW900, H441, H661, haGo-K-1, A549 | Flavone, quercetin | (Bai ve ark., 1998) |
| Prostat kanseri | LNCaP, PC3, DU145 | Catechin, epicatechin, quercetin, kaempferol, luteolin, genistein, apigenin, myricetin, silymarin | (Agarwal, 2000) (Bhatia ve Agarwal, 2001) |
| Kolon Kanseri | Caco-2, HT-29, IEC-6, HCT-15 | Flavone, quercetin, genistein, anthocyanin | (Kuo ve ark., 1997) |
| Lösemi | HL-60, K562, 4A5, B16 mouse melanoma | Jurkat Apigenin, quercetin, myricetin, chalcones | (Kuntz ve ark., 1999) (Shi ve ark., 2001) |

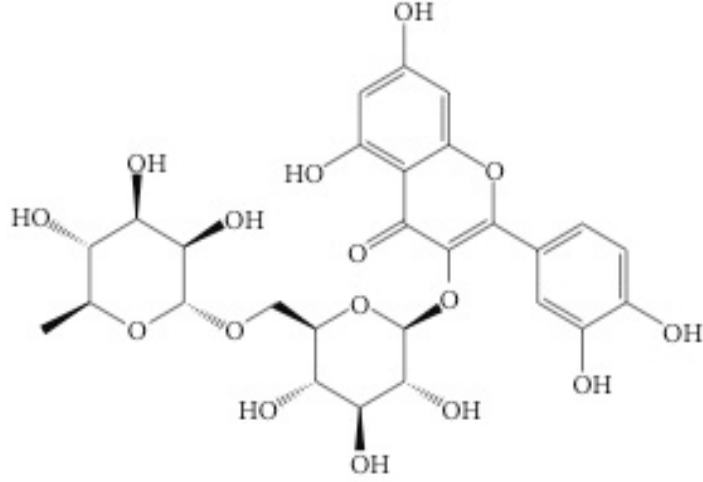
Akciğer tümörogenезisinin A/J farelerde katekin ile zenginleştirilmiş çay ile önlenebileceği gösterilmiştir (Yang ve ark., 2000). 4-(methylnitrosamine)-1-(3 piridil)-1 bütanon (NNK) tedavisinden 2 hafta önce başlanan ve 3 veya 15 hafta boyunca kafeinsiz yeşil veya siyah çay farelere verilmiş ve bu durum farelerde oluşturulmuş tümörlerin sayısında azalmaya neden olmuştur. Bu farelerde NNK enjeksiyonundan 16 hafta sonra adenomlar gelişmiş ve adenomların adenokarsinomlara gelişimi siyah çay kullanımı ile belirgin düzeyde inhibe edilmiştir. Bu araştırmalar ışığında akciğer karsinogenезisine karşı çayın inhibitör etkisi olduğu ve karsinogenезisin başlama, gelişim veya ilerleme evrelerinde

verildiğinde etkili olduğunu kanısına varılmıştır. Ayrıca flavonoidlerin tümör metastazlarını baskıladığına dair kanıt vardır.

Flavonoid moleküllerinden bir grup olan Kateşinler, in vitro olarak fare M04 hücrelerinin embriyonik civciv kalp fragmentleri içine invazyonunu inhibe eder (Bracke ve ark., 1991). Bir polimetoksi flavonoid olan citrus depressa dan elde edilen nobiletin, Matrigel model de matriks metalloproteazlarının (MMPs) ekspresyonunu baskılayarak ve metalloproteinaz doku inhibitörlerini arttırarak insan fibrosarkoma HT-108 hücrelerinin tümör invazyon aktivitesini inhibe eder (Sato ve ark., 2002). Quercetin ve apigenin in vitro olarak singenetik farelerde melanoma hücresinin (B16-BL6) büyüme ve metastatik potansiyelini inhibe eder (Yin ve ark., 1999). B16-BL6 hücrelerinin invazyonunda önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. Aynı zamanda, apigenin erkek Wistar ratlarda azoksimetan ile oluşturulmuş intestinal adenokarsinomalarda lenfatik invazyonu ve bombesin tarafından arttırılan peritoneal metastazları anlamlı düzeyde azaltmıştır. Kanser metastazında apigenin in inhibitör etkisi mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) fosforilasyonunun inhibisyonu yoluyla olabilmektedir (Tatsuta ve ark., 2000).

1.3.6.3. Rutin

Rutin (quersetin rutinosid) flavonoid quersetinin bir glikozididir. Rutin diyetle büyük oranda mevcuttur ve çeşitli hastalıkların tedavisinde ampirik olarak kullanılmaktadır. Genellikle gelişmiş bitkilerde bulunan bir flavonoiddir. Rutin elma kabuğu ve çay gibi birçok bitkide bulunur. Fagopyrum esculentum moench, (karabuğday) bitkisi rutinden en zengin kaynaktır. Rutin suda kısmen çözünür ve kan dolaşımına katıldığında ise quercetine dönüştürülür (Morand ve ark., 2000).



Şekil 1.10. Rutin ve Kimyasal yapısı (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Rutin, fenolik bir antioksidandır ve süperoksit radikallerini süpürdüğü ispatlanmıştır. Rutin, demir katyonları gibi metal iyonlarıyla şelat oluşturabilir. Rutinin in vivo antioksidan aktivitesi, ileri sindirim aşamasında oluşan metaboliti ve aynı zamanda ağlikanı olan quersetinden ileri gelmektedir. Rutin aynı zamanda biyolojik antioksidan olan indirgenmiş glutatyonun düzeyini korumaya yardım eder. Belirli şartlar altında, rutin ve metaboliti olan Quersetin pro-oksidan olarak da görev yapabilirler. Rutin; trombosit agregasyonunu önler, anti-inflamatuar etkileri vardır ve dolaşımdaki yağ ile kolesterolün azalmasını sağlar. Ayrıca diğer birçok yararlı etkisi de tespit edilmiştir (Rotelli ve ark., 2003).

Neuroprotektif (Nakayama ve ark., 2011), renal apoptoz ve inflamasyonu hafifletmesi (Arjumand ve ark., 2011), kanser riskini azaltması (Han ve ark., 2009), koroner kalp hastalığı insidansını azaltması (Fernandes ve ark., 2010) ve yaşam süresini attırması gibi yararlı etkileri bulunmuştur.

Antikanser çalışmalar ile, rutinün prekanseröz lezyon miktarının azaltılmasında ve kalın barsak kanserlerinde apoptozun teşvik edilmesinde önemli ve yararlı etkileri kanıtlanmıştır (Volate ve ark., 2005).

1.4. Amaç

Bu çalışmanın amacı, farklı kanser hücrelerinde etkinliği bildirilen, sağlıklı hücrelerde düşük toksik etkinliği olan Rutin flavonoid molekülünün, kolorektal kanser hücrelerinden Caco-2 hücrelerinde antiproliferatif etkisi, sitotoksitesi, apoptozis ve inflamasyon belirteçleri üzerine etkinliğini araştırmak ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda in vivo çalışmalara temel oluşturmaadır. Bu çalışma ile Rutin molekülünün selektif etkinliği tartışılacaktır. Ayrıca Oksaliplatin ve 5-Florourasil kemoretaötik ajanlar ile birlikte kullanım (kemosensitizasyon) etkinliği araştırılacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Caco-2 hücre hattı (ATCC,HTB-37), Tripsin/EDTA (Lonza, BE02-007E), FBS standart (Lonza, DE14-801F), DMEM hücre besiyeri (Lonza, BEI 2-169F), %1 Penisilin/streptomisin 10000units/ml(Lonza, DE I 7-602E), %1 Non-essential aminoasit(100X) (Lonza, BE13-114E), Sodyum piruvat solusyonu 100mM (Lonza, BE13-115E), DMSO (Sigma-Aldrich, D2650-5X10), Ethanol (JT Baker, 8006.2500), PathScan Inflammation Multi-Target Sandwich ELISA kiti (cell signaling, 7276), PathScan Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA kiti (cell signaling, 7105S), Kaspaz-8 kolorimetrik Kiti (Millipore, APT171), Kaspaz-9 kolorimetrik kiti (Millipore, APT173), COX-2 sandwich ELISA kiti (CST-E product, 7291S), Rutin trihydrate 97% (alfaAesar, A13570), 5 Florourasil 1000mg/20ml (Fluorouracil, Koçak Farma, E1919-02), Oxaliplatin 5mg/ml (Eloxatin, Sanofi Aventis, 333303), PBS (Lonza, BE17-516F), Etidiyum bromür (Fisher, BD102-1), Agaroz (Lonza, 50002), Triton X-100 (Fisher, BP151-500), SDS (Fisher, BP166-500), 100bp DNA marker (NEB, N0467S), Apoptotik DNA ladder kit (Millipore, APT151), BSA (CST-E product, 9998S), Propanol (JT Baker, 8067.2500), Mycozap antifungal spray (Lonza, VZA-2001), Zefirolium.

2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Serolojik steril pipetler, 1 ml (SARSTEDT, 86.1251.001), Serolojik steril pipetler, 5 ml (SARSTEDT, 86.1253.001), Serolojik steril pipetler, 10 ml (SARSTEDT, 86.1254.001), Steril tüpler , 15 ml (SARSTEDT, 62.554.502), Steril tüpler , 50 ml (SARSTEDT, 62.547.254), Flask T-75 (SARSTEDT, 83.1813.002), Flask T-175 (SARSTEDT, 83.1812.002), 96 kuyucuklu plate (SARSTEDT, 83.1835), Cryo tüp 2 ml (Biosigma, N40.3683), Lam (Marienfeld, C100000), Lamel (Marienfeld,

C911040), Neubaure hemositometre (Marienfeld, 0630010), 1000µl pipet ucu (BIOHIT, 791004), 200 µl pipet ucu (FL, 28052), 10µl Filtreli pipet ucu (BIOHIT, 790011F), 0,2 S PAT enjektör filter (SARSTEDT, 83.1826.001), 0,45 S PAT enjektör filter (SARSTEDT, 83.1826), 5 ml mikrosantrifüj tüpü (Bioplastic, B74011), 2 ml eppendorf tüp (Bioplastic, B71420), Aloe veralı pudrasız eldiven (Yerli, Aloepdrsz-M), Maske (Yerli, Mask), Steril tek kullanımlık önlük (Yerli, Onlk), Cam balon joje 1000 ml (Isolab), Cam balon joje 100 ml (Isolab), Mezür 1000 ml (Isolab), Mezur 100 ml (Isolab), Beher 1000 ml (Isolab), Spatül 200 g (Isolab).

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Laminar akımlı kabin (Holten, 1,8), İnvirt Mikroskop (Olympus, CKX41), Floresan mikroskop (Leica, CME), CO₂'li inkubatör (Sanyo, MCO-18AIC), Buzdolabı (Ariston), -80°C derin dondurucu (Sanyo, MDF-03386S), Sterilizatör (Biosan, UV-cleaner UVC), Su arıtma cihazı (ultrasaf su) (Millipore, Synergy 185), Su banyosu (ısıtmalı) (Nüve, BM402), ELISA spektrofotometrik cihazı (Tecan, Sunrise), Yatay elektroforez tankı (Hoefer, SE600), Mikrodalga fırın (Kenwood), Pipet 1000µl (Gilson, Pipetman), Pipet 100µl (Gilson, Pipetman), Pipet 10µl (Gilson, Pipetman), Kırık buz makinesi (Frocchetti, AF-100), Santrifüj (Sigma, 3K30), Güç kaynağı (Conset, E815), Vorteks (Biosan, Biovortex VI), UV jel görüntüleme (Kodak, Gel logic 200), Transluminatör (Herolab, UVT-20M), Hassas terazi (Shimadzu, AUW320).

2.2. Yöntem

2.2.1. Caco-2 Hücre Kültürünün Hazırlanması

Çalışmada Kolon kanseri hücre hattı Caco-2 (Colon Adeno Carcinoma Cell) kullanılmıştır.

Caco-2 hücreleri, %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 esansiyel olmayan amino asit içeren DMEM besi ortamı içerisinde, 37°C'de %5

karbondioksit (CO₂) varlığında hücre kültürü inkubatoründe ve T75 cm² lik filtre kapaklı hücre kültürü üretme flaskında üretildi.

Her gün hücrelerin canlılıkları ve çoğalma hızları invert mikroskop ile takip edilip ve hücrelerin gereksinimlerine bağlı olarak 2-3 günde bir besiyeri değiştirildi.

Çoğalan hücreler kültür kabının yüzeyini kapladıktan (konfluent) sonra 75 cm²'lik kültür kaplarına pasajlanmış ve hücreler bu kültür kaplarında çoğaltılmaya devam edilmiştir. Yeterli hücre yoğunluğuna sahip flasklar içindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve kültür kabının hücre bulunan yüzeyi 1X PBS ile yıkanmıştır. 75 cm²'lik kültür kaplarına 3 ml Tripsin-EDTA eklenmiş ve hücreler 5 dakika inkübe edilmiştir. 5 dakika sonunda kültür kabının yüzeyinden ayrılan hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alınmış, üzerine 5 ml besi yeri ilave edilmiş ve 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış, pellet 13 ml besi yeri ile resüspanse edilmiş ve 75 cm²'lik kültür kaplarına alınarak inkubatorde büyümeye bırakılmıştır. 75 cm²'lik kültür kabında yüzeyi kaplayan hücreler deneyler için gerekli hücre sayısına bağlı olarak 1:2, 1:3 oranında seyreltilerek pasajlanmıştır. Son pasajlarda hücrelerin bir kısmı stok olarak saklanmak üzere %10 dimetilsülfoksit (DMSO), %20 FBS içerecek şekilde cryo tüplere aktarılmış ve -80°C'de saklanmıştır.

2.2.2. MTT hücre canlılık testi

MTT(3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid), hücelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir (Alley ve ark., 1988). Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir (Abe ve Matsuki, 2000).

Yeterli yoğunluğa ulaşan 75cm²'lik flasklardaki Caco-2 hücreleri Tripsin-EDTA eklenip santrifüj edildi. FBS içermeyen besiyeri eklenerek ependorf tüpe alındı. Trypan mavisini ile karıştırıp sulandırıldı. Daha sonra lam üzerine alınıp invert mikroskopta sayıldı. 75cm²'likflasklarda yeterli yoğunlukta (%70-%80) olan Caco-2 hücre sayısı $1,67 \times 10^6$ /ml oranında hesaplandı.

MTT Proliferasyon Yöntemi 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. Uygun ortamda çoğaltılan hücreler her kuyucukta 5×10^4 hücre/100 µl olacak şekilde Caco-2 hücreleri ekilmiş ve kuyucuklara hücrelerin homojen bir biçimde yayılması

sağlanmıştır. Bu hücreler 37°C’de, %5 CO₂’li inkubatörde 24 saat bekletildi. Süre sonunda 96 kuyucuklu plakaya kaplanan hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak farklı konsantrasyonlarda 5-florourasil, Oksaliplatin, Rutin, 5-florourasil+Oksaliplatin, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin içeren 100 µl besiyerleri şu şekilde eklenmiştir:

Kontrol, 3,125 mg/ml; 6,25 mg/ml; 10 mg/ml; 12,5mg/ml, 25 mg/ml konsantrasyonunda 5-florourasil , 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,312 mg/ml, 0,156 mg/ml, 0,078 mg/ml, 0,039 mg/ml, 0,0195 mg/ml, 0,0097 mg/ml konsantrasyonunda Oksaliplatin , 2000 µM, 1500 µM, 1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 50 µM, 10 µM, 1 µM konsantrasyonunda Rutin , 3,125 mg/ml 5FU+0,156 mg/ml OX; 6,25 mg/ml 5FU+0,312 mg/ml OX; 10 mg/ml 5FU+0,625 mg/ml OX; 12,5mg/ml 5FU+1,25 mg/ml OX, 25 mg/ml 5FU+2,5 mg/ml OX konsantrasyonunda 5-florourasil+ Oksaliplatin , 125 µM Rutin ile birlikte 5-florourasil dozları, 125 µM Rutin ile birlikte Oksaliplatin dozları ve 125 µM Rutin ile birlikte 5-florourasil+ Oksaliplatinin dozları uygulandı.

Uygulamadan sonraki 24. saatte ilgili plak etüvden çıkarılmış üzerindeki besiyeri alınarak her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri MTT solusyonu karışımı eklenmiştir (90 µl besiyeri + 10 µl 5mg/ml MTT solüsyonu) ve 2 saat 37°C’de, %5 CO₂’li etüvde bekletilmiştir. 2 saat sonunda Formazan kristallerinin çözülmesi amacıyla bütün kuyucuklara 100 µl çözücü solusyon (SDS) eklenmiş ve 3 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaktaki hücrelerin canlılık ölçümü spektrofotometre cihazında 570 nm’de yapılmıştır. Aynı protokol 48. ve 72. saatlerde de uygulanmış ve absorbans verileri elde edilmiştir.

2.2.3. kaspaz-8 kolorimetrik analizi

Kaspaz-8 analizleri “Caspase-8 colorimetric assay (Millipore, APT171)” kiti ile gerçekleştirildi.

Testten önce Caco-2 hücreleri $0,5-2 \times 10^6$ sayıda hazırlandı. Bu hücreler 10 dk 1500 rpm’de santrifuj edilip ve lizis tampon ile sulandırıldı (50-500µl) ve 5 dk 1000 g’de santrifuj edildikten sonra süpernatant eppendorf tüpe alınıp buza konuldu ve daha sonra 96 kuyucuklu plaklara, kit solusyonları ve hazırladığımız örnekler Çizelge 2.1.’e göre eklendi.

Çizelge 2.1.Kaspaz-8 Analiz Tablosu

| Örnek | 5xÖrnek tampon | Kaspaz-8 Örneği | H ₂ O | Kaspaz-8 substrat | Toplam volüm |
|----------------|-------------------|--------------------|------------------|----------------------|-----------------|
| Tampon blank | 20 µl | 0 µl | 80 µl | 0 µl | 100 µl |
| Substrat blank | 20 µl | 0 µl | 70 µl | 10 µl | 100 µl |
| Test Örneği | 20 µl | x µl | (70-x) µl | 10 µl | 100 µl |

Belirlenen şekilde hazırlanan plaka 37°C’de 1-2 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda mikroparka okuyucuda 405 nm dalgaboyunda optik dansiteler okundu.

2.2.4. kaspaz-9 kolorimetrik analizi

Kaspaz-9 analizleri “Caspase-9 colorimetric assay (Millipore, APT173)” kiti ile gerçekleştirildi. Kontrol, rutin, oksaliplatin, 5-florourasil ve bunların kombinasyonları uygulamaları yapılan Caco-2 hücreleri 48 saat inkubasyon süresi sonunda hazırlanıp pellet haline getirildi. Bu hücreler lizis tampon ile sulandırıldı (50-500µl) ve 10 dk buz içerisinde bekletildi. Daha sonra 10000 g’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant eppendorf tüpe alınıp buza konuldu. Ardından 96 kuyucuklu plaklara, kit solusyonları ve hazırladığımız örnekler aşağıdaki tabloya göre eklendi.

Çizelge 2.2. Kaspaz-9 Analiz Tablosu

| Örnek | 5xÖrnek tampon | Kaspaz-9 Örneği | H ₂ O | Kaspaz-9 substrat | Toplam volüm |
|----------------|-------------------|--------------------|------------------|----------------------|-----------------|
| Tampon blank | 20 µl | 0 µl | 80 µl | 0 µl | 100 µl |
| Substrat blank | 20 µl | 0 µl | 70 µl | 10 µl | 100 µl |
| Test Örneği | 20 µl | x µl | (70-x) µl | 10 µl | 100 µl |

Belirlenen şekilde hazırlanan plaka 37°C’de 1-2 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda mikroparka okuyucuda 405 nm dalgaboyunda optik dansiteler okundu.

2.2.5.İnflamasyon ve apoptozis belirteçleri analizi için Hücre lizatı hazırlaması

Daha önceden kontrol, Rutin, Oksaliptatin, 5-florourasil ve bunların kombinasyonları uygulamaları yapılan Caco-2 kolon kanseri hücreleri 48 saat inkubasyon süresi sonrasında mediumları uzaklaştırılmış ve buzda soğutulmuş PBS ile bir kez yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 0,5 ml buzda soğutulmuş Cell Lysis Buffer ilave edilmiş ve 5 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Sonra hücre kazıyıcıları ile hücreler flasktan kaldırılmış ve küçük tüplere aktarılmıştır. Tüpler buz içinde sonikatörde lize edilmiştir. 10 dk 4°C’de santrifuj edilerek süpernatant tüpe aktarılarak analizde kullanılmıştır. Her bir uygulama 3kez tekrarlanmış ve hücre lizatları hazırlanmıştır.

2.2.5.1.Sandwich ELISA yöntemi

Apoptozis ve inflamasyon belirteçleri sandwich ELİSA yöntemi ile ölçülmüştür. Polistren ölçüm tüplerinin iç duvarına antijen için spesifik antikorlar fazla miktarda adsorbe edilmiştir (immobilize antikorlar). Ölçüm tüpüne örnek pipetlenir. İnkübasyon süresince örnekteki antijenlerin hepsi immobilize antikorlar tarafından bağlanırlar; antikor- antijenkompleksleri oluşur. Yıkama ile antikor-antijenkompleksleri dışındaki maddeler ortamdandan uzaklaştırılır. Ölçüm tüpüne reaktif (enzim işaretli antikor içerir) pipetlenir. İkinci inkübasyon süresince primer antikor-antijen-enzim işaretli antikorkompleksi oluşur. Yıkama ile primer antikor-antijen-enzim işaretli antikorkompleksi dışındaki maddeler ortamdandan uzaklaştırılır. Enzimin substratı ortama eklenir. Renkli ürün oluşumu end-point ölçülür. Renkli ürün oluşumu, işaretsiz ligandın (serumdaki antijen veya antikor) konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

2.2.6. İnflamasyon belirteçleri analizi

İnflamasyon belirteçleri “PathScan Inflammation Multi-Target Sandwich ELISA” kiti ile analiz edilmiştir (K. no 7276).

2.2.6.1. Test prosedürü

Hücre lizatı hacmi kadar Sample Diluent (hücre Sulandırma tamponu) ilave edilen örneklerden 100µl NFκB p65, Phospho-NFκB p65, Phospho-SAPK/JNK, Phospho-p38, Phospho-Stat3, Phospho-IκB-α antikorlarla kaplı mikrotiplere pipetlenmiştir (1:1 süpernatant sulandırılmıştır). 4°C’de 1gece inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonrası plak içeriği dökülmüş ve 4 kez yıkama buffer ile yıkanmıştır. Son yıkamayı takiben iyice kuruttuktan sonra her analiz için uygun 100µl tesbit antikor (Detection Antibody) ilave edilip üzeri kapatılarak 1 saat 37°C’de inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası yıkama işlemi yapılmıştır (4 kez). Son yıkama işlemini takiben yine her analiz için uygun olan HRP bağlı ikinci antikordan 100µl ilave edilip 30 dk 37°C’de inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası yıkama işlemi yapılmıştır (4kez). Yıkamayı takiben 100µl TMB substrat ilave edilerek 10 dk 37°C’de inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası 100µl stop solusyonu ilave edilerek 450nm’de 30dk içinde ELİSA okuyucuda optik dansiteleri okunmuştur.

2.2.7. Apoptozis belirteçleri analizi

Apoptozis belirteçleri “PathScan Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA” kiti ile analiz edilmiştir (K. no 7105S).



Şekil2.1. Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA analiz kiti
(<http://www.cellsignal.com/products/elisa-kits>)

2.2.7.1. Test prosedürü

Daha öncede hazırlanan Hücre lizati, hacmi kadar Sample Diluent (hücre Sulandırma tamponu) ilave edilen örneklerden 100 µl Phospho-p53, p53, Cleaved Caspase 3, Cleaved PARP, Phospho-Bad, Bad antikorlarla kaplı mikrolatlara pipetlenmiştir (1:1 süpernatant sulandırılmıştır). 4°C’de 1gece inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonrası plak içeriği dökülmüş ve 4kez yıkama buffer ile yıkanmıştır. Son yıkamayı takiben iyice kuruttuktan sonra her analiz için uygun 100µl tesbit antikoru (Detection Antibody) ilave edilip üzeri kapatılarak 1 saat 37°C’de inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası yıkama işlemi yapılmıştır (4 kez). Son yıkama işlemi takiben yine her analiz için uygun olan HRP bağlı ikinci antikorden 100µl ilave edilip 30 dk 37°C’de inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası yıkama işlemi yapılmıştır (4kez). Yıkamayı takiben 100µl TMB substrat ilave edilerek 10dk 37°C’de inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası 100µl stop solusyonu ilave edilerek 450nm’de 30 dk içinde ELİSA okuyucuda optik dansiteleri okunmuş ve kontrol grubuna göre değişimler değerlendirilmiştir.

2.2.7.2. Cox2 analizi

Cox2 analizleri “Total Cox2 Sandwich ELISA” kiti ile gerçekleştirilmiştir (Kat no. 7291).

Daha öncede hazırlanan hücre lizati, hacmi kadar Sample Diluent (hücre Sulandırma tamponu) ilave edilen örneklerden 100 µl mikrolatlara pipetlenmiştir (1:1 süpernatant sulandırılmıştır). 4°C’de 1gece inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonrası plat içeriği dökülmüş ve 4kez yıkama buffer ile yıkanmıştır. Son yıkamayı takiben iyice kuruttuktan sonra 100µl tesbit antikoru (Detection Antibody) ilave edilip üzeri kapatılarak 1 saat 37°C’de inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası yıkama işlemi yapılmıştır (4 kez). Son yıkama işlemi takiben HRP bağlı ikinci antikordan 100µl ilave edilip 30 dk 37°C’de inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası yıkama işlemi yapılmıştır (4kez). Yıkamayı takiben 100µl TMB substrat ilave edilerek 10 dk 37°C’de inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası 100µl stop solusyonu ilave edilerek 450nm’de 30dk içinde ELİSA okuyucuda optik dansiteleri okunmuştur.

2.2.8. DNA ladering

2.2.8.1. Agaroz Jelin hazırlanışı

Beher içerisine 100 ml 1X TBE tampon alınıp ve 1g toz agaroz üzerine eklendi. Bu karışımın erimesi için 3 dk mikrodalga fırında kaynatıldı. Beherin dış yüzeyi soğutulularak jelin soğuması sağlandı. Jelin katılaşmasına izin verilmeden 3,5 µl etidyum bromür eklenip iyice karıştırıldı. Daha sonra jel tankına döküldü ve elektroforez tarağı takılarak donmaya bırakıldı. Donan jel elektroforez tankına yerleştirildi ve 1 x TBE tamponu tanka dolduruldu.

Bu analiz “Apoptotic DNA Ladder Detection” kiti ile gerçekleştirilmiştir (Kat no. APT151). Oluşturduğumuz hücre peletleri PBS ile yıkanıp 5 dk 5000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldıktan sonra 40 µl lizis solusyonu kullanıldı. Daha sonra 5’er µl enzim A (RNase A), enzim B (Proteinase K) eklendi ve 30 dk 50°C’de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası her örneğe 5 µl amonyum asetat uygulandı ve -20°C’de 10 dk bekletildi. DNA presipitasyon için yüksek hızda 10 dk santrifüj edildi ve %1 agaroz jele yüklendi.

Örnekler 100 voltta 90 dk yürütüldü ve daha sonra jel görüntüleme cihazında görüntülenerek kaydedildi.

2.2.9. İstatistik analiz

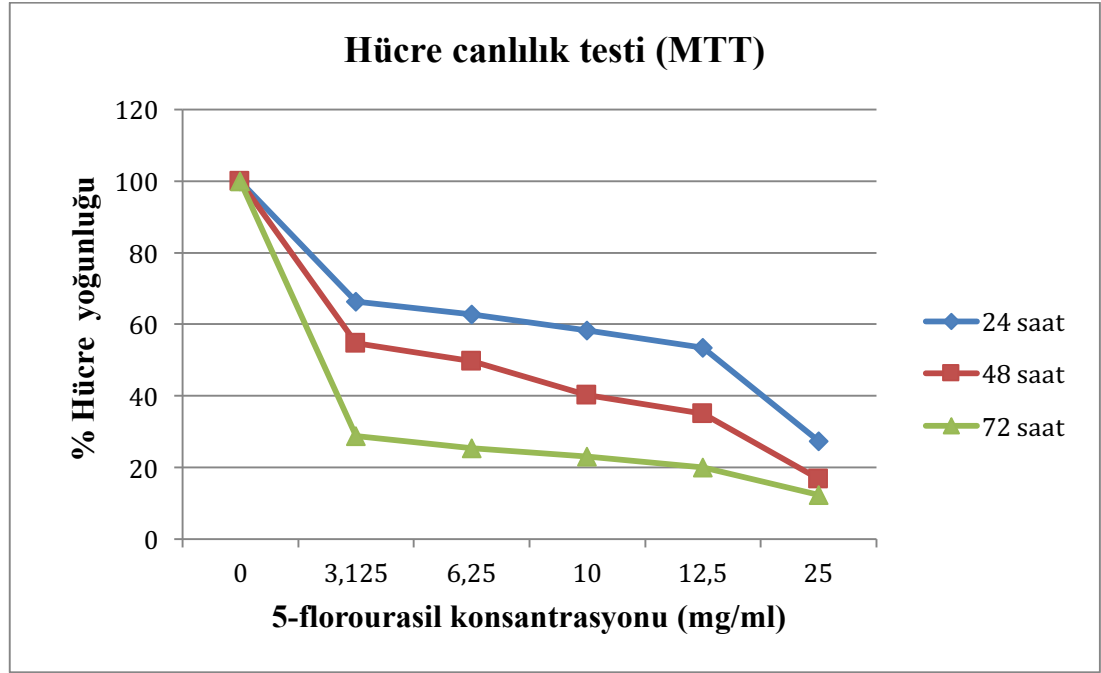
Çoklu karşılaştırmalarda Kruskal Wallis, ikili karşılaştırmalarda Benforonni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır (Sümbüloğlu, 2012).

3. BULGULAR

3.1. Caco-2 Hücrelerinde sitotoksosite ve hücre canlılık testi

3.1.1. 5-florourasilin Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkisi

Kontrole göre farklı dozlarda 5-florourasilin 24, 48 ve 72 saatlik inkubasyon sonrası kolon kanser hücrelerinde canlılık testi sonuçları Şekil 3.1.'de verilmiştir. 5-florourasil'in 24 saatlik inkubasyon sonucunda Caco-2 hücre hatlarındaki hücre canlılıkları 3,125; 6,25; 10; 12,5 ve 25 mg/ml 5-florourasil konsantrasyonlarında sırasıyla %66,32; %62,71; %58,31; %53,38 ve %27,27 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.1. 5-florourasil uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları (5FU=5-florourasil)

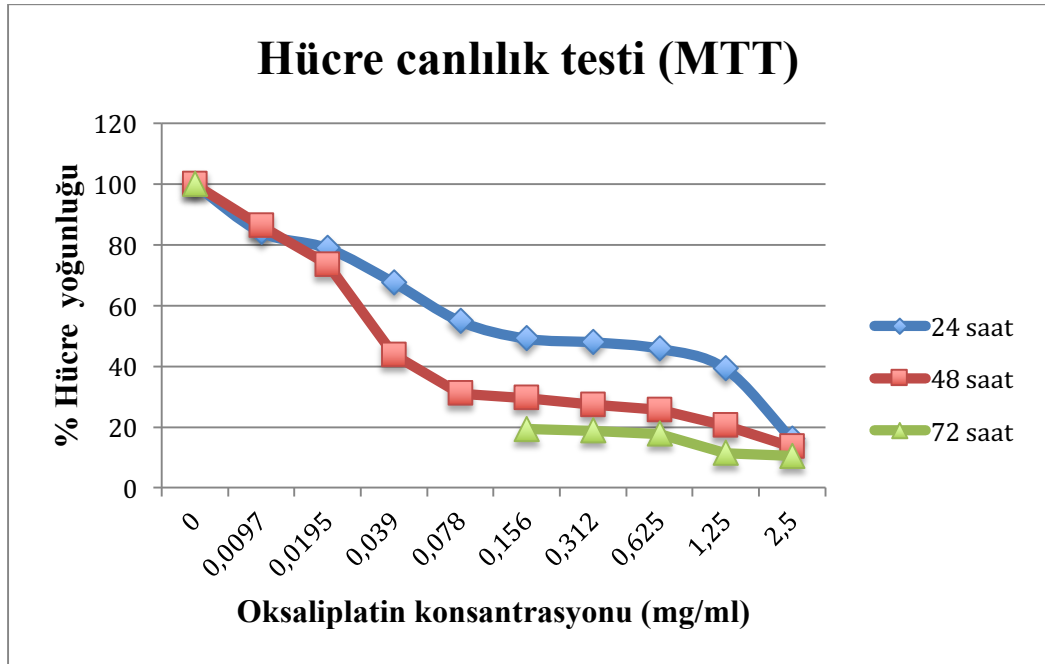
5-florourasil'in farklı dozlarının Caco-2 hücrelerinde 48 saat inkubasyon sonucu kontrol grubuna göre hücre canlılığı belirgin azalma göstermiştir ve artan 5-florourasil dozlarında hücre canlılığı oranları sırasıyla %54,77; %49,78; %40,26; %35,07; %16,81 olarak belirlenmiştir.

72 saat süreli inkubasyonda kontrole göre farklı dozlarda 5-florourasil'in Caco-2 hücre hatlarındaki canlılık oranı artan doza (3,125; 6,25; 10; 12,5; 25 mg/ml 5FU) bağımlı olarak sırasıyla %28,72; %25,34; %23,03; %20,07; %12,39 olarak bulunmuştur.

Caco-2 hücrelerinde 5-florourasil'in 24, 48 ve 72 saatlik inkubasyon sonrasında elde edilen sonuçlara göre, 48 saatlik uygulamalarda optimal sonuçlar elde edildiği için apoptozis ve inflamasyon belirteçlerinin analizlerinde 48 saatlik inkubasyon süresi uygulanmış ve IC₅₀ değeri 6,25 mg/ml olarak belirlenmiştir.

3.1.2. Oksaliptatinin Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkisi

Oksaliptatinin 0,0097 mg/ml ile 2,5 mg/ml arasındaki farklı konsantrasyonlarının Caco-2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat inkubasyon sonucunda elde edilen hücre canlılık testi sonuçları Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Oksaliptatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları (OX= Oksaliptatin)

0,0097 mg/ml; 0,0195 mg/ml; 0,039 mg/ml; 0,78 mg/ml; 0,156 mg/ml; 0,312 mg/ml; 0,625 mg/ml; 1,25 mg/ml ve 2,5 mg/ml Oksaliptatin uygulanan hücrelerdeki canlılık oranı 24 saat inkubasyon sonucu sırasıyla %84,27; %78,96; %67,66; %54,92; %49,21; %48,01; %45,91; %39,28; %16,12 olarak bulunmuştur.

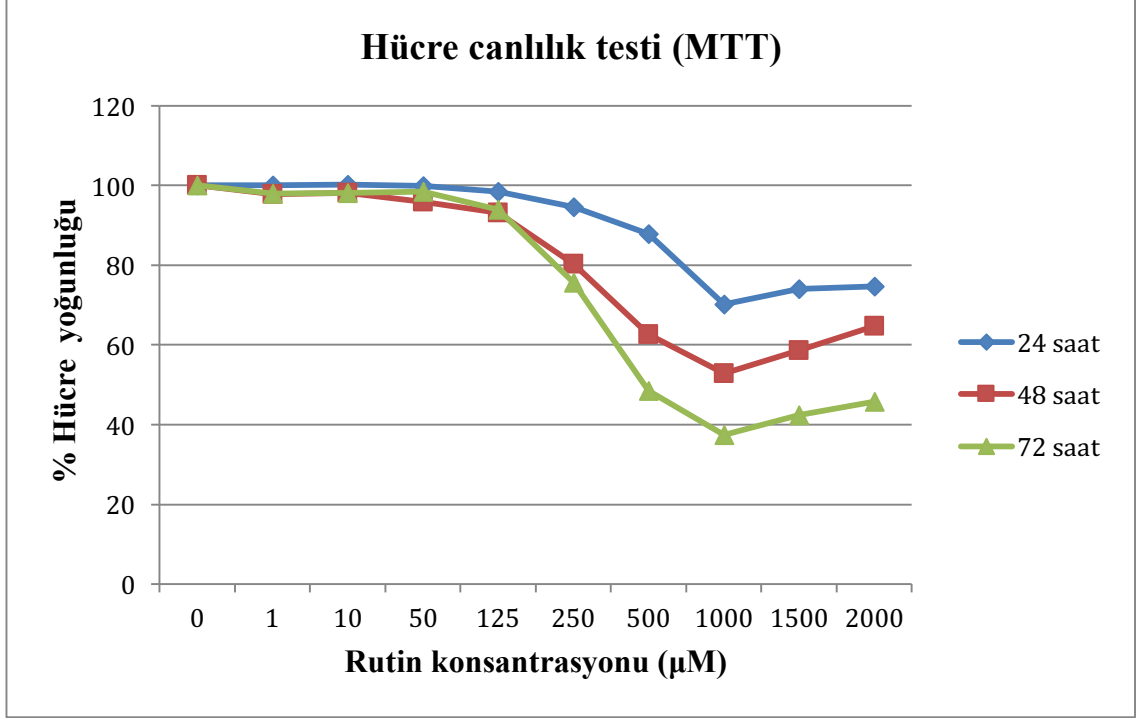
48 saat süreli inkubasyonda doza bağlı (0,0097; 0,0195; 0,039; 0,78; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5 mg/ml) oksaliplatin uygulaması yapılan Caco-2 hücrelerde, hücre canlılığına etkisi artmış ve hücre canlılığı kontrole göre yüzde değerleri sırasıyla %86,26; %73,49; %43,82; %31,03; %29,57; %27,34; %25,67; %20,48; %13,57 olarak tespit edilmiştir.

Oksaliplatinin, 72 saat süreyle inkubasyonunda doza bağlı olarak hücre canlılığını sırasıyla %19,39; %18,78; %17,79; %11,41; %10,49 oranında azaldığı gösterilmiştir (Şekil 3.2.).

İnkubasyon sonucunda optimal sonuçlar 48 saat'te belirlendiği için, bundan sonraki analizlerde 48 saatlik inkubasyon süresi uygulanmıştır. 48 saatlik inkubasyon süresine göre oksaliplatinin IC₅₀ dozu 0,039 mg/ml olarak belirlenmiştir. Apoptozis ve inflamasyon belirteçleri ile ilgili çalışmalar yapılırken 48 saatlik inkubasyonda 0,039 mg/ml oksaliplatin konsantrasyonu kullanılmıştır.

3.1.3. Rutinin Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkisi

Caco-2 hücrelerinde Rutinin 24, 48 ve 72 saatlik MTT testine ait canlı hücre yoğunlukları Şekil 3.3.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM, 1500 µM, ve 2000 µM Rutin uygulanan hücrelerde 24 saat inkubasyon sonucu, canlılık oranı kontrole göre sırasıyla %100,02; %100,21; %99,95; %98,44; %94,62; %87,93; %70,27; %74,09; %74,64 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.3. Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları

Rutin, 48 saat süreyle inkubasyonunda 1 µM, 10 µM, 50 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM, 1500 µM, ve 2000 µM doza bağımlı olarak hücre canlılığını sırasıyla %97,82; %98,13; %95,93; %93,15; %80,27; %62,72; %52,92; %58,59; ve %64,72 oranında azaldığı gözlenmiştir.

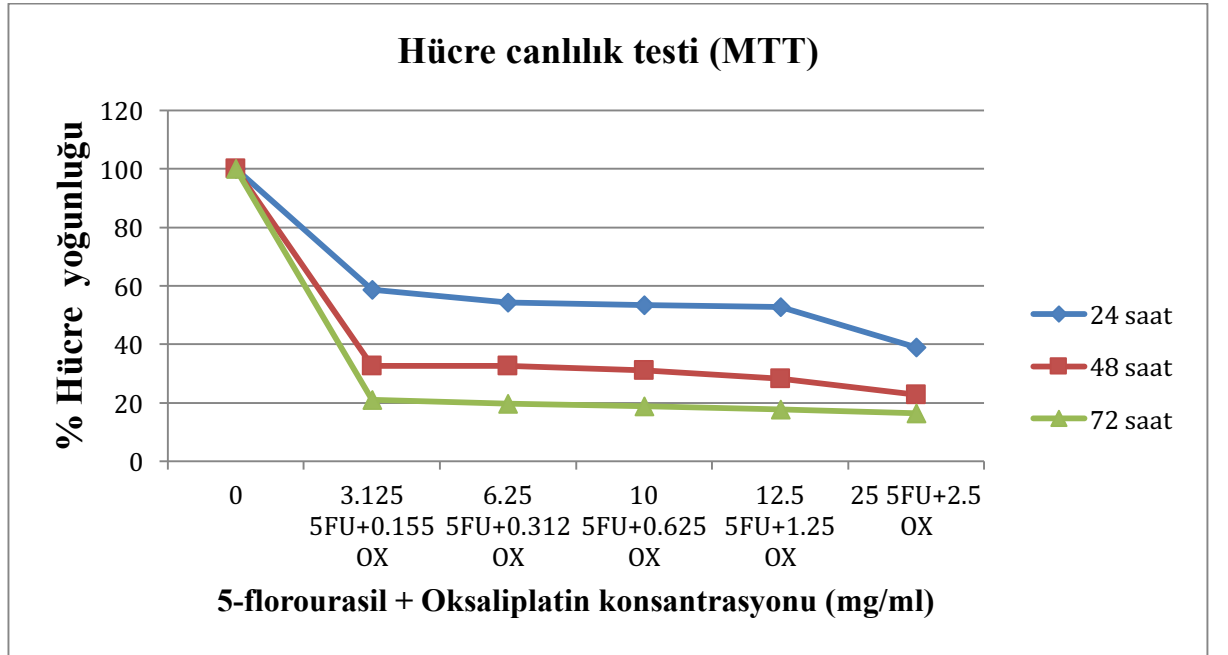
72 saat süreli inkubasyonda kontrole göre farklı dozlarda Rutinin Caco-2 hücre hatlarındaki canlılık oranı artan doza (1, 10, 50, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 µM Rutin) bağlı olarak sırasıyla %97,98; %98,12; %98,50; %94; %75,68; %48,52; %37,39; %42,39; %45,78 olarak bulunmuştur.

5-florourasil ve Oksaliplatinin inkubasyon süresi 48 saat belirlendiği için Rutinde de inkubasyon süresi 48 saat olarak belirlenmiştir. Rutin flavonoidinin IC₅₀ değeri 1000 µM dozda tespit etmemize rağmen çok yüksek konsantrasyonda bulunduğu için 125 µM Rutin dozu apoptozis ve inflamasyon belirteçleri analizlerinde kullanılmıştır. 125 µM Rutin dozu 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda hücre canlılığı üzerinde etkilerinin görüldüğü ilk dozdur.

3.1.4. 5-florourasil ve Oksaliplatinin birlikte uygulamalarında Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkileri

Caco-2 hücrelerine 5-florourasil (3,125; 6,25; 10; 12,5 ve 25 mg/ml) ile Oksaliplatinin (0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5 mg/ml) dozları kombine edilerek uygulanmış. 24, 48 ve 72 saatlik hücre canlılık testi sonuçları Şekil 3.4.'de verilmiştir.

5-florourasil ve Oksaliplatinin, 24 saat süreyle inkubasyonunda (3,125 5FU+0,156 OX; 6,25 5-FU+0,312 OX; 10 5FU+0,625 OX; 12,5 5FU+1,25 OX; 25 5-FU+2,5 OX mg/ml) artan dozlara bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla %58,59; %54,33; %53,47; %52,56; %39,06 oranında azaldığı gözlenmiştir.



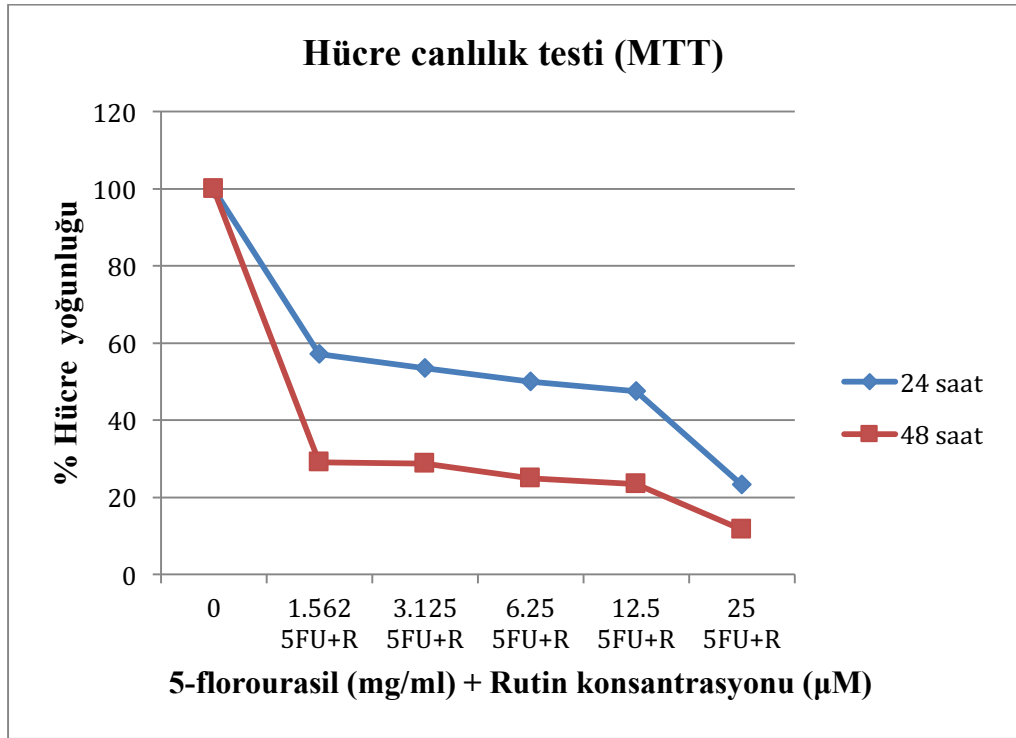
Şekil 3.4. 5-florourasil ve Oksaliplatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları (5FU=5-florourasil , OX= Oksaliplatin)

48 saat inkubasyon sonucunda artan 5-florourasil+Oksaliplatin dozlarında canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %32,68; %32,54; %31,10; %28,29; %22,48 oranında azalmıştır.

72 saat inkubasyon sonucunda artan 5-florourasil+Oksaliplatin dozlarında canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %21,02; %19,72; %18,87; %17,74 ve %16,47 olarak bulunmuştur.

3.1.5. 5-florourasil ve Rutinin birlikte uygulamalarında Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkileri

Kontrole göre farklı dozlarda 5-florourasil ile 125 μ M Rutin dozlarının birlikte 24 ve 48 saatlik inkubasyon sonrası kolon kanser hücrelerinde canlılık testi sonuçları Şekil 3.5.'de verilmiştir. 5-florourasil ve Rutininin, 24 saat süreyle inkubasyonunda (1,562+R; 3,125+R; 6,25+R; 12,5+R ve 25+R mg/ml) hücre canlılığını sırasıyla %57,10; %53,49; %50,05; %47,59 ve %23,26 olarak bulunmuştur.

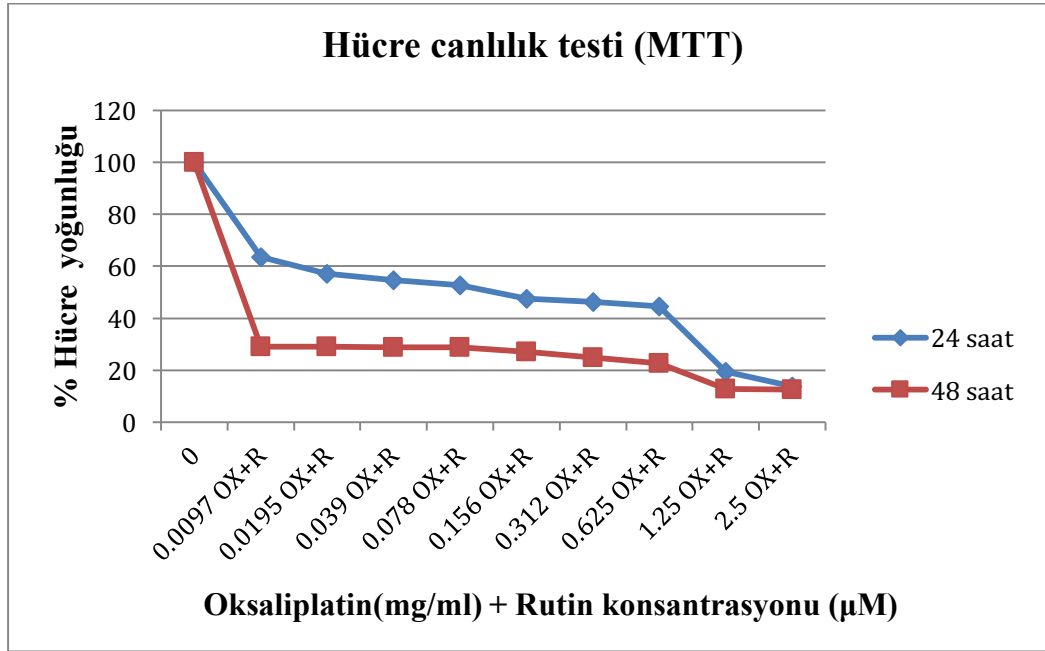


Şekil 3.5. 5-florourasil ve Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları (5FU=5-florourasil , R= Rutin)

5-florourasil ve Rutininin, 48 saat süreyle inkubasyonunda (1,562+R; 3,125+R; 6,25+R; 12,5+R ve 25+R mg/ml) hücre canlılığı sırasıyla %29,14; %28,76; %24,93; %23,51 ve %11,71 olarak tespit edilmiştir.

3.1.6. Oksaliplatin ve Rutinin birlikte uygulamalarında Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkileri

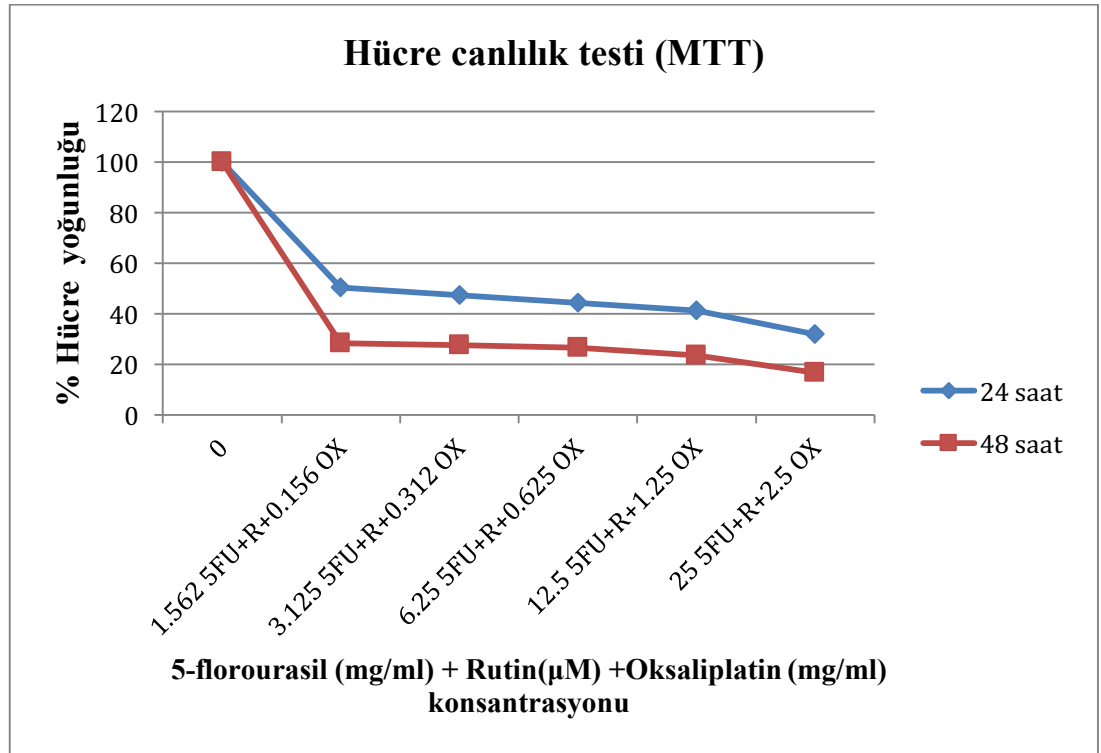
Kontrole göre farklı dozlarda Oksaliplatin ile 125 μ M Rutin dozlarının birlikte 24 ve 48 saatlik inkubasyon sonrası kolon kanser hücrelerinde canlılık testi sonuçları Şekil 3.6.'da verilmiştir. Caco-2 hücrelerine Oksaliplatin (0,0097; 0,0195; 0,039; 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25 ve 2,5 mg/ml) ile Rutin (125 μ M) kombine edilerek 24 saat kültüre edilen hücrelerin canlılık oranı kontrole göre sırasıyla %63,47; %57,20; %54,66; %52,82; %47,63; %46,31; %44,65; %19,57; %13,91 oranında azalırken, 48 saat inkubasyonda %29,05; %29,07; %28,86; %28,81; %27,05; %24,93; %22,61; %12,92; %12,55 oranında azalma görülmüştür.



Şekil 3.6. Oksaliplatin ve Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları (OX= Oksaliplatin, R=Rutin)

3.1.7. 5-florourasil, Oksaliptatin ve Rutinin birlikte uygulamalarında Caco-2 hücre canlılığı üzerinde etkileri

Kontrole göre farklı dozlarda 5-florourasil, Oksaliptatin ile 125 μ M Rutin dozlarının birlikte 24 ve 48 saatlik inkubasyon sonrası kolon kanser hücrelerinde canlılık testi sonuçları Şekil 3.7.'de verilmiştir. Caco-2 hücrelerine 5-florourasil (1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25 mg/ml) Oksaliptatin (0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5 mg/ml) ve Rutinin (125 μ M) kombine edilerek 24 saat kültüre edilen hücrelerin canlılık oranı kontrole göre sırasıyla %50,25; %47,34; %44,29; %41,18; %31,92 oranında azalırken, 48 saat inkubasyonda %28,33; %27,58; %26,55; %23,36; %16,62 oranında azalma görülmüştür.



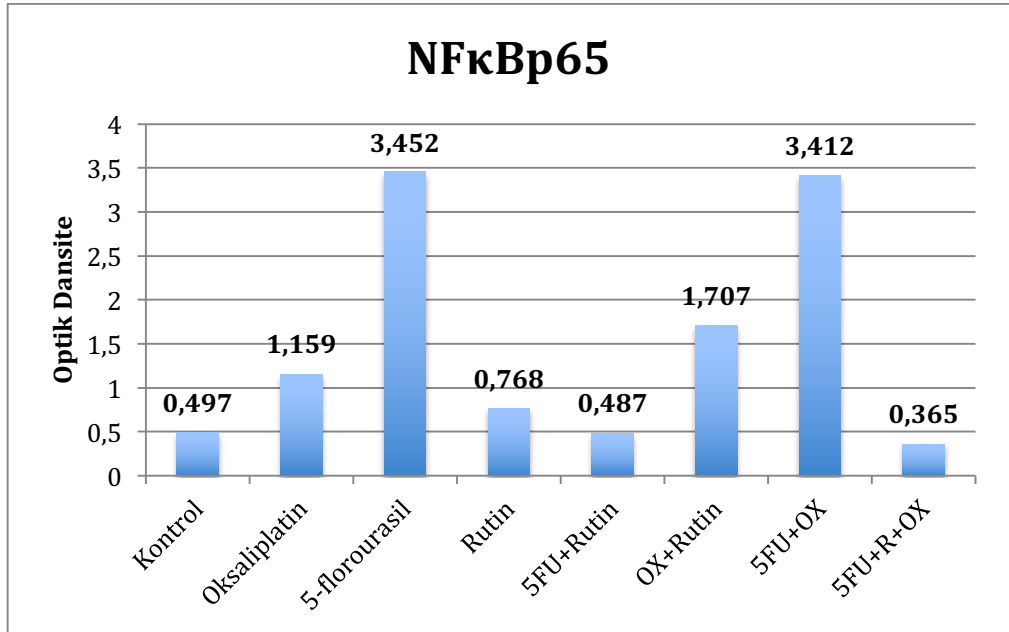
Şekil 3.7. 5-florourasil, Oksaliptatin ve Rutinin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi (MTT) sonuçları (5FU=5-florourasil, OX= Oksaliptatin, R=Rutin)

3.2. Caco-2 hücrelerinde 5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin ayrı ve birlikte kullanımlarında inflamasyon belirteçlerine etkileri

Hücre canlılık testi sonuçlarına göre inkubasyon süresi 48 saat belirlendiğinden inflamasyon belirteçlerinin analizlerinde bu inkubasyon süresi uygulanmıştır.

48 saatlik inkubasyon süresinde 5-florourasil 6,25 mg/ml, Oksaliplatin 0,312 mg/ml dozunda, Rutin ise 125 μ M dozunda uygulanmış ve inflamasyon belirteçlerinin analizi yapılmıştır.

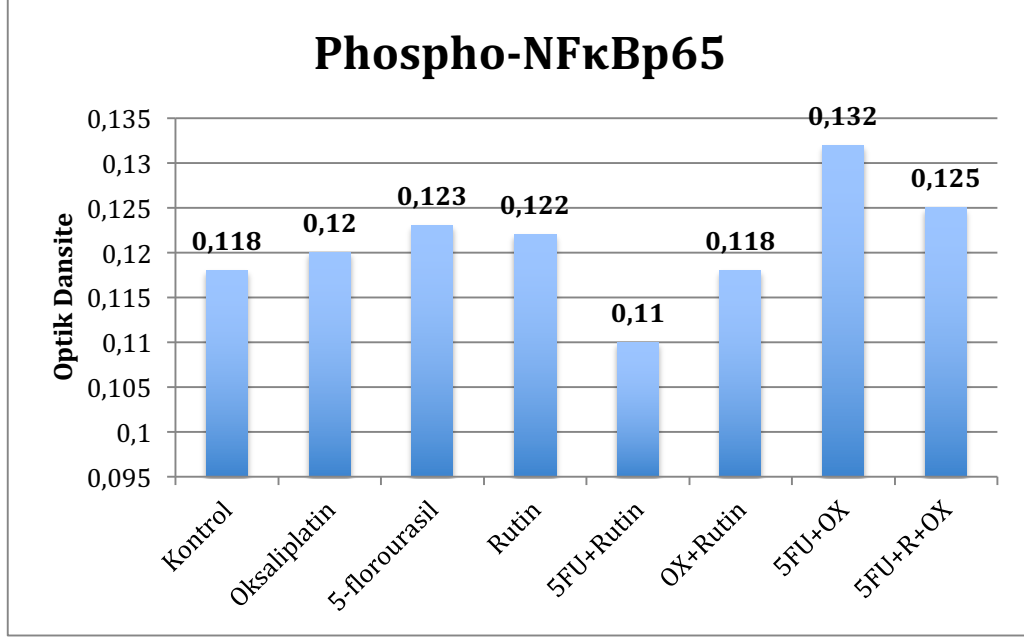
5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin ayrı ayrı ve birlikte Caco-2 hücrelerine 48 saatlik inkubasyon süresince uygulama sonrası analiz edilen inflamasyon belirteçleri ile ilgili sonuçlar Şekil 3.8., Şekil 3.9., Şekil 3.10. , Şekil 3.11., Şekil 3.12., Şekil 3.13.'de verilmiştir. İnflamasyon belirteçlerinde NF κ B65, Phospho-NF κ Bp65, Phospho-SAPK/JNK, Phospho-p38, Phospho-Slat3 ve Phospho-1 κ B- α analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.8. NF κ B p65 düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

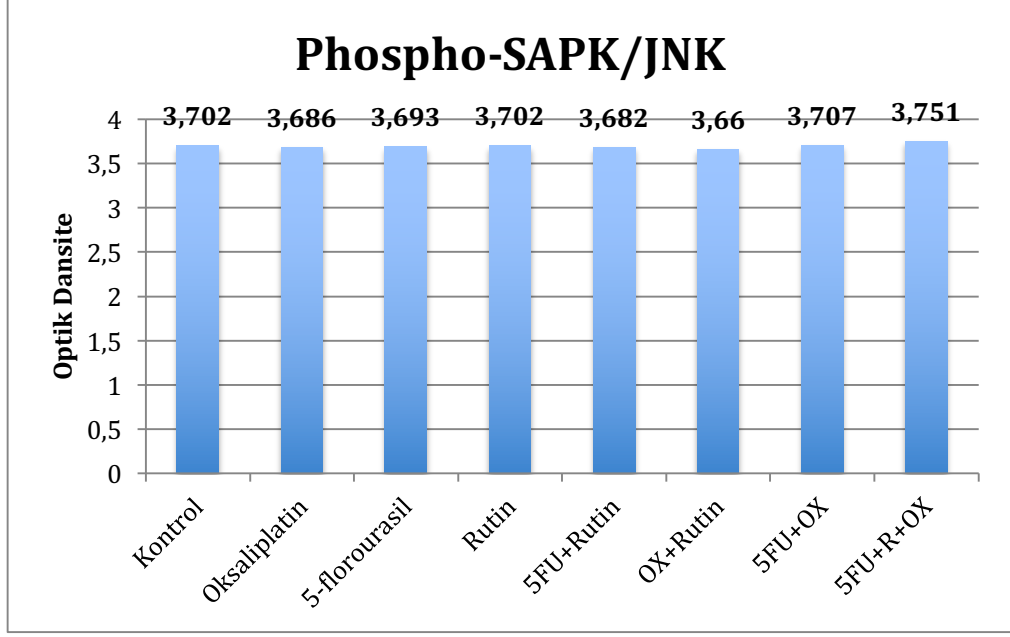
5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı Caco-2 hücrelerinde NF κ B p65 düzeyleri 5-florourasil+Rutin ve hepsinin birlikte uygulamaları kontrol grubuna göre farklılık göstermemektedir. Oksaliplatin tek başına uygulandığında kontrol grubu hücrelere göre 2,3 kat yükselmiştir. 5-

florourasil tek başına ve Oksaliplatin ile birlikte kullandığında NFκB p65 düzeyleri kontrole göre sırasıyla 6,9 ve 6,8 kat yükselmiştir. Rutin tek başına uygulandığında kontrol grubu hücrelere göre 1,5 kat yükselmiştir, Oksaliplatin ile birlikte uygulandığında 3,4 kat artmıştır (Şekil 3.8.).



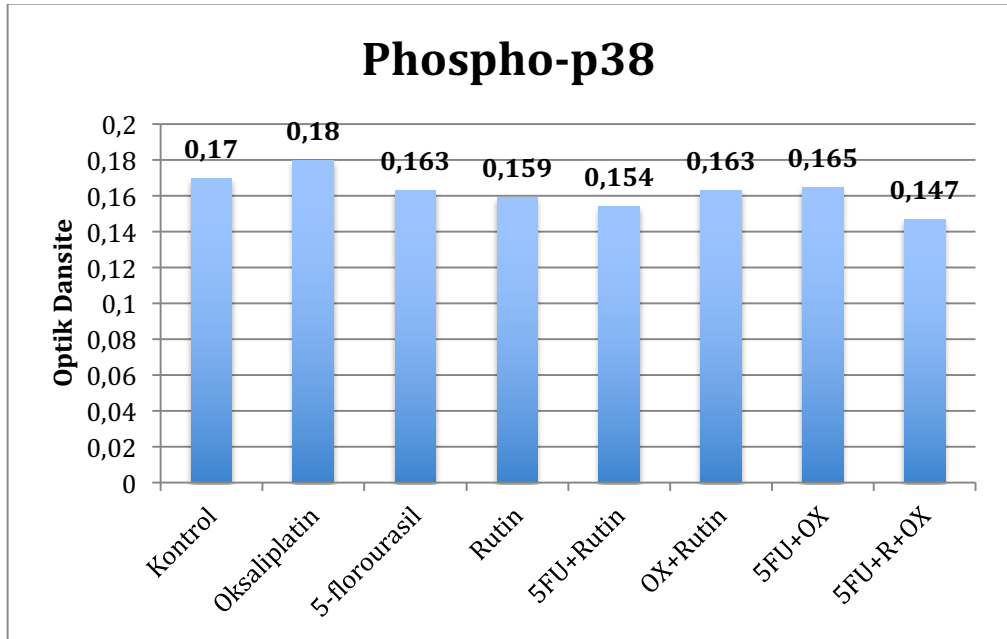
Şekil 3.9. Phospho-NFκB p65 düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

Şekil 3.9.'de gösterildiği gibi Oksaliplatin, 5-florourasil, Rutin, Oksaliplatin+ Rutin ve hepsinin birlikte uygulamaları Caco-2 hücrelerinde Phospho-NFκB p65 düzeyleri kontrol gruba göre farklılık göstermemektedir. Phospho-NFκB p65 düzeyleri 5-florourasil+Rutin uygulanan hücrelerde kontrole göre azalmıştır (0,93). 5-florourasil+ Oksaliplatin uygulanan hücrelerde ise Phospho-NFκB p65 düzeyleri kontrole göre artmıştır (1,12 kat).



Şekil 3.10. Phospho-SAPK/JNK düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

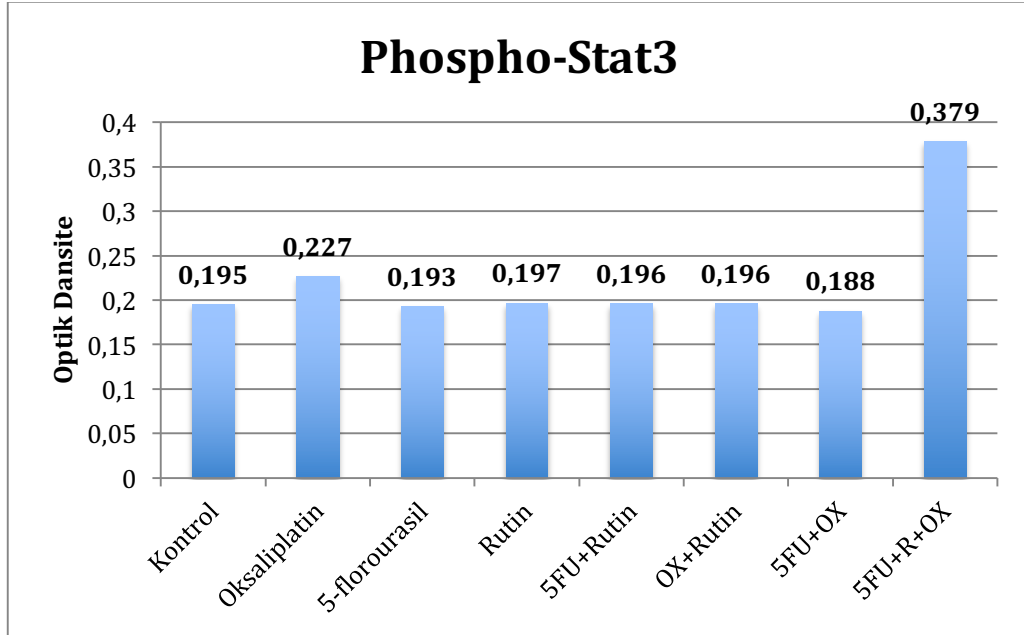
Şekil 3.10.'de gösterildiği gibi 5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin birlikte uygulandığı Caco-2 hücrelerinde Phospho-SAPK/JNK düzeyleri kontrol grubuna göre 1,013 kat oranında artarken diğer gruplarda Phospho-SAPK/JNK düzeyleri kontrol gruba göre farklılık göstermemektedir.



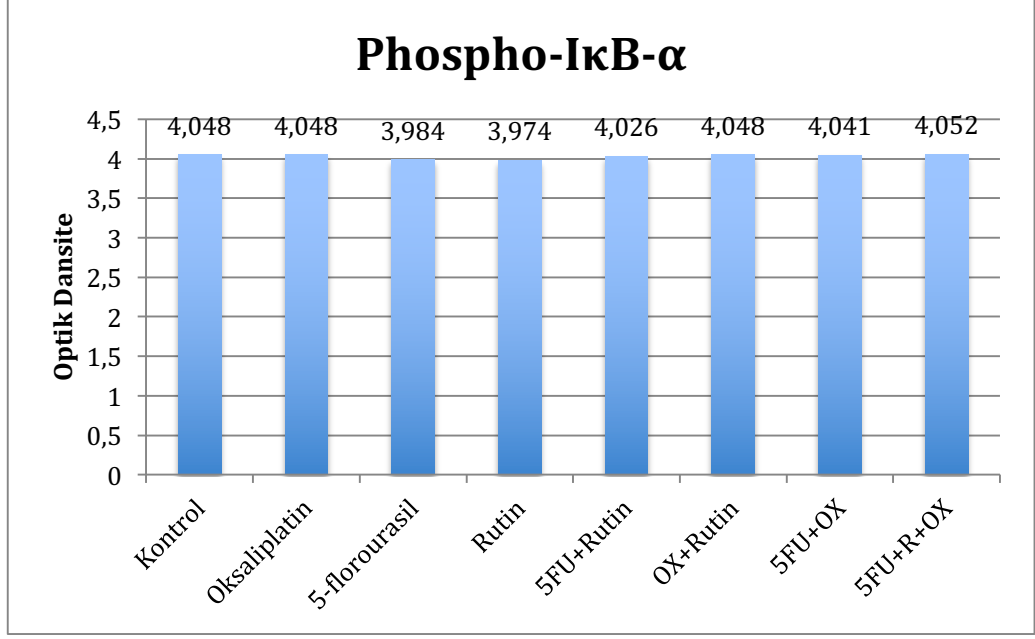
Şekil 3.11. Phospho-p38 düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

5-florourasil, Rutin, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, 5-florourasil+Oksaliplatin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde Phospho-p38 düzeyleri kontrole göre sırasıyla 0,95; 0,93; 0,90; 0,95; 0,97 ve 0,86 kat azalırken, Oksaliplatinin tek başına uygulandığı hücrelerde 0,59 kat artış görüldü.

Şekil 3.12.'de gösterildiği gibi Oksaliplatinin tek başına ve 5-florourasil ve Rutin ile birlikte uygulandığı Caco-2 hücrelerinde Phospho-Stat3 düzeyleri kontrol grubuna göre sırasıyla 1,17 ve 1,94 kat oranında artarken diğer gruplarda Phospho-Stat3 düzeyleri kontrol gruba göre farklılık göstermemektedir.



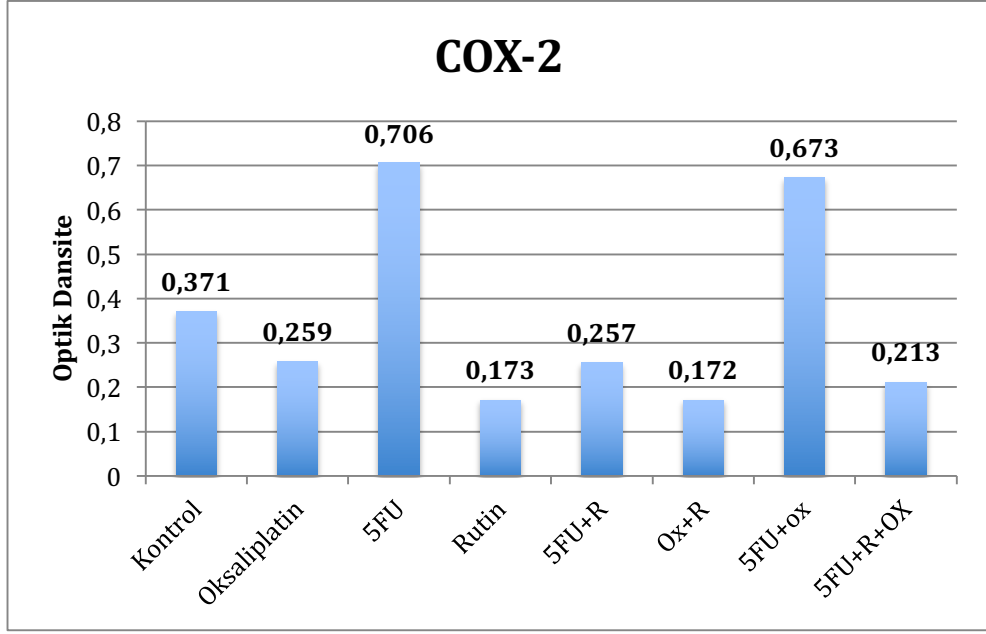
Şekil 3.12. Phospho-Stat3 düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)



Şekil 3.13. Phospho-I κ B- α düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

Caco-2 hücrelerinde 5-florourasil ve Rutinin tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre Phospho-I κ B- α düzeylerinde azalma görüldü. diğer gruplarda Phospho-I κ B- α düzeylerinde kontrol grubuna göre farklılık görülmedi.

5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin birlikte ve ayrı, 48 saatlik uygulama sonrası COX-2 düzeylerine etkileri Şekil 3.14.'de verilmiştir.

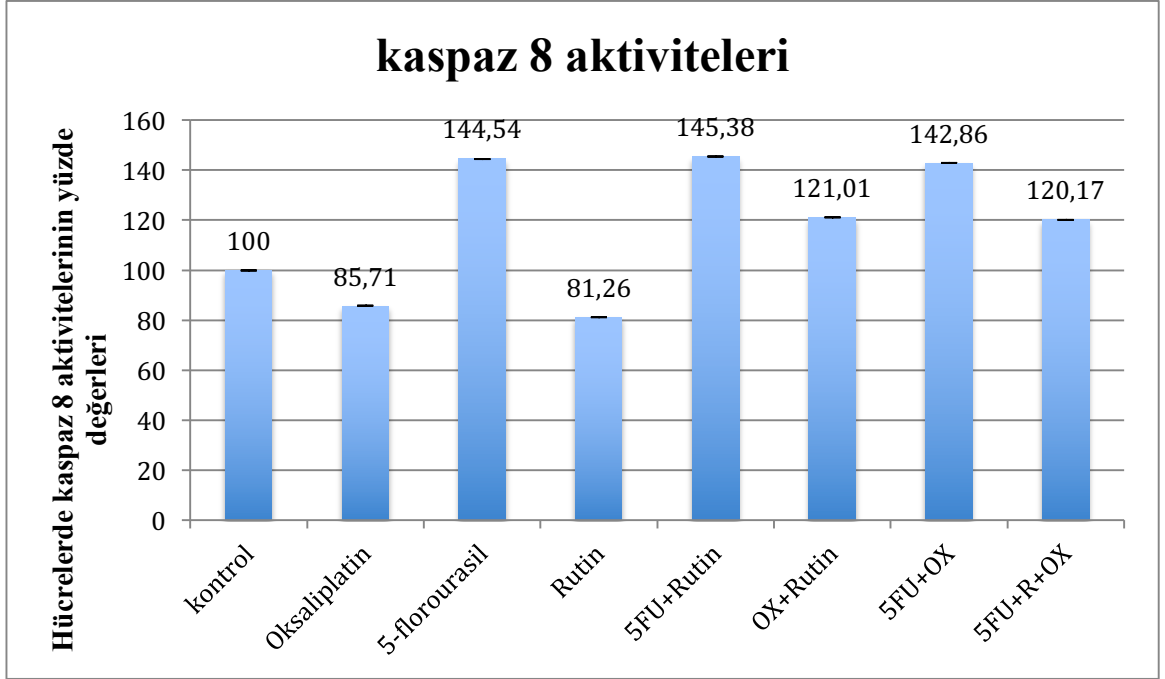


Şekil 3.14. COX-2 düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

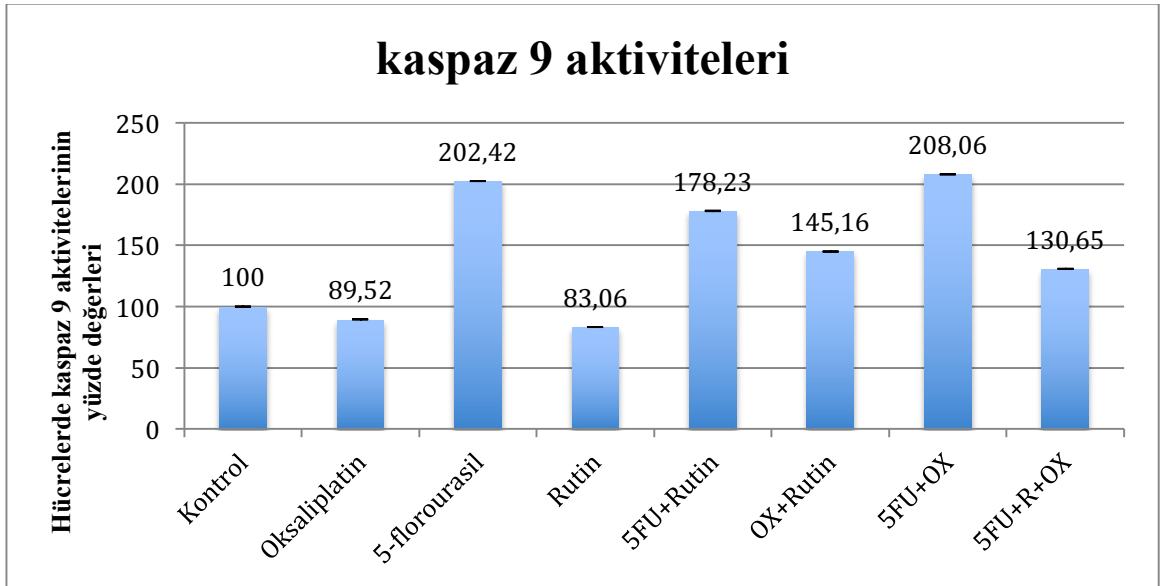
Şekil 3.14.'de gösterildiği gibi 5-florourasil ve 5-florourasil+ Oksaliplatin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde COX-2 düzeyleri kontrole göre sırasıyla 1,90 ve 1,81 kat artmıştır. Oksaliplatin, Rutin, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulanan hücrelerde COX-2 düzeyleri kontrole göre sırasıyla 0,69; 0,46; 0,69; 0,46 ve 0,57 kat azalmıştır.

3.3. 5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin birlikte ve ayrı olarak Caco-2 hücrelerine 48 saatlik uygulama sonrası apoptozis belirteçlerine etkileri

6,25 mg/ml 5-florourasil, 0,039 mg/ml Oksaliplatin ve 125µM Rutin dozlarının birlikte ve ayrı olarak 48 saatlik inkubasyon süresi sonrasında apoptozis belirteçlerinden kaspazlar üzerine kaspaz 8, kaspaz 9 ve Cleaved kaspaz 3 düzeylerine etkileri Şekil 3.15., Şekil 3.16. ve Şekil 3.17.'de verilmiştir.



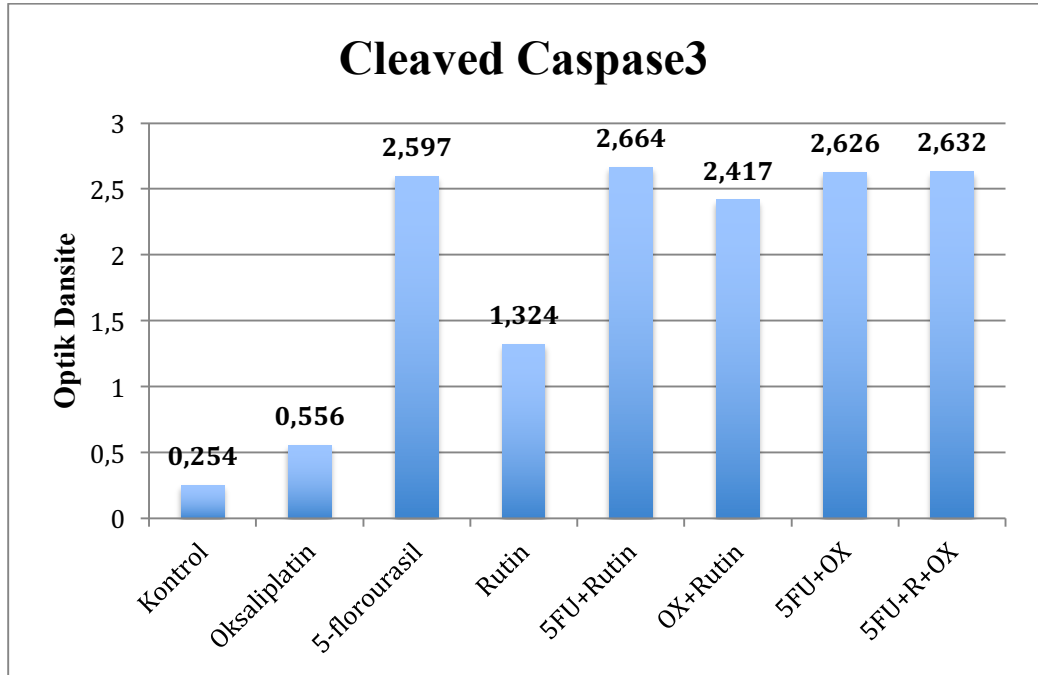
Şekil 3.15. Oksaliplatin, 5-florourasil ve Rutinin ayrı ayrı ve birlikte uygulanan Caco-2 hücre grubunda kaspaz 8 aktiviteeri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)



Şekil 3.16. Oksaliplatin, 5-florourasil ve Rutinin ayrı ayrı ve birlikte uygulanan Caco-2 hücre grubunda kaspaz 9 aktiviteeri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

5-florourasil, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, 5-florourasil+Oksaliplatin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde kaspaz 8 aktiviteleri kontrole göre sırasıyla %44,54; %45,38; %21,01; %42,86 ve %20,17 oranında artırırken Oksaliplatin ve Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde kaspaz 8 aktiviteleri kontrole göre sırasıyla %14,29 ve %18,74 oranında azalmıştır (Şekil 3.15.).

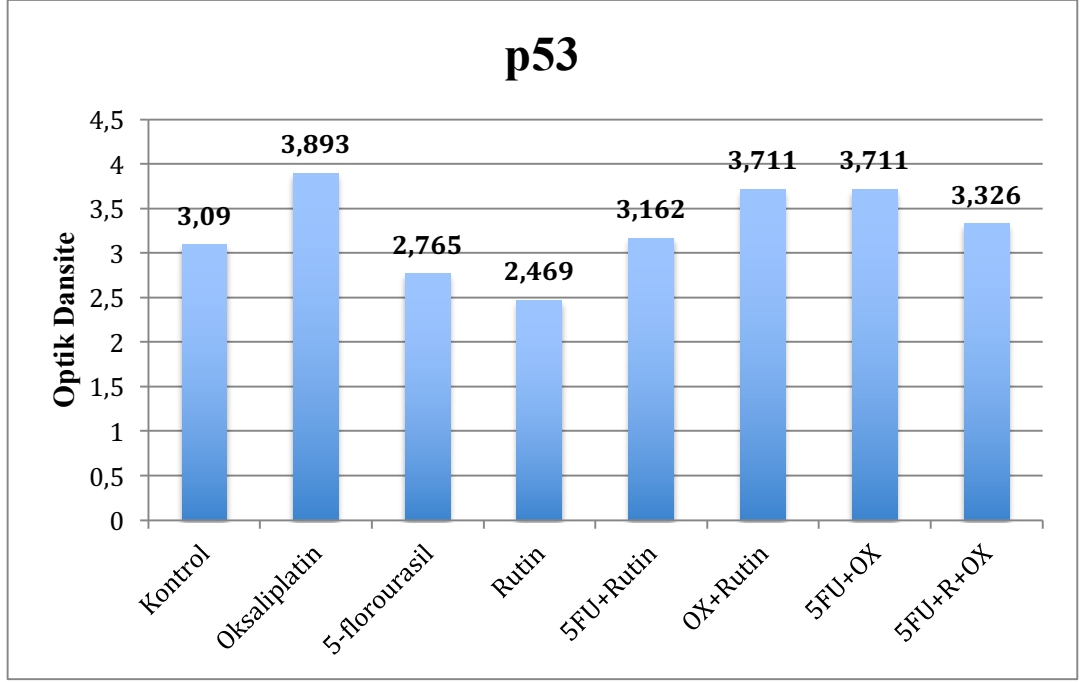
Oksaliplatin ve Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde kaspaz 9 aktiviteleri kontrole göre sırasıyla %10,48 ve %16,94 oranında azalırken, 5-florourasil, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, 5-florourasil+Oksaliplatin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde kaspaz 9 aktiviteleri kontrole göre sırasıyla %102,42; %78,23; %45,16; %108,06 ve %30,65 oranında artmıştır (Şekil 3.16.).



Şekil 3.17. Cleaved Caspase3 düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

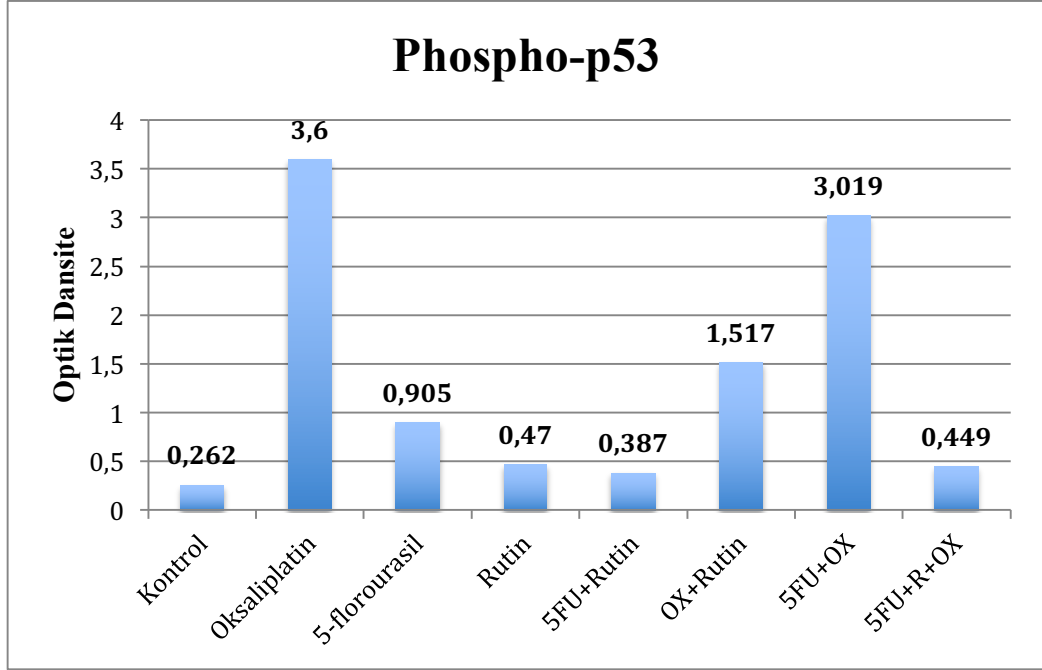
Oksaliplatin, 5-florourasil, Rutin, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, 5-florourasil+Oksaliplatin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde Cleaved Caspase3 düzeyleri kontrole göre sırasıyla 2,19; 10,22; 5,21; 10,48; 9,51; 10,33 ve 10,36 kat artış görüldü.

5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin birlikte ve ayrı ayrı Caco-2 hücrelerine 48 saatlik uygulama sonrasında apoptozis belirteçlerinden p53, Phospho-p53, Bad, Phospho-Bad ve Cleaved PARP analiz sonuçları Şekil 3.18., Şekil 3.19., Şekil 3.20., Şekil 3.21, Şekil 3.22.'de verilmiştir.



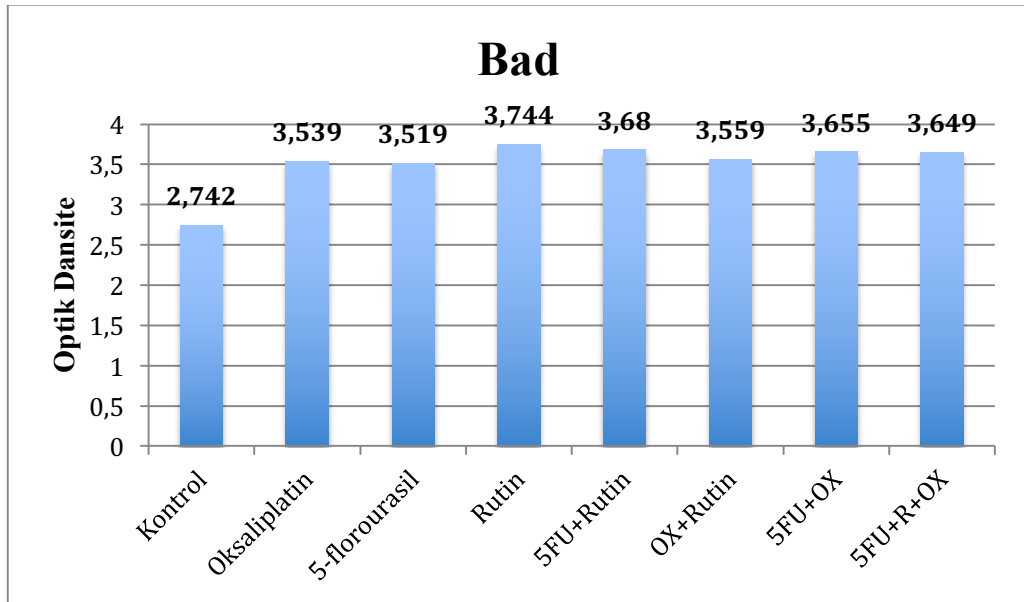
Şekil 3.18. p53 düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

Oksaliplatin, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, 5-florourasil+Oksaliplatin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde p53 düzeyleri kontrole göre sırasıyla 1,26; 1,023; 1,20; 1,20 ve 1,076 kat artmıştır. 5-florourasil ve Rutin uygulanan hücrelerde P53 düzeyleri kontrole göre sırasıyla 0,89 ve 0,79 kat azalmıştır.



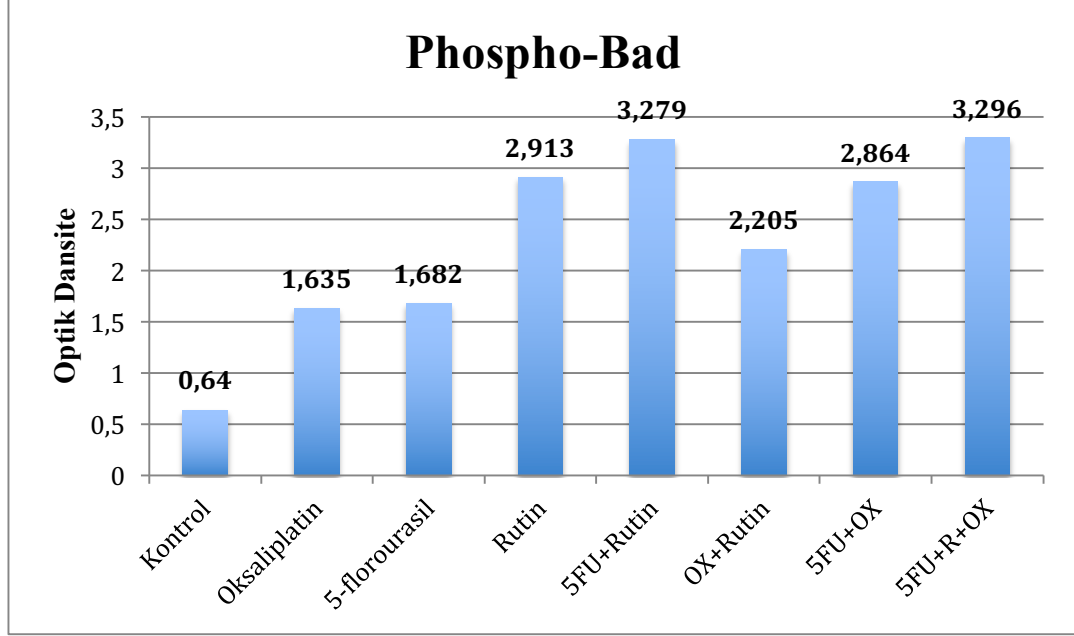
Şekil 3.19. Phospho-p53 düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

Oksaliplatin, 5-florourasil, Rutin, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, 5-florourasil+ Oksaliplatin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde Phospho-p53 düzeyleri düzeyleri kontrole göre sırasıyla 13,74; 3,45; 1,79; 1,47; 5,79; 11,52 ve 1,71 kat artış görüldü (Şekil 3.19.).



Şekil 3.20. Bad düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

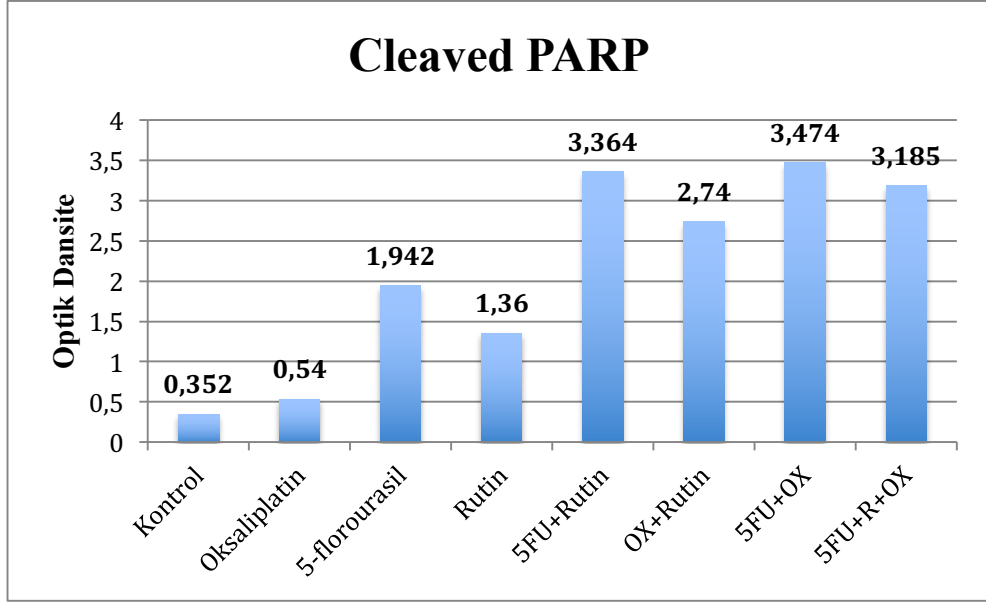
Şekil 3.20.'de gösterildiği gibi Oksaliplatin, 5-florourasil, Rutin, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, 5-florourasil+ Oksaliplatin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde Bad düzeyleri düzeyleri kontrole göre sırasıyla 1,29; 1,28; 1,36; 1,34; 1,29; 1,33 ve 1,33 kat artış görüldü.



Şekil 3.21. Phospho-Bad düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

Oksaliplatin, 5-florourasil, Rutin, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, 5-florourasil+Oksaliplatin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde Phospho-Bad düzeyleri düzeyleri kontrole göre sırasıyla 2,55; 2,62; 4,55; 5,12; 3,44; 4,47 ve 5,15 kat artış görüldü (Şekil 3.21.).

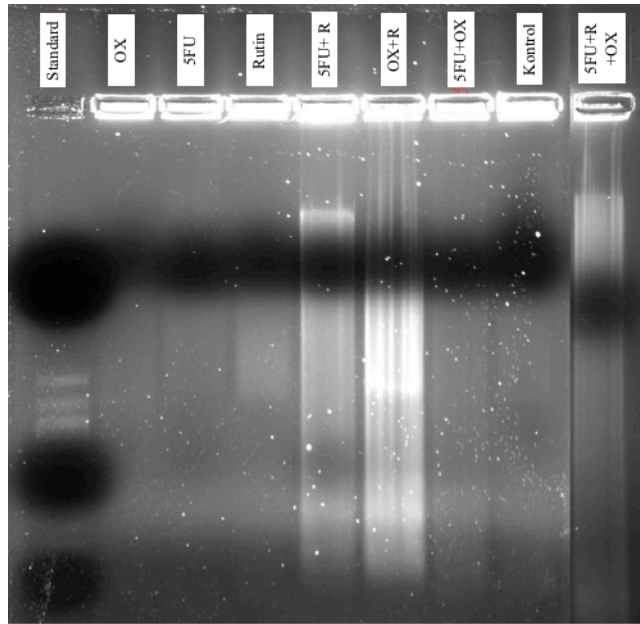
Şekil 3.22.'de gösterildiği gibi Oksaliplatin, 5-florourasil, Rutin, 5-florourasil+Rutin, Oksaliplatin+Rutin, 5-florourasil+Oksaliplatin ve 5-florourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulandığı Caco-2 hücrelerinde Cleaved PARP düzeyleri düzeyleri kontrole göre sırasıyla 1,53; 5,51; 3,86; 9,55; 7,78; 9,86 ve 9,04 kat artış görüldü.



Şekil 3.22. Cleaved PARP düzeyleri (5FU+R+OX=5-florourasil+Rutin+Oksaliplatin)

3.4. DNA laddering sonuçları

5-florourasil, Oksaliplatin ve Rutinin birlikte ve ayrı ayrı 48 saat uygulama sonrası Caco-2 hücrelerinde DNA laddering agar jel görüntüleri Şekil 3.23.'de verilmiştir.



Şekil 3.23. DNA laddering

Etidyum Bromür ile boyanmış %1 agar jel elektroforez sonuçlarına bakıldığında

5-florourasil+Rutin, Oksaliptin+Rutin ile 5-florourasil+Oksaliptin+Rutin uygulamalarının yapıldığı Caco-2 hücrelerinde DNA kırıklarının oluşumu gözlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Kolorektal kanser, kanser türlerinin başında gelmektedir. Geçen 40 yıl içinde kolorektal kanser tedavisinde 5-florourasil kemoterapisi başta gelmektedir. Son yıllarda 5-FU ile kombine kullanımlarda yer alan Oksaliplatin, kolorektal kanser tedavisinde umut vaat eden sonuçlar vermektedir. Kolorektal kanser kemoterapisinde 5-FU ile %12-24 yanıt alınırken, Oksaliplatin ilavesiyle tedaviye yanıt %60 lara yükselmiştir (Rothenberg, 2000).

Pirimidin analogu olan 5-FU, timidilat sentetaz enzimini inhibe etmektedir. Hücre siklusunu postG1/preS fazında durdurmaktadır ve birçok enzimle direk yada indirek etkileşerek DNA sentezini inhibe etmektedir (Yoshikawa ve ark., 2001).

Oksaliplatin, DNA da zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlanmalar yaparak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonu engellemek suretiyle etki gösterdiği düşünülmektedir (Asmis T. R. ve ark., 2008).

Oksaliplatin kolorektal kanserlerde 5-FU ve lökovorin ile birlikte yapılan çoklu sağaltımlarda kullanılmaktadır (Ruzzo ve ark., 2007). Oksaliplatin aynı zamanda diğer sitotoksik ilaçlarla sinerjik etki gösterir ancak bu etkilerin altında yatan mekanizma henüz tamamen anlaşılammıştır (Raymond ve ark., 1998). Bir çalışmada 5-FU ile OX sinerjik etkisi %78 olarak test edilmiştir (Rothenberg, 2000).

5-FU ve Oksaliplatinin, HT-29, SW48 ve colo-205 gibi farklı kolorektal kanser hücre hatlarında hücre canlılığına etkilerinin değerlendirildiği çalışmada IC₅₀ değerleri 5-FU için sırasıyla 20 µM, 27 µM ve 31 µM olarak belirlenmişken OX için sırasıyla 9 µM, 7 µM ve 34 µM olarak belirlenmiştir (Flis ve Splawinski, 2009).

Hem in vitro hemde in vivo prelinik çalışmalarda Oksaliplatin ile 5-FU kombinasyonlarının sinerjik etkileri olduğu ortaya konulmuştur (Grivicich, 2001).

LS-180 kolon kanser hücreleriyle yapılan çalışmada Oksaliplatin ve 5-FU'in artan konsantrasyonlarında hücre canlılığında azalma tesbit edilmiştir. 5-FU'in 24 saat inkubasyonda IC₅₀ değeri 6,5 µg/ml bulunmuştur. Oksaliplatinin IC₅₀ değeri 24 saat inkubasyonda 4 µM dir. 5-FU'in artan konsantrasyonlarının Oksaliplatin ile kombinasyonlarda hücre canlılığı, Oksaliplatinin tek başına uygulamasına göre artmıştır (Kjellestrom ve ark., 2005).

SW620 kolon kanser hücrelerinde 5-FU ve Oksaliplatinin 72 saat inkubasyonda IC₅₀ değerleri sırasıyla 4 µM ve 0,1 µM bulunmuştur (Sharma ve Smith, 2008).

Boyer ve ark. (2004), 5-FU ve Oksaliplatin için HCT-116 hücrelerinde IC₅₀ değerlerini sırasıyla 4,3 µM ve 0,3 µM olarak bildirmişlerdir.

Zhou ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada ise 72 saat inkubasyonda kolon kanser hücrelerinde sırasıyla 5-FU ve Oksaliplatin IC₅₀ değerleri 8,21 ve 2,89 µM, HCT-116 kolon kanser hücreleri için IC₅₀ değerleri 5-FU ve Oksaliplatin için sırasıyla 11,06 ve 1,2 µM olarak bildirilmektedir.

Bracht ve ark. (2010) 77 kolorektal kanser hücre hatlarında 5-FU uygulaması ile yaptıkları çalışmada, IC₅₀ değerlerini 0,03 ile 47,5 µM konsantrasyonları arasında bulmuşlardır ki bu yaklaşık maksimum 1600 kat µM farklı değer aralığındadır.

HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı ile 5-FU'e direnç geliştirilmiş HCT-116 hücrelerinde, kurkuminin hücrelerden 5-FU'e duyarlılığını artırdığı ve kurkumin uygulamasını takiben 5-FU uygulanan hücrelerde hücre canlılığında azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (Shakibaei ve ark., 2014).

HCT-116 kolon adenokarsinoma hücre hattı ve kolon kanser kök hücreleri ile yapılan çalışmada, 5-FU'in tek başına kullanımının 5-FU ile Oksaliplatin kombinasyonuna göre daha etkili olduğu bildirilmektedir (Toloudi ve ark., 2015).

Bu çalışmada, Caco-2 hücrelerinde 5-florourasil ve Oksaliplatinin 24, 48 ve 72 saatlik inkubasyon süreleri uygulanmış ve 48 saatlik inkubasyon süresine göre IC₅₀ dozu 5-florourasil ve Oksaliplatin için sırasıyla 6,25 mg/ml ve 0,039 mg/ml olarak

belirlenmiştir. Sonuçlar yukarıda belirtilen diğer çalışmaların (Boyer ve ark.,2004; Kjellestrom ve ark., 2005; Sharma ve Smith, 2008; Flis ve Splawinski, 2009; Zhou ve ark., 2010) sonuçlarından daha yüksek bulunmuştur. 5-FU ve OX için IC₅₀ değerlerindeki farklılık hücre hatlarındaki bireysel farklılık yanında, inkubasyon süresindeki farklılıklardan da kaynaklanabilir.

5-FU ile Oksaliplatin kombinasyonunda, 5-FU'in IC₅₀ değeri 2,34 mg/ml (yaklaşık 1,5 kat düşük) iken Oksaliplatinin IC₅₀ değeri 0,12 mg/ml bulunmuştur. Oksaliplatinin 5-FU kombinasyonu için bulunan IC₅₀ değeri tek başına uygulamaya göre 4 kat artmıştır. 5-FU ile Oksaliplatinin birlikte kullanımlarında artan etkinlikleri ile ilgili alışmalarda göz önüne alındığında (Rothenberg, 2000; Grivicich, 2001; Kjellestrom ve ark., 2005; Toloudi ve ark., 2015), Caco-2 hücrelerinde de 5-FU+OX uygulamalarında görülen hücre canlılığındaki azalmada artış gözlenmiştir. 5-FU ile Oksaliplatin kombinasyonunun 5-FU'in tek başına kullanımına göre daha etkili olduğu tesbit edilmiştir.

Tek başına 5-FU veya 5-FU ile Oksaliplatin kombinasyonlarının HCT-116 ve HT-29 kolon kanser hücrelerinde kurkumin ile birlikte uygulandığında hücre büyümesinde inhibisyonu ile apoptozis stimülasyonunda önemli düzeyde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Patel ve ark., 2008).

Bu çalışmada, Caco-2 hücrelerine 5-florourasilin farklı dozlarının, Rutin (125 µM) ile kombine edilerek uygulandığı 48 saatlik inkubasyonda 5-FU'in IC₅₀ değeri 1,5 mg/ml olarak bulunmuştur. 5-FU'in tek başına uygulamasına göre IC₅₀ değeri yaklaşık dört kat düşmüştür. Aynı şekilde Oksaliplatinin Rutin ile kombine uygulamasında 48 saatlik inkubasyonda IC₅₀ değeri 0,0065 mg/ml tesbit edilmiştir, bu da Oksaliplatinin tek başına uygulamasına göre IC₅₀ değeri yaklaşık beş kat düşmüştür. Fakat 5-FU'in Oksaliplatin ile birlikte kullanımlarında görülen sinerjik etki Rutin kombinasyonuna göre daha düşük gözlenmiştir. 5-FU ile Oksaliplatinin Rutin ile üçlü kombinasyonunda ise 5-FU ve Oksaliplatinin IC₅₀ değeri 5-FU+Oksaliplatin ikili kombinasyonundaki değerlerle aynı bulunmuştur. Patel ve ark.'nın (2008) kurkumin ile yaptıkları çalışmada olduğu gibi Rutin anti-kanser ilaçların etkinliğini artırmıştır.

Tekli ajanlar daha az toksik ve sinerjistik etkili ilaçlar ile kombine edildiklerinde antitümör etkileri artmaktadır. Ayrıca ilaçlar biyokimyasal etki mekanizmalarına, hücre siklusunun farklı fazlarına etkilerine göre kombine edilir. Kombinasyona gidilmesinin nedenleri, maksimum etki elde ederken, minimum toksisitede kalabilmek ve doz titrasyonu ile vücuda alınacak ilaç miktarının minimum düzeyde tutulmasıdır (Kumar ve ark., 2009; Lee, 2013).

Kanser hücrelerinin ilaç kaynaklı apoptozise duyarlılığının geliştirilmesi 5-FU için önemli bir strateji haline gelmiştir. p53'ün daha yüksek konsantrasyonlarından bağımsız bir şekilde 5-FU aracılı apoptozisi sinerjik olarak teşvik eder (Chan ve ark., 2008). Ayrıca 5-FU p53 bağımlı metabolizmada mitokondriyal ROS oluşumunu sağlar (Hwang ve ark., 2001). Ek olarak, BMI-1 tükenmesi PI3K/AKT yolunun engellenmesiyle ilişkili apoptozu sağlayarak NPC hücrelerinin kemosenitivitesini artırır (Qin ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada, Kurkumin uygulamasını takiben 5-FU uygulanan hücrelerde hücre canlılığında azalma apoptoziste ise artma gözlenmiştir. Apoptoziste artışta ise artan cleaved-PARP düzeyi etkili olmuştur (Shakibaei ve ark., 2014).

Çok güçlü antitümör ajanlar olan flavonoidler, antiproliferatif ve antioksidan fonksiyonlarından dolayı apoptozisi indükleme, hücre döngüsünü modüle edebilme ve hücre farklılaşmasını sağlama özelliklerine sahiptirler (Choi 2007, Lee ve ark., 2011, Sghaiera ve ark., 2011). Birçok çalışma flavonoidlerin antiproliferatif, antioksidan, proapoptotik, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antiviral etkileri olduğunu göstermektedir (Gibellini ve ark., 2011).

Flavonoidler CYP1A1 ve CYP1A2, gibi P450 izoenzim etkinliğini engelleyerek aktif karsinojenlerden kaynaklı hücre hasara karşı koruyucu etki sergilerler (Marchand ve ark., 2000).

Flavonoidler ksantin oksidaz (Chang ve ark., 1993), COX veya LOX55 (Mutoh, 2000)'ın inhibisyonunda etkilidirler, böylece tümör hücre proliferasyonunu engellerler. Ayrıca poliamin biyosentezi inhibisyon mekanizması flavonoidlerin

antiproliferatif aktivitelerine katkıda bulunabilir. Çok sayıda çalışma göstermiştir ki flavonoidler tümör promotörleri tarafından uyarılan ornitin dekarboksilazı inhibe edebilir, bu durum poliamin, DNA inhibisyonu ve protein sentezi azalmasına neden olur (Makita ve ark., 1996; Tanaka ve ark., 1997).

Flavonoidlerin anti-oksidan ve serbest radikal süpürücü aktiviteleri ve ayrıca anti-inflamatuar, anti-viral ve özellikle de anti-kanser özellikleri vardır ve çeşitli hücrel hedeflerle etkileşimde bulunarak insan sağlığını olumlu yönde etkilerler. Supresyon, blokaj ve transformasyonu içeren çeşitli yollarla kanser oluşumu ve gelişimi kontrol edilebilir. Supresyon ajanları prokarsinojenlerden yeni kanser oluşumunu önler, bloke edici ajanlar karsinojenik bileşenlerin kritik inisiyasyon alanlarına ulaşmasını engeller ve transforme edici ajanlar ise daha az toksik madde içeren karsinojenik bileşenlerin metabolizmasını kolaylaştırır veya biyolojik etkilerini önler. Flavonoidler her üç şekilde de görev yapabilir (Manthey ve ark., 2001). Diğer birçok potansiyel kemopreventif polifenoller karsinogenez sürecini kesintiye uğratar veya geriye döndürebilir (Surh, 2003).

Kanser hücre kültüründeki hücre döngülerinin kontrol noktaları olan G1/S ve G2/M'in silimarin, genistein, quercetin, daidzein, luteolin, kaempferol, apigenin ve epigallocatechin3-gallate gibi flavonoidlerle işlevlerinin bozulduğu bulunmuştur (Choi ve ark., 2001; Casagrande ve Darbon, 2001).

Apoptozis düzeninin bozulması onkogenezi kritik bir rol oynar. Normal hücrelerden ayrılan bazı kanser hücre hatlarında flavonoidlerin apoptozisi teşvik ettiği görülmüştür. DNA topoizomeraz I / II etkinliğinin engellenmesi (Bailly, 2000; Sukardiman ve ark., 2000), ROS azalması (Lee ve ark., 2002), ısı şok protein ekspresyonunun düzenlenmesi (Rong ve ark., 2000), sinyal yolları modülasyonu (Yin ve ark., 1999), NF-κB'nin baskılanması, endonükleaz aktivasyonu ve Mcl-1 protein supresyonunu içeren çeşitli mekanizmalar bu durumda söz konusu olabilir (Iwashita ve ark., 2000).

Quercetin, resveratrol ve Rutin güçlü antioksidan faaliyetleri ile büyük diyet polifenol bileşiklerdir (Calamini ve ark., 2010; Leiro ve ark., 2010; Svajger ve Jeras 2012).

Rutin, oksidatif stress (Patil ve ark., 2013), inflamasyon gelişmesi, kan ve hepatik kolesterolunu azaltma etkisine sahip olan çeşitli biyolojik fonksiyonları modüle eden bir glikozit flavondur (Al-Rejaie ve ark., 2013). Rutinin serbest radikalleri temizleme ve lipid peroksidasyonu inhibe etme kabiliyeti vardır (Patil ve ark., 2013).

Rutin, W480 kolon kanser hücreleri ile aşılınmış(Ksenograft) farelerde önemli ölçüde tümör gelişimini azaltmıştır (Alonso-Castro ve ark., 2013).

Phyllanthus urinaria özü, Rutin'den zengin bir maddedir. Bu madde, metastatik A549 ve Lewis akciğer karsinoma (LLC) hücreleri ile zenograftlanmış farelerde önemli miktarda tümör yayılmasını inhibe ettiği, NF-kB ve AP-1 nükleer birikiminin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Ayrıca, metalloproteinaz-2'nin de aşağı regüle edilmesi belirtilmiştir (Tseng ve ark., 2012).

Lösemi HL-60 hücreleri ile zenograftlanmış farelerde, Rutinin 120 mg/kg uygulanması tümörün gerilemesine neden olmuştur (Lin ve ark., 2012).

İnsan osteosarkoma hücrelerinde ise Quercetin'in 10, 100, 200, 500 ve 1000 μ M dozları 24 ile 48. s inkubasyonlarda Suh ve ark.(2010) tarafından incelenmiştir. Quercetin'in bu dozları 48 s inkubasyonda hücre proliferasyon inhibisyonu sırasıyla %9; 24; 31,3; 41,2; 51,3 oranında gerçekleşmiştir. Ayrıca apoptotik kaspaz 3'ün Quercetin tarafından indüklenmesi ve hücre siklusunun G1/S fazının durdurulmasıyla hücrelerin birikmesi de, proliferasyon inhibisyonuna etken olarak gösterilmiştir.

Choi ve ark. yaptığı bir çalışmada Quercetin, MDA-MB-453 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir. Bu inhibisyonun nasıl gerçekleştiğine dair bilgileri, apoptotik markırları ve hücre siklusu analizlerini yaparak elde etmişlerdir. Buna göre proapoptotik kaspaz 3, sitokrom C, Bax ve p53 proteinleri artmış, antiapoptotik Bcl2 proteini azalmıştır (Choi ve ark., 2008).

Wang ve ark. insan mide karsinoma hücresi BGC-823 hücrelerinde Quercetin'in etkisini araştırmışlardır. Buna göre Quercetin'in apoptotik yolaktaki, proapoptotik

kaspaz 3 ve Bax proteinlerini artırıp, antiapoptotik Bcl-2 proteinini azalttığını, bununla beraber hücre siklusundaki S fazını durdurduğunu gözlemlemişlerdir. Dolayısıyla Quercetin BGC-823 hücreleri proliferasyonunu azaltmıştır (Wang ve ark., 2012).

Quercetin ile karşılaştırıldığında Rutin, Kuntz ve ark.(1999) tarafından yapılan çalışmaya göre kolorektal kanser hücre proliferasyonunu üzerinde etkisi daha az bulunmuştur. Rutinin kolorektal kanser hücresel apoptozis üzerinde etkileri ile ilgili çalışmalar nadir ve çelişkilidir (Kim ve ark., 2005). Bazı çalışmalarda Rutinin apoptozisi indüklediği (Goncalves ve ark., 2010; Goncalves ve ark., 2011) va bazı diğer çalışmalarda apoptozise etkisi olmadığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2005).

Yang ve ark. (2000) tarafından farelerde yapılan çalışmaya göre Rutinin COX-2 aktivitelerini inhibe ettiği görülmüştür.

Quercetin'in apoptozisi indüklemesinde, DNA zinciri kırıkları oluşumu (Kuo, 1996; (Mertens-Talcott, 2005), kaspaz 3 (Mertens-Talcott, 2005), kaspaz 7, kaspaz 9 va Bax gibi apoptotik proteinlerin up-regülasyonu, cleaved PARP düzeyinde artış, sitikrom C salınımı ve Bcl-xl ve Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin down-regülasyonuna etkili olduğu bildirilmektedir (Ramos, 2008).

Rutin'in anti-inflamatuar etkisi lökotrien ve prostaglandinler gibi bazı inflamasyon araçlarının üretiminde önemli bir rol oynayan siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX), protein kinaz C (PKC) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI-3 kinaz)'ın Rutin tarafından inhibe edilmesi ile, yani bazı inflamasyonda rol oynayan anahtar enzimleri ve/veya hücre sinyal yollarının engellenmesi ile açıklanmaktadır (Vlahos, 1995; You ve ark., 1999).

Yapılan bir çalışmada, cisplatin uygulama öncesinde Rutin uygulanan ratlarda, cisplatinin indüklediği renal inflamasyonun TNFa ve NFkB üzerine inhibitor etkileri ile Rutinin önlediği bildirilmiştir (Arjumand ve ark., 2011).

Bizim yaptığımız çalışmanın sonuçları Rutinin antikanser etkilerinin olduğunu ve 5-FU ve Oksaliplatinin IC_{50} değerlerinde düşmeye sebep olduğunu göstermiştir. Rutin tek başına ve antikanser ilaç kombinasyonları ile apoptotik hücre ölümü proteinlerinden Bad, cleaved PARP, cleaved kaspaz 3 seviyelerini artırmıştır. Çalışmamızda Bad, cleaved PARP ve cleaved kaspaz 3 moleküllerindeki artış apoptozisin indüklendiğini göstermektedir. Bad pro-apoptotik sinyal moleküllerindendir ve Akt/PKB tarafından fosfatlandığında, Bad molekülünün mitokondrial kanallarını açık tutma kapasitesi azalarak anti-apoptotik etki gösterir (Weinberger, 2007). Bad düzeyindeki artış, pBad düzeyindeki artışında nedenidir, zamana bağlı Bad molekülünün fosfatlanması sonucudur.

P53 proteini apoptozisi indüklemektedir. P53 fosfatlanarak hücre içindeki yıkımdan kaçır, bu da p53 konsantrasyonunun hücre içinde hızla yükselişine neden olur (Weinberger, 2007). Çalışmamızda p53 ve fosfo-p53 düzeyleri oksaliplatin uygulamalarında yükselmiştir. Bu da oksaliplatin uygulamalarında görülen hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik p53 ve fosfo-p53 düzeylerindeki artışa bağlanılabilir.

Kaspazlar apoptotik mekanizmada merkezi bir role sahiptirler. Kaspazların aktive olması üç yolla gerçekleşir. Bunlar; intrinsik veya mitokondrial yolak ki kaspaz 9 aktivasyonu; ekstrinsik veya ölüm reseptörleri bağımlı yolak ise kaspaz 8 aktivasyonu ile ilerlemektedir ve intrinsik endoplazmik retikulum yolağıdır. İntrinsik ve ekstrinsik yollar apoptozisin genel olarak yürütülmesini sağlarlar (Rebecca, 2011). İntrinsik ve ekstrinsik yollardaki başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9, -10) tarafından aktive edilen Kaspaz-3, en önemli uygulama kaspazıdır. Hem aktif kaspaz-8, hem de kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktive ederler ve apoptozise yol açarlar. Kaspaz-3, apoptozisde meydana gelen endonükleaz aktivasyonuna, kromatin kondensasyonuna ve membran cepciklerinin oluşumuna aracılık eder. Kaspaz 3 apoptozisin son fazının tamamlanmasında rol alan önemli bir enzimdir ve apoptotik ölüme uğrayan hücrelerde aktif formdadır (cleaved Kaspaz 3) (Hassen ve ark., 2012; Rebecca, 2011). 5-FU uygulamalarında ise, kaspaz 8 ve kaspaz 9 düzeylerinde artış bulunmuştur. Bu

sonuçlar da, 5-FU uygulamalarında görülen hücre canlılığındaki azalmanın intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolağın aktivasyonu ile olduğunu göstermektedir.

PARP fonksiyonu ile hücre ölümü arasındaki ilişki PARP'ın apoptozis sürecinde kaspaz 3 tarafından hızlıca ve spesifik olarak kırılmasıdır (Tewari ve ark., 1995). Çalışma sonucunda tüm uygulama yapılan hücrelerde kontrole kıyasla cleaved PARP ve cleaved kaspaz 3 düzeylerinde görülen artış hücrelerin apoptozisle lme gittiklerini göstermektedir. Antikanser ilaçların Rutin ile kombinasyonları cleaved PARP ve cleaved kaspaz 3 düzeylerinde tek başlarına kullanımlarına göre daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Sadece Rutin ile kombine uygulamalarda görülen DNA kırıklarının oluşumu da bu sonuçları desteklemektedir.

Rutin flavonoidi, antikanser ilaçlarla birlikte uygulandığında, tek başlarına uygulandığında yükselme gösteren NFkB ve COX-2 aktivitelerini inhibe ederek inflamasyonu da inhibe (antiinflamasyon etki) etmiştir. Rutinin antiinflamatuvar etkisi, antikanser ilaçların yan etkilerinin azalmasında da etkili olabileceğinin bir göstergesi olabilir. Sonuçlar yukarıda belirtilen birçok çalışmaların (Vlahos, 1995; You ve ark., 1999; Yang ve ark., 2000; Kim ve ark., 2005; Goncalves ve ark., 2010, Suh ve ark., 2010; Goncalves ve ark., 2011) sonuçlarıyla uyumlu olarak bulunmuştur.

ÇalıŐmamız, 5-FU ve Oksaliplatin gibi kanser tedavisinde kullanılan ajanlarla Rutin'in birlikte kullanılmasının, kanser hücrelerinin apoptoza yönelmesinde gerekli olan etkin doz ve süreyi indirebileceğini, hücreler üzerindeki sitotoksik etkiyi azaltabileceğini akla getirmiŐtir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Rutin, 5-FU ve Oksaliplatine maruz kalan Caco-2 insan kolon kanser hücrelerinde doza ve zamana bağlı çoğalmada inhibisyon gözlenmiştir.

Hücre canlılığı testi, Rutinin 1,000 uM üstünde yüksek konsantrasyonlarda Caco-2 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir.

5-FU ve Oksaliplatinin Caco-2 hücreleri üzerinde çoğalmayı inhibe edici etkileri, Rutin ile kombinasyonlarında belirgin olarak artmıştır.

Sonuçlar Rutinin önemli antikanser etkilerinin olduğunu ve 5-FU ve Oksaliplatinin IC₅₀ değerlerinde düşmeye sebep olduğunu göstermiştir.

Yaygın bir şekilde tedavi amaçlı olarak kullanılan 5-Fluorourasil ve Oksaliplatin kemoterapi ajanlarının kolorektal kanser hücrelerinde kullanımına bir flavonoid olan Rutinin sinerjik etkilerinin belirlenmesi ile yeni tedavi yöntemleri ve kombinasyon tedavileri ortaya konulabilir. Daha verimli tedavi seçeneklerini sunulmasında moleküler düzeyde yapılan çalışmalar önemlidir.

Rutin flavonoidinin tek başına ve kombinasyonları ile apoptotik hücre ölümü proteinlerin seviyelerini (cleaved kaspaz 3 ve cleaved PARP) artırmıştır.

Kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri Rutin ve Oksaliplatin kombinasyonlarında tek başlarına göre uyarıldığı görülmüştür.

Kanser farmakoterapisinde Cox-2 ve NFkB düzeylerinin azalması anahtar hedef olarak dikkate alınmaktadır. Rutin NFkB ve COX-2 aktivitelerini inhibe etmiştir. NFkB ve COX-2 aktivitelerini inhibe ederek inflamasyonda inhibe etmiştir.

DNA fragmentasyonu sadece kombine uygulamalarda görülmüştür.

Rutin anti-kanser ilaçlar (5-FU ve/veya Oksaliptatin) ile kombine uygulanması, Caco-2 hücrelerinin büyümesinin inhibisyonunda, ilaçların ayrı ayrı uygulamalarına göre daha etkilidir.

5-FU ve oksaliptatinin Rutin ile düşük dozlarda kullanımı, benzer etkilere sahip olarak, bu ilaçların olası yan etkilerini azaltmak için yararlı olabilir.

Oksaliptatin ve 5-Florourasil kemoretaötik ajanlar ile birlikte Rutin kullanım (kemosensitizasyon) etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, özellikle kemosensitizasyon analizlerinden elde edilen sonuçların kliniğe aktarımı sonucunda, onkoloji tedavi grubu alanında ülkemize katma değer sağlayacaktır.

ÖZET

Oksaliplatin ve 5-Florourasilin Caco-2 Kanser Hücrelerinde Toksikite ve Antitümör Aktivitelerine Rutin Flavonoidinin Etkileri

Rutin, diğer flavonoidlere göre oksitlenmemesi ve toksik olmaması ile avantajlara sahip kuvvetli bir antioksidan moleküldür. Doğal bileşiklerin anti-kanser ilaçlarla tedavide ikili kullanımı, yeni tedavi stratejisinde umut verici bir yaklaşım haline gelmiştir. Bu çalışmada rutin kolon kanser hücrelerinde anti-proliferatif, apoptotik ve anti-enflamatuar etkilerinin ve antikanser ilaçlardan 5-FU ve oksaliplatinin etkilerini artırmadaki etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Caco-2 human kolon adenokarsinom hücreleri kullanılmıştır. Rutin ve/veya anti-kanser ilaçlar (5-FU ve oksaliplatin) ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde hücre canlılığı, apoptozis ve inflamasyon belirteçlerine bakılmıştır. Rutinin Caco-2 hücrelerinde anti-proliferatif etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. Apoptotik ve inflamasyon belirteçleri spesifik ELISA kitleri ile tespit edilmiştir. Kaspaz-8 ve kaspaz-9 düzeyleri kolorimetrik kitlerle analiz edilmiştir. DNA fragmentasyonu ise agar jel elektroforez ile gösterilmiştir. Rutin, 5-FU ve oksaliplatine maruz kalan Caco-2 insan kolon kanser hücrelerinde doza ve zamana bağlı büyümede inhibisyon gözlenmiştir. Hücre canlılığı testi, rutin yüksek konsantrasyonlarda (1.000 µM üstünde) Caco-2 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. 5-FU ve oksaliplatinin Caco-2 hücreleri üzerinde büyümeyi inhibe edici etkileri, rutin ile kombinasyonlarında belirgin olarak artmıştır. Sonuçlar rutin önemli antikanser etkilerinin olduğunu ve 5-FU ve oksaliplatinin IC₅₀ değerlerinde düşmeye sebep olduğunu göstermiştir. Bu flavonoid tek başına ve kombinasyonları ile apoptotik hücre ölümü proteinlerin seviyelerini (cleaved kaspaz-3 ve cleaved PARP) artırmıştır. Kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri rutin ve oksaliplatin kombinasyonlarında tek başlarına göre uyarıldığı görülmüştür. Rutin NFκB ve COX-2 aktiviteleri inhibe ederek inflamasyonu inhibe etmiştir. DNA fragmentasyonu sadece kombine uygulamalarda görülmüştür.

Rutin anti-kanser ilaçlar (5-FU ve / veya oksaliplatin) ile kombine uygulanması, Caco-2 hücrelerinin büyümesinin inhibisyonunda, ilaçların ayrı ayrı uygulamalarına göre daha etkilidir. 5-FU ve oksaliplatinin rutin ile düşük dozlarda kullanımı, benzer etkilere sahip olarak, bu ilaçların olası yan etkilerini azaltmak için önerilebilir.

Anahtar Sözcükler: 5-FU, Apoptoz, İnflamasyon, Kolon kanser, Oksaliplatin, Rutin

SUMMARY

The Effects of Rutin Flavonoid on Toxicity and Antitumor Activity of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Caco-2 Cells.

Rutin is a strong antioxidant molecule and it has advantageous over other flavonoids since it is a nontoxic and nonoxidizable molecule. The concept of dual therapy of anti-cancer drugs with natural compounds has become a very promising approach in new strategy to treatment. The aim of this study was to evaluate the antiproliferative, apoptotic and anti-inflammatory effects of rutin flavonoids and its efficacy in enhancing the anticancer effects of 5-FU (5-fluorouracil) and oxaliplatin against colon cancer cells. Caco-2 human colon adenocarcinoma cells were used. Caco-2 human colon cancer cells were treated with rutin and/or anticancer drugs (5-FU and oxaliplatin). Cell viability, apoptosis and inflammation parameters were examined. The antiproliferative effects of rutin in Caco-2 cells were detected by MTT assay. Apoptotic and inflammation markers were determined using specific enzyme-linked immunosorbent assay kits. Caspase-8 and caspase-9 were analyzed by colorimetric activity assay kit. DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis. The exposure of Caco-2 human colon cancer cells to rutin, 5-FU and oxaliplatin resulted growth inhibition in a dose- and time-dependent manner. Cell viability assay shows that rutin inhibiting growth of Caco-2 cells at high concentrations (over 1000 μM). Combination with rutin markedly enhanced 5-FU and oxaliplatin growth inhibiting effects on Caco-2 cells. Results suggested that rutin had significant anticancer abilities; such rutin were capable of causing multifold decreases in the half maximal inhibitory concentration IC_{50} value of 5-FU and oxaliplatin. This flavonoid increased the levels of proteins associated with apoptotic cell death (cleaved caspase 3 and cleaved PARP) alone and combination. The activities of caspase 8 and caspase 9 were stimulated by the combination treatment of rutin and oxaliplatin then alone. Rutin suppresses inflammation by inhibiting NfKB and COX-2 activities. DNA fragmentation was observed only on combination treatment.

Combined treatment with rutin and anticancer drugs (5-FU and/or oxaliplatin) is more effective than the individual treatments of drugs at inhibiting growth of Caco-2 cells. The use of lower 5-FU and oxaliplatin doses, with similar effects, could be also useful to reduce possible adverse effects of these drugs.

Key words: 5-FU, Apoptosis, Inflammation, Colon cancer, Oxaliplatin, Rutin

KAYNAKLAR

ABE, K., MATSUKI, N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *J. Neuroscience Research.*, **38**: 325-329.

AGARWAL, R. (2000). Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *J. Biochemical Pharmacology.*, **60**: 1051-1059.

AHLQUIST, D. A., SKOLETSKY, J. E., BOYNTON, K. A., HARRINGTON, J. J., MAHONEY, D. W., PIERCEALL, W. E., THIBODEAU, S. N., SHUBER, A. P. (2000). Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *J. Gastroenterology.*, **119**: 1219-1227.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*, 5th Ed. New York: Garland Science, Chapter 18.

ALIMONTI, J. B., BALL, T. B., FOWKE, K. R. (2003). Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J. General Virology.*, **84**(7): 1649-1651.

ALLEY, M. C., SCUDIERO, D. A., MONKS, A., HURSEY, M. L., CZERWINSKI, M. J., FINE, D. L., ABBOTT, B. J., MAYO, J. G., SHOEMAKER, R. H., BOYD, M. R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *J. Cancer Research.*, **48**: 589-601.

ALONSO-CASTRO, A. J., DOMÍNGUEZ, F., GARCÍA-CARRANCÁ, A. (2013). Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *J. Archives of Medical Research*, **44**(5): 346-351.

AL-REJAIE, S. S., ALEISA, A. M., SAYED-AHMED, M. M., AL-SHABANAH, O. A., ABUOHASHISH, H. M., AHMED, M. M., AL-HOSAINI, K. A., HAFEZ, M. M. (2013). Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Wistar rat. *J. BMC Complementary and Alternative Medicine.*, **13**:136.

ALTMAN, R., SARG, M. (1992). *The Cancer Dictionary*. New York: Facts on File.
Amado, R. G. (2008). Panitumumab efficacy and patient-reported outcomes in metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS tumour status. *2008 Gastrointestinal Cancers Symposium.*, 278-278.

AMERICAN CANCER SOCIETY. (2002). *Nutrition and Physical Activity Guidelines for Cancer Prevention*.

AMERICAN CANCER SOCIETY. (2011). Cancer facts & figures 2011: Erişim: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsfigures/cancerfactsfigures/cancer-facts-figures-2011>, ErişimTarihi: 16.07.2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. (2014). Colorectal cancer facts & figures 2014-2016:Erişim: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/colorectal-cancer-facts-figures>, ErişimTarihi: 16.07.2014.

AN, Q., ROBINS, P., LINDAHL, T., BARNES, D.E. (2007). 5-Fluorouracil incorporated into DNA is excised by the Smug1 DNA glycosylase to reduce drug cytotoxicity. *J. Cancer Research.*, **67**: 940-945.

ARJUMAND, W., SETH, A., SULTANA, S. (2011). Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFκB, TNF-α and caspase-3 expression in wistar rats. *J. Food and Chemical Toxicology.*, **49**: 2013-2021.

ARMSTRONG, F., MATHERS, J. C. (2000). Kill and cure: dietary augmentation of immune defences against colon cancer. *J. Proceedings of the Nutrition Society.*, **59**: 215-220.

ASMIS, T. R., SALTZ, L. (2008). Systemic therapy for colon cancer. *J. Gastroenterology Clinics of North America.*, **37**: 287-295.

BAI, F., MATSUI, T., OHTANI-FUJITA, N., MATSUKAWA, Y., DING, Y., SAKAI, T. (1998). Promoter activation and following induction of the p21/WAF1 gene by flavone is involved in G1 phase arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *J. FEBS Letters.*, **437**: 61-64.

BAILLY, C. (2000). Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *J. Current Medicinal Chemistry.*, **7**: 39-58.

BALDWIN A. S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J. Clinical Investigation.*, **107**: 241-246.

BASSERES, D. S., BALDWIN, A. S. (2006). Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *J. Oncogene.*, **25**: 6817-6830.

BECKER, J. C., ANDERSEN M. H., SCHRAMA, D., STRATEN P. (2013). Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. *J. Cancer Immunology, Immunotherapy.*, **62**(7): 1137-1148.

BEECHER, G. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutrition.*, **133**: 3248-3254.

BEG, A. A., BALTIMORE, D. (1996). An essential role for NF-Kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death. *J. Science.*, **274**: 782-784.

BENSON, A. B., SCHRAG, D., SOMERFIELD, M. R., COHEN, A. M., FIGUEREDO, A. T., FLYNN, P. J., KRZYZANOWSKA, M. K., MAROUN, J., MCALLISTER, P., VANCUSTEM, E., BROUWERS, M., CHARETTE, M., HALLER, D. G. (2004). ASCO recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J. Clinical Oncology.*, **16**: 3408-3419.

BHATIA, N., AGARWAL, R. (2001). Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, genistein and epigallocatechin 3-gallate on epigenetic events in human prostate carcinoma DU145 cells. *Prostate.*, **46**: 98-107.

BIGBEE, W., HERBERMAN, R. B. (2003). Tumor markers and immunodiagnosis, In: *Cancer Medicine*, 6th Ed., Ed.: R. J. BAST, D. W. KUFEL, R. E. POLLOCK, Hamilton. Ontario. Canada: BC Decker Inc.

BINGHAM, S. (2000). Diet and colorectal cancer prevention. *J. Biochemical Society Transactions.*, **28**: 12-16.

BIRT, D. F., HENDRICH, S., WANG, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention Flavonoids and isoflavonoids. *J. Pharmacology & Therapeutics.*, **90**: 157-177.

BLOCH, A. (1995). Position of the American Dietetic Association: Phytochemicals and Functional Foods. *J. The Journal of the American Dietetic Association.*, **95**: 493-496.

BOEHM, I. (2006). Apoptosis in physiological and pathological skin: Implications for therapy. *J. Current molecular medicine.*, **6**(4): 375-394.

BOUVIER, A., MINICOZZI, P., GROSCLAUDE, P., BOUVIER, V., FAIVRE, J., SANT, M. (2013). Patterns of adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer in France and Italy. *J. Digestive and Liver Disease.*, **45**(8): 687-691.

BOYER, J., MCLEAN, E. G., AROORI, S., WILSON, P., Mc CULLA, A., CAREY, PD., LONGLEY, D. B., JOHNSTON, P. G. (2004). Characterization of P53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *J. Clinical Cancer Research.*, **10**: 2158-2167.

BRACHT, K., NICHOLLS, A. M., LIU, Y., BODMER, W. F. (2010). 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *J. British Journal of Cancer.*, **103**: 340-346.

BRACKE, M., VYNCKE, B., OPDENAKKER, G., FOIDART, J.M., DE PESTEL, G., MAREEL, M. (1991). Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion in vitro. *ClinExp Metastasis.*, **9**: 13–25.

BRAVO, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *J. Nutrition Reviews.*, **56**: 317-333.

BRUNI, P., MINOPOLI, G., BRANCACCIO, T., NAPOLITANO, M., FARAONIO, R., ZAMBRANO, N., HANSEN, U., RUSSO, T. (2002). Fe65, a ligand of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein, blocks cell cycle progression by down-regulating thymidylate synthase expression. *J. Biological Chemistry.*, **277**: 35481-35488.

BU-ABBAS, A., CLIFFORD, M. N., WALKER, R., IOANNIDES, C. (1998). Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food and Chemical Toxicology.*, **36**: 617-621.

BUDIHARDJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X., WANG, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *J. Annual Review of Cell and Developmental Biology.*, **15**: 269-290.

CALAMINI, B., RATIA, K., MALKOWSKI, M. G., CUENDET, M., PEZZUTO, J. M., SANTARSIERO, B. D., MESECAR, A. D. (2010). Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *J. Biochemical Journal.*, **429**: 273-282.

CALTAGIRONE, S., ROSSI, C., POGGI, A., RANELLETTI, F. O., NATALI, P.B.G., BRUNETTI, M., AIELLO, F. B., PIANTELLI, M. (2000). Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *J. International Journal of Cancer.*, **87**: 595-600.

CARBONE, A., RODECK, U., MAURI, F. A., SOZZI, M., GASPARI, F., SMIRNE, C., PRATI, A., ADDEO, A., NOVARINO, A., ROBECCHI, A., BERTETTO, O., EMANUELLI, G., BELLONE, G. (2005). Human Pancreatic Carcinoma Cells Secrete Bioactive Interleukin-18 after Treatment with 5-Fluorouracil. *J. Cancer Biology & Therapy.*, **4**: 231-241.

CASAGRANDE, F., DARBON, J. M. (2001). Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology*, **61**: 1205-1215.

CHAN, J. Y., PHOO, M. S., CLEMENT, M. V., PERVAIZ, S., LEE, S. C. (2008). Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis: the roles of caspase-6 and p53. *J. Cancer Biology & Therapy*, **7**(8):1305-1312.

CHANG, W. S., LEE, Y. J., LU, F. J., CHIANG, H. C. (1993). Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *J. Anticancer Research*, **13**: 2165-2170.

CHEN, G., GOEDEL, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *J. Science*, **296** (5573): 1634-1635.

CHEN, L., WILLIS, S.N., WEI, A., SMITH, B. J., FLETCHER, J. I., HINDS, M. G. COLMAN, P. M., DAY, C. L., ADAMS, J. M., HUANG, D. C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *J. Molecular Cell*, **17**(3): 393-403.

CHERNYSHEV, A., FLEISCHMANN, T., KOHEN, A. (2007). Thymidyl biosynthesis enzymes as antibiotic targets. *J. Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**: 282-289.

CHOI, E. J. (2007). Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. *J. Nutrition and Cancer*, **59**(1): 115-119.

CHOI, E. J., BAE, S. M., AHN, W. S. (2008). Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *J. Archives of Pharmacal Research*, **31**(10): 1281-1285.

CHOI, J. A., KIM, J. Y., LEE, J. Y., KANG, C. M., KWON, H. J., YOO, Y. D., KIM, T. W., LEE, Y. S., LEE, S. J. (2001). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *J. International Journal of Oncology*, **19**: 837-844.

COMPTON, C., FENOGLIO-PREISER C. M., PETTIGREW N., FIELDING L. P. (2000). American joint committee on cancer prognostic factors consensus conference: Colorectal Working Group. *J. Cancer.*, **88**: 1739-1757.

CORY, S., ADAMS, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.*, **2**: 647–56.

DABBAGH, A., SAMIRA, R. (2013). The Role Of Anesthetic Drugs In Liver Apoptosis. *J. Hepatitis Monthly.*, **13**(8).

DOĞAN, M., AKBULUT, H. (2009). Kolorektal kanserde adjuvant tedavi. *T. Klinikleri Tibbi Onkoloji Özel Dergisi.*, **2**(3): 49-57.

DONG, S.M., TRAVERSO, G., JOHNSON, C., GENG, L., FAVIS, R., BOYNTON, K., HIBI, K., GOODMAN, S.N., D'ALLESSIO, M., PATY, P., HAMILTON, S. R., SIDRANSKY, D., BARANY, F., LEVIN, B., SHUBER, A., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., JEN, J. (2001). Detecting colorectal cancer in stool with use of multiple genetic targets. *J. Journal of the National Cancer Institute.*, **93**: 858-865.

DOUILLARD, J. Y., CUNNINGHAM, D., ROTH, A. D., NAVARRO, M., JAMES, R. D., KARASEK, P., JANDIK, P., IVESON, T., CARMICHAEL, J., ALAKL, M., GRUIA, G., AWAD, L., ROUGIER, P. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *J. Lancet.*, **355**: 1041-1047.

DUFFY, M. J., VAN DALEN, A., HAGLUND, C., HANSSON, L., HOLINSKIFEDER, E., KLAPDOR, R., LAMERZ, R., PELTOMAKI, P., STURGEON, C., TOPOLCAN, O. (2007). Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *J. European Journal of Cancer.*, **43**: 1348-1360.

DUFFY, M. J., VAN DALEN, A., HAGLUND, C., HANSSON, L., KLAPDOR, R., LAMERZ, R., NILSSON, O., STURGEON, C., TOPOLCAN, O. (2003). Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *J. European Journal of Cancer.*, **39**: 718-727.

DWYER, J., PICCIANO, M., RAITEN, D. (2003). Food and dietary supplement databases for What We Eat in America - NHANES. *J. Nutrition.*, **133**: 624-634.

EHRHARDT, A., EHRHARDT, G. R., GUO, X., SCHRADER, J. W. (2002). Ras and relatives-job sharing and networking keep an old family together. *J. Experimental Hematology.*, **30**: 1089 -1106.

ELATTAR, T. M., VIRJI, A. S. (2000). The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. *J. Anticancer Research.*, **20**: 1733-1738.

ESTELLER, M., GONZALEZ, S., RISQUES, R. A., MARCUELLO, R., MANGUES, J. R., GERMA, J. G., HERMAN, G., CAPELLA, G., PEINADO, M. A. (2001). K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J. Clinical Oncology.*, **19**: 299-304.

EWIS, J. (2000). Prevention and treatment of colorectal cancer: pay now or pay later. *J. Annals of Internal Medicine.*, **133**: 647-649.

FADEEL, B., ORRENIUS, S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Internal Medicine.*, **258**: 479-517.

FAIVRE, S., CHAN, D., SALINAS, R., WOYNAROWSKA, B., WOYNAROWSKI, J. M. (2003). DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *J. Biochemical Pharmacology.*, **66**: 225-237.

FERNANDES, A. A., NOVELLI, E. L., OKOSHI, K., OKOSHI, M. P., DI MUZIO, B. P., GUIMARÃES, J. F., FERNANDES, A. (2010). Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *J. Biomedicine & Pharmacotherapy.*, **64**: 214-219.

FERNANDEZ, E., NEGRI, E., La VECCHIA, C., FRANCESCHI, S. (2000). Diet diversity and colorectal cancer. *J. Preventive Medicine.*, **31**: 11-14.

FISCHEL, J. L., FORMENTO, P., CICCOLINI, J., ROSTAGNO, P., ETIENNE, M. C., CATALIN, J. (2002). Impact of the oxaliplatin–5 fluorouracil–folinic acid combination on respective intracellular determinants of drug activity. *J. British Journal of Cancer.*, **86**: 1162-1168.

FISHER, D. E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *J. Cell.*, **78**: 539-542.

FLIS, S., SPŁWIŃSKI, J. (2009). Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *J. Anticancer Research.*, **29**(1): 435-441.

FLOOD, A., VELIE, E., CHATERJEE, N., SUBAR, A. F., THOMPSON, F. E., LACEY JR, J. V., SCHAIRER, C., TROISI, R., SCHATZKIN, A. (2002). Fruit and vegetable intakes and the risk of colorectal cancer in the Breast Cancer Detection Demonstration Project follow-up cohort. *J. American Journal of Clinical Nutrition.*, **75**: 936-943.

FUND, W. C. (1997). Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective, Washington, D.C.: American Institute for Cancer Research.

GIACCHETTI, S., PERPOINT, B., ZIDANI, R., LE BAIL, N., FAGGIUOLO, R., FOCAN, C., CHOLLET, P., LLORY, J. F., LETOURNEAU, Y., COUDERT, B., BERTHEAUT-CVITKOVIC, F., LARREGAIN-FOURNIER, D., LE ROL, A., WALTER, S., ADAM, R., MISSET, J. L., LÉVI, F. (2000). Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J. Clinical Oncology.*, **18**: 136-147.

GIBELLINI, L., PINTI, M., NASI, M., MONTAGNA, J. P., BIASI, S. D., ROAT, E., BERTONCELLI, L., COOPER, E. L., COSSARIZZA, A. (2011). Quercetin and cancer chemoprevention. *J. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, doi: 10.1093/ecam/neaq053.

GIOVANNUCCI, E., (2003). Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiological evidence. *J. Women's Health.*, **12**: 173-182.

GIOVANNUCCI, E., WILLETT, W. C. (1994). Dietary factors and risk of colon cancer. *J. Annals of Medicine.*, **26**: 443-452.

GO, V. L., WONG, D. A., BUTRUM, R. (2001). Diet, nutrition, and cancer prevention: where are we going from here?. *J. Nutrition.*, **131**: 3121-3126.

GOMEZ, S., Le, G., CLARKE, C., GLASER, S., FRANCE, A., West, D. (2003). cancer incidence patterns in koreans in the us and in kangwha, south korea. *J. Cancer Causes & Control.*, **14**: 167-174.

GREM, J. L. (2000). 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *J. Investigational New Drugs.*, **18**: 299-313.

GRIVICICH, I., MANS, D. R. A., PETERS, G. J., SCHWARTSMANN, G. (2001). Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. *J. Brazilian journal of medical and biological research.*, **34**: 1087-1103.

HAN, D., TACHIBANA, H., YAMADA, K. (2001). Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids. *J. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal.*, **37**: 275-282.

HAN, Y., HARAGUCHI, T., IWANAGA, S., TOMOTAKE, H., OKAZAKI, Y., MINEO, S., MORIYAMA, A., INOUE, H., KATO, N. (2009). Consumption of some polyphenols reduces fecal deoxycholic acid and lithocholic acid, the secondary bile acids of risk factors of colon cancer. *J. Agricultural & Food Chemistry.*, **23**: 8587-8590.

HANKE, B., RIEDEL, C., LAMPERT, S., HAPPICH, K., MARTUS, P., PARSCH, H., HIMMLER, B., HOHENBERGER, W., HAHN, E. G., WEIN, A. (2001). CEA and CA 19-9 measurements as a monitoring parameter in metastatic colorectal cancer (CRC) under palliative first-line chemotherapy with weekly 24-hr infusion of high-dose 5-fluoruracil (5-FU) and folinic acid (FA). *J. Annals of Oncology.*, **12**: 221-226.

HASSEN, S., ALI, N., CHOWDHURY, P. (2012). Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol.*, **3**: 7-79.

He, Y. F., Wei, W., Zhang, X., Li, Y. H., Li, S., Wang, F. H., Lin, X. B., Li, Z. M., Zhang, D. S., Huang, H. Q., Hu, B., Jiang, W. Q. (2008). Analysis of the DPYD gene implicated in 5-fluorouracil catabolism in Chinese cancer patients. *J. Clinical Pharmacology & Therapeutics.*, **33**: 307-314.

HEIM, K., TAGLIAFERRO, A., BOBILYA, D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. The Journal Of Nutritional Biochemistry.*, **13**(10): 572-584.

HENGARTNER, M. O., HORVITZ, H. R. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *J. Cell.*, **76**: 665-676.

HIRANO, T., GOTOH, M., OKA, K. (1994). Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *J. Life Sciences.*, **55**: 1061-1069.

HODEK, P., TREFIL, P., STIBOROVA, M. (2002). Flavonoids- Potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *J. Chemico-Biological Interactions.*, **139**: 1-21.

HORAK, E., SMITH, K., BROMLEY, L., LEJEUNE, S., GREENALL, M., LANE, D., HARRIS, A. L. (1991). Mutant p53, EGF receptor and c-erbB-2 expression in human breast cancer. *J. Oncogene.*, **6**: 2277-2284.

HULME, A. T., PRICE, S. L., TOCHER, D. A. (2005). A New Polymorph of 5-Fluorouracil Found Following Computational Crystal Structure Predictions. *J. Journal of the American Chemical Society*, **127**: 1116-1117.

HWANG, J. T., HA, J., PARK, O. J. (2005). Combination of 5-Fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation

of AMPK and COX-2 signaling pathways. *J. Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **332**: 433-440.

HWANG, P. M., BUNZ, F., YU, J., RAGO, C., CHAN, T. A., MURPHY, M. P., KELSO, G. F., SMITH, R. A., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. (2001). Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *J. Nature Medicine.*, **7**: 1111-1117.

IBRAHIM, A., HIRSCHFELD, S., COHEN, M. H., GRIEBEL, D. J., WILLIAMS, G. A., PAZDUR, R. (2004). FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *J. Oncologist.*, **9**: 8-12.
ISIDRO, R. (2015). Immunohistochemical expression of SP-NK-1R-EGFR pathway and VDR in colonic inflammation and neoplasia. *J. The World Journal of Gastroenterology.*, **21**(6): 1749.

IWASHITA, K., KOBORI, M., YAMAKI, K., TSUSHIDA, T. (2000). Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *J. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.*, **64**: 1813-1820.

JACKMAN, A., KAYE, S., WORKMAN, P. (2004). The combination of cytotoxic and molecularly targeted therapies-can it be done?. *J. Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies.*, **1**(4): 445-454.

KALADY, M., DEJULIUS, K., SANCHEZ, J., JARRAR, A., LIU, X., MANILICH, E., SKACEL, M., CHURCH, J. (2012). BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis. *J. Diseases of the Colon & Rectum.*, **55**(2): 128-133.

KEMP, B. E. (1990). Peptides and Protein Phosphorylation. Florida: CRC Press, p.: 239-253.

KJELLSTRÖM, J., KJELLÉN, E., JOHNSON, A. (2005). In vitro radiosensitization by oxaliplatin and 5-fluorouracil in a human colon cancer cell line. *J. Acta Oncology.*, **44**(7): 687-693.

KONDO, M., NAGANO, H., WADA, H., DAMDINSUREN, B., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, N., EGUCHI, H., MIYAMOTO, A., YAMAMOTO, T., OTA, H., NAKAMURA, M., MARUBASHI, S., DONO, K., UMESHITA, K., NAKAMORI, S., SAKON, M., MONDEN, M. (2005). Combination of IFN-A and 5-Fluorouracil Induces Apoptosis through IFN-A/B Receptor in Human Hepatocellular Carcinoma. *J. Clinical Cancer Research.*, **11**: 1277-1286.

KUMAR, B., YADAV, P. R., GOEL, H. C., MOSHAHID, M., RIZVI, A. (2009). Recent Developments in Cancer Therapy by Use of Nanotechnology. *J. Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures.*, **4**(1): 1-12.

KUNTZ, S., WENZEL, U., DANIEL, H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer cell lines. *J. European Journal of Nutrition.*, **38**: 133-142.

KUO, S. M., MOREHOUSE, H. F., LIN, C. P. (1997). Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *J. Cancer Letters.*, **116**: 131-137.

LASTRA, D., VILLEGAS, I., SANCHEZ-FIDALGO, S. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors: New pharmacological functions and potential clinical implications. *J. Current Pharmaceutical Design.*, **13**: 933-962.

LEE, C. (2013). Chemotherapy and target therapy for colorectal cancer. *The Hong Kong Anti-Cancer Society*, Erişim: <http://www.hkacs.org.hk>, Erişim Tarihi: 17.07.2014.

LEE, K., KIM E., CHO, S. G., HAN, Y. J., YANG, Y. C., LEE, S. S., KO, M. S., RIU, K. J., LEE, H. T., PARK, S. P. (2011). 3,4- Dihydroxyflavone acts as an antioxidant and antiapoptotic agent to support bovine embryo development in vitro. *J. The Journal of Reproduction and Development.*, **57**: 127-134.

LEE, W. R., SHEN, S. C., LIN, H. Y., HOU, W. C., YANG, L. L., CHEN, Y. C. (2002). Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by

a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease. *Biochemical Pharmacology.*, **63**: 225-236.

LEIPENG, L., RUISI, L., FENGJIE, X., YUANGANG, Z., ZHIGUO, L. (2015). Study on the interactions between anti-cancer drug oxaliplatin and DNA by atomic force microscopy. *J. Micron.*, **76**: 46-51.

LEIRO, J. M., VARELA, M., PIAZZON, M. C., ARRANZ, J. A., NOYA, M., LAMAS, J. (2010). The anti-inflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF- alpha) pre-mRNA splicing. *J. Molecular Immunology.*, **47**: 1114-1120.

LI, M. H., ITO, D., SANADA, M., ODANI, T., HATORI, M., IWASE, M., NAGUMO, M. (2004). Effect of 5- fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *J. Oral Oncology.*, **40**: 63-70.

LIBUTTI, S. K., SALZ, L. B., WILLETT, C. G. (2011). Cancer of the Colon, In: *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 9th Ed., Ed.: V. T. DEVITA, T. S. LAWRENCE, S. A. ROSENBERG, Philadelphia. Pa: Lippincott Williams & Wilkins, p.: 1084-1126.

LIN, J.P., YANG, J.S., LIN, J.J., LAI, K.C., LU, H.F., MA, C.Y., SAI-CHUEN, W. R., WU, K.C., CHUEH, F.S., GIBSON, W.W., CHUNG, J.G. (2012). Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *J. Environmental Toxicology and Chemistry*, **27**(8): 480-484.

LOMBARDI, L., MORELLI, F., CINIERI, S., SANTINI, D., SILVESTRIS, N., FAZIO, N., ORLANDO, L., TONINI, G., COLUCCI, G., MAIELLO, E. (2010). Adjuvant colon cancer chemotherapy: where we are and where we'll go. *J. Cancer treatment reviews.*, **36**: 34-41.

LONGLEY, D. B., LATIF, T., BOYER, J., ALLEN, W. L., MAXWELL, P. J., JOHNSTON, P. G. (2003). The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells. *J. Seminars in Oncology.*, **30**: 3-9.

MAKITA, H., TANAKA, T., FUJITSUKA, H., TATEMATSU, N., SATOH, K., HARA, A., MORI, H. (1996). Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *J. Cancer Research.*, **56**: 4904-4909.

Manthey, J. A., Guthrie, N., Grohmann, K. (2001). Biological properties of Citrus flavonoids Pertaining to cancer and inflammation. *J. Current Medicinal Chemistry.*, **8**: 135-153.

MARCHAND, L. L., MURPHY, S. P., HANKIN, J. H., WILKENS, L. R., KOLONEL, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *J. National Cancer Institute.*, **92**: 154-160.

MARTINVALET, D., ZHU, P., LIEBERMAN, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *J. Immunity.*, **22**: 355-70.

MCLEOD, H. L., MURRAY, G. I. (1999). Tumor markers of prognosis in colorectal cancer. *J. Cancer.*, **79**: 191-203.

MIDDLETON, E. J., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *J. Pharmacological Reviews.*, **52**: 673-751.

MORAND, C., MANACH, C., CRESPIY, V., REMESY, C. (2000). Respective bioavailability of quercetinaglycone and its glycosides in a rat mode. *J. Biofactors.*, **12**: 169-174.

MRAZ, M., MALINOVA, K., KOTASKOVA, J., PAVLOVA, S., TICHY, B., MALCIKOVA, J., KOZUBIK, K.S., SMARDOVA, J., BRYCHTOVA, Y., DOUBEK, M., TRBUSEK, M., MAYER, J., POSPISILOVA, S. (2009). MiR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *J. Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund.*, **23**(6): 1159-1163.

MURPHY, K. (2012). Janeway's Immunobiology, 8th Ed. London: Garland Science, Chapter 15, p.: 611-668.

MUTOH, M., TAKAHASHI, M., FUKUDA, K., KOMATSU, H., ENYA, T., MATSUSHIMA, H. Y., MUTOH, H., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. (2000). Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: Structure-activity relationship. *J. Gann Nihon Gan Gakkai Japanese journal of cancer research.*, **91**: 686-691.

NAKASHIMA, K., YAMAZAKI, K., BOKU, N. (2008). Molecular target therapy and chemotherapy for advanced colorectal cancer. *J. Gan to Kagaku Ryoho Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy.*, **35**(5): 725-730.

NAKAYAMA, M., AIHARA, M., CHEN, Y.N., ARAIE, M., TOMITA- YOKOTANI, K., IWASHINA, T. (2011). Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia, glutamate, and oxidative stress induced retinal ganglion cell death. *J. Molecular Vision.*, **17**: 1784-1793.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (U.S.). (2006). What you need to know about cancer of the colon and rectum. *Bethesda, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute.*

Nehru, M. R., Singh, P.O. (2008). Nanotechnology and Cancer Treatment. *J. Asian Journal of Experimental Biological Science.*, **22**: 45-50.

NEWBY, Z., LEE, T. T., MORSE, R. J., LIU, Y., LIU, L., VENKATRAMAN, P., SANTI, D. V., FINER-MOORE, J. S., STROUD, R. M. (2006). The role of protein dynamics in thymidylate synthase catalysis: variants of conserved 2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP)-binding Tyr-261. *J. Biochemistry.*, **45**: 7415-7428.

NG, K., MEYERHARDT, J., CHAN, A., SATO, K., CHAN, J., NIEDZWIECKI, D., SALTZ, L. B., MAYER, R. J., BENSON, A. B., SCHAEFER, P. L., WHITTON, R., HANTEL, A., GOLDBERG, R. M., VENOOK, A. P., OGINO, S., GLOVANNUCCI, E.

L., FUCHS, C. S. (2014). Aspirin and COX-2 Inhibitor Use in Patients With Stage III Colon Cancer. *J. Journal Of The National Cancer Institute.*, **107**(1): 345-345.

NICHOLSON, D. W., THORNBERRY, N. A. (2000). Caspases: killer proteases. *J. Biochemical Sciences.*, **22**: 299-306.

NOORDHUIS, P., HOLWERDA, U., VAN DER WILT, C. L., VAN GROENINGEN, C. J., SMID, K., MEIJER, S., PINEDO, H. M., PETERS, G. J. (2004). 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *J. Annals of Oncology.*, **15**: 1025-1032.

OBDULIO, B. G., JULIAN, C., FRANCISCO, R. M., ANA, O., JOSE, A. D. (1997). Uses and properties of Citrus flavonoids. *J. Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **45**: 4505-4515.

OHNSTON, P. G., DRAKE, J. C., TREPPEL, J., ALLEGRA, C. J. (1992). Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal anti-body TS 106 in 5 fluorouracil-sensitive and-resistant human cancer cell lines. *J. Anticancer Research.*, **52**: 4306-4312.

OOYAMA, A., OKA, T., ZHAO, H. Y., YAMAMOTO, M., AKIYAMA, S. I., FUKUSHIMA, M. (2008). Anti- angiogenic effect of 5-Fluorouracil-based drugs against human colon cancer xenografts. *J. Cancer Letters.*, **267**(1): 26-36.

PATEL, B. B., SENGUPTA, R., QAZI, S., VACHHANI, H., YU, Y., RISHI, A. K., MAJUMDAR, A. P. (2008). Curcumin Enhances the Effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Mediating Growth Inhibition of Colon Cancer Cells by Modulating EGFR and IGF-1R. *J. International Journal of Cancer.*, **122**: 267-273.

PATIL, S. L., MALLAIAH, S. H., PATIL, R. K. (2013). Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation. *J. JOURNAL OF MEDICAL PHYSICS.*, **38**: 87-92.

PITOT, H. C., GOLDSWORTHY, T., MORAN, S. (2004). The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *J. Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry.*, **17**(2): 133-146.

POUGET, C., LAUTHIER, F., SIMON, A., FAGNERE, C., BASLY, J. P., DELAGE, C., CHULIA, A. J. (2001). Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *J. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* ., **11**: 3095-3097.

POWER, D., LICHTMAN, S. (2008). Adjuvant and Palliative Chemotherapy for Colon Cancer in the Elderly Patient. *J. Seminars in Colon and Rectal Surgery.*, **19**(4): 239-246.

PUVVADA, S. D., FUNKHOUSER, W. K., GREENE, K., DEAL, A., CHU, H., BALDWIN, A. S., TEPPER, J. E., O'NEIL, B. H. (2010). NF- κ B and Bcl-3 Activation Are Prognostic in Metastatic Colorectal Cancer. *J. Oncology.*, **78**: 181-188.

QIN, L., ZHANG, X., ZHANG, L., FENG, Y., WENG, G. X., LI, M. Z., KONG, Q. L., QIAN, C. N., ZENG, Y. X., ZENG, M. S., LIAO, D. F., SONG, L. B. (2008). Downregulation of BMI-1 enhances 5-fluorouracil- induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *J. Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **371**: 531-535.

RAHMAN, A., SULTAN, T., ISLAM, R. (2012). Apoptosis and cancer: insights molecular mechanisms and treatments. *Int. J. Biomol. and Biomed*, **2**: 1-16.

RANGER, G. (2014). Current concepts in colorectal cancer prevention with cyclooxygenase inhibitors. *J. Anticancer Research*, **34**(11): 6277-6282.

Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. (1998). Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *J. Annals of Oncology.*, **9**(10): 1053-71.

RAYMOND, E., CHANEY, S. G., TAAMMA, A., CVITKOVIC, E. (1998). Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *J. Annals of Oncology.*, **9**: 1053-1071.

REBECCA, S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Experimental & Clinical Cancer Research.*, **30**: 1-14.

REITER, W., STIEBER P., REUTER, C., NAGEL, D., LAU-WERNER, U., PAHL, H., FATEH-MOGHADAM, A. (1997). Preoperative serum levels of CEA and CA 19-9 and their prognostic significance in colorectal carcinoma. *J. Anticancer Research.*, **17**: 2935-2938.

REITER, W., STIEBER, P., REUTER, C., NAGEL, D., LAU-WERNER, U., LAMERZ, R. (2000). Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *J. Anticancer Research.*, **20**: 5195-5198.

Roberts, S. A., Hyatt, D. C., Honts, J. E., Changchien, L., Maley, G. F., Maley, F., Montfort, W. R. (2006). Structure of the Y94F mutant of Escherichia coli thymidylate synthase. *J. Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications.*, **62**: 840-843.

RONG, Y., YANG, E. B., ZHANG, K., MACK, P. (2000). Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *J. Anticancer Resesrch .*, **20**: 4339-4345.

ROTELLI, A. E., GUARDIA, T., JUAREJ, A. O., ROCHA. N. E., PELZER, L. E. (2003). Comparative study of Flavonoids in experimental models of inflammation. *J. Pharmacological Research.*, **48**: 601-606.

ROTHENBERG, M. L. (2000). Efficacy of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. *J. Oncology., (Williston Park).*, **14**: 9-14.

ROY, N., CARDONE, M. H. (2002). The Caspases: Consequential Cleavage, In: Apoptosis: The Molecular Biology of Programmed Cell Death, Ed: M. D. JACOBSON, N. MCCARTHY, Oxford: Oxford University Press, p.: 93-135.

ROY, N., DEVERAUX, Q. L., TAKAHASHI, R., SALVESEN, G. S., REED, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *J. The EMBO Journal.*, **16**: 6914-6925.

RUDDON, R. (2007). *Cancer Biology*, Vol. 4. Oxford: Oxford University Press, p.: 3-8.
Ruzzo, A., Graziano, F., Loupakis, F., Rulli, E., Canestrari, E., Santini, D., Catalano, V., Ficarelli, R., Maltese, P., Bissoni, R., Masi, G., Schiavon, G., Giordani, P., Giustini, L., falcone, A., Tonini, G., Silva, R., Mattioli, R., Floriani, I., Magnani, M. (2007). Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J. Clinical Oncology.*, **25**: 1247-54.

RUZZO, A., GRAZIANO, F., LOUPAKIS, F., RULLI, E., CANESTRARI, E., SANTINI, D., CATALANO, V., FICARELLI, R., MALTESE, P., BISONNI, R., MASI, G., SCHIAVON, G., GIORDANI, P., GIUSTINI, L., FALCONE, A., TONINI, G., SILVA, R., MATTIOLI, R., FLORIANI, I., MAGNANI, M. (2007). Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J. Clinical Oncology.*, **25**(10): 1247-54.

SAK, K. (2014). Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *J. Pharmacognosy Reviews.*, **8**(16): 122-146.

SAKAGAMI, H., JIANG, Y., KUSAMA, K., ATSUMI, T., UEHA, T., TOGUCHI, M. (2000). Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoid-substituted flavonoids in human oral tumor cell lines. *J. Anticancer Research.*, **20**: 271-277.

SALVESEN, G. S., DIXIT, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *J. Cell.*, **91**: 443-446.

SATO, T., KOIKE, L., MIYATA, Y., HIRATA, M., MIMAKI, Y., SASHIDA, Y. (2002). Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 production and suppression of production of matrix

metalloproteinases-1 and -9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *J. Cancer Research.*, **62**: 1025-1029.

SENDEROWICZ, A. M. (2001). Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies. *Leukemia.*, **15**: 1-9.

SGHAIERA, M. B., SKANDRANI, I., NASRA, N., FRANCA, M. G. D., CHEKIR-GHEDIRAA, L., GHEDIRAA, K. (2011). Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *J. Environmental Toxicology and Pharmacology.*, **32**: 336-348.

SHAKIBAEI, M., BUHRMANN, C., KRAEHE, P., SHAYAN, P., LUEDERS, C., GOEL, A. (2014). Curcumin Chemosensitizes 5-Fluorouracil Resistant MMR-Deficient Human Colon Cancer Cells in High Density Cultures. *J. PLoS ONE.*, **9(1)**: e85397. doi: 10.1371/journal.pone.0085397.

SHARMA, R. I., SMITH, T. A. D. (2008). Colorectal tumor cells treated with 5-FU, oxaliplatin, irinotecan and cetuximab exhibit changes in 18 F-FDG incorporation corresponding with hexokinase activity and glucose transport. *J. Journal of Nuclear Medicine.*, **49**: 1386-1394.

SHI, Y. Q., FUKAI, T., SAKAGAMI, H., CHANG, W. J., YANG, P. Q., WANG, F. P., NOMURA, T. (2001). Cytotoxic flavonoids with isoprenoid groups from *Morus mongolica*. *J. Journal of Natural Products.*, **64**: 181-188.

SISS, M. H., LE BON, A. M., CANIVENC-LAVIER, M. C., SUSCHETET, M. (2000). Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *J. Biofactors.*, **12**: 193-199.

SILVERSTEIN, A., SILVERSTEIN, V., NUNN, L. (2006). *Cancer*, Brookfield, Conn.: Twenty-First Century Books, p.: 11-12.

SLATTERY, M. L., BOUCHER, K., CAAN, B. J., POTTER, J. D., MA, K. N. (1998). Eating patterns and risk of colon cancer. *J. American Journal of Epidemiology.*, **148**: 4-16.

SLATTERY, M. L., CAAN, B. J. (2001). Nutrition and Colon Cancer, In: *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*, Ed.: A. M. COULSTON, C. L. ROCK, E. R. MONSEN, San Diego. CA: Academic Press, Chapter 23.

STEELE, V. E., KELLOFF, G. J., BALENTINE, D., BOONE, C. W., MEHTA, R., BAGHERI, D., SIGMAN, C. C., ZHU, S., SHARMA, S. (2000). Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *J. Carcinogenesis.*, **21**: 63-67.

STEINMETZ, K., Potter, J. D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. American Dietetic Association.*, **96**: 1027-1039.

SUH DK, LEE EJ, KIM HC, KIM JH. (2010). Induction of G1/S phase arrest and apoptosis by quercetin in human osteosarcoma cells. *J. Archives of Pharmacal Research.*, **33**: 781-785.

SUKARDIMAN., DARWANTO, A., TANJUNG, M., DARMADI, M. O. (2000). Cytotoxic mechanism of flavonoid from TemuKunci (*Kaempferiapandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. *J. Clinical Hemorheology and Microcirculation.*, **23**: 185-190.

SÜMBÜLOĞLU, K., SÜMBÜLOĞLU, V. (2012). Biyoistatistik, 12. Basım, Ankara: Hatipoğlu yayın evi.

SUN, X. Y., PLOUZEK, C. A., HENRY, J. P., WANG, T. T., PHANG, J. M. (1998). Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *J. Cancer Research.*, **58**: 2379-2384.

SURGET, S., KHOURY, M., BOURDON, J. C. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *J. OncoTargets and therapy.*, **7**: 57-68.

SURH, Y. J., (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *J. Nature Reviews Cancer.*, **3**: 768-780.

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI KANSER DAİRE BAŞKANLIĞI. (n.d.). 2006-2008 yılları Türkiye Kanser İnsidansı: Erişim: <http://kanser.gov.tr/>, Erişim Tarihi: 28.06.2014.

TAKAOKA, A., HAYAKAWA, S., YANAI, H., STOIBER, D., NEGISHI, H., KIKUCHI, H., SASAKI, S., IMAI, K., SHIBUE, T., HONDA, K., TANIGUCHI, T. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *J. Nature.*, **424**: 516-523.

TANAKA, T., MAKITA, H., KAWABATA, K., MORI, H., KAKUMOTO, M., SATOH, K., HARA, A., SUMIDA, T., TANAKA, T., OGAWA, H. (1997). Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis By the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *J. Carcinogenesis.*, **18**: 957-965.

TATSUTA, M., IISHI, H., BABA, M., YANO, H., MURATA, K., MUKAI, M., AKEDO, H. (2000). Suppression by apigenin of peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane in Wistar rats. *J. Clinical & Experimental Metastasis.*, **18**: 657-662.

TODD, R. C., LIPPARD, S. J. (2009). Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *J. Metallomics.*, **1**: 280-291.

TOLOUDI, M., APOSTOLOU, P., PAPASOTIRIOU, I. (2015). Efficacy of 5-FU or oxaliplatin monotherapy over combination therapy in colorectal cancer. *J. Journal of Cancer Therapy.*, **6**: 345-355.

TSENG, H.H., CHEN, P.N., KUO, W.H., WANG, J.W., CHU, S.C., HSIEH, Y.S. (2012). Antimetastatic potentials of *Phyllanthus urinaria* L on A549 and Lewis lung carcinoma cells via repression of matrix-degrading proteases. *J. Integrative Cancer Therapies*, **11**(3): 267-278.

VAJGER, U., JERAS, M. (2012). Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. *J. International Reviews of Immunology.*, **31**: 202-222.

VANDER, L. E., ROELOFS, H. M., NAGENGAST, F. M., PETERS, W. H. (2003). Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. *J. Carcinogenesis.*, **24**: 1651-1656.

VIRAG, L., SZABO, C. (2002). The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *J. Pharmacological Reviews.*, **54**: 375-429.

VOLATE, S. R., DAVENPORT, D. M., MUGA, S. J., WARGOVICH, M. J. (2005). Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *J. Carcinogenesis.*, **26**(8): 1450-1456.

VOORRIPS, L. E., GOLDBOHM, R. A., VAN POPPEL, G., STURMANS, F., HERMUS, R. J. J., VAN DEN BRANDT, P. A. (2000). Vegetable and fruit consumption and risks of colon and rectal cancer in a prospective cohort study. *J. American Journal of Epidemiology.*, **152**: 1081-1092.

WADA, H., NAGANO, H., YAMAMOTO, H., ARAI, I., OTA, H., NAKAMURA, M., DAMDINSUREN, B., NODA, T., MARUBASHI, S., MIYAMOTO, A., TAKEDA, Y., UMESHITA, K., DOKI, Y., DONO, K., NAKAMORI, S., SAKON, M., MONDEN, M. (2007). Combination therapy of interferon-alpha and 5-fluorouracil inhibits tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma cells by regulating vascular endothelial growth factor and angiopoietins. *J. Oncology Reports.*, **18**: 801-809.

WAJANT, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *J. Science.*, **296**: 1635-1636.

WANG P, ZHANG K, ZHANG Q, MEIB J, CHEN C, FENG Z, YU D. (2012). Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *J. Toxicology in Vitro.*, **26**: 221-228.

Wang, H. K. (2000). The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opinion on Investigational Drugs.*, **9**: 2103-2119.

WANG, X., WANG, Y., CHEN, Z., SHIN, M. D. (2009). Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology. *J. Cancer Research and Treatment.*, **41**: 1-11.

WEIDNER, M., PETER, S., STROKMEYER, T., HUSSNATTER, R., ACKERMANN, R., SIES, H. (1990). Inverse relationship of epidermal growth factor receptor and HER2/neu gene expression in human renal cell carcinoma. *J. Cancer Research.*, **50**: 4504-4509.

WENZEL, U., KUNTZ, S., BRENDEL, M. D., DANIEL, H., DANIEL, H. (2000). Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *J. Cancer Research.*, **60**: 3823-3831.

WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH World. (2007). Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. *Washington, DC: WCRF/AICR.*

WOYNAROWSKI, J. M., FAIVRE, S., HERZIG, M. C., ARNETT, B., CHAPMAN, W. G., TREVINO, A. V., RAYMOND, E., CHANEY, S. G., VAISMAN, A., VARCHENKO, M., JUNIEWICZ, P. E. (2000). Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *J. Molecular Pharmacology.*, **58**: 920-927.

YANG, C. S., CHUNG, J. Y., YANG, G. Y., CHHABRA, S. K., LEE, M. J. (2000). Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J. Nutrition.*, **130**: 472-478.

YANG, C. S., LANDAU, J. M., HUANG, M. T., NEWMARK, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *J. Annual Review of Nutrition.*, **21**: 381-406.

YIN, F., GIULIANO, A. E., VAN HERLE, A. J. (1999). Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *J. Thyroid.*, **9**: 369-376.

YIN, F., GIULIANO, A. E., VAN HERLE, A. J. (1999). Signal pathways involved in apigenin inhibition of Growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *J. Anticancer Research.*, **19**: 4297-4303.

YONISH-ROUACH, E., RESNITSKY, D., LOTEM, J., SACHS, L., KIMCHI, A., OREN, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *J. Nature.*, **352**: 345-347.

YOSHIDA, H., KONG, Y. Y., YOSHIDA, R., ELIA, A. J., HAKEM, A., HAKEM, R., PENNINGER, J. M., MAK, T. W. (1998). Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *J. Cell.*, **18**: 739-750.

YOSHIKAWA, R., KUSUNOKI, M., YANAGI, H., NODA, M., FURUYAMA, J. I., YAMAMURA, T., HASHIMOTO-TAMAOKI, T. (2001). Dual Antitumor Effects of 5-Fluorouracil on the Cell Cycle in Colorectal Carcinoma Cells: A Novel Target Mechanism Concept for Pharmacokinetic Modulating Chemotherapy. *J. Cancer Research.*, **61**: 1029-1037.

ZEISS, C. J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *J. Veterinary Pathology.*, **40**: 481-95.

ZHOU, J., ZHOU, Y., YIN, B., HAO, W., ZHAO, L., JU, W., BAI, C. (2010). 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells in vitro. *J. oncology reports.*, **23**: 121-128.

ZOU, H., HENZEL, W. J., LIU, X., LUTSCHG, A., WANG, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *J. Cell.*, **90**: 405-413.

ZUCKERMAN, D. S., CLARK, J. W. (2008). Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *J. Cancer.*, **112**: 1879-91.

Ek-1. 5-Fluorourasil uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (24 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std. Hata | Std. Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|----|----------------|-----------|------------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 12 | 100,00 | 3,83 | 13,26 | 95,52 | 41,33 | 86,78 | 128,11 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 66,32 | 1,39 | 3,93 | 65,39 | 10,85 | 61,39 | 72,23 | b | |
| | B | 7 | 62,71 | 1,38 | 3,64 | 62,76 | 8,09 | 58,72 | 66,81 | bc | |
| | C | 7 | 58,31 | 1,10 | 2,92 | 58,46 | 7,58 | 55,10 | 62,68 | cd | |
| | D | 8 | 53,38 | 0,84 | 2,37 | 52,99 | 7,66 | 49,42 | 57,08 | d | |
| | E | 8 | 27,27 | 0,88 | 2,49 | 26,52 | 7,83 | 24,37 | 32,20 | e | |

Ek-2. 5-Fluorourasil uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (48 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|----|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 16 | 100,00 | 1,35 | 5,41 | 99,73 | 23,02 | 90,66 | 113,68 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 54,77 | 1,14 | 3,22 | 54,61 | 10,00 | 48,42 | 58,43 | b | |
| | B | 8 | 40,26 | 0,60 | 1,70 | 40,33 | 4,68 | 37,56 | 42,24 | c | |
| | C | 8 | 40,26 | 0,60 | 1,70 | 40,33 | 4,68 | 37,56 | 42,24 | c | |
| | D | 8 | 35,07 | 0,69 | 1,94 | 35,04 | 5,54 | 32,95 | 38,49 | d | |
| | E | 8 | 16,81 | 0,29 | 0,82 | 16,51 | 2,37 | 15,83 | 18,20 | e | |

Ek-3. 5-Fluorourasil uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (72 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|----|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 15 | 100,00 | 1,20 | 4,67 | 101,19 | 20,41 | 86,88 | 107,30 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 28,72 | 0,16 | 0,46 | 28,58 | 1,27 | 28,23 | 29,49 | b | |
| | B | 8 | 25,34 | 0,21 | 0,61 | 25,15 | 1,49 | 24,76 | 26,25 | c | |
| | C | 8 | 23,03 | 0,26 | 0,74 | 23,33 | 1,98 | 21,90 | 23,88 | c | |
| | D | 8 | 20,07 | 0,15 | 0,41 | 20,11 | 1,43 | 19,37 | 20,80 | d | |
| | E | 8 | 12,39 | 0,14 | 0,38 | 12,44 | 1,27 | 11,55 | 12,82 | e | |

Ek-4. Oksaliptatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (24 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|-------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 12 | 100,00 | 3,83 | 13,26 | 95,52 | 41,33 | 86,78 | 128,11 | a | 0,000 |
| | A | 4 | 77,85 | 1,21 | 2,43 | 76,93 | 5,34 | 76,11 | 81,45 | b | |
| | B | 4 | 72,94 | 1,39 | 2,77 | 73,87 | 6,11 | 68,96 | 75,08 | b | |
| | C | 4 | 62,51 | 0,63 | 1,27 | 62,63 | 2,50 | 61,13 | 63,62 | c | |
| | D | 4 | 50,73 | 1,49 | 2,99 | 50,67 | 6,20 | 47,70 | 53,90 | d | |
| | E | 4 | 45,46 | 0,94 | 1,87 | 45,54 | 3,79 | 43,48 | 47,27 | de | |
| | F | 6 | 48,01 | 1,35 | 3,30 | 47,22 | 9,64 | 43,99 | 53,64 | d | |
| | G | 7 | 45,91 | 0,97 | 2,58 | 46,92 | 6,37 | 42,27 | 48,64 | de | |
| | H | 8 | 39,28 | 0,67 | 1,90 | 39,00 | 6,46 | 36,33 | 42,79 | e | |
| I | 8 | 16,12 | 0,11 | 0,32 | 16,10 | 1,03 | 15,67 | 16,70 | f | | |

Ek-5. Oksaliptatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (48 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|-------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 12 | 100,00 | 1,90 | 6,57 | 101,58 | 22,20 | 87,73 | 109,92 | a | 0,000 |
| | A | 4 | 86,26 | 2,28 | 4,56 | 84,74 | 10,13 | 82,71 | 92,84 | b | |
| | B | 4 | 73,49 | 1,71 | 3,43 | 72,91 | 8,20 | 69,97 | 78,17 | c | |
| | C | 4 | 43,82 | 1,64 | 3,28 | 42,80 | 7,05 | 41,31 | 48,35 | d | |
| | D | 8 | 40,67 | 0,86 | 2,43 | 40,87 | 7,43 | 36,48 | 43,91 | de | |
| | E | 8 | 39,06 | 0,81 | 2,30 | 39,09 | 7,53 | 36,09 | 43,62 | e | |
| | F | 4 | 27,34 | 0,58 | 1,15 | 27,17 | 2,70 | 26,15 | 28,86 | g | |
| | G | 7 | 33,92 | 0,74 | 1,96 | 34,16 | 5,79 | 31,66 | 37,45 | f | |
| | H | 8 | 27,06 | 0,44 | 1,25 | 27,26 | 3,67 | 25,38 | 29,05 | g | |
| I | 8 | 17,93 | 0,13 | 0,36 | 17,95 | 1,16 | 17,28 | 18,43 | h | | |

Ek-6. Oksaliptatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (72 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|-------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 15 | 100,00 | 1,20 | 4,67 | 101,19 | 20,41 | 86,88 | 107,30 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 19,39 | 0,27 | 0,77 | 19,20 | 2,04 | 18,60 | 20,63 | b | |
| | B | 8 | 18,78 | 0,13 | 0,36 | 18,76 | 0,99 | 18,32 | 19,31 | b | |
| | C | 8 | 17,79 | 0,39 | 1,10 | 17,44 | 3,41 | 16,62 | 20,03 | b | |
| | D | 8 | 11,41 | 0,20 | 0,56 | 11,28 | 1,65 | 10,56 | 12,22 | c | |
| E | 8 | 10,49 | 0,13 | 0,36 | 10,43 | 1,05 | 9,90 | 10,95 | c | | |

Ek-7. Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (24 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|-------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 14 | 100,00 | 1,39 | 5,21 | 100,36 | 18,65 | 92,66 | 111,31 | a | 0,000 |
| | A | 7 | 100,02 | 1,65 | 4,35 | 100,06 | 12,43 | 93,85 | 106,28 | a | |
| | B | 8 | 100,21 | 1,87 | 5,28 | 100,95 | 16,87 | 91,48 | 108,35 | a | |
| | C | 8 | 99,95 | 2,28 | 6,45 | 101,84 | 15,99 | 91,77 | 107,76 | a | |
| | D | 8 | 98,44 | 1,69 | 4,77 | 97,70 | 15,69 | 92,07 | 107,76 | a | |
| | E | 8 | 94,62 | 1,63 | 4,61 | 95,18 | 13,62 | 88,22 | 101,84 | a | |
| | F | 8 | 87,93 | 2,12 | 5,99 | 86,74 | 17,76 | 82,60 | 100,36 | b | |
| | G | 8 | 70,27 | 2,03 | 5,75 | 71,50 | 15,69 | 62,47 | 78,16 | c | |
| | H | 8 | 74,09 | 1,32 | 3,74 | 74,01 | 10,36 | 68,39 | 78,75 | c | |
| I | 8 | 74,64 | 1,02 | 2,89 | 74,90 | 7,99 | 71,05 | 79,04 | c | | |

Ek-8. Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (48 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|-------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 15 | 100,00 | 1,94 | 7,52 | 99,72 | 26,27 | 88,06 | 114,33 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 97,83 | 0,91 | 2,58 | 98,52 | 6,84 | 94,09 | 100,93 | ab | |
| | B | 7 | 98,13 | 1,71 | 4,53 | 100,66 | 11,39 | 90,74 | 102,14 | ab | |
| | C | 7 | 95,93 | 1,13 | 2,98 | 95,03 | 7,91 | 93,16 | 101,06 | ab | |
| | D | 8 | 93,16 | 2,02 | 5,72 | 93,29 | 18,09 | 82,70 | 100,80 | b | |
| | E | 8 | 80,27 | 2,81 | 7,94 | 81,43 | 26,27 | 63,67 | 89,94 | c | |
| | F | 8 | 62,73 | 1,21 | 3,42 | 62,33 | 9,38 | 58,84 | 68,22 | de | |
| | G | 8 | 52,93 | 0,90 | 2,55 | 53,95 | 7,10 | 48,39 | 55,49 | f | |
| | H | 8 | 58,59 | 0,65 | 1,83 | 58,64 | 6,03 | 55,49 | 61,52 | ef | |
| I | 8 | 64,72 | 3,73 | 10,54 | 64,67 | 38,33 | 47,45 | 85,78 | d | | |

Ek-9. Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (72 saat)

| | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p | |
|------------|---------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|--------|----|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 10 | 100,00 | 1,98 | 6,27 | 100,35 | 20,12 | 92,24 | 112,36 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 97,98 | 1,72 | 4,88 | 97,21 | 12,34 | 92,12 | 104,47 | ab | |
| | B | 7 | 98,12 | 1,51 | 4,00 | 96,93 | 10,06 | 93,04 | 103,10 | ab | |
| | C | 8 | 98,50 | 1,50 | 4,23 | 100,24 | 13,14 | 89,38 | 102,53 | a | |
| | D | 8 | 94,00 | 1,54 | 4,35 | 93,78 | 12,00 | 89,50 | 101,50 | b | |
| | E | 8 | 75,68 | 1,71 | 4,85 | 77,61 | 15,43 | 66,86 | 82,30 | c | |
| | F | 8 | 48,52 | 1,02 | 2,88 | 48,12 | 8,00 | 44,92 | 52,92 | d | |
| | G | 8 | 37,39 | 0,53 | 1,51 | 37,26 | 4,80 | 35,20 | 40,00 | f | |
| | H | 8 | 42,39 | 0,62 | 1,77 | 42,52 | 5,71 | 40,00 | 45,72 | e | |
| I | 8 | 45,78 | 0,35 | 1,00 | 45,61 | 2,97 | 44,23 | 47,21 | de | | |

Ek-10. 5-Fluorourasil+Oksaliplatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (24 saat)

| | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p | |
|------------|---------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|--------|----|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 16 | 100,00 | 1,84 | 7,38 | 100,38 | 22,89 | 87,80 | 110,69 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 58,59 | 1,67 | 4,72 | 57,45 | 15,15 | 51,87 | 67,02 | b | |
| | B | 8 | 54,33 | 1,61 | 4,57 | 53,47 | 15,00 | 46,95 | 61,94 | bc | |
| | C | 8 | 53,47 | 1,32 | 3,74 | 52,61 | 11,17 | 48,90 | 60,07 | bc | |
| | D | 7 | 52,68 | 1,55 | 4,09 | 52,02 | 9,37 | 48,12 | 57,49 | c | |
| | I | 8 | 39,06 | 1,37 | 3,89 | 39,21 | 14,22 | 31,64 | 45,85 | d | |

Ek-11. 5-Fluorourasil+Oksaliplatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (48 saat)

| | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p | |
|------------|---------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|--------|----|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 15 | 100,00 | 1,68 | 6,51 | 100,13 | 24,02 | 88,05 | 112,07 | a | 0,000 |
| | A | 7 | 32,68 | 0,53 | 1,40 | 32,12 | 3,91 | 31,25 | 35,17 | b | |
| | B | 8 | 32,54 | 0,58 | 1,65 | 32,05 | 5,44 | 30,52 | 35,96 | b | |
| | C | 8 | 31,10 | 0,71 | 2,02 | 30,95 | 5,91 | 28,60 | 34,50 | bc | |
| | D | 8 | 28,29 | 0,38 | 1,07 | 27,80 | 3,18 | 27,60 | 30,79 | c | |
| | E | 8 | 22,84 | 0,43 | 1,22 | 22,63 | 3,91 | 20,64 | 24,55 | d | |

Ek-12. 5-Fluorourasil+Oksaliptatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (72 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|----|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 15 | 100,00 | 0,92 | 3,56 | 99,29 | 13,05 | 93,38 | 106,43 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 21,02 | 0,78 | 2,20 | 20,64 | 7,31 | 18,91 | 26,22 | b | |
| | B | 8 | 19,72 | 0,66 | 1,87 | 19,97 | 6,02 | 15,67 | 21,70 | bc | |
| | C | 8 | 18,87 | 0,76 | 2,14 | 19,63 | 6,75 | 13,89 | 20,64 | bcd | |
| | D | 8 | 17,74 | 0,22 | 0,61 | 17,63 | 1,95 | 16,85 | 18,80 | cd | |
| | E | 8 | 16,47 | 0,43 | 1,22 | 16,59 | 3,79 | 14,39 | 18,18 | d | |

Ek-13. 5-Fluorourasil+Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (24 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|----|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 16 | 100,00 | 1,91 | 7,65 | 99,03 | 28,71 | 89,87 | 118,58 | a | 0,000 |
| | A | 6 | 57,10 | 1,59 | 3,88 | 57,96 | 11,41 | 49,76 | 61,16 | b | |
| | B | 6 | 53,49 | 2,66 | 6,53 | 52,48 | 20,17 | 44,38 | 64,55 | bc | |
| | C | 8 | 50,05 | 1,64 | 4,65 | 50,16 | 13,76 | 43,06 | 56,82 | cd | |
| | D | 8 | 47,59 | 0,74 | 2,09 | 48,28 | 5,52 | 44,09 | 49,61 | d | |
| | E | 8 | 23,26 | 0,65 | 1,84 | 23,74 | 5,30 | 20,54 | 25,83 | e | |

Ek-14. 5-Fluorourasil+Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (48 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|----|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 13 | 100,00 | 1,75 | 6,32 | 99,96 | 23,81 | 92,75 | 116,56 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 29,14 | 0,70 | 1,97 | 29,40 | 5,41 | 26,21 | 31,62 | b | |
| | B | 8 | 28,76 | 0,75 | 2,13 | 28,50 | 5,71 | 26,59 | 32,29 | b | |
| | C | 8 | 24,93 | 0,77 | 2,17 | 25,27 | 5,78 | 21,85 | 27,64 | c | |
| | D | 8 | 23,51 | 0,42 | 1,20 | 23,43 | 3,60 | 21,85 | 25,46 | c | |
| | E | 8 | 11,71 | 0,25 | 0,70 | 11,68 | 2,10 | 10,59 | 12,69 | d | |

Ek-15. Oksaliptatin +Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (24 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|-------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 16 | 100,00 | 1,91 | 7,65 | 99,03 | 28,71 | 89,87 | 118,58 | a | 0,000 |
| | A | 4 | 50,12 | 1,87 | 3,74 | 49,79 | 8,17 | 46,37 | 54,54 | b | |
| | B | 4 | 45,17 | 2,72 | 5,45 | 45,89 | 13,10 | 37,91 | 51,01 | bc | |
| | C | 4 | 43,17 | 0,19 | 0,39 | 43,28 | 0,88 | 42,62 | 43,50 | c | |
| | D | 4 | 41,71 | 0,23 | 0,45 | 41,70 | 0,88 | 41,29 | 42,17 | c | |
| | E | 7 | 47,63 | 1,09 | 2,90 | 47,03 | 8,46 | 44,53 | 52,99 | bc | |
| | F | 8 | 46,31 | 0,73 | 2,07 | 46,08 | 6,11 | 43,43 | 49,54 | bc | |
| | G | 8 | 44,65 | 1,17 | 3,31 | 44,75 | 11,26 | 39,08 | 50,35 | bc | |
| | H | 8 | 19,57 | 0,63 | 1,79 | 18,70 | 4,64 | 17,96 | 22,60 | d | |
| I | 8 | 13,91 | 1,07 | 3,03 | 12,81 | 9,05 | 12,00 | 21,05 | e | | |

Ek-16. Oksaliptatin +Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (48 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|-------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 13 | 100,00 | 1,75 | 6,32 | 99,96 | 23,81 | 92,75 | 116,56 | a | 0,000 |
| | A | 4 | 22,61 | 0,49 | 0,98 | 22,91 | 2,25 | 21,18 | 23,43 | c | |
| | B | 4 | 22,62 | 0,63 | 1,26 | 22,68 | 3,08 | 21,03 | 24,11 | c | |
| | C | 4 | 22,46 | 0,59 | 1,18 | 22,46 | 2,25 | 21,33 | 23,58 | c | |
| | D | 4 | 22,42 | 0,79 | 1,59 | 22,00 | 3,45 | 21,10 | 24,56 | c | |
| | E | 8 | 27,05 | 0,63 | 1,77 | 26,74 | 5,86 | 23,81 | 29,66 | b | |
| | F | 8 | 24,93 | 0,69 | 1,95 | 25,01 | 6,01 | 20,88 | 26,89 | bc | |
| | G | 8 | 22,61 | 0,44 | 1,25 | 22,79 | 3,45 | 20,58 | 24,03 | c | |
| | H | 8 | 12,92 | 0,21 | 0,58 | 12,80 | 2,03 | 12,02 | 14,04 | d | |
| I | 8 | 12,55 | 0,28 | 0,80 | 12,54 | 2,85 | 11,27 | 14,12 | d | | |

Ek-17. 5-Fluorourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (24 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 9 | 100,00 | 1,22 | 3,65 | 99,91 | 12,30 | 94,41 | 106,71 | a | 0,000 |
| | A | 6 | 50,25 | 0,46 | 1,12 | 50,56 | 2,98 | 48,28 | 51,26 | b | |
| | B | 8 | 47,34 | 1,49 | 4,20 | 46,09 | 11,56 | 42,40 | 53,96 | bc | |
| | C | 8 | 44,29 | 1,77 | 5,00 | 44,22 | 14,54 | 37,28 | 51,82 | cd | |
| | D | 8 | 41,18 | 1,15 | 3,25 | 40,77 | 9,60 | 38,30 | 47,90 | d | |
| | E | 8 | 31,92 | 0,37 | 1,05 | 31,83 | 3,45 | 30,20 | 33,64 | e | |

Ek-18. 5-Fluorourasil+Oksaliplatin+Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları (48 saat)

| | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|------------|---------|----|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık % | Kontrol | 12 | 100,00 | 1,90 | 6,57 | 101,58 | 22,20 | 87,73 | 109,92 | a | 0,000 |
| | A | 8 | 28,33 | 0,53 | 1,49 | 28,04 | 3,76 | 26,83 | 30,59 | b | |
| | B | 8 | 27,58 | 0,91 | 2,56 | 27,22 | 7,82 | 25,19 | 33,01 | b | |
| | C | 8 | 26,55 | 0,74 | 2,11 | 27,07 | 6,47 | 22,97 | 29,44 | bc | |
| | D | 8 | 23,36 | 0,29 | 0,81 | 23,16 | 2,61 | 22,00 | 24,61 | c | |
| | E | 8 | 16,62 | 0,37 | 1,05 | 16,89 | 3,47 | 14,67 | 18,14 | d | |

Ek-19. Farklı dozlarda 5-Fluorourasil uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları ile diğer gruplar sonuçlarının karşılaştırılması (24 saat)

| A | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | 5FU 24 sa | 8 | 66,32 | 1,39 | 3,93 | 65,39 | 10,85 | 61,39 | 72,23 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 8 | 58,59 | 1,67 | 4,72 | 57,45 | 15,15 | 51,87 | 67,02 | b | |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 6 | 57,10 | 1,59 | 3,88 | 57,96 | 11,41 | 49,76 | 61,16 | b | |
| | Mix | 6 | 50,25 | 0,46 | 1,12 | 50,56 | 2,98 | 48,28 | 51,26 | c | |

| B | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | 5FU 24 sa | 7 | 62,71 | 1,38 | 3,64 | 62,76 | 8,09 | 58,72 | 66,81 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 8 | 54,33 | 1,61 | 4,57 | 53,47 | 15,00 | 46,95 | 61,94 | b | |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 6 | 53,49 | 2,66 | 6,53 | 52,48 | 20,17 | 44,38 | 64,55 | b | |
| | Mix | 8 | 47,34 | 1,49 | 4,20 | 46,09 | 11,56 | 42,40 | 53,96 | c | |

| C | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | 5FU 24 sa | 7 | 58,31 | 1,10 | 2,92 | 58,46 | 7,58 | 55,10 | 62,68 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 8 | 53,47 | 1,32 | 3,74 | 52,61 | 11,17 | 48,90 | 60,07 | b | |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 8 | 50,05 | 1,64 | 4,65 | 50,16 | 13,76 | 43,06 | 56,82 | b | |
| | Mix | 8 | 44,29 | 1,77 | 5,00 | 44,22 | 14,54 | 37,28 | 51,82 | c | |

| D | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | 5FU 24 sa | 8 | 53,38 | 0,84 | 2,37 | 52,99 | 7,66 | 49,42 | 57,08 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 7 | 52,68 | 1,55 | 4,09 | 52,02 | 9,37 | 48,12 | 57,49 | a | |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 8 | 47,59 | 0,74 | 2,09 | 48,28 | 5,52 | 44,09 | 49,61 | b | |
| | Mix | 8 | 41,18 | 1,15 | 3,25 | 40,77 | 9,60 | 38,30 | 47,90 | c | |

| E | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | 5FU 24 sa | 8 | 27,27 | 0,88 | 2,49 | 26,52 | 7,83 | 24,37 | 32,20 | c | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 8 | 39,06 | 1,37 | 3,89 | 39,21 | 14,22 | 31,64 | 45,85 | a | |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 8 | 23,26 | 0,65 | 1,84 | 23,74 | 5,30 | 20,54 | 25,83 | d | |
| | Mix | 8 | 31,92 | 0,37 | 1,05 | 31,83 | 3,45 | 30,20 | 33,64 | b | |

Ek-20. Farklı dozlarda 5-Fluorourasil uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları ile diğer gruplar sonuçlarının karşılaştırılması (48 saat)

| A | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | 5FU 48 sa | 8 | 54,77 | 1,14 | 3,22 | 54,61 | 10,00 | 48,42 | 58,43 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 7 | 32,68 | 0,53 | 1,40 | 32,12 | 3,91 | 31,25 | 35,17 | b | |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 29,14 | 0,70 | 1,97 | 29,40 | 5,41 | 26,21 | 31,62 | c | |
| | Mix | 8 | 28,33 | 0,53 | 1,49 | 28,04 | 3,76 | 26,83 | 30,59 | c | |

| B | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | 5FU 48 sa | 8 | 40,26 | 0,60 | 1,70 | 40,33 | 4,68 | 37,56 | 42,24 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 8 | 32,54 | 0,58 | 1,65 | 32,05 | 5,44 | 30,52 | 35,96 | b | |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 28,76 | 0,75 | 2,13 | 28,50 | 5,71 | 26,59 | 32,29 | c | |
| | Mix | 8 | 27,58 | 0,91 | 2,56 | 27,22 | 7,82 | 25,19 | 33,01 | c | |

| C | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | 5FU 48 sa | 8 | 40,26 | 0,60 | 1,70 | 40,33 | 4,68 | 37,56 | 42,24 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 8 | 31,10 | 0,71 | 2,02 | 30,95 | 5,91 | 28,60 | 34,50 | b | |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 24,93 | 0,77 | 2,17 | 25,27 | 5,78 | 21,85 | 27,64 | c | |
| | Mix | 8 | 26,55 | 0,74 | 2,11 | 27,07 | 6,47 | 22,97 | 29,44 | c | |

| D | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p | |
|----------|-----------------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|-------|---|-------|
| Canlılık | 5FU 48 sa | 8 | 35,07 | 0,69 | 1,94 | 35,04 | 5,54 | 32,95 | 38,49 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 8 | 28,29 | 0,38 | 1,07 | 27,80 | 3,18 | 27,60 | 30,79 | b | |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 23,51 | 0,42 | 1,20 | 23,43 | 3,60 | 21,85 | 25,46 | c | |
| | Mix | 8 | 23,36 | 0,29 | 0,81 | 23,16 | 2,61 | 22,00 | 24,61 | c | |

| E | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p | |
|----------|-----------------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|-------|---|-------|
| Canlılık | 5FU 48 sa | 8 | 16,81 | 0,29 | 0,82 | 16,51 | 2,37 | 15,83 | 18,20 | b | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 8 | 22,84 | 0,43 | 1,22 | 22,63 | 3,91 | 20,64 | 24,55 | a | |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 11,71 | 0,25 | 0,70 | 11,68 | 2,10 | 10,59 | 12,69 | c | |
| | Mix | 8 | 16,62 | 0,37 | 1,05 | 16,89 | 3,47 | 14,67 | 18,14 | b | |

Ek-21. Farklı dozlarda Oksaliplatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları ile diğer gruplar sonuçlarının karşılaştırılması (24 saat)

| A | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p | |
|----------|----------------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|-------|---|-------|
| Canlılık | OX 24 sa | 4 | 77,85 | 1,21 | 2,43 | 76,93 | 5,34 | 76,11 | 81,45 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 8 | 58,59 | 1,67 | 4,72 | 57,45 | 15,15 | 51,87 | 67,02 | b | |
| | OX+Rutin 24 sa | 4 | 50,12 | 1,87 | 3,74 | 49,79 | 8,17 | 46,37 | 54,54 | c | |
| | Mix | 6 | 50,25 | 0,46 | 1,12 | 50,56 | 2,98 | 48,28 | 51,26 | c | |

| B | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p | |
|----------|----------------|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|-------|---|-------|
| Canlılık | OX 24 sa | 4 | 72,94 | 1,39 | 2,77 | 73,87 | 6,11 | 68,96 | 75,08 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 8 | 54,33 | 1,61 | 4,57 | 53,47 | 15,00 | 46,95 | 61,94 | b | |
| | OX+Rutin 24 sa | 4 | 45,17 | 2,72 | 5,45 | 45,89 | 13,10 | 37,91 | 51,01 | c | |
| | Mix | 8 | 47,34 | 1,49 | 4,20 | 46,09 | 11,56 | 42,40 | 53,96 | c | |

| C | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | OX 24 sa | 4 | 62,51 | 0,63 | 1,27 | 62,63 | 2,50 | 61,13 | 63,62 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 8 | 53,47 | 1,32 | 3,74 | 52,61 | 11,17 | 48,90 | 60,07 | b | |
| | OX+Rutin 24 sa | 4 | 43,17 | 0,19 | 0,39 | 43,28 | 0,88 | 42,62 | 43,50 | c | |
| | Mix | 8 | 44,29 | 1,77 | 5,00 | 44,22 | 14,54 | 37,28 | 51,82 | c | |

| D | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | OX 24 sa | 4 | 50,73 | 1,49 | 2,99 | 50,67 | 6,20 | 47,70 | 53,90 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 7 | 52,68 | 1,55 | 4,09 | 52,02 | 9,37 | 48,12 | 57,49 | a | |
| | OX+Rutin 24 sa | 4 | 41,71 | 0,23 | 0,45 | 41,70 | 0,88 | 41,29 | 42,17 | b | |
| | Mix | 8 | 41,18 | 1,15 | 3,25 | 40,77 | 9,60 | 38,30 | 47,90 | b | |

| E | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | OX 24 sa | 4 | 45,46 | 0,94 | 1,87 | 45,54 | 3,79 | 43,48 | 47,27 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 24 sa | 8 | 39,06 | 1,37 | 3,89 | 39,21 | 14,22 | 31,64 | 45,85 | b | |
| | OX+Rutin 24 sa | 7 | 47,63 | 1,09 | 2,90 | 47,03 | 8,46 | 44,53 | 52,99 | a | |
| | Mix | 8 | 31,92 | 0,37 | 1,05 | 31,83 | 3,45 | 30,20 | 33,64 | c | |

Ek-22. Farklı dozlarda Oksaliplatin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları ile diğer gruplar sonuçlarının karşılaştırılması (48 saat)

| A | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | OX 48 sa | 4 | 86,26 | 2,28 | 4,56 | 84,74 | 10,13 | 82,71 | 92,84 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 7 | 32,68 | 0,53 | 1,40 | 32,12 | 3,91 | 31,25 | 35,17 | b | |
| | OX+Rutin 48 sa | 4 | 22,61 | 0,49 | 0,98 | 22,91 | 2,25 | 21,18 | 23,43 | d | |
| | Mix | 8 | 28,33 | 0,53 | 1,49 | 28,04 | 3,76 | 26,83 | 30,59 | c | |

| B | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | OX 48 sa | 4 | 73,49 | 1,71 | 3,43 | 72,91 | 8,20 | 69,97 | 78,17 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 8 | 32,54 | 0,58 | 1,65 | 32,05 | 5,44 | 30,52 | 35,96 | b | |
| | OX+Rutin 48 sa | 4 | 22,62 | 0,63 | 1,26 | 22,68 | 3,08 | 21,03 | 24,11 | d | |
| | Mix | 8 | 27,58 | 0,91 | 2,56 | 27,22 | 7,82 | 25,19 | 33,01 | c | |

| C | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | OX 48 sa | 4 | 43,82 | 1,64 | 3,28 | 42,80 | 7,05 | 41,31 | 48,35 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 8 | 31,10 | 0,71 | 2,02 | 30,95 | 5,91 | 28,60 | 34,50 | b | |
| | OX+Rutin 48 sa | 4 | 22,46 | 0,59 | 1,18 | 22,46 | 2,25 | 21,33 | 23,58 | d | |
| | Mix | 8 | 26,55 | 0,74 | 2,11 | 27,07 | 6,47 | 22,97 | 29,44 | c | |

| D | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | OX 48 sa | 8 | 40,67 | 0,86 | 2,43 | 40,87 | 7,43 | 36,48 | 43,91 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 8 | 28,29 | 0,38 | 1,07 | 27,80 | 3,18 | 27,60 | 30,79 | b | |
| | OX+Rutin 48 sa | 4 | 22,42 | 0,79 | 1,59 | 22,00 | 3,45 | 21,10 | 24,56 | c | |
| | Mix | 8 | 23,36 | 0,29 | 0,81 | 23,16 | 2,61 | 22,00 | 24,61 | c | |

| E | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | OX 48 sa | 8 | 39,06 | 0,81 | 2,30 | 39,09 | 7,53 | 36,09 | 43,62 | a | 0,000 |
| | 5FU+OX 48 sa | 8 | 22,84 | 0,43 | 1,22 | 22,63 | 3,91 | 20,64 | 24,55 | c | |
| | OX+Rutin 48 sa | 8 | 27,05 | 0,63 | 1,77 | 26,74 | 5,86 | 23,81 | 29,66 | b | |
| | Mix | 8 | 16,62 | 0,37 | 1,05 | 16,89 | 3,47 | 14,67 | 18,14 | d | |

Ek-23. Farklı dozlarda Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları ile diğer gruplar sonuçlarının karşılaştırılması (24 saat)

| A | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 24 sa | 7 | 100,02 | 1,65 | 4,35 | 100,06 | 12,43 | 93,85 | 106,28 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 6 | 57,10 | 1,59 | 3,88 | 57,96 | 11,41 | 49,76 | 61,16 | b | |
| | OX+Rutin 24 sa | 4 | 50,12 | 1,87 | 3,74 | 49,79 | 8,17 | 46,37 | 54,54 | c | |
| | Mix | 6 | 50,25 | 0,46 | 1,12 | 50,56 | 2,98 | 48,28 | 51,26 | c | |

| B | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 24 sa | 8 | 100,21 | 1,87 | 5,28 | 100,95 | 16,87 | 91,48 | 108,35 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 6 | 53,49 | 2,66 | 6,53 | 52,48 | 20,17 | 44,38 | 64,55 | b | |
| | OX+Rutin 24 sa | 4 | 45,17 | 2,72 | 5,45 | 45,89 | 13,10 | 37,91 | 51,01 | c | |
| | Mix | 8 | 47,34 | 1,49 | 4,20 | 46,09 | 11,56 | 42,40 | 53,96 | bc | |

| C | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 24 sa | 8 | 99,95 | 2,28 | 6,45 | 101,84 | 15,99 | 91,77 | 107,76 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 8 | 50,05 | 1,64 | 4,65 | 50,16 | 13,76 | 43,06 | 56,82 | b | |
| | OX+Rutin 24 sa | 4 | 43,17 | 0,19 | 0,39 | 43,28 | 0,88 | 42,62 | 43,50 | c | |
| | Mix | 8 | 44,29 | 1,77 | 5,00 | 44,22 | 14,54 | 37,28 | 51,82 | bc | |

| D | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 24 sa | 7 | 97,10 | 1,19 | 3,16 | 96,81 | 9,18 | 92,07 | 101,25 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 8 | 47,59 | 0,74 | 2,09 | 48,28 | 5,52 | 44,09 | 49,61 | b | |
| | OX+Rutin 24 sa | 4 | 41,71 | 0,23 | 0,45 | 41,70 | 0,88 | 41,29 | 42,17 | c | |
| | Mix | 8 | 41,18 | 1,15 | 3,25 | 40,77 | 9,60 | 38,30 | 47,90 | c | |

| E | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 24 sa | 8 | 94,62 | 1,63 | 4,61 | 95,18 | 13,62 | 88,22 | 101,84 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 24 sa | 8 | 23,26 | 0,65 | 1,84 | 23,74 | 5,30 | 20,54 | 25,83 | d | |
| | OX+Rutin 24 sa | 7 | 47,63 | 1,09 | 2,90 | 47,03 | 8,46 | 44,53 | 52,99 | b | |
| | Mix | 8 | 31,92 | 0,37 | 1,05 | 31,83 | 3,45 | 30,20 | 33,64 | c | |

Ek-24. Farklı dozlarda Rutin uygulanan Caco-2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları ile diğer gruplar sonuçlarının karşılaştırılması (48 saat)

| A | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 48 sa | 8 | 97,83 | 0,91 | 2,58 | 98,52 | 6,84 | 94,09 | 100,93 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 29,14 | 0,70 | 1,97 | 29,40 | 5,41 | 26,21 | 31,62 | b | |
| | OX+Rutin 48 sa | 4 | 22,61 | 0,49 | 0,98 | 22,91 | 2,25 | 21,18 | 23,43 | c | |
| | Mix | 8 | 28,33 | 0,53 | 1,49 | 28,04 | 3,76 | 26,83 | 30,59 | b | |

| B | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 48 sa | 7 | 98,13 | 1,71 | 4,53 | 100,66 | 11,39 | 90,74 | 102,14 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 28,76 | 0,75 | 2,13 | 28,50 | 5,71 | 26,59 | 32,29 | b | |
| | OX+Rutin 48 sa | 4 | 22,62 | 0,63 | 1,26 | 22,68 | 3,08 | 21,03 | 24,11 | c | |
| | Mix | 8 | 27,58 | 0,91 | 2,56 | 27,22 | 7,82 | 25,19 | 33,01 | b | |

| C | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 48 sa | 7 | 95,93 | 1,13 | 2,98 | 95,03 | 7,91 | 93,16 | 101,06 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 24,93 | 0,77 | 2,17 | 25,27 | 5,78 | 21,85 | 27,64 | bc | |
| | OX+Rutin 48 sa | 4 | 22,46 | 0,59 | 1,18 | 22,46 | 2,25 | 21,33 | 23,58 | c | |
| | Mix | 8 | 26,55 | 0,74 | 2,11 | 27,07 | 6,47 | 22,97 | 29,44 | b | |

| D | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 48 sa | 8 | 93,16 | 2,02 | 5,72 | 93,29 | 18,09 | 82,70 | 100,80 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 23,51 | 0,42 | 1,20 | 23,43 | 3,60 | 21,85 | 25,46 | b | |
| | OX+Rutin 48 sa | 4 | 22,42 | 0,79 | 1,59 | 22,00 | 3,45 | 21,10 | 24,56 | b | |
| | Mix | 8 | 23,36 | 0,29 | 0,81 | 23,16 | 2,61 | 22,00 | 24,61 | b | |

| E | | N | Aritmetik Ort. | Std.Hata | Std.Sapma | Medyan | Değişim Aralığı | Minimum | Maksimum | Harf | p |
|----------|-----------------|---|----------------|----------|-----------|--------|-----------------|---------|----------|------|-------|
| Canlılık | Rutin 48 sa | 8 | 80,27 | 2,81 | 7,94 | 81,43 | 26,27 | 63,67 | 89,94 | a | 0,000 |
| | 5FU+Rutin 48 sa | 8 | 11,71 | 0,25 | 0,70 | 11,68 | 2,10 | 10,59 | 12,69 | d | |
| | OX+Rutin 48 sa | 8 | 27,05 | 0,63 | 1,77 | 26,74 | 5,86 | 23,81 | 29,66 | b | |
| | Mix | 8 | 16,62 | 0,37 | 1,05 | 16,89 | 3,47 | 14,67 | 18,14 | c | |

Ek-25. Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 düzeyleri

| Gruplar | Kas 8 n=3 | | Kas 9 n=3 | |
|---------|------------------|-----------|------------------|-----------|
| | $\bar{x} \pm SE$ | min-max | $\bar{x} \pm SE$ | min-max |
| Kontrol | 0.119±0.00416 | 0.11-0.13 | 0.124±0.00404 | 0.12-0.13 |
| 1 | 0.102±0.00451 | 0.9-0.11 | 0.111±0.00153 | 0.11-0.11 |
| 2 | 0.172±0.00608 | 0.16-0.18 | 0.251±0.00811 | 0.24-0.27 |
| 3 | 0.0967±0.00318 | 0.9-0.10 | 0.103±0.00173 | 0.10-0.11 |
| 4 | 0.173±0.00696 | 0.16-0.19 | 0.221±0.00384 | 0.22-0.23 |
| 5 | 0.144±0.00418 | 0.14-0.15 | 0.180±0.00524 | 0.17-0.19 |
| 6 | 0.170±0.00517 | 0.16-0.18 | 0.258±0.1255 | 0.24-0.28 |
| 7 | 0.143±0.00722 | 0.13-0.16 | 0.162±0.00902 | 0.14-0.17 |

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Farnoud
Soyadı: Nasiri
Doğum Tarihi: 18 Kasım 1981
Uyruğu: İran
Doğum Yeri: Oroumieh
Medeni Hali: Bekar
İletişim: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı
Dışkapı/Ankara
farnoud_nasiri@hotmail.com
05313227797

II.Eğitim

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Doktora
Öğrencisi, 2010-
Urmia Azad Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2000 – 2006
Chamran Lisesi, 1996 – 2000
Shahed Ortaokulu, 1993 – 1996
Shafipour İlkokulu, 1988 – 1993

Yabancı dil

İngilizce

III- Ünvanı

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

Urmia Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Oroumieh/İRAN

Jinekoloji Kliniği: Nisan-Mayıs-Haziran 2006

Kliniğe gelen hastaların muayeneleri, hastalıkların teşhis ve tedavisinde görev alma. Düzenlenen seminerlere katılma.

Küçük Hayvan Cerrahi Kliniği: Nisan-Mayıs-Haziran 2006

Çeşitli operasyonlara asistan olarak katılma. Hayvanların operasyon sonrası bakım ve tedavisinden sorumlu olarak çalışma ve ayrıca klinikte tedavileri sürdürülen hayvanların rutin kontrollerinde görev alma.

Küçük Hayvan Cerrahi Kliniği: Nisan-Mayıs-Haziran 2005

Çeşitli operasyonlara asistan olarak katılım. Hayvanların operasyon sonrası bakım ve tedavisinden sorumlu olarak çalışma ve ayrıca klinikte tedavileri sürdürülen hayvanların rutin kontrollerinde görev alma.

Jinekoloji Kliniği: Nisan-Mayıs-Haziran 2005

Çeşitli operasyonlara asistan olarak katılım. İnek, kısırak, kedi ve köpek gibi hayvanların jinekolojik muayenesini yaparak bu konuda çeşitli bilgiler edinme.

İç Hastalıkları Kliniği: Nisan-Mayıs-Haziran 2005

Kliniğe gelen hastaların muayenesinde ve klinikte tedavileri devam eden hastaların bakımında yardımcı olma.

Dr.Onsori Veteriner Kliniği, Oroumieh/İRAN

Asistan Öğrenci: 2001–2003

Üniversite eğitimim sırasında yaz tatillerinde klinik uygulamalarına katılma.

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

EACR (The European Association for Cancer Research)

Moleküler Kanser Araştırma Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

NASİRİ, F., KISMALI, G., SEL, T. (2015). Rutin inhibits cells growth and suppresses inflammation by inhibiting NFkB and COX-2 activities in colon cancer cells, *J. anti-cancer drugs*

NASİRİ, F., GÜNEŞ, V., MERAL, Ö., EKCAN, M., KISMALI, G., SALMANOĞLU, B., SEL, T. (2014). İçme Sularında Yüksek Nitrat Bulunan Akkaraman Koyunlarda Serum Seruloplazmin, Paraoksanaz Ve Nitrik Oksit Düzeyleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **20(2)**: 239-242, DOI: 10.9775/kvfd.2013.9919

NASİRİ, F., GÜNEŞ, V., MERAL, Ö., EKCAN, M., KISMALI, G., SALMANOĞLU, B., SEL. İçme Sularında Yüksek Nitrat Bulunan Akkaraman Koyunlarda Serum Seruloplazmin, Paraoksanaz Ve Nitrik Oksit Düzeyleri. 6.Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25-27 Haziran 2013, KARS, Poster sunumu.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

VERDİĞİ SEMİNER VE KONFERANSLAR

Rutin inhibits cells growth and suppresses inflammation by inhibiting NFkB and COX-2 activities in colon cancer cells “1st International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, August 31 - September 02, 2015, Istanbul

Tümör Hücre Biyokimyası “ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 8 Ağustos 2012.

Propolis'in Biyokimyası ve Biyolojik Önemi “ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 12 Eylül 2011.

PROJE

Oksaliplatin ve 5-Florourasilin Caco-2 Kanser Hücrelerinde Toksikite ve Antitümör Aktivitelerine Rutin Flavonoidinin Etkileri.proje NO:13L3338008

Bilimsel Faaliyetler

Laboratuvar Akreditasyonu Eğitimi (ISO/IEC 17025),İyi Laboratuvar Uygulamaları Eğitimi (GLP), İyi Üretim Uygulamaları Eğitimi (GMP) ve İyi Hijyen Uygulamaları Eğitimi” kursuna katılım.27-28 Eylül 2014 Ankara Üniversitesi

Hücre Ölümü Yöntemleri” kursuna katılım. 02-11 Ekim 2013 İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı (MOKAD)

PCR Temelli Genetik Analizi” kursuna katılım. 02-03 Haziran 2011 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, ANKARA.

Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (ANKÜSEM) ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu işbirliği çerçevesinde 26 Aralık2011-06 Ocak 2012 tarihleri arasında düzenlenen “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” Eğitim Programı.

5.Ankara Tıp Biyokimya Günü”Kongresi.17 Nisan 2012 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, ANKARA.

1st International Congress on AquaticAnimalHealth Management andDiseases” 27-28 Ocak 2009 Tahran-İRAN

15.İran Veteriner Hekimleri Kongresi”26-27 Nisan 2008 Tahran-İRAN

Ödüller

4.Uluslararası Öğrenciler Mezuniyet Töreninde, Cumhurbaşkanı R.T. Erdoğan'dan tarafından 60 bin uluslararası öğrenci içinde dereceye giren öğrencilere verilen başarı ödülü