T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN KOLON KANSER HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ

RÜYA YAŞAR

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ÖZLEM AYTEKİN

BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
HAZİRAN/2025

İTHAF

“Sevgili anneme, babama ve eşime ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde bilimsel katkı ve desteklerini esirgemeyen, tez danışmanlığımı üstlenerek bana yol gösteren, tez konumun belirlenmesinde, çalışmamın planlanmasında, gerçekleştirilmesinde ve sonuçlandırılmasında her türlü katkı ve manevi desteği esirgemeyen değerli hocam Sayın **Doç. Dr. Özlem AYTEKİN**'e,

Çalışmamın gerçekleşmesindeki maddi desteklerinden dolayı **Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü**'ne (BAP-2023/075),

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde yardım ve desteklerinden dolayı Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Sayın **Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN**'e,

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölüm Başkanı Sayın **Prof. Dr. Fatih ÖZBEY**'e,

Tez sürecinde birlikte bazı deneysel çalışmaları deneme fırsatı bulduğum, bu süreçte laboratuvar imkanlarından, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın **Dr. Sevda DEMİR**'e, **Dr. Tayfun ACAR**'a ve **Doç. Dr. Burcu Uçar-ACAR**'a,

Çalışmamın bulgularının yorumlanmasında sağladığı değerli akademik katkılar ve yönlendirmeleri için Sayın **Doç. Dr. Ali Özhan AYTEKİN**'e,

Tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerini bana aktaran, beni her zaman motive eden Sayın **Prof. Dr. Ayşen YARAT**'a ve Sayın **Prof. Dr. Ebru EMEKLI**'ye,

Deneysel çalışmalarım sırasında desteğini ve yardımını esirgemeyen sevgili **Sevda ARISOY** ve **Yasemin Tuğba ÖĞÜNÇ**'e, tez sürecinde beni her zaman motive eden, yardımlarını ve dostluğunu esirgemeyen sevgili arkadaşlarım **Hava TASLAK** ve **Dr. Begüm Gürel GÖKMEN'**e, fikir alışverişinde bulunduğum ve yapıcı geri bildirimleriyle katkı sağlayan kıymetli arkadaşım **Seden BEDİR**'e,

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve hep yanımda olup bana destek olan sevgili annem **Mevlüde KURU,** babam **Şefik KURU,** kız kardeşlerim **Hübra ve Dilruba KURU'ya** ve tez sürecinde tüm desteğiyle yanımda olan, beni her zaman motive eden sevgili eşim **Ahmet Selçuk YAŞAR**'a,

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ x
ŞEKİLLER LİSTESİ xiii
RESİMLER LİSTESİ xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR xviii
ÖZET xxvi
ABSTRACT xxvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. KALIN BAĞIRSAK ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ 3
2.2. KALIN BAĞIRSAĞIN FONKSİYONLARI 5
2.3. KOLOREKTAL KANSER VE EPİDEMİYOLOJİ 5
2.4. KOLOREKTAL KANSER RİSK FAKTÖRLERİ VE PREDİSPOZAN DURUMLAR 6
2.4.1. Değiştirilemez Risk Faktörleri 6
2.4.2. Değiştirilebilir Risk Faktörleri 7
2.5. KOLOREKTAL KANSER ETİYOLOJİSİ VE PATOFİZYOLOJİSİ 10
2.6. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER PATOGENEZİ 12
2.7. KOLOREKTAL KANSER, APOPTOZ VE NEKROZ 16
2.8. KOLOREKTAL KANSER VE METASTAZ 21
2.8.1. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş 22
2.8.2. İntravazasyon 23
2.8.3. Dolaşımda Hayatta Kalma 24
2.8.4. Ekstravazasyon 24
2.8.5. Mikro Ve Makro Metastaz 24
2.9. KOLOREKTAL KANSERİN KLİNİK BELİRTİLERİ 27
2.10. KOLOREKTAL KANSER TARAMA VE TANI YÖNTEMLERİ 28
2.11. KOLOREKTAL KANSER EVRELEME 28
2.12. KOLOREKTAL KANSER TEDAVİ YÖNTEMLERİ 30
2.13. 5-FLUOROURASİL VE İLAÇ DİRENÇ MEKANİZMALARI 31
2.14. ANTİOKSİDAN SİSTEM VE KOLOREKTAL KANSER 35
2.15. BOR VE KANSER 39

2.16. MİKROBİYOTA VE KOLOREKTAL KANSER 44
2.17. BÜTİRAT VE KOLOREKTAL KANSER 47
2.18. KEFİR VE KOLOREKTAL KANSER 48
2.19. KARNOSOL VE KOLOREKTAL KANSER 51
3. GEREÇ VE YÖNTEM 53
3.1. KEFİR ÜRETİMİ 53
3.2. KEFİR VE SÜTÜN *İN VİTRO* GASTROİNTESTİNAL SİNDİRİMİ 53
3.2.1. Gastrik Faz Simülasyonu 54
3.2.2. İntestinal Faz Simülasyonu 54
3.2.3. Santrifügal Filtrasyon 55
3.3. KEFİR VE SÜT ÖRNEKLERİNDE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ 56
3.4. KEFİR VE SÜT ÖRNEKLERINDE TOPLAM FENOLİK MADDE TAYINI 57
3.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ 58
3.5.1. Hücre Hatları 59
3.5.2. Hücrelerin Kültüre Ekimi 60
3.5.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması 61
3.5.4. Hücre Sayısının Belirlenmesi 62
3.6. HÜCRELERE UYGULANACAK MADDELERİN HAZIRLANMASI 63
3.6.1. 5-Fluorourasil'in Dozlarının Hazırlanması 63
3.6.2. Kefir Ve Süt Dozlarının Hazırlanması 63
3.6.3. Sodyum Pentaborat Pentahidrat Dozlarının Hazırlanması 64
3.6.4. Sodyum Bütirat Dozlarının Hazırlanması 64
3.6.5. Karnosol Dozlarının Hazırlanması 65
3.7. HÜCRE CANLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ 65
3.8. KOMBİNASYONLARIN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 67
3.9. KOMBİNASYON İNDEKSİNİN HESAPLANMASI 67
3.10. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ 69
3.10.1. RNA İzolasyonu 69
3.10.2. Tamamlayıcı DNA Sentezi 70
3.10.3. Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu 71
3.10.4. Relatif Kantitasyon Hesaplanması 73
3.11. HT29 HÜCRE ÖLÜMLERİNİN FLORESAN BOYAMA İLE DEĞERLENDİRİLMESİ 73
3.12. PROTEOMİK ANALİZ 75
3.12.1. Protein Ekstraksiyonu 75
3.12.2. Protein Miktar Tayini 75
3.12.3. Çözelti İçinde Sindirim 75

3.12.4. Nano Sıvı Kromatografi-Elektrosprey İyonizasyon Tandem Kütle Spektrometrisi 76
3.12.5. Veri Analizi 76
3.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 76
4. BULGULAR 77
4.1. 5-FLUOROURASİL'İN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ 77
4.1.1. 5-Fluorourasil'in HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 77
4.1.2. 5-Fluorourasil'in FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 78
4.2. SODYUM PENTABORAT PENTAHİDRAT'IN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ 78
4.2.1. Sodyum Pentaborat Pentahidrat'ın HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 78
4.2.2. Sodyum Pentaborat Pentahidrat'ın FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi . 79
4.3. SODYUM BÜTİRAT'IN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ 80
4.3.1. Bütirat'ın HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 80
4.3.2. Bütirat'ın FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 81
4.4. KARNOSOL'ÜN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ 82
4.4.1. Karnosol'ün HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 82
4.4.2. Karnosol'ün FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 83
4.5. SİNDİRİLMİŞ KEFİR'İN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ ... 84
4.5.1. Sindirilmiş Kefirin HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 84
4.5.2. Sindirilmiş Kefirin FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 85
4.6. SİNDİRİLMEMİŞ KEFİRİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ 86
4.6.1. Sindirilmemiş Kefirin HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 86
4.6.2. Sindirilmemiş Kefirin FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 87
4.7. SİNDİRİLMİŞ SÜTÜN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ 88
4.7.1. Sindirilmiş Sütün HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 88
4.7.2. Sindirilmiş Sütün FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi 89
4.8. HT29 HÜCRELERİNDE SİNDİRİLMİŞ SÜT, SİNDİRİLMİŞ VE SİNDİRİLMEMİŞ KEFİRİN ETKİLERİNİN ZAMANA VE DOZA BAĞLI KARŞILAŞTIRILMASI 89
4.9. FHC HÜCRELERİNDE SİNDİRİLMİŞ SÜT, SİNDİRİLMİŞ VE SİNDİRİLMEMİŞ KEFİRİN ETKİLERİNİN ZAMANA VE DOZA BAĞLI KARŞILAŞTIRILMASI 90
4.10. TÜM MADDELERİN 72. SAATTE FHC VE HT29 HÜCRELERİNDE IC50 VE TERAPÖTİK İNDEKS DEĞERLERİ 91
4.11. KOMBİNASYONLARIN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ 92
4.11.1. Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 92

4.11.2. Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının Sinerjik Etki Analiz Bulguları 97
4.11.3. Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının FHC Hücreleri Üzerine Etkisi 102
4.11.4. Sindirilmiş Kefir Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 107
4.11.5. Sindirilmiş Kefir Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının Sinerjik Etki Analiz Bulguları 113
4.11.6. Sindirilmiş Kefir Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının FHC Hücreleri Üzerine Etkisi 118
4.12. HT29 HÜCRELERİNDE PCR BULGULARI 125
4.12.1. 5-Fluorourasil, Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve Kombinasyonlarının HT29 Hücrelerinde Apoptotik, Anti-Apoptotik ve İnvazyonla İlişkili Gen Ekspresyonları 125
4.12.2. 5-Fluorourasil, Sindirilmiş Kefir ve Kombinasyonlarının HT29 Hücrelerinde Apoptotik, Anti-Apoptotik Ve İnvazyonla İlişkili Gen Ekspresyonları 127
4.13. HT29 HÜCRELERİNDE FLORESAN MİKROSKOPİ ile BELİRLENEN HÜCRE ÖLÜM TİPLERİ 131
4.13.1. 5-Fluorourasil, Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve Kombinasyonlarının HT29 Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisinin Floresan Görüntüleme Bulguları 131
4.13.2. 5-Fluorourasil, Sindirilmiş Kefir Ve Kombinasyonlarının HT29 Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisinin Floresan Görüntüleme Bulguları 133
4.14. KEFİR VE SÜT ÖRNEKLERİNDE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE VE TOPLAM FENOLİK MADDE İÇERİĞİ 136
4.15. HT29 HÜCRELERİNİN TOPLAM PROTEİN DÜZEYLERİ 138
4.15. HT29 HÜCRELERİNDE PROTEOMİK ANALİZ SONUÇLARI 139
5. TARTIŞMA 141
5.1. 5-FLUOROURASİL HAKKINDA TARTIŞMA 141
5.2. SODYUM PENTABORAT PENTAHİDRAT'IN VE 5-FU İLE KOMBİNASYONLARI ile İLGİLİ TARTIŞMA 142
5.3. SODYUM BÜTİRAT İLE İLGİLİ TARTIŞMA 150
5.4. KARNOSOL İLE İLGİLİ TARTIŞMA 154
5.5. SİNDİRİLMİŞ KEFİR, SÜT VE SİNDİRİLMEMİŞ KEFİR, SİNDİRİLMİŞ KEFİR İLE 5-FLUOROURASİL KOMBİNASYONLARI HAKKINDA TARTIŞMA 156
5.6. PROTEOMİK ANALİZ İLE İLGİLİ TARTIŞMA 166
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 170
KAYNAKLAR 173

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Epitel ve mezenkimal hücrelerin özeliklerinin karşılaştırılması 22

Tablo 2.2: Kolorektal kanserde tümörün yerleşim yerine göre hastaların başvuru semptomları... 27

Tablo 2.3: Kolorektal kanser evrelemesi 29

Tablo 2.4: Kefirin enerji ve besin ögesi içeriği..... 50

Tablo 3.1: Simüle gastrik sıvı ve intesinal sıvının hazırlanması..... 54

Tablo 3.2: Standart trolox çözeltilerinin hazırlanması..... 57

Tablo 3.3: Gallik asit standart çözeltilerin hazırlanması 58

Tablo 3.4: HT29 hücre hattının özellikleri 59

Tablo 3.5: FHC hücre hattının özellikleri..... 60

Tablo 3.6: Besiyeri içeriği..... 60

Tablo 3.7: 5-Fluorourasil uygulama dozlarının hazırlanması..... 63

Tablo 3.8: Kefir ve süt dozlarının hazırlanması..... 63

Tablo 3.9: Sodyum pentaborat dozlarının hazırlanması 64

Tablo 3.10: Sodyum bütirat uygulama dozlarının hazırlanması..... 64

Tablo 3.11: Karnosol uygulama dozlarının hazırlanması..... 65

Tablo 3.12: Kombinasyon indeksi sınıflandırması..... 68

Tablo 3.13: Sıfır etkileşim potansiyeli skorlaması 69

Tablo 3.14: Diğer modellerin skorlaması 69

Tablo 3.15: Tamamlayıcı DNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımının bilgileri..... 71

Tablo 3.16: Tamamlayıcı DNA sentez reaksiyonu koşulları..... 71

Tablo 3.17: Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan mastermix 72

Tablo 3.18: Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu koşulları 72

Tablo 3.19: Primer bilgileri..... 72

Tablo 3.20: Hücre ölüm tiplerinin sınıflandırılması 74

Tablo 4.1: HT29 hücrelerinde sindirilmiş süt, sindirilmiş ve sindirilmemiş kefirin etkilerinin zamana ve doza bağlı karşılaştırılması 90

Tablo 4.2: FHC hücrelerinde sindirilmiş süt, sindirilmiş ve sindirilmemiş kefirin etkilerinin zamana ve doza bağlı karşılaştırılması 91

Tablo 4.3: Maddelerin 72. saatte HT29 ve FHC hücrelerinde terapötik indeks değerleri .. 92

Tablo 4.4: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi 93

Tablo 4.5: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi 95

Tablo 4.6: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi 96

Tablo 4.7: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saatte kombinasyon indeksleri 101

Tablo 4.8: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 103

Tablo 4.9: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 105

Tablo 4.10: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 106

Tablo 4.11: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkilerinin karşılaştırılması 108

Tablo 4.12: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisinin karşılaştırılması 110

Tablo 4.13: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi 112

Tablo 4.14: Sindirilmiş kefir ve 5-Fluorourasil kombinasyonlarının tüm inkübasyon zamanlarında HT29 hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması 113

Tablo 4.15: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının 72. saatte kombinasyon indeksleri 117

Tablo 4.16: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisinin karşılaştırılması 119

Tablo 4.17: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 121

Tablo 4.18: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 123

Tablo 4.19: 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması 124

Tablo 4.20: 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki karşılaştırmalı etkileri 127

Tablo 4.21: 185 µg/mL 5-Fluorourasil, %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki karşılaştırmalı etkileri 128

Tablo 4.22: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil, %2,5 ve %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki karşılaştırmalı etkileri 130

Tablo 4.23: HT29 hücrelerinde toplam protein düzeyleri 138

Tablo 4.24: HT29 hücrelerinde farklı madde ve kombinasyonlarına göre tespit edilen proteinler 140

Tablo 5.1: Bazı bor bileşiklerinin antikanser etkilerini inceleyen çalışmalar 143

Tablo 5.2: İnsan kolonunda *in vitro* dozlara dayalı tahmini eşdeğer bütirat miktarları 152

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Kalın bağırsağın anatomik bölümleri 3

Şekil 2.2: Kalın bağırsağın katmanlı yapısı 4

Şekil 2.3: Normal kolon histolojisi 4

Şekil 2.4: Kolorektal kanser risk faktörleri 6

Şekil 2.5: Mukozadan karsinomaya ilerleyiş 10

Şekil 2.6: Türkiye'de kolorektal kanser histolojik tiplerinin % dağılımı 11

Şekil 2.7: Kolorektal kanser ve genetik mutasyon yolları 12

Şekil 2.8: p53'ü arttıran nedenler ve p53'ün fonksiyonları 15

Şekil 2.9: İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolakları 17

Şekil 2.10: Metastaz oluşum basamakları 22

Şekil 2.11: Kolonda erken adenomdan metastaza ilerleyiş 25

Şekil 2.12: Kolorektal kanserden karaciğere metastaz 26

Şekil 2.13: Kolorektal kanser evreleri 29

Şekil 2.14: 5-Fluorourasil 31

Şekil 2.15: 5-Fluorourasil'in karaciğerde katabolizması 33

Şekil 2.16: Bor nötron yakalama tedavisi 41

Şekil 2.17: FDA onaylı bor içeren ilaçlar 42

Şekil 2.18: Sodyum pentaborat pentahidrat 43

Şekil 2.19: Kolorektal kanserde zenginleşmiş mikrobiyota 45

Şekil 2.20: Karnosolün yapısı 52

Şekil 3.1: Simüle gastrik ve intestinal sıvı 53

Şekil 3.2: İntestinal faz simülasyonu sonrası kefir ve süt örnekleri 55

Şekil 3.3: Ultrafiltre edilmiş kefir ve süt örnekleri 56

Şekil 3.4: HT29 hücre hattının mikroskop görüntüleri 59

Şekil 3.5: FHC hücre hattının mikroskop görüntüleri 60

Şekil 4.1: 5-Fluorourasil'in HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi……77

Şekil 4.2: 5-Fluorourasil'in FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi 78

Şekil 4.3: Sodyum pentaborat pentahidrat'ın HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi 79

Şekil 4.4: Sodyum pentaborat pentahidrat'ın FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi 80

Şekil 4.5: Sodyum bütirat'ın HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi 81

Şekil 4.6: Bütirat'ın FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi 82

Şekil 4.7: Karnosol'ün HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi 83

Şekil 4.8: Karnosol'ün FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi..... 84

Şekil 4.9: Sindirilmiş kefirin HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi..... 85

Şekil 4.10: Sindirilmiş kefirin FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi 86

Şekil 4.11: Sindirilmemiş kefirin HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi..... 87

Şekil 4.12: Sindirilmemiş kefirin FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi 87

Şekil 4.13: Sindirilmiş sütün HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi..... 88

Şekil 4.14: Sindirilmiş Sütün FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi 89

Şekil 4.15: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi..... 93

Şekil 4.16: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi..... 94

Şekil 4.17: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi..... 96

Şekil 4.18: Sodyum pentaborat pentahidrat ve 5-Fluorourasil kombinasyonlarının HT29 hücrelerinde 72 saatlik inkübasyon sonrası oluşturduğu inhibisyon etkisi (%) ısı haritası. 97

Şekil 4.19: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saatte sıfır etkileşim gücü modeli yüzey grafiği 98

Şekil 4.20: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saatte en etkili tek ajan yüzey grafiği..... 99

Şekil 4.21: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saatte Bliss yüzey grafiği 99

Şekil 4.22: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saat Loewe ekleme modeli yüzey grafiği 100

Şekil 4.23: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat'ın fraksiyon-doz eğrisi. 101

Şekil 4.24: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 102

Şekil 4.25: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 104

Şekil 4.26: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 106

Şekil 4.27: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi 107

Şekil 4.28: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi 109

Şekil 4.29: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi 111

Şekil 4.30: Sindirilmiş kefir ve 5-Fluorourasil kombinasyonlarının HT29 hücrelerinde 72 saatte oluşturduğu inhibisyon etkisi (%) ısı haritası. 114

Şekil 4.31: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının 72. saatte sıfır etkileşim gücü yüzey grafiği 115

Şekil 4.32: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının 72. saatte en etkili tek ajan yüzey grafiği 115

Şekil 4.33: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının 72. saatte Bliss yüzey grafiği 116

Şekil 4.34: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının Loewe ekleme modeli yüzey grafiği 116

Şekil 4.35: Sindirilmiş kefir ve 5-Fluorourasil kombinasyonlarının fraksiyon-doz eğrisi 117

Şekil 4.36: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 118

Şekil 4.37: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 120

Şekil 4.38: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi 122

Şekil 4.39: 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat ve kombinasyon tedavisinin gen ekspresyonları üzerindeki etkileri 126

Şekil 4.40: 185 µg/mL 5-Fluorourasil, %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki etkileri 128

Şekil 4.41: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil, %2,5 ve %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki etkileri 129

Şekil 4.42: HT29 hücrelerinde 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat ve kombinasyonlarının erken ve geç apoptoz/nekroz oranlara etkisinin yüzde dağılımı 132

Şekil 4.43: HT29 hücrelerinde 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil, kefir ve kombinasyonlarının erken ve geç apoptoz/nekroz oranlara etkisinin yüzde dağılımı 134

Şekil 4.44: HT29 hücrelerinde 185 µg/mL5-Fluorourasil, kefir ve kombinasyonlarının erken ve geç apoptoz/nekroz oranlara etkisinin yüzde dağılımı 136

Şekil 4.45: Kefir ve süt örneklerinin antioksidan aktiviteleri 137

Şekil 4.46. Kefir ve süt örneklerinde toplam fenolik madde içeriği 138

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1. HT29 hücrelerinde 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat ve kombinasyonlarının floresan mikroskopi görüntüleri..... 132

Resim 4.2: HT29 hücrelerinde 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil, kefir ve kombinasyonlarının floresan mikroskopi ile erken ve geç apoptoz/nekroz analizine ait görüntüler 133

Resim 4.3: HT29 hücrelerinde 185 µg/mL 5-Fluorourasil, kefir ve kombinasyonlarının floresan mikroskopi ile erken ve geç apoptoz/nekroz analizine ait görüntüler 135

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-FU: 5-Fluorourasil

18qLOH: 18. Kromozomun Uzun Kolunda Heterozigosite Kaybı (18q Loss of Heterozygosity)

ABC: ATP Bağlayıcı Kaset Proteinleri (ATP-Binding Cassette Proteins)

ACE: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (Angiotensin Converting Enzyme)

AIF: Apoptozis İndükleyici Faktör

AJCC: Amerikan Kanser Ortak Komitesi (American Joint Committee on Cancer)

Akt: Protein Kinaz B

APAF-1: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1

APC: Adenomatöz Polipozis Koli (Adenomatous Polyposis Coli)

BAD: Bcl-2 ile İlişkili Hücre Ölüm Proteini Agonisti (Bcl-2-Associated Death Promoter)

BAK: Bcl-2 Antagonist Katili-1 (Bcl-2 Antagonist Killer-1)

BAX: Bcl-2 İlişkili X Apoptoz Regülatörü (Bcl-2-Associated X Apoptosis Regulator)

BCA: Bicinchoninic Asit

BCL-2: B Hücre Lenfoması 2 (B-Cell Lymphoma 2)

BCL-XL: B Hücre Lenfoması-Ekstra Büyük (B-Cell Lymphoma-Extra Large)

BH3: Bcl-2 Homoloji Bölgesi-3 (Bcl-2 Homology Region-3)

BID: BH3 Etkileşim Alan Ölüm Agonisti (BH3 İnteracting-Domain Death Agonist)

BNCT: Bor Nötron Yakalama Tedavisi (Boron Neutron Capture Therapy)

CAD: Kaspaz ile Aktive Olan DNaz (Caspase-activated DNase)

CAP: Kapesitabin (Capecitabine)

CAT: Katalaz (Catalase)

CCL2: Kemokin Ligandı 2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2)

CDH1: Kadherin-1 (Cadherin-1)

CDKN1A: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A)

CDNA: Tamamlayıcı DNA (Complementary DNA)

CEA: Karsino Embriyojenik Antijen (Carcinoembryonic Antigen)

CI: Kombinasyon İndeksi (Combination Index)

CIMP: CpG Ada Metilatör Fenotipi (Cpg Island Methylator Phenotype)

CIN: Kromozomal İnstabilite (Chromosomal Instability)

CKI: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor)

CpG: Sitozin-Fosfat-Guanin Dizisi (Cytosine-Phosphate-Guanine Sequence)

CRP: C-Reaktif Protein

CT: Eşik Döngü (Cycle Threshold)

CUPRAC: Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

CUR: Kurkumin (Curcumin)

CYLD: Silindromatozis (Cylindromatosis)

DCC: Kolorektal Kanserde Silinen (Deleted in Colorectal Cancer)

DD: Ölüm Domaini (Death Domain)

DHFU: 5,6-Dihidro-5-Florourasil

DISC: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (Death-Inducing Signaling Complex)

DMSO: Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)

DNA: Deoksiribonükleik asit

DOX: Doksorubisin (Doxorubicin)

DPP-IV: Dipeptidil peptidaz-IV

DPBS: Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)

DPD: Dihidropirimidin Dehidrogenaz

DPPH: 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)

DPYS: Dihidropirimidinaz

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

DTMP: Deoksitimidin Monofosfat (Deoxythymidine Monophosphate)

DUMP: Deoksiüridin Monofosfat (Deoxyuridine Monophosphate)

ECM: Ekstraselüler Matriks (Extracellular Matrix)

EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)

EMT: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (Epithelial-Mesenchymal Transition)

Endo-G: Endonükleaz-G

EpCAM: Epitelyal Hücre Adezyon Molekülü (Epithelial Cell Adhesion Molecule)

ETZ: Elektron Taşıma Zinciri

FA: Fraksiyon Etkisi (Fraction Effect)

FADD: Ölüm Etki Alanına Sahip Fas ile İlişkili Protein (Fas-Associated Protein with Death Domain)

FASL: Fas Ligandı

FBAL: α-Floro-β-Alanin (α-Fluoro-β-Alanine)

FC: Kat Değişimi (Fold Change)

FDA: ABD Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)

FDUDP: Florodeoksiüridin Difosfat

FDUMP: Florodeoksiüridin Monofosfat

FDUTP: Florodeoksiüridin Trifosfat

FIT: Fekal İmmünokimya Testi (Fecal Immunochemical Test)

FIT-DNA: Çok Hedefli Fekal DNA Testi (Multi-Target Fecal DNA Test)

FITC: Fluorescein İzotiyosiyanat (Fluorescein Isothiocyanate)

FRAP: Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi (Ferric Reducing Antioxidant Power)

FUDP: Florouridin Difosfat

FUPA: 5-Fluorourasil Pirofosfat

FUTP: Florouridin Trifosfat

GADD45A: Büyümeyi Durduran DNA Hasar Tepki Proteini 45 Alfa (Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible Alpha)

GAE: Gallik Asit Eşdeğeri

GPR: G-protein Reseptörü

GPR-41: G-Protein Reseptörü-41

GPx: Glutatyon peroksidaz (Glutathione peroxidase)

GR: Glutatyon redüktaz

GSK3β: Glikojen Sentaz Kinaz 3-beta

GTP: Guanozin-5'-trifosfat

GTPaz: Guanin trifosfataz (Guanine Triphosphatase)

HAT: Histon Asetil Transferaz (Histone Acetyltransferase)

HDAC: Histon Deasetilaz (Histone Deacetylase)

H-RAS: Harvey Rat Sarkoma (Harvey Rat Sarcoma)

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor)

HSA: En Etkili Tek Ajan (Highest Single Agent)

IAP: Apoptoz İnhibitör Proteini (Inhibitor of Apoptosis Protein)

IC50: Yarı Maksimal İnhibitör Konsantrasyon (Half Maximal Inhibitory Concentration)

ICAD: İnaktif Kaspaz Aktive Edici Dnaz (Inhibitor Of Caspase-3-Activated Dnase)

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (Insulin-Like Growth Factor-1)

IL-6: İnterlökin-6

IL-10: İnterlökin-10

IRI: İrinotekan

ISAPP: Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics)

K-Ras: Kirsten Sıçan Sarkomu Virüsü (Kirsten Rat Sarcoma Virus)

KRK: Kolorektal Kanser

MAPK: Mitogenle Aktive Olan Protein Kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MAP2K3: Mitojen Aktiviteli Protein Kinaz Kinaz 3 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3)

MAP3K7: Mitojen Aktiviteli Protein Kinaz Kinaz Kinaz 7 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7)

MCL-1: Miyeloid Hücreli Lösemi-1 (Myeloid Cell Leukemia-1)

MCM2: Minichromosome Maintenance Complex Component 2 (Mini Kromozom Bakım Kompleks Bileşeni 2)

MDR: Çoklu İlaç Direnci (Multiple Drug Resistance)

MET: Mezenkimal-Epitelyal Dönüşüm (Mesenchymal-Epithelial Transition)

MLH: Mutator L Benzeri Homolog Gen

MLKL: Karışık Soy Kinaz Alanı Benzeri Psödokinaz (Mixed Lineage Kinase Domain-Like Pseudokinase)

MMP: Matriks Metalloproteinaz

MMR: Yanlış Eşleşme Tamir Geni (DNA Mismatch Repair)

MS: Kütle Spektrometrisi (Mass Spectrometry)

MSH: Mutator S Benzeri Homolog Gen

MSI: Mikrosatelit İnstabilitesi (Microsatellite Instability)

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-İl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür

NC: Negatif Kontrol (Negative Control)

NF-κB: Nükleer Faktör Kappa-B (Nuclear Factor Kappa-B)

NK: Doğal Öldürücü Hücre (Natural Killer Cell**)**

NPTXR: Nöronal Pentraxin Reseptörü (Neuronal Pentraxin Receptor)

NQO1: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Dehidrogenaz Kinon-1 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Dehydrogenase Quinone 1)

N-RAS: Neuroblastoma Ras (Neuroblastoma Rat Sarcoma)

NRF2: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2)

ORAC: Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi Yöntemi (Oxygen Radical Absorption Capacity)

OX: Oksaliplatin (Oxaliplatin)

PARP-1: Poli-ADP-Riboz Polimeraz 1 (Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1)

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi (Phosphate-Buffered Saline)

PERK: Protein Kinaz R-Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinazı (Protein Kinase R-Like Endoplasmic Reticulum Kinase)

PI: Propidyum İyodür (Propidium Iodide)

PI3K: Fosfoinositid 3-Kinaz (Phosphoinositide 3-Kinase)

PI3KCA: Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Alfa (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha)

PlGF: Plasental Büyüme Faktörü (Placental Growth Factor)

PİP: Piperin (Piperine)

PMS: N-Metil-Dibenzopirazin Metilsülfat (N-Methyl-Dibenzopyrazine Methylsulfate)

PS: Fosfatidilserin (Phosphatidylserine)

RB1: RNA Bağlayıcı Tampon 1 (RNA Binding Buffer 1)

RIPK: Protein Kinaz Reseptörüyle Etkileşen Protein Kinaz (Receptor-İnteracting Serine/Threonine-Protein Kinase)

RNW Buffer: RNA Yıkama Tamponu (RNA Wash Buffer)

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)

RR: Ribonükleotid Redüktaz

RT Qpcr: Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction)

SCFA: Kısa Zincirli Yağ Asiti (Short Chain Fatty Acid)

SGF: Simüle Gastrik Sıvı (Simulated Gastric Fluid)

SIF: Simüle İntestinal Sıvı (Simulated Intestinal Fluid)

SMAC: Ikinci Mitokondri Kökenli Kaspaz Aktivatörü (Smac, Second Mitochondria-Derived Activator Of Caspase

SOD: Süperoksit Dismutaz

SPP: Sodyum Pentaborat Pentahidrat

STAT-3: Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3)

SW1: Güçlü Yıkama Tamponu 1 (Strong Wash Buffer 1)

TBID: Kesik BID (Trunkated BID)

TEAC: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Yöntemi (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

TGF: Transforme Edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)

TI: Terapötik İndex (Therapeutic Index)

TLL-1: Tolloid-Benzeri Protein-1 (Tolloid-Like Protein 1)

TNF: Tümör Nekroz Faktör (Tumor Necrosis Factor)

TNM: Tümör, Lenf Nodu, Metastaz (Tumor, Node, Metastasis)

TRAF2: TNF Reseptörü İlişkili Faktör 2 (TNF Receptor-Associated Factor 2)

TRAIL: TNF ile İlişkili Apoptozis İndükleyen Ligand (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)

TRAP: Toplam Radikal Tuzaklayıcı Antioksidan Parametre Yöntemi (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter)

TS: Timidilat Sentaz

TWEAK: TNF-İlişkili Apoptozisin Zayıf Uyaranları (TNF-Related Weak Inducer Of Apoptosis)

UICC: Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (Union For International Cancer Control)

UPA/UPAR: Ürokinaz-Tip Plazminojen Aktivatör Sistemi (Urokinase-Type Plasminogen Activator System)

UPB1: B-Ureidopropiyonaz

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)

XTT: 2,3-Bis[2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfonylphenyl]-2H-Tetrazolium-5-Carboxyanilide

ZIP: Sıfır Etkileşim Potansiyeli (Zero Interaction Potency)

BAZI BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN KOLON KANSER HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada kolorektal kanser tedavisini destekleyici yeni kombinasyonların belirlenmesi ve yeni kemopreventif stratejilerin geliştirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat, karnosol, sodyum bütirat ve *in vitro* sindirilmiş kefir ve süt ile sindirilmemiş kefir'in HT29 ve FHC hücre canlılığı üzerindeki etkileri XTT yöntemi ile değerlendirildi. Terapötik indeks değerleri doğrultusunda çalışmaya 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat ve sindirilmiş kefir ve kombinasyonları ile devam edildi. Kombinasyon etkileri, sinerji yazılımları kullanılarak değerlendirildi. HT29 hücre ölümü, floresan mikroskop altında değerlendirildi. Apoptoz ve invazyon ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Ölü hücrelerdeki protein düzeyindeki değişiklikler proteomik analizle saptandı.

Bulgular: Sodyum pentaborat pentahidrat ve sindirilmiş kefirin terapötik indeksleri 5-Fluorourasil'e kıyasla daha yüksek bulundu. 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat'ın kombinasyonları çoğunlukla sinerjikti. 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonları ise doza bağlı olarak sinerjik, additif ve antagonistik etkiler gösterdi.

Sonuç: Sodyum pentaborat pentahidrat, kolorektal kanser tedavisinde 5-Fluorourasil'e alternatif ya da tamamlayıcı bir ajan olarak umut vaadetmektedir. Günlük tüketimle uyumlu miktarda içilen kefir, kolorektal kanser hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etki göstermekte ancak kefirin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımında doz optimizasyonu gereklidir. Tüm bu etkileşimlerin geçerliliğini değerlendirebilmek için ise deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Bor, Fluorourasil, HT29 Hücreleri, Kefir, Kolorektal Neoplazmalar

IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME BIOACTIVE COMPOUNDS ON COLON CANCER CELL LINE

ABSTRACT

Aim: This study aimed to identify new combinations that support colorectal cancer treatment and to develop new chemopreventive strategies.

Materials and Methods: The effects of 5-Fluorouracil, sodium pentaborate pentahydrate, carnosol, sodium butyrate, and *in vitro* digested kefir and milk, and undigested kefir on HT29 and FHC cell viability were evaluated by the XTT method. In line with therapeutic index values, the study was continued with 5-Fluorouracil, sodium pentaborate pentahydrate, and digested kefir and their combinations. Combination effects were evaluated using synergy software. HT29 cell death was assessed under the fluorescence microscope. Expression levels of genes related to apoptosis and invasion were determined. Changes in protein levels in dead cells were detected by proteomic analysis.

Results: Therapeutic indices of sodium pentaborate pentahydrate and digested kefir were higher than 5-Fluorouracil. Combinations of 5-Fluorouracil and sodium pentaborate pentahydrate were mostly synergistic. Combinations of 5-Fluorouracil and digested kefir showed synergistic, additive, and antagonistic effects depending on the dose.

Conclusion: Sodium pentaborate pentahydrate is promising as an alternative or complementary agent to 5-Fluorouracil in colorectal treatment. Kefir consumed in amounts compatible with daily consumption shows selective cytotoxic effects on colorectal cancer cells, but dose optimization is required when kefir is used together with chemotherapeutic agents. Experimental and clinical studies are needed to evaluate the validity of all these interactions.

Key Words: Boron, Colorectal Neoplasms, Fluorouracil, HT29 Cells, Kefir

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK), kolon veya rektum kaynaklı olup, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin ikinci en yaygın nedenidir. Meme ve akciğer kanserlerinden sonra en sık görülen üçüncü malignite türüdür (1). KRK olgularının yaklaşık üçte ikisi sporadik, kalan üçte biri ise ailevi veya kalıtsal kökenlidir (2). Çevresel faktörler ve özellikle beslenme gibi yaşam tarzı bileşenleri, KRK gelişiminde önemli rol oynamaktadır (3).

Tedavide temel yaklaşımlar arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler yer almaktadır (4). Ancak bu yöntemlerin her biri bazı sınırlılıklar içermektedir. Özellikle geç tanı, yüksek nüks oranı ve çoklu ilaç direnci gibi faktörler, KRK'nin etkin şekilde yönetimini zorlaştırmaktadır. Yaygın olarak kullanılan kemoterapi ajanlarından biri olan 5-Fluorourasil (5-FU), sınırlı etkinliği, düşük biyoyararlanımı, zayıf çözünürlüğü ve kanser/normal hücreler arasında seçici olmayan dağılımı nedeniyle çeşitli zorluklar barındırmaktadır. Ayrıca, KRK hücrelerinde zamanla gelişen ilaç direnci de 5-FU'nun klinik etkinliğini azaltan başlıca faktörlerden biridir (5).

Artan kanser mortalitesi ve tedavi maliyetleri, alternatif terapötik yaklaşımlara olan ilgiyi artırmakta ve doğal kaynaklardan elde edilen kemopreventif ajanların araştırılmasını teşvik etmektedir (6). Lamiaceae ailesine ait olan ve Türkiye'nin güney ile batı kıyı şeridinde doğal olarak yetişen biberiye (*Rosmarinus officinalis*), *Salvia officinalis* (adaçayı) ve *Ocimum basilicum* (fesleğen) gibi bitkilerin yapraklarında bulunan fenolik bir diterpen olarak karnosolün antioksidan, antikanserojen, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özellikleri olduğu literatürde bildirilmiştir (7). Özellikle kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir biyolojik ajan olarak araştırılmaktadır.

Bor, Türkiye'nin dünya rezervlerinin yaklaşık %73'ünü barındırmasıyla stratejik öneme sahiptir (8). Borun kemik gelişimi, hormon metabolizması, yara iyileşmesi, enerji metabolizması, antioksidan savunma, zihinsel performans artışı ve kilo kontrolü gibi birçok biyolojik fonksiyona katkı sunduğu bilinmektedir (9). Lewis asidi özelliği sayesinde biyomoleküllerle etkileşime girebilmesi, boru birçok farmasötik üründe etkili kılmaktadır (10). Sodyum pentaborat pentahidrat (SPP), doğal bir bor bileşiği olup; hücre

proliferasyonunu baskılayıcı, oksidatif stres düzenleyici ve apoptozu indükleyici etkileriyle bazı kanser türlerinde umut vadeden sonuçlar ortaya koymuştur (11,12).

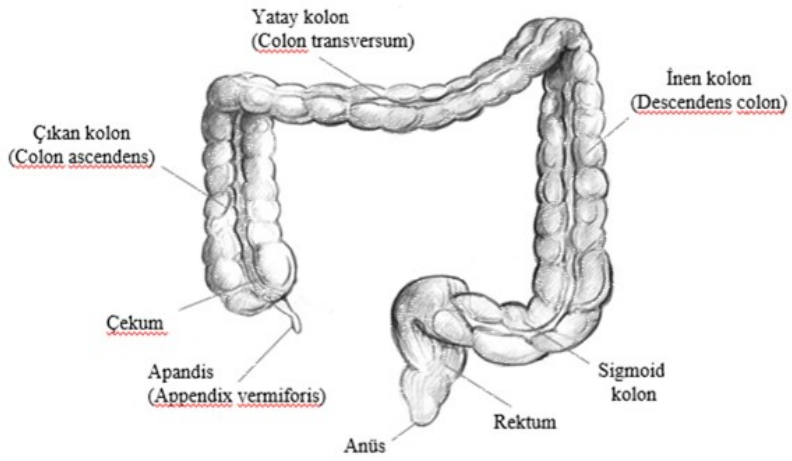
Kefir ise fermente süt ürünleri arasında fonksiyonel bir içecek olarak ön plana çıkmaktadır. Türk Gıda Kodeksi'ne göre kefir; *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus kefiranofaciens* ve *Lactobacillus kefirgranum* gibi özgün mikroorganizmaları ve bazı maya türlerini içeren, kefir danesi veya starter kültürler kullanılarak üretilen fermente süt ürünüdür (13). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, *in vitro* sindirilmiş kefirin biyoaktif molekül içeriğinin, sindirilmemiş kefire kıyasla belirgin şekilde fazla olduğu ve biyolojik etkinliğinin değerlendirilmesinde sindirilmiş formunun tercih edilmesi gerektiği belirtilmiştir (14). Ayrıca, kefirin, ilaç direnci gösteren HT-29 hücrelerinde kemo-duyarlılaştırıcı etkileri gösterilmiş; doksorubisin tedavisiyle kombine kullanımında fayda sağlayabileceği öne sürülmüştür (15). Başka bir çalışmada ise kefirin, KRK etiyopatogenezinde rolü olduğu bilinen *Fusobacterium nucleatum* bakterisine karşı belirgin inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (16). Ancak literatürde, *in vitro* sindirilmiş kefirin KRK üzerindeki etkilerini doğrudan inceleyen bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Bütirat ise insan vücudunda bakteriyel fermantasyon yoluyla üretilen en önemli metabolitlerden biri olarak bilinmektedir. Sağlıklı kolon hücrelerinin bütiratı ana enerji kaynağı olarak kullandığı ve oksidatif metabolizma ile bütiratı metabolize ettiği bilinmektedir. Ancak, kanserli kolon hücreleri Warburg etkisi nedeniyle bütiratı yeterince metabolize edememekte ve bütirat bu durumda Histon Deasetilaz (Histone Deacetylase, HDAC) inhibitörü olarak işlev görmekte ve kanser hücrelerinde antiproliferatif etki göstermektedir (17).

Tüm bu literatür bulguları doğrultusunda bu tez çalışmasının amacı; 5-FU, SPP, karnosol, bütirat ve sindirilmiş kefirin hem tekli hem de farklı kombinasyonlar halinde HT-29 kolon adenokarsinom hücre hattına uygulanarak hücre canlılığı ve hücre ölüm biçimlerinin değerlendirilmesi; sinerjik etki analizlerin yapılması, apoptotik, antiapoptotik ve invazyonla ilişkili genlerin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi, ölü hücreler üzerinden gerçekleştirilecek proteomik analizler ile bu tedavilerin hücresel protein düzeyinde oluşturduğu değişikliklerin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu kapsamda elde edilen veriler ışığında, KRK tedavisini destekleyici yeni kombinasyonların belirlenmesi ve yeni kemopreventif stratejilerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KALIN BAĞIRSAK ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

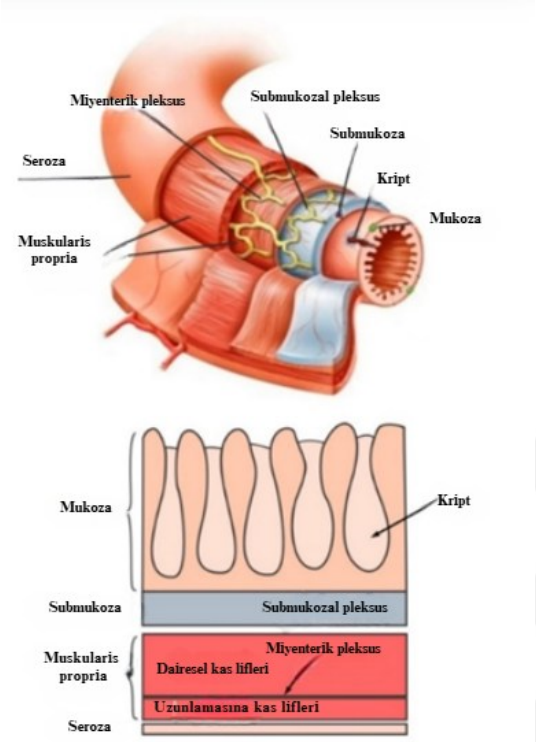
Kalın bağırsak (Intestinum Crassum); gastrointestinal kanalın çekum, kolon, rektum ve anal kanaldan oluşan bölümüdür (18). Kolon; anatomik olarak sırasıyla çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon ile devam etmekte ve rektum ile birleşmektedir (Şekil 2.1) (19).



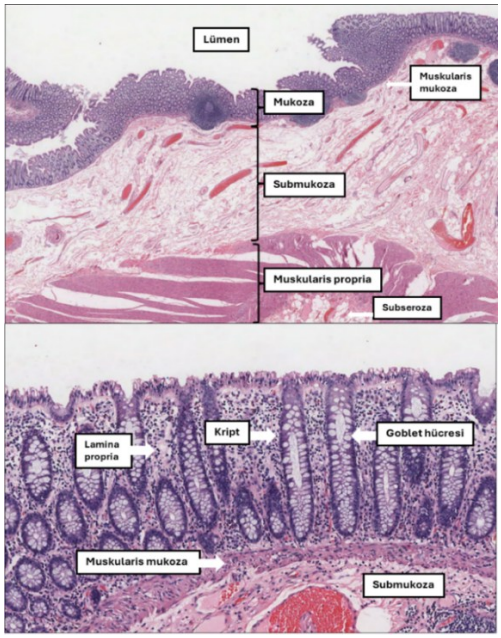
Şekil 2.1: Kalın bağırsağın anatomik bölümleri (19)

Kalın bağırsak duvarı 4 farklı katmandan oluşmaktadır. Bu katmanlar içten dışa: mukoza, submukoza, muskularis propria ve serozadır (Şekil 2.2) (20). Mukoza, ince bir epitel tabakası, lamina propria adı verilen bir bağ dokusu tabakası ve muskularis mukoza adı verilen ince bir kas tabakasından oluşan bir iç astardır. Kolon epiteli, emici sütunlu hücrelerden ve goblet hücrelerinden oluşmaktadır. Epitel, alttaki lamina propriaya doğru ilerledikçe, karakteristik paralel test tüpü benzeri bir düzende düzenlenmiş kript adı verilen bez yapıları oluşturmaktadır. Kriptin tabanında ayrıca enteroendokrin hücreler, Paneth hücreleri ve kök hücreler de bulunmaktadır. Lamina propria ise kriptleri

destekleyen mezenkimal hücrelerden ve inflamatuar hücrelerden oluşan, kılcal damarlar ve lenfatikler açısından zengin gevşek bağ dokusudur (Şekil 2.3) (20,21).



Şekil 2.2: Kalın bağırsağın katmanlı yapısı (20)



Şekil 2.3: Normal kolon histolojisi (21)

Submukoza, mukozayı çevreleyen lifli bir bağ dokusu tabakasıdır. Submukoza lüminal yüzeyin konfigürasyonunu düzenleyen, glandüler salgıları kontrol eden, elektrolit ve su taşınımını değiştiren ve lokal kan akışını düzenleyen submukoza pleksusa ev sahipliği yapmaktadır. Muskularis propria, sirküler ve longitudinal yönde seyreden kas lifi demetlerinden oluşmuştur. Bunların arasında miyenterik pleksus adı verilen peristaltizi yönlendiren enterik nöral pleksus bulunmaktadır. Seroza ise bağırsak duvarının en dış tabakasıdır ve skuamöz epitel hücrelerinin sürekli bir tabakası olan mezotelden oluşur. Rektum ise daha kalın mukozaya sahiptir ve esas olarak goblet hücreleriyle kaplıdır, daha uzun kriptlerle seyretmekte ve mukoza rektumdan anal kanala doğru kademeli olarak emici sütunlu epitel hücrelerden yassı (skuamöz) epitel hücrelere yerini bırakmaktadır (20,22).

2.2. KALIN BAĞIRSAĞIN FONKSİYONLARI

Kalın bağırsağın depolama, fermantasyon, emilim, salgılama ve hareketlilik olmak üzere 5 önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Kolon, ince bağırsaktan gelen lüminal kimustaki su ve elektrolitlerin emilimini sağlamak, sindirimden kalan atık maddeleri feçes olarak katılaştırmak, feçesin peristaltik hareketle gastrointestinal yoldan aşağı doğru hareket etmesini sağlamak ve bunu gastrointesinal yolun distal kısmı olan rektuma iletmektedir (23). Kolonun özellikle ilk yarısı elektrolitlerin ve suyun geri emilimi için önemlidir. Kolon mukozası aktif sodyum emilimi için büyük bir kapasiteye sahiptir. Bu durum eş zamanlı olarak klor ve suyun emilimini de sağlamaktadır. Sigmoid kolon ve rektum, feçesin tutulmasını ve gerektiğinde boşaltılmasını sağlamaktadır. Kolon ayrıca mikrobiyota adı verilen bakteri, arkea, virüs ve mantara ev sahipliği yapmaktadır (24). Bu konu ile ilgili “Mikrobiyota ve KRK” başlığında daha detaylı olarak bilgi verilmiştir.

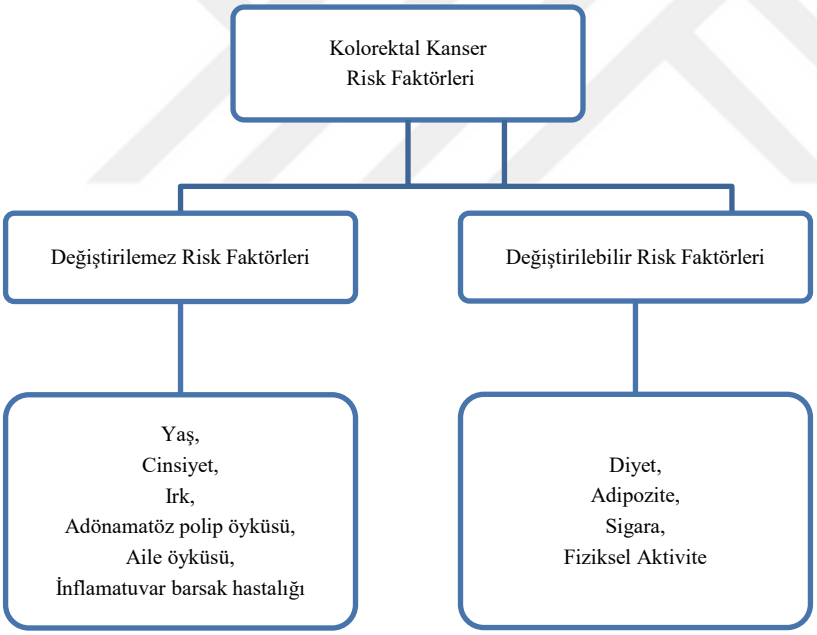
2.3. KOLOREKTAL KANSER VE EPİDEMİYOLOJİ

Kanserle ilişkili mortalitenin ikinci yaygın nedeni olan KRK, kolon veya rektumdan köken alan bir kanser türüdür. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğünün 2025 yılında yayınladığı Türkiye Kanser İstatistikleri raporuna göre KRK prevelansı ülkemizde hem erkeklerde hem de kadınlarda üçüncü sıradadır ve sıklığı sırasıyla %000 25,5 ve %000 15,5’ dir (25). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, KRK’nın küresel yükünün 2020 ile 2040 arasında %56 artacağını ve yılda 3 milyondan fazla yeni vakanın beklendiğini tahmin etmektedir (26). En yüksek

insidans oranları Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika'da iken en düşük oranlar ise Afrika ve Güney-Orta Asya'da bulunmaktadır. Tüm KRK hastalarının %76'sı 65 ila 85 yaşları arasında teşhis edilir, ancak batı diyeti ve yaşam tarzının benimsenmesiyle daha genç yaşları da etkilemektedir (27).

2.4. KOLOREKTAL KANSER RİSK FAKTÖRLERİ VE PREDİSPOZAN DURUMLAR

Kolorektal kanserin gelişimi, değiştirilemeyen risk faktörleri ve değiştirilebilir risk faktörleriyle ilişkilidir (Şekil 2.4). Kişisel tıbbi geçmiş (cinsiyet, yaş, ırk, adenomatöz polip öyküsü, inflamatuvar bağırsak hastalığı öyküsü) ve aile öyküsü bireyler tarafından kontrol edilemez. Değiştirilebilir faktörler bireysel alışkanlıklar veya yaşam tarzlarıyla ilişkilidir. Bu faktörler değiştirilerek KRK riski azaltılabilir (28).



Şekil 2.4: Kolorektal kanser risk faktörleri

2.4.1. Değiştirilemez Risk Faktörleri

2.4.1.1. Yaş ve cinsiyet: Yaş ile beraber KRK insidansı artmaktadır (29). Yeni tanı almış KRK vakalarının yaklaşık %90'ını 50 yaş üzeri kişiler oluşturmaktadır (30). 1990 yılının başlarından itibaren Avrupa ve Kuzey Amerika'da 20-49 yaş arasındaki

kişilerde ortaya çıkan erken başlangıçlı KRK'de endişe verici bir artış vardır ve bunun hızla gelişen batılılaşmış yaşam tarzından kaynaklandığı düşünülmektedir (31). Fizyoloji, sosyo-kültürel eğilimler ve bazı faktörler (diyet, alkol ve sigara) arasındaki karmaşık etkileşimler nedeniyle erkekler, kadınlara göre sporadik KRK gelişimine daha yatkındır. Ayrıca erkekler kadınlardandaha fazla rektal kanser insidansına sahiptir (32).

2.4.1.2. Irk: Dünya genelinde ırklara göre KRK insidansına bakıldığında, en yaygın Japonlarda, Ruslarda ve Çinlilerdedir. Avrupa'da en yüksek insidansa sahip ilk 4 ülke İtalya, İngiltere, Fransa ve Almanya'dır. ABD'de Afrikalı Amerikanların tüm etnik gruplar içerisinde en yüksek KRK insidansına sahip olduğu belirlenmiştir (28).

2.4.1.3. Adenomatöz polip öyküsü: Kolorektal polipler, KRK riski oluşturmayan hiperplastik polipler ve KRK riskini arttıran neoplastik/diplastik polipler olarak ikiye ayrılmaktadır. Displastik poliplerin %5'inin malign hale geldiği bildirilmiştir. Displaziden maligniteye dönüşüm ise mutasyon gerektiren yavaş bir süreçtir ve bu 5-10 yıl sürebilmektedir (30).

2.4.1.4. Aile öyküsü: Ailede bir birinci derece akraba veya iki ikinci derece akrabada KRK varsa veya birinci derece akrabada 50 yaşın altında teşhis konulduysa KRK'nın arttığı bilinmektedir. Bu nedenle KRK hastalarının aile öyküsü açısından sorgulanması ve risk değerlendirmesi yapılması önerilmektedir (30).

2.4.1.5. İnflamatuvar bağırsak hastalığı: İnflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda KRK gelişme riski 2-3 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (33). Bu durumun, esas olarak kronik bağırsak iltihabının pro-neoplastik etkilerinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (34). Endoskopik görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler ve tıbbi tedaviler sayesinde inflamatuvar bağırsak hastalığı olan kişilerde KRK insidansında son 30 yılda bir azalma mevcuttur (35).

2.4.2. Değiştirilebilir Risk Faktörleri

2.4.2.1. Diyet: Kapsamlı araştırmalar, KRK gelişiminde diyetin hem nedensel hem de koruyucu bir rol oynayabileceğini ileri sürmektedir. Dünya Kanser Araştırma Fonu 2018 yılında, dünya çapında 29 milyondan fazla yetişkin ve 247.000'den fazla KRK olgusunu içeren 99 çalışmayı analiz ettiği bir raporu yayınladı. Bu raporda; vücut yağlanmasının, işlenmiş et, kırmızı et ve alkollü içecekler tüketmenin, sigara içmenin

KRK riskini arttırabileceği belirtilmiştir (36). 400 KRK hastası ve 400 sağlıklı bireyin dahil edilen bir çalışmada; obezite, aktif ve pasif sigara içimi, düşük fiziksel aktivite ve yüksek kırmızı et ve tuz tüketiminin KRK için risk faktörleri olduğu belirlenmiştir (37). Başka bir prospektif çalışmada, günde ortalama 76 g işlenmiş ve kırmızı et tüketen katılımcıların, günde 21 g tüketenlere kıyasla KRK riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (38). Üç büyük prospektif kohorttan elde edilen verilerin değerlendirildiği bir araştırmada ultra işlenmiş gıdaların KRK riskiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir (39).

Yüksek sıcaklıklarda et pişirmenin heterosiklik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonların oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Bu bileşiklerin ve kırmızı etteki yüksek hem demir düzeyinin, kanserojen N-nitrozo bileşiklerinin endojen oluşumunu uyararak KRK'yı desteklediği gösterilmiştir. İşlenmiş et ürünlerinin ayrıca potansiyel olarak kanserojen olabilen ekzojen N-nitrozo bileşikleri de içermektedir (40). KRK tanısı öncesi işlenmiş etten zengin bir diyet modelinin daha yüksek tümör tekrarlaması, metastaz ve mortalite ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (41). Yukarıda adı geçen Dünya Kanser Araştırma Fonu raporuna göre fiziksel aktivitede bulunmak, tam tahıllar tüketmek, diyet lifi içeren yiyecekleri günlük beslenmeye dahil etmek, süt ürünleri tüketmek ve kalsiyum takviyeleri almak, KRK riskini azaltmaktadır. Ayrıca, 5 yıl veya daha uzun süre anti-inflamatuar ilaç kullanımı ve menopoz sonrası kadınlarda hormon tedavisinin de KRK riskini azalttığı bildirilmiştir (36).

Diyet lifi tüketiminin iki mekanizma ile KRK riskini azaltabileceği öne sürülmektedir: Birincisi, çözünmeyen lifin kolon geçişini hızlandırması ve kolon epitel hücrelerinin heterosiklik aminler gibi kanserojenlere maruziyetini azaltabilmesidir. İkincisi ise çözünür lifin belirli bakteri sınıfları tarafından bütirat ve diğer potansiyel olarak yararlı metabolitlere fermente edilmesidir (42). Prospektif bir çalışmada tahıl kaynaklı lif alımının KRK'da daha düşük mortalite ile ilişkili olduğu bulunmuştur (43). Tam tahıllar, meyve ve sebzelerin ağırlıklı olduğu bitki bazlı bir diyetin tüketilmesinin daha düşük KRK insidansı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (44). 2.325.040 katılımcı ve 24.115 gastrointestinal kanser vakası içeren 42 kohort çalışmanın meta-analizinde, balık tüketiminin günde 20 g artmasının gastrointestinal kanser riskinde %2'lik bir azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur (45).

2.4.2.2. Sigara: Uzun süreli sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre KRK geliştirme riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (46). KRK'lı

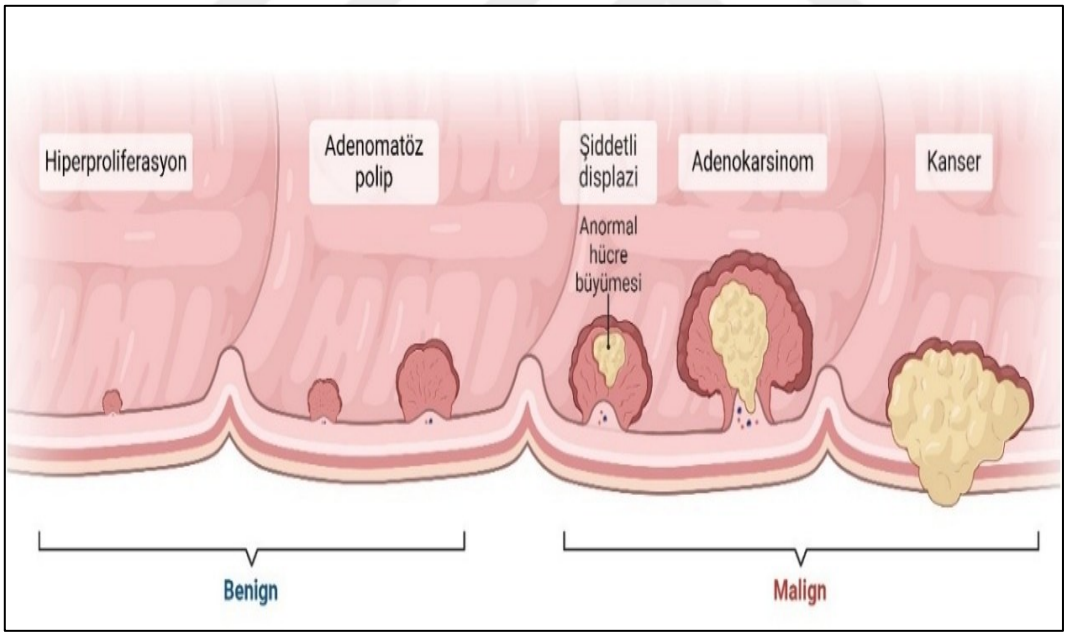
hastalarda tanı öncesi sigara içiminin kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (47). Toplam 18.816 hastanın dahil edildiği bir kohort çalışmasında sigara içmenin KRK mortalite riski ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (48).

2.4.2.3. Fiziksel aktivite: Fiziksel aktivite ve kanser riskini değerlendiren 19 inceleme, 26 meta-analiz ve 541 orijinal çalışmayı içeren kapsamlı bir inceleme, düzenli fiziksel aktivitenin 7 kanser türünü (KRK, meme, endometriyum, akciğer, yemek borusu, pankreas ve menenjiyom) önlemede faydalı olduğunu göstermiştir (49). Fiziksel aktivitenin kanser riski üzerindeki etkisi meme ve KRK'da diğer kanser türlerine göre çok daha güçlü olduğu belirlenmiştir (50). 982 kişinin dahil edildiği multietnik bir çalışmada haftada 1 veya daha fazla saat egzersiz yaptığını bildiren hastalarda kolorektal polip görülme sıklığının egzersiz yapmayanlara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (51). Egzersizin KRK tanısı öncesi ve sonrasında mortalite ve nüks riskini azaltmadaki etkinliği gösterilse de gerekli egzersiz türü, süresi ve yoğunluğu henüz belirsizdir (52).

2.4.2.4. Adiposite: KRK tanısı konulan hastaların %40'tan fazlasında obezite, diyabet, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve kalp yetmezliği gibi hastalıklar eşlik etmektedir (53). Obezite, KRK için en önemli risk faktörüdür (54). Adipoz dokunun genel inflamatuar durumu, KRK riski ve gelişimi arasındaki ilişkide rol oynadığı bilinmektedir. Visseral adipozite, subkutan adipoziteden daha çok endişe verici görünmektedir ve beden kitle indeksindeki artış KRK açısından daha fazla risk taşımaktadır (55). Visseral adipoz doku, obeziteyle ilişkili karakteristik sistemik düşük dereceli inflamasyona katkıda bulunan Tümör nekroz faktörü-alfa (TNFα), interlökin-6 (IL-6) ve C-reaktif protein (CRP) gibi proinflamatuar sitokinler salgılamaktadır. Bu sitokinler normal doku homeostazını bozmakta, insülin direncini teşvik etmekte ve oksidatif stresi arttırmaktadır (56). Kronik inflamasyon, tümör baskılayıcı gen *p53*'teki mutasyonlar da dahil olmak üzere çeşitli mutasyonlara yol açmakta, Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarını ve kromozomal instabiliteyi teşvik etmekte, anjiyogenezin merkezinde yer alan vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) gibi çeşitli moleküllerin ekspresyonunu değiştirmekte, fosfoinozitid 3-kinaz (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/protein kinaz B (Akt) yolağı gibi çeşitli yolakları düzenleyerek hücre sağkalımı, çoğalması ve metabolizmasında rol oynamakta ve kanser oluşumuna zemin hazırlamaktadır (57).

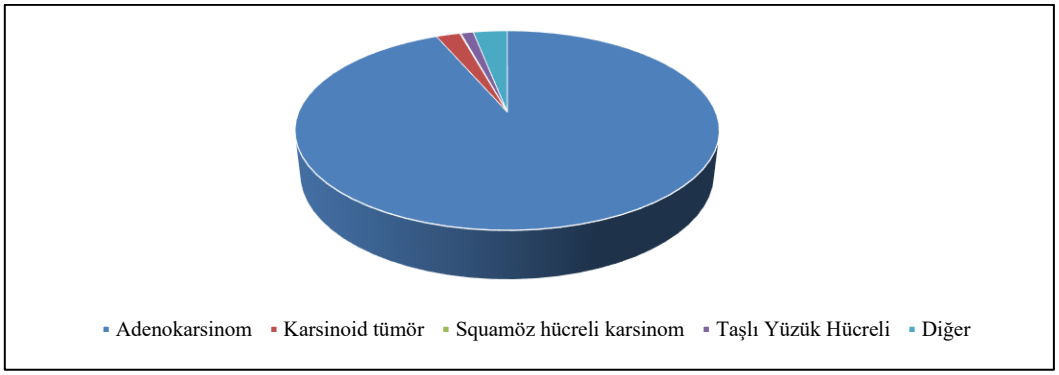
2.5. KOLOREKTAL KANSER ETİYOLOJİSİ VE PATOFİZYOLOJİSİ

Tüm KRK'lerin yaklaşık üçte ikisi sporadikken, kalan üçte biri ailevi veya kalıtsaldır (58). KRK, genellikle insan genomundaki genetik mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonlar nedeniyle sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlar ve modifikasyonlar, hücre davranışını düzenleyen sinyal yollarını değiştirerek normal mukozanın karsinoma ilerlemesini sağlar (59). Özellikle, bağırsak epitelinin yüksek yenilenme hızı, bu dokuyu malign dönüşümler için odak noktası haline getirmektedir. Ancak, ilk aşamada, KRK genellikle kolon veya rektumun iç duvarında neoplastik veya neoplastik olmayan bir polip olarak başlar. Polipler ne kadar büyükse, malign potansiyelleri de o kadar yüksektir. En yaygın tip, bu poliplerden mukus üreten glandüler hücrelerde oluşan adenomatöz poliptir. Kolorektumun iç duvarında oluşan adenomlar histolojik olarak neoplastiktir (60). Malign hale geldiklerinde adenokarsinomlar olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Mukozadan karsinomaya ilerleyiş (61)

Türkiye Birleşik Veri Tabanı (62) 2018 yılı verilerine göre KRK'nın %90,7'si adenokarsinomdur. Non-adenokarsinom KRK ise nadir görülmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Türkiye'de kolorektal kanser histolojik tiplerinin % dağılımı

En yaygın kalıtsal KRK, vakaların %2-3'ünü oluşturan Lynch sendromudur, bunu vakaların %0,5-1'inden sorumlu olan ailevi adenomatöz polipoz takip etmektedir. *MUTYH* ile ilişkili polipoz, Peutz-Jeghers sendromu ve diğerleri gibi diğer kalıtsal varyantlar vakaların %1'inden daha azını temsil etmektedir (63). Lynch sendromu, insanlarda DNA yanlış eşleşme tamir (Mismatch Repair, *MMR*) genlerinden birinde inherediter germline mutasyon nedeniyle gelişmektedir. Bunlar, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* veya epitel hücre yapışma molekülü (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EpCAM)'dür (64). Ailevi adenomatöz polipoz, bağırsakta tümör oluşumunu engelleyen adenomatöz polipozis koli (Adenomatous polyposis coli, *APC*) gen mutasyonunun neden olduğu nadir bir hastalıktır (65).

Kolorektal kanser gelişiminin, üç farklı mutasyonel yolun birinden veya bir kombinasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir: kromozomal anöploidilerde artışla karakterize kromozomal instabilite (Chromosomal Instability, CIN); CpG (C;sitozin-P;fosfat-G;Guanin) bölgelerinin hipermetilasyonuyla oluşan ve CpG ada metilatör fenotipi (CpG island methylator phenotype, CIMP) olarak bilinen tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına neden olan epigenetik değişiklikler ve DNA uyumsuzluk onarımının bozulmasıyla oluşan mikrosatelit instabilitesi (Microsatellite instability, MSI) (Şekil 2.7) (66). Tüm KRK vakalarının yaklaşık %15'inde MSI görülürken, %10-40'ında CIMP bulunur ve %85'i CIN ile ilişkilidir (42). CIN; *APC*, *P53*, *SMAD2* (Mothers Against Decapentaplegic Homolog-2), *SMAD4*, KRK'de silinen (Deleted in Colorectal Cancer, *DCC*) gen, Kirsten sıçan sarkomu virüsü (Kirsten Rat Sarcoma Virus, *K-RAS*) ve *β-katenin* dahil olmak üzere çeşitli genlerin mutasyonuyla bağlantılıdır (67).

Şekil 2.7: Kolorektal kanser ve genetik mutasyon yolları

2.6. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER PATOGENEZİ

Kolorektal karsinogenez, anormal hücre çoğalması, hücre farklılaşması, apoptoza direnç, kolorektal tümör hücreleri tarafından bitişik yapıların istila edilmesi ve uzak metastaz gibi bir dizi patofizyolojik mekanizmayı içermektedir. Çeşitli genler ve çoklu sinyal yollarının etkileşimi kolorektal onkogenezde rol oynamaktadır (68). Onkogenler, hücrelerde proliferasyonu ve farklılaşmayı düzenleyen proto-onkogenlerin endojen ve/veya ekzojen mutasyonlar sonucunda karsinogenez yönünde değişime uğrayan, hücrenin kanserleşme sürecinde önemli rol oynayan genlerdir (69).

Hücre dışı büyüme sinyallerinin nükleusa iletilmesi için bir anahtar görevi gören *Ras* onkogenleri hücresel sinyal iletimini düzenleyen G-proteinlerine homolojisi olan küçük proteinlerin bir ailesini kodlamaktadır (30). *Ras* ailesi, üç onkogenden oluşmaktadır: *K-RAS*, Nöroblastoma-RAS (*N-ras)*, Harvey-RAS (*H-ras*). KRK'nın yaklaşık %40'ında *K-ras* mutasyonu, buna ek olarak %4 *N-ras* mutasyonu ve %1 oranında *H-ras* mutasyonu bulunmaktadır (70). *RAS* mutasyonları, proteinleri GTPaz (Guanin trifosfataz) tarafından GTP (Guanozin-5'-trifosfat) hidrolizine dirençli bırakır ve

bu da yapısal olarak aktif bir GTP'ye bağlı protein ve sürekli bir büyüme uyaranı ile sonuçlanır. *RAS*'ın düzenlenmesini ve işlevini değiştiren onkojenik mutasyonlar, kalıcı Mitogenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) yolu aktivasyonuna ve dengesiz proliferatif sinyallemeye yol açmaktadır (71). Ras proteini tarafından stimüle edilen BRAF proteini ise Ras-MAPK sinyal ara yolunda görev alan bir diğer moleküldür. Tüm insan tümörlerinin %8'inde, kolorektal tümörlerin ise %5-12'sinde *BRAF* mutasyonu rapor edilmiştir (72).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal growth factor receptor, EGFR), sitoplazma zarında yerleşen ve tirozin kinaz özelliği gösteren bir transmembran reseptördür (69). Başlıca ligandları; Epidermal büyüme faktörü (EGF), Transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth factor, TGF)-α, amfiregulin ve betaselülindir. Bu ligandlar domainlerle birleşirse, Ras/Raf/MAPK yolu ve PI3K/Akt yolu gibi ana hücre içi sinyal iletimi, reseptörlerin dimerizasyonu ve sürekli otofosforilasyon yoluyla aktive olmakta ve tümörlerin farklılaşması, metastazı, anjiyogenezisi ve hücre ölümü etkilenmektedir. İleri KRK hastalarının %65-75'inde aşırı EGFR ekspresyonu bulunmuştur (73). KRK hastalarının %32'sinde fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, *PI3KCA*) mutasyonu belirlenmiştir (74).

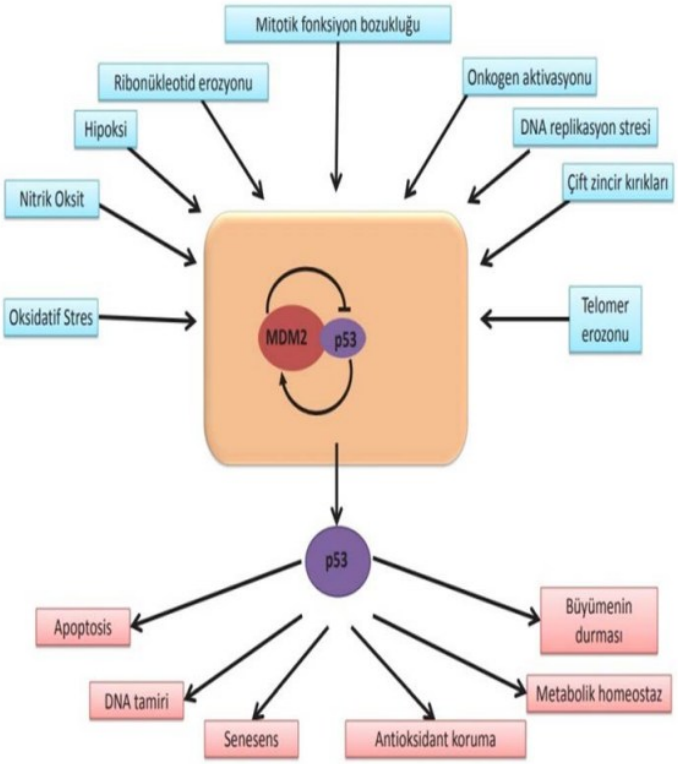
Kanser hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik ederek kolorektal onkogenezde ve tedaviye yanıtta önemli bir rol oynayan başka bir yolak Wnt/β-katenin'dir. APC, Wnt yolu aktivitesinin kontrolünü, aktin ve mikrotübül sitoskeletonlarının düzenlenmesini içeren çeşitli rollere sahip bir proteindir. *APC* geni, tümör baskılayıcı bir gendir. *APC* mutasyonları, 1 cm'den daha küçük adenomlarda bile tespit edilmektedir. Dolayısıyla KRK'nın gelişiminin erken evrelerinde en kritik gen olduğu düşünülmektedir. KRK'nın %80'inde *APC* mutasyonu bulunmaktadır (75). β-katenin ise Wnt yolunun temel molekülüdür. APC-Aksin-Glikojen Sentaz Kinaz 3-Beta (GSK3β)-Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü (CKI)'den oluşan yıkıcı bir kompleks, β-katenin'e bağlanmakta ve fosforillenmektedir. β-katenin proteinin fosforillenmesi, kendisinin yıkımı için bir etiket oluşturmaktadır (76). β-katenin parçalandığından sitoplazmadan çekirdeğe girememekte ve bu şekilde Wnt/β-katenin sinyal yolağı inhibe olmaktadır. APC, yıkıcı kompleksin temel sınırlayıcı düzenleyicisidir, kompleksin bir araya gelmesi için bir iskele oluşturmakta ve β-kateninin

etkili kovalent modifikasyonunu sağlamaktadır. *APC* genindeki mutasyon sonucu APC proteini fonksiyon göremekte ve Wnt sinyal yolağı sürekli aktif hale gelmektedir (30).

Genomun gardiyanı olarak da bilinen *TP53* KRK'da sıklıkla mutasyona uğrayan başka bir gendir (77). *TP53* geni 17. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır ve 393 amino asit kalıntısı olan p53 adı verilen bir protein kodlamaktadır. p53, spesifik olarak DNA'ya bağlanan ve çeşitli genleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Normal koşullar altında, hücresel p53 protein düzeyleri, ubikitinasyon yoluyla p53 bozunmasını destekleyen ve negatif düzenleyicileri olan Mouse double minute (MDM)2 ve MDM4 tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmesi nedeniyle çok düşüktür. Hücreler, DNA hasarı, hipoksi, besin eksikliği ve kanser riski dahil olmak üzere iç ve dış streslere maruz kaldığında, p53 ubikitinasyonu inhibe olur ve hücre içi p53 protein düzeylerinde hızlı bir artışa neden olmaktadır. Birikmiş p53, çekirdekte tetramerler oluşturur, hedef DNA'ya bağlanır ve gen transkripsiyonunu düzenlemektedir (76).

Hücresel strese yanıt olarak p53, mutasyona uğramış veya hasar görmüş DNA'ya sahip hücrelerin farklılaşmasını önler ve apoptoz ve hücre döngüsünde yer alan çeşitli genleri transkripsiyonel olarak aktive ederek hücresel süreçleri sonlandırmaktadır. *p53*, anti-apoptotik proteinler olan B hücreli lenfoma 2 (B cell lenfoma-2, Bcl-2), B-hücreli lenfoma-ekstra büyük (B cell lenfoma-ekstra Large, Bcl-xL) ve miyeloid hücreli lösemi-1 (myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)'e fiziksel olarak bağlanarak, pro-apoptotik protein Bcl-2 antagonist katili 1 (Bcl-2 antagonist killer 1, Bak)'i doğrudan aktive ederek, *Puma*, Bcl-2 ilişkili x apoptoz (*Bax*) regülatörü ve Noxa gibi pro-apoptotik genlerin ifadesinin transkripsiyonel olarak aktive ederek veya Mcl-1 ve Bak kompleksini bozarak apoptozu indüklemektedir. p53'ün metabolik homeostaz, ferroptoz, kök hücre farklılaşması, otofaji, senesans, tümör mikroçevresini de kontrol ettiğini gösterilmiştir (78) (Şekil 2.8).

TP53 mutasyonu kanserlerin büyük bir çoğunluğunda meydana gelmektedir. *TP53* mutasyonu KRK hastalarının yaklaşık %50'sinde oluşmaktadır ve adenomun kansere dönüşümünü başlattığı bilinmektedir. TP53'ün mutasyonla etkisiz hale getirilmesi, hasarlı hücrelerin apoptozdan kaçmasına ve sürekli tümör büyümesine izin vermektedir (77).



Şekil 2.8: p53'ü arttıran nedenler ve p53'ün fonksiyonları (79).

18. Kromozomun uzun kolunda heterozigosite kaybı (18q Loss of Heterozygosity, 18qLOH), KRK'lı hastaların %70'inde saptanan ve en sık görülen sitogenetik değişikliktir. Kromozom 18q, bazı tümör baskılayıcı genleri içermektedir; bunlar arasında KRK'da önemli roller oynadıkları bildirilen Kolorektal Kanserde Silinen (Deleted in Colorectal Cancer, *DCC*) ve *SMAD4* genleridir. DCC geni netrin-1 reseptörünü kodlar. Bu, hücre adezyon moleküllerin immünoglobulin süper ailesinin bir üyesidir, tümör oluşumuna ve metastazına karşı dirençle ilişkilendirilmektedir (80,81). TGF-β/SMAD4 sinyal yolu, hücre zarından çekirdeğe sinyal iletimini kontrol etmekte ve çoğalma, farklılaşma, apoptoz, metastaz dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçlerden sorumludur (82). SMAD4, TGF-β kompleksinin çekirdeğe taşınmasını sağlayan hücre içi bir proteindir. KRK'da SMAD4 kaybının yaklaşık %30'luk bir sıklıkta meydana geldiği ve bunun ileri evre hastalık, lenf nodu metastazı varlığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. *SMAD4*'ün heterozigot delesyonunun *APC*'nin germ hattı mutasyonuyla başlatılan KRK'nın ilerlemesini desteklediği bildirilmiştir (83).

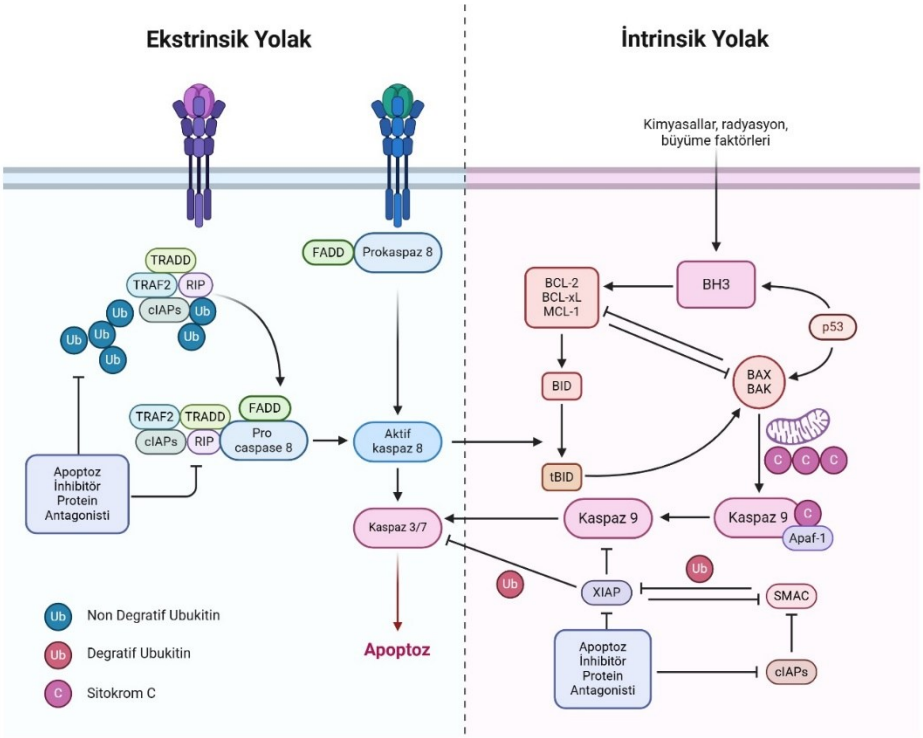
2.7. KOLOREKTAL KANSER, APOPTOZ VE NEKROZ

Apoptoz, hücrelerin fonksiyonlarını gerçekleştirdikten sonra güvenli bir şekilde ortadan kaldırılmalarını sağlayan, genetik olarak regüle edilen programlanmış bir hücre ölüm şeklidir. Organizma homeostazını korunmasını sağlayan ve hücre popülasyonunu kontrol eden kritik bir süreçtir. Normal doku yenilenmesi, zarar görmüş ve otoimmün hücrelerin yok edilmesi, embriyogenez sırasında oluşan dokulara şekil verilmesi, kanal oluşumu ve parmak oluşumu gibi çeşitli fizyolojik işlemlerde gerçekleşmektedir (69,84).

Apoptozun regülasyonu, hücre içi ve hücre dışı kaynaklı çeşitli faktörler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu faktörler arasında apoptozu tetikleyerek sinyal yolağını başlatan faktörlere "pro-apoptotik", hücre ölümünü engelleyen ve apoptor sinyal yolağını baskılayan faktörlere "anti-apoptotik" adı verilmektedir (85).

Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{+2} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (iskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar ve radyasyon)'dir. Hem iç hem de dış sinyal yolaklarında kaspazlar görev almaktadır. Hücre içi sinyaller instrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indüklemektedir (86) (Şekil 2.9). TNFα, Fas ligandı (FasL) ve TNF ile ilişkili apoptozis indükleyen ligand (TRAIL)'ın, hedef hücre yüzey reseptörlerinin homolog ölüm alanlarına bağlanmasıyla ekstrinsik apoptozis yolağı aktive olmaktadır. Hücre yüzey reseptörlerinin sitoplazmik ucunda bulunan Ölüm Domaini (Death Domatin, DD) etkileşim bölgeleri, Ölüm etki alanına sahip Fas ile ilişkili protein (Fas-associated protein with death domain, FADD) ile prokaspaz-8 veya prokaspaz-10 proteinlerinin bir araya getirmektedir ve böylece ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death-Inducing Signaling Comple, DISC) oluşumu tamamlanmaktadır (69). Kaspaz-8, DISC içerisinde aktive olmakta ve sitozoldeki prokaspaz -3, -6 ve -7'nin kesilmelerini ve aktif hale gelmelerini sağlamakta, hücreyi apoptoza götürmektedir. Kaspaz-8, BH3 etkileşim alan ölüm agonisti (BH3 interacting-domain death agonist, BID)'ni kesebilir, kesik BID (truncated BID, tBID)'yi mitokondriye girerek içten gelen uyaranların tetiklediği intrinsik apoptozu harekete geçirmektedir. Kaspaz -3, -6 ve -7; hedef proteinlerini spesifik kesim dizilerinden tanıyarak onları enzimatik olarak kesmektedir. Bu proteinlere örnek olarak hücre iskeleti öğeleri, çekirdek iç yapısını oluşturan lamin proteinleri ve DNA

kesiliminden sorumlu enzim olaran Kaspazla aktive olan DNaz (Caspase-activated DNase, CAD)'ın inhibitörü olan İnaktif kaspaz aktive edici DNaz (inhibitor of caspase-3-activated DNase, ICAD) örnek gösterilebilir (87).



Şekil 2.9: İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolakları (61)

Apaf-1: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1, BAK: Bcl-2 Homolog Antagonist/Killer (Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer), BAX: Bcl-2 Bağlı X Proteini (Bcl-2-Associated X Protein), BCL-2: B-hücre Lenfoma 2 (B-cell Lymphoma 2), BCL-xL: B-hücre Lenfoma Ekstra Büyük (B-cell Lymphoma Extra Large), BH3: Bcl-2 Homoloji Bölgesi 3 (Bcl-2 Homology Region 3), BID: Bcl-2 İnteraktör Ölüm Proteini (Bcl-2 Interacting Death Protein), cIAPs: Hücre İçi Apoptoz İnhibitör Proteinleri (Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins), FADD: Fas İlişkili Ölüm Alanı Proteini (Fas-Associated Death Domain Protein), MCL-1: Miyeloid Hücre Lösemi 1 (Myeloid Cell Leukemia 1), RIP: Reseptör Etkileşim Proteini (Receptor-Interacting Protein), SMAC: İkinci Mitokondriyal Türetilmiş Aktivatör Kaspaz (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase), tBID: Kesik BID (Truncated BID), TRADD: TNF Reseptörü Bağlantılı Ölüm Alanı Proteini (TNF Receptor-Associated Death Domain Protein), TRAF2: TNF Reseptörü İlişkili Faktör 2 (TNF Receptor-Associated Factor 2), Ub: Ubiquitin (Ubiquitin), XIAP: X'e Bağlı Apoptoz İnhibitör Proteini (X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein).

Hücre içinde, DNA hasarı, metabolik stres gibi sinyaller tespit edildiğinde, intrinsik apoptoz yolağı başlatılmaktadır. Bu sinyallerin yokluğunda Bcl-2 ailesi proteinlerinden Bcl-2 ve Bcl-x gibi anti-apoptotik proteinler, Bax ve Bak gibi pro-apoptoik üyelerin aktivasyonunu engellemektedir (88). Bu sinyaller varlığında ise BID,

kaspaz-8/kaspaz 10 tarafından kesilmekte ve aktif hale gelmektedir. Aktif BID, Bax ve Bak'ın oligomerazisaynonunu tetikleyerek mitokondri dış zarında kanallar oluşmasını sağlamaktadır. Bunun sonucunda sitokrom c, ikinci mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü (Second mitochondria-derived activator of caspase, Smac), apoptozis indükleyici faktör (AIF), Endonükleaz-G (Endo-G) ve HTRA2/OMI uyaranları sitoplazmaya salınmaktadır. Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF-1), sitokrom c ve prokaspaz-9 proteini ile etkileşerek kaspaz-9'u aktive etmek üzere apoptozomu oluşturmaktadır. Aktif kaspaz 9, kaspaz-3, -6 ve -7'nin aktivasyonunu sağlamaktadır. Bunu hücrenin çeşitli yapı taşlarının kesilerek küçük çift katlı membranla çevrili cisimciklere (apoptotik cisimcikler) paketlenmesi izlemektedir. Aynı süreçte DNA'nın da belirli aralıklarla kesilmesi söz konusudur. ENDO-G de DNA'yı parçalamaktadır (85). Aktif kaspaz-3 de ICAD'ı inaktifleştirerek CAD'ı serbestleştirmektedir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmante olmasına neden olur. Smac ise prokaspazların aktivasyonunu engelleyen apoptoz inhibitörü proteinine (Inhibitor of Apoptosis Protein, IAP) bağlanarak prokaspazları serbest bırakmaktadır. AIF, ise poli-ADP-riboz polimeraz 1 (PARP-1) sayesinde DNA degredasyonuna neden olmaktadır. Büyüme hormonları ise hücrelerde PI3K, fosfoinosit bağımlı kinaz 1/2 (PDK1/2), Akt ve nükleer faktör kappa-B (NF-κB)'yi aktive ederek hücre ölümünü engellemekte veya ertelemektedir (87).

Apoptozu tetikleyen sinyaller aktif oldukça hücre içi kalsiyum hücre dışına verilmekte ve hücre içindeki Adenozin trifosfat (Adenosine triphosphate, ATP) tamamıyla kullanılmaktadır. Hücre zarı bozulmadan hücre küçülmeye başlamaktadır. Kromatinler çekirdek zarına doğru yoğunlaşmaya başlamaktadır. Mitokondrivel aktivite, apoptotik faktörlerin üretimi ve salınımı ile artmaktadır. Aktif kaspazlar diğer apoptotik proteinlerin indüklenmesine sebep olmaktadır. Zar asimetrisi kaybolmakta, anyonik fosfolipidler ve fosfatidilserin (Phosphatidylserine, PS) membranın dış katmanına çıkar. Bütün bu değişiklikler hücrenin fagositik hücreler tarafından tanınmasını sağlamaktadır. Zamanla hücre zan, lizozom, mitokondri, kromatin parçaları ve diğer dejenere olmuş organelleri içeren apoptotik cisimcikleri oluşturulmakta ve hücre dağıtılmaktadır. Bu parçalar komşu hücreler ve fagositik makrofajlar tarafından yutulmakta ve inflamasyona yol açmadan dokulardan uzaklaştırılmaktadır (69).

Apoptozisin erken evresinde, hücre zarında PS ifadesi vardır ve bu içeriden tersine çevrilmektedir. Bu, makrofajlar tarafından ölen hücrelerin hızlı bir şekilde tespit edilmesini sağlar ve pro-inflamatuar medyatörlerin salınımı olmadan fagositoza neden olmaktadır. Pro- ve anti-apoptotik yollar arasındaki denge, hücre ölümünün kontrolünde hayati bir rol oynar ve proteinler arasındaki dengedeki bozulmalar, tümör hücrelerinde apoptozu azaltarak artan karsinogenezle ilişkilendirilmektedir (85).

Kanserde hücreler apoptozdan kaçmakta ve apoptoza karşı direnç geliştirmektedir. Anti-apoptotik moleküllerin ifadesinde artış, pro-apoptotik proteinleri ifade eden genlerde mutasyonlara bağlı işlev kaybı ya da miktar azalması, p53 ve/veya PI3K/Akt yolaklarındaki değişiklikler çekirdeğe taşınımda bozukluklar apoptoza direnç gelişimine neden olan belli başlı mekanizmalardır (89). Buna ölüm sinyallerinin ekspresyonunun azalması ölüm reseptörlerinin ekspresyonlarının azalması reseptörlerin ölüm domainindeki bozukluklar anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu (örneğin Bcl-2), pro-apoptotik proteinlerin düşük ekspresypnu [örneğin BİD, BCL-2 ile ilişkili hücre ölüm proteini agonisti (BCL-2-associated death promoter, Bad), Bax], *p53* mutasyonları, kaspaz ekspresyonlarının azalması, IAP ekspresyonunun artması sebep olabilmektedir. Örneğin aşırı ifade edilen Bcl-2, TRAIL tarafından indüklenen apoptozu engellemektedir (90).

İnsan kolorektal mukozasının kriptleri, polarize yapısal organizasyon sergilemektedir. Rejeneratif epitelin kök hücrelerinin yedek havuzu çok azdır ve kript tabanında yer almaktadır. Kök hücreler kript altından yukarı doğru hareket etmekte ve mukozanın apikal kenarında günde yaklaşık 10 milyon hücre apoptozdan ölmekte ve ardından lümene düşmektedir. Bu nedenle, normal kolorektal mukozanın homeostazını korumak için yeterli hücre ölümü gerekmektedir (91). Bununla birlikte, kusurlu sinyalleme veya apoptozun dengesiz düzenlenmesi muhtemelen bir adenomun KRK ile sonuçlanan karsinoma dizisine başlamasının ve ilerlemesinin nedenlerinden biri olmaktadır. KRK gelişimi sırasında, bağırsak epitel hücre homeostazını koruyan hücre büyümesi ve apoptoz oranları arasındaki denge giderek bozulur. Apoptoz başarısızlığı KRK evriminde, kemoterapi ve radyasyona zayıf yanıtında önemli bir faktördür. Bu nedenle KRK'da apoptozu uyarmak için tasarlanan tedavileri kritik bir rol oynamaktadır. Şu anda, proapoptotik reseptörler tarafından ekstrinsik yolun doğrudan aktivasyonu, Bcl-2 proteinlerinin inaktivasyonu, kaspaz modifikasyonu ve IAP inhibisyonu umut verici

adaylar arasındadır. Apoptotik fonksiyondaki anormallikler hem KRK patogenezine hem de kemoterapötiklere ve radyoterapiye direncine katkıda bulunmaktadır (92).

Genellikle hücrelerde ani hasar olduğunda gerçekleşen travmatik hücre ölüm şekli olan nekroz; plazma membran bütünlüğünün bozulması, hücre içeriğinin kontrolsüz salınımı, organel disfonksiyonu, yaygın mitokondriyal hasar ve inflamasyonla karakterizedir. Sitokinler, mikrobiyal enfeksiyonlar veya iskemi/reperfüzyon gibi hücre dışı sinyallerle tetiklenen düzensiz ve kazara bir hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (93). Endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, mitokondri gibi organellerde şişme; Ca^{+2} iyonlarının hücre dışı ortamdan hücre içerisine geçmesi ile endonükleazların aktifleşmesi ve DNA'da kırıklar oluşması, çekirdek kromatinin dağılması, çekirdek zarının parçalanması, hücre içi bileşenlerin etrafa yayılması ve o bölgede inflamasyonun meydana gelmesiyle meydana gelmektedir. Apoptozun aksine, nekroz sıklıkla iltihaplanma ve çevre dokularda hasarla ilişkilidir çünkü ölmekte olan hücreler tarafından salınan hücre içi içerikler, immün sistemi aktive edebilir ve komşu hücrelere zarar verebilmektedir (85).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, nekroptoz, piroptozis ve ferroptozis gibi birden fazla programlanmış nekroz türünü ortaya çıkarmıştır. Nekroptoz, nekrozla morfolojik özellikler paylaşan ancak düzenlenmiş sinyal yolları aracılığıyla yürütülen bir programlanmış nekroz türüdür. Bu süreç, apoptozun engellendiği koşullar altında tetiklenebilmekte ve hücre ölümünü sağlamak için bir yedek mekanizma görevi görmektedir (94). Ferroptoz, demir türevi lipid peroksidasyonu ile gerçekleştirilen programlı nekrozun bir başka benzersiz formudur. Lipoksijenazlar tarafından üretilen lipid peroksitler, plazma membranında yapılandırılmış lipid gözeneklerinin oluşumunu kolaylaştırarak hücre ölümüne yol açmaktadır. İnflamasomun aktivasyonuyla tetiklenen piroptozis ise mikrobiyal enfeksiyonlar ve enfeksiyöz olmayan faktörler tarafından uyarılan, daha yakın zamanda tanımlanmış bir düzenlenmiş nekroz türüdür (95,96).

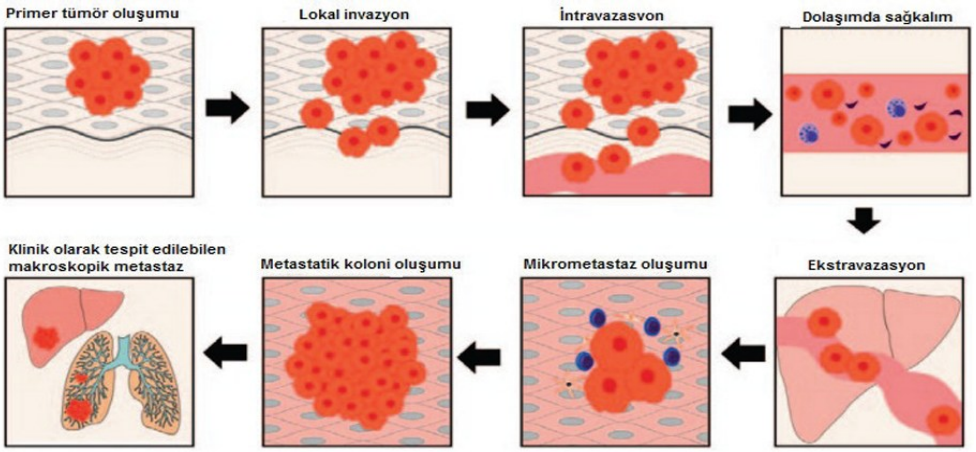
Nekroptoz; TNF, Fas ligandlar, interferon, TRAIL, TNF-ilişkili apoptozisin zayıf uyaranları (TNF-Related Weak Inducer of Apoptosis, TWEAK) ve T hücre reseptörlerinin uyaranları tarafından indüklenebilmektedir. Devamında protein kinaz reseptörüyle etkileşen protein kinaz 1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1, RIPK1), CYLD tarafından deubiquitinlenir ve aktifleşir. Kaspaz-8'in yokluğunda, RIPK1 ve RIPK3'ün fosforilasyon plazma membranına translokasyon

yapabilen ve membran permeabilizasyonuna ve nekroptotik hücre ölümüne aracılık eden karışık soy kinaz alanı benzeri psödokinaz (Mixed lineage kinase domain like pseudokinase, MLKL)'ı fosforile ederek aktif hale getirmektedir. Ayrıca RIPK3 aktif hale geldiğinde mitokondrilerdeki pirüvat dehidrogenaz kompleksini fosforile etmekte, oksidatif fosforilasyonu ve mitokondriyal reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS)'nin üretimini teşvik etmektedir (97). Nekroptozisin, özellikle RIPK3'ün, inflamasyon kaynaklı KRK'yı baskılayabildiği, RIPK3 kaybının ise NF-κB, Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3, STAT-3), Akt ve Wnt-β-katenin yolaklarının aktivasyonunun yukarı regülasyonu yoluyla tümör oluşumunu indüklediğini ve böylece anormal tümör hücresi proliferasyonuna, kolon inflamasyonuna, bağışıklık hücresi infiltrasyonuna ve son olarak KRK'ye yol açtığını gösterilmiştir (98). Ancak nekroptoz ve kanser ilişkisi henüz netleşmiş değildir ve nekroptoz indüksiyonunun ikili etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Programlanmış nekrozun indüksiyonu tümör hücrelerini öldürmekte ve tümör gelişimini engellemektedir. Diğer yandan, litik hücre ölümü olan programlanmış nekroz, hücre içi içerikleri hücre dışı ortama salmakta ve bu da inflamatuar yanıtları tetiklemekte ve tümör ve metastazı tetikleyebilmektedir (99).

2.8. KOLOREKTAL KANSER VE METASTAZ

Metastaz, primer tümör kitlesinden ayrılan kanser hücrelerinin kan ve lenf dolaşımı aracılığıyla yeni koloni oluşturabilecekleri uygun bölgeler bulmalarıyla gerçekleşen bir olaydır. Kanser tedavilerinde önemli oranda sınırlayıcı bir faktör olan metastaz, mortalitenin %90'ından sorumludur. Metastaz, tümör hücrelerinde birçok moleküler ve biyokimyasal etmenler tarafından yürütülen oldukça kompleks bir süreçtir (100).

Primer tümör kitlesinden ayrılan hücreler, metastaz oluşturacakları bölgeye ulaşana kadar birbirini takip eden birçok karmaşık aşamayı atlatmak zorundadır. Buna invazyon-metastaz kaskadı denilmektedir. Metastaz sırasıyla şu basamaklardan oluşmaktadır: 1. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (Epitelial Mezenkimal Transition, EMT) 2. İntravazasyon 3. Dolaşımda sağkalım 4. Ekstravazasyon 5. Mikrometastaz oluşumu 6. Metastatik koloni oluşumu (Şekil 2.10) (101,102).



Şekil 2.10: Metastaz oluşum basamakları (101,102)

2.8.1. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

Epitel hücreler; sıkı bağlantılar, desmozomlar ve yapışık bağlantılar yolu ile bitişik hücrelerle olan temaslarını koruyarak apikal-bazal polaritelerini sağlamaktadır. Mezenkimal hücreler ise bunun aksine kendilerini komşu dokudan ayıran bir bazal lamina yapısına ve belirgin bir apikal-bazolateral polariteye sahip değildir (Tablo 2.1) (103).

Tablo 2.1: Epitel ve mezenkimal hücrelerin özeliklerinin karşılaştırılması (103)

Özellik	Epitel Hücreler	Mezenkimal Hücreler
Morfoloji	Çokgen, çakıl taşı benzeri şekil.	Uzatılmış, iğ biçimli.
Polarite	Apikal-bazal.	Ön-arka.
İstila Yeteneği	Hareketli değil.	Geliştirilmiş hareket ve baskın yetenekleri.
Hücre İskeleti	Sitokeratin ekspresyonu.	Vimentin ekspresyonu.
Hücreler Arası Bağlantı	Sıkı bağlantılar, yapışık bağlantılar ve desmozomlar.	Hücre dışı matrise gevşek bir şekilde bağlı.
Ekstraselüler Matriste Etkileşimler	Hemidesmozomlardaki integrin α6β4 aracılığıyla; sitokeratinlerle bağlantılı.	Yapışma plaklarındaki β1 içeren veya β3 içeren integrinler aracılığıyla; aktin stres liflerine bağlı.
Biyobelirteç	Bağlantı proteinleri, epitel belirteçleri, matriks proteinleri.	Matriks proteinleri, proteazlar, mezenkimal belirteçler.

Normal şartlarda bazal membran ile bazal yüzeyi aracılığıyla etkileşime giren epitel bir hücrenin, apoptoza karşı yüksek direnç gösteren ve gelişmiş göç kapasitesine sahip bir mezenkimal hücre fenotipi kazanmasını sağlayan bir sürece EMT denilmektedir (104).

Hücre-hücre adezyonu, hücre-ekstraselüler matriks (Extracellular Matrix, ECM) adezyonu çözülmeye ve hücre polaritesi kaybedilmeye başlanmakta ve mezenkimal-kök hücre görünümlü yeni bir invazif hücreye dönüşüm gerçekleşmektedir. Epitel hücreler polaritelerini kaybedip bazal membrandan ayrılmaktadır. Hücreler, bağ dokuyu işgal etmekte ve ECM bağlantılarını kaybetmektedir (69).

Tümör hücreleri tarafından salgılanan Matriks Metaloproteinaz (MMP) enzimleri nedeniyle de ECM degrade olmaktadır. MMP'ler çinko bağımlı endopeptidazlardır. MMP'ler ayrıca büyüme faktörlerinin ekspresyonunu arttırarak hücre proliferasyonunda da artışa neden olmaktadır. ECM moleküllerinden laminin, fibronektin, kolajen ve proteoglikanları parçalamaktadır. ECM bağlantısını kaybetmesi sonucu apoptoza (=anoikis) giden epitel hücrelerinin aksine tümör hücreleri primer tümörden ayrılmak için mekanizmalar geliştirmektedir. Bu süreçlerde epitelyal hücre-hücre adezyonunun ana proteini olan E-kaderin Slug, Snail ve Twist gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu azalarak epitelin daha geçirgen olmasına yol açmaktadır (69,105,106). Tümör hücrelerinde bu süreçte E-kaderin ekspresyonu azalırken de novo N-kaderin ekspresyonunda artış görülür. E-kaderin ekspresyonundaki kaybolma epitel hücreleri arasındaki bağlantıların, apiko-bazal hücre polaritesinin ve epitel doku yapısının bozulmasına neden olurken, N-kaderin ekspresyonundaki artış ise kanser hücrelerinin primer dokudan serbestleşmesini, invazif kapasite kazanmasını kolaylaştırmaktadır. "Kaderin değişimi (cadherin-switch)" olarak adlandırılan bu olay tümörün invazifliği ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (107,108).

2.8.2. İntravazasyon

Metastatik kaskattaki bir sonraki adım, kanser hücrelerinin kan veya lenfatik dolaşıma girmesidir. Bu duruma "intravazasyon" adı verilmektedir. İntravazasyonun gerçekleşebilmesi için kanser hücrelerinin endotelyumu geçebilmesi dolayısıyla endotelyal bağlantıları parçalaması gerekmektedir. Bu temelde tümör hücrelerinin salgıladığı MMP-1, -2 ve -9 ile birlikte proteolitik ürokinaz-tip plazminojen aktivatör sisteminin (uPA/uPAR) aktivasyonu sayesinde gerçekleşmektedir (109). İntravazasyon, tümör hücrelerinin perisit ve endotel bariyerlerini aşmasını kolaylaştıran TGF-β ve VEGF gibi moleküller tarafından hızlandırılmaktadır. İntratümöral hipoksi, anjiyogenezi indükleyen VEGF ekspresyonunu artırır, hücre yayılması için gerekli yolları sunar, vasküler bütünlüğü ve geçirgenliği değiştirir ve intravazasyon ve ekstravazasyonu teşvik

etmektedir. VEGF gibi moleküller, anjiyogenez sürecini başlatarak yeni damarların oluşmasını sağlar ve bu sayede tümör hücrelerinin daha fazla besin ve oksijen almasına olanak tanımaktadır (110).

2.8.3. Dolaşımda Hayatta Kalma

Tümör hücrelerinin çok az bir kısmı dolaşımda hayatta kalıp metastaz oluşturabilmektedir. Pek çok tümör hücresi hemodinamik güçler, anoikis, sitotoksik immün sistem hücrelerinin saldırısı sonucu dolaşımdan uzaklaştırılmaktadır (111,112). Tümör hücrelerinin hayatta kalabilmeleri için ECM'ye integrin-bağımlı adezyon yapmaları gerekmektedir. Aksi taktirde hücrelerin anoikis denilen apoptoz yolağına girmesi beklenmektedir. Ayrıca dolaşımdaki doğal öldürücü (Natural Killer, NK)'hücrelerden kurtulmaları gerekmektedir (69). Ancak tümör hücreleri; L-, P-Selektinler, trombin, doku faktörü, Katepsin B, MMP-2/-14 gibi faktörler salgılayarak platelet agregasyonunu uyarıp kendilerine platelet kalkanı oluşturarak immün sistemden kaçabilmektedir (108).

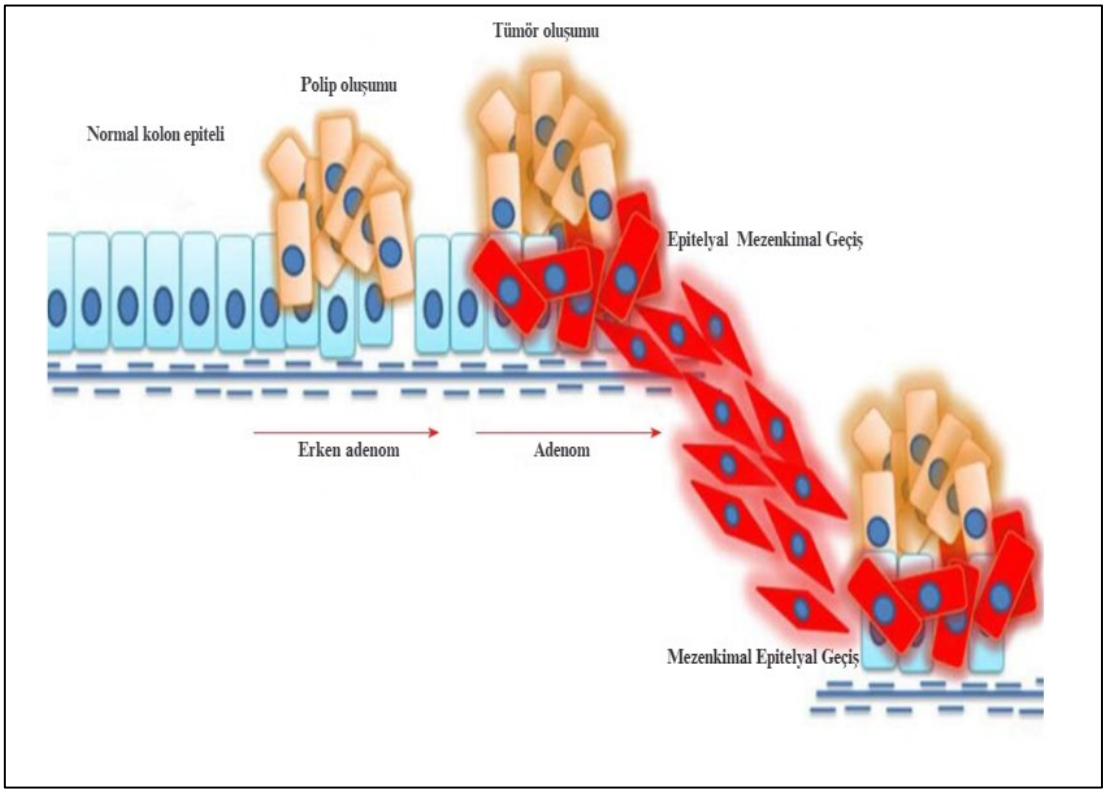
2.8.4. Ekstravazasyon

Dolaşımdaki tümör hücreleri, ilgili organların damar sistemine ulaştıklarında lümen içinde büyüyerek mikro koloni oluşturup ve sonunda damar duvarını delerek parankim dokuya ulaşmaktadır. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin endoteli aşıp organlara ulaşması ekstravazasyon olarak adlandırılmaktadır (112). Tümör hücreleri belirli organlara afinite gösterirler. Buna doku tropizmi adı verilir. Bunun sebeplerinden birisi her organ tarafından salınan belirli kemokinlerin uygun reseptörlerinin tümör hücresinde eksprese olmasıdır (69).

2.8.5. Mikro Ve Makro Metastaz

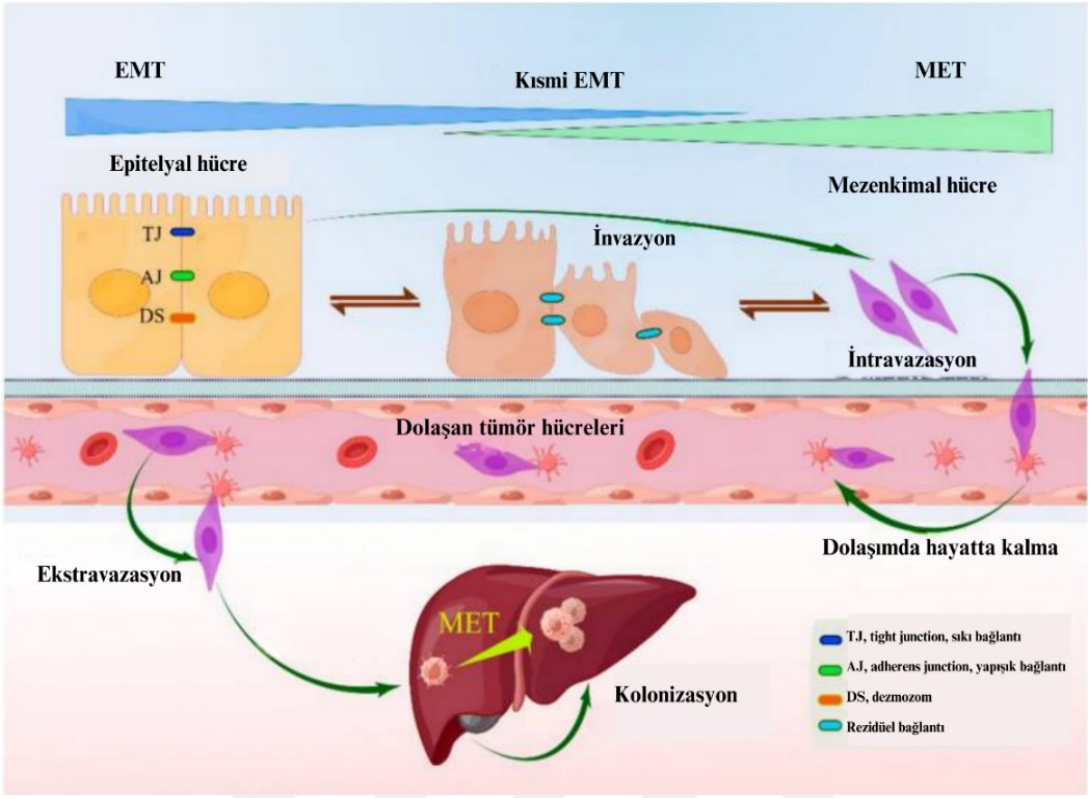
Metastazın gerçekleşmesi için tümör hücrelerinin kendine yabancı bir organın parankim dokusunda hayatta kalması gerekmektedir. Bunu sağlayabilmek adına primer kanser hücreleri, dolaşıma TGF-β, VEGF-A, plasental büyüme faktörü (Placental Growth Factor, PlGF), kalprotektin gibi moleküllerin upregülasyonunu uyaran sinyaller oluşturarak tümörün ilerideki proliferasyon zemini olacak olan 'metastatik niş'i oluşturmaktadır. EMT hedef dokuda tersine dönerek mezenkimal-epitelyal dönüşüm (Mesenchymal-Epithelial Transition, MET) gerçekleşmekte (Şekil 2.11) (113) ve tümör

hücreleri çoğalarak organda makro koloniler oluşturmaktadır (108). Mikrometastazlar farklı dokulara dağılıp makroskopik metastazlar oluşturabilmektedir. Fakat bu belli bir paternde gerçekleşmemektedir. Tümör hücreleri bazen bulundukları yerde yıllarca sessizce yer alabilmektedir. Adaptif immünite sayesinde sessizleştirilerek bir süre sekonder bir tümör oluşumuna yol açamazlar ancak genetik modifikasyonlar ve mikroçevre ile etkileşerek, örneğin Snail gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile tümör hücreleri zamanla metastatik hale dönüşebilmektedir (114).



Şekil 2.11: Kolonda erken adenomdan metastaza ilerleyiş (113)

Metastaz, KRK hastalarında mortalitenin başlıca nedenidir. Metastaik KRK, 5 yıllık %14 sağ kalım oranıyla mortalitenin başlıca nedenidir. KRK için en yaygın metastaz bölgesi %50'den fazla karaciğerdir (Şekil 2.12). Bunu periton, akciğer ve kemik metastazı takip etmektedir (103).



Şekil 2.12: Kolorektal kanserden karaciğere metastaz (103)

Karaciğere KRK metastazı, portal venin doğrudan karaciğere boşlaması nedeniyle sıklıkla görülmektedir (114). Ayrıca karaciğer vaskülarizasyonu sinüzoidal endotelden oluşmaktadır dolayısıyla organize subendotelyal bazal membrana sahip değildir. Bu nedenle tümör hücre ekstravazasyonu karaciğerde daha kolaydır. Ancak karaciğer parankimi, doğuştan immün sistem hücreleri açısından zengindir ve bu potansiyel olarak tümör hücrelerine bir engel oluşturmaktadır (115). Bununla birlikte TRAIL, karaciğerde yerleşik NK hücre aktivasyonunu inhibe etmekte ve metastaz artabilmektedir. KRK, karaciğer metastazını destekleyen; kemokin ligandı 2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2, CCL2) ve IL-6 gibi faktörler aracılığıyla miyeloid hücreleri harekete geçirmektedir (116). KRK hastalarında dolaşımdaki IL-6 düzeyi yükselmektedir ve genellikle metastaz, kötü prognoz ve daha kısa sağkalım ile ilişkilendirilirken, daha düşük bir IL-6 düzeyi tedaviye daha iyi yanıt ile ilişkilidir (117).

Kolorektal kanser, TGF-β açısından zengin bir kanserdir. KRK tümörleri ve hücre hatları normal kolon epitelinden daha fazla TGF-β ifade eder. TGF-β, EMT ile ilişkili kapsamlı bir şekilde araştırılmış bir sitokindir. TGF-β sinyali zamanla EMT'yi başlatabilmektedir. SNAIL'in ise KRK'de önemli bir rol oynadığı ve tümör hücrelerinde

yükselen WNT sinyalizasyonunun SNAIL seviyelerini yükselttiği, SNAIL'in ise E-kadherin kodlayan gen Kadherin-1 (Cadherin-1, *CDH1*)'i inhibe ettiği, böylece EMT'yi düzenlediği ve lokal invazyonu teşvik ettiği gösterilmiştir (118).

2.9. KOLOREKTAL KANSERİN KLİNİK BELİRTİLERİ

Kolorektal kanser hastalarında tümörün yerleşim yerine göre (Tablo 2.2) ve evrelere göre hastaların belirtilerinde değişiklikler olabilmektedir (119). KRK hastalarının genellikle gizli kan kaybı nedenli ile anemileri mevcuttur ve aneminin belirti ve bulguları ile doktora başvurmaktadırlar. Bunlar; yorgunluk güçsüzlük, halsizlik, nefes darlığı, kulak çınlaması ve bayılmadır. Özellikle kalın bağırsağın sağ tarafında, çekumun yakınındaki tümörlerin genellikle kanamaya neden olma olasılıkları yüksektir. Kalın bağırsağın sol tarafında, inen ve sigmoidal kolonda tümör genellikle kolon duvarının etrafında büyümekte ve onu çevrelemektedir. Bu nedenle bağırsak kanalını daraltıp ve kısmi tıkanıklığa neden olabilmektedir. Tipik semptomlar arasında kabızlık, ishal, defekasyonda değişiklik, dışkı kıvamında ve renginde değişiklik, rektal kanama ve tanezm görülmektedir. Ayrıca KRK hastalarında evre ilerledikçe iştahta azalma ve kilo kaybı görülmektedir. Bazı hastalar ise karın içinde ele gelen sertlik ve dolgunluk ile de doktora başvurmaktadır (120).

Tablo 2.2: Kolorektal kanserde tümörün yerleşim yerine göre hastaların başvuru semptomları (119)

Belirti	Proksimal (Çıkan ve Transvers) Kolon-Rektum Kanseri (%)	Distal (İnen ve Sigmoid) Kolon- Rektum Kanseri (%)
Anemi	70	47
Halsizlik	31	20
Kabızlık	23	30
İshal	16	27
Kilo Kaybı	46	34
Gaita Değişikliği	17	30
Rektal Kanama	43	70
Tanezm	4	12

2.10. KOLOREKTAL KANSER TARAMA VE TANI YÖNTEMLERİ

Kolorektal kanser taramasında gaitada gizli kan testi, fekal immünokimya testi (FIT), FIT-DNA, Karsino Embriyojenik Antijen (Carcinoembryonic Antigen, CEA) gibi testler kolonoskopi, baryum enama/flexibl sigmoidoskopi, BT kolongrafidir gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak kolonoskopi, KRK'nın hem taramasında hem teşhisinde hem de tedavisinde kullanıldığı için altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir (119).

Kolonoskopinin kolonik hastalık, premalign adenom ve kanser saptamada yüksek duyarlılığı ve özgünlüğü bilinmektedir. Kolonoskopide şüpheli lezyonlardan biyopsi olma olanağı mevcuttur (bu nedenle tanı doğruluğu artmakta ve aynı işlem sırasında çoğu benign lezyonun tamamen çıkarılmasına olanak sağlamaktadır). Bununla beraber distal kolonda tıkayıcı lezyon varlığı, kolonoskopinin tamamlanma oranında operatörler arası farklılık, işlemin tolere edilememesi, uygun olmayan barsak temizliği gibi durumlarda kolonoskopinin tamamlanması sağlanamayabilir (28). Ciddi kardiyorespiratuar ve nörolojik eşlik eden hastalıkları olan hastalarda kolonoskopinin potansiyel komplikasyonları daha riskli olabilmektedir. (örneğin kolonik perforasyon, sedasyon etkileri). Benzer durumdaki hastalarda baryum enema veya BT-Kolonografi gibi alternatif tetkikler daha yararlı olabilmektedir (30).

2.11. KOLOREKTAL KANSER EVRELEME

Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (Union for International Cancer Control, UICC) ve Amerikan Kanser Ortak Komitesi (American Joint Committee on Cancer, AJCC) tarafından onaylanan evrelendirme, TNM (Tümör, lenf nodu, metastaz) terminoloji sistemi kullanılarak yapılmaktadır (30,121).

En erken evre, henüz muskularis mukoza tabakasına ulaşmamış olan kolon veya rektum mukozasındaki kötü huylu hücrelerin varlığıyla tanımlanan, karsinoma in situ olarak da bilinen evre 0'dır.

Evre 1'de hastalık, çoğalan tümör hücrelerinin submukozal veya muskularis propria tabakalarına invazyonu ile ilerler, ancak bitişik organlara veya lenf düğümlerine ulaşmaz.

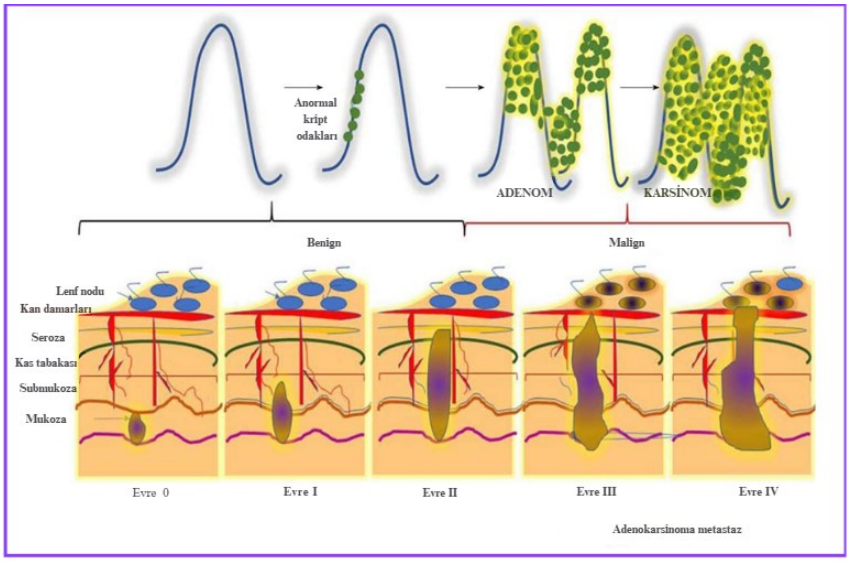
Evre 2'de KRK, rektum ve kolonun dış katmanlarına ilerlemiştir ancak henüz lenf düğümlerine veya diğer organlara yayılmamıştır.

Evre 3'te, tümör hücreleri lenf düğümlerini istila eder.

Son olarak, evre 4, CRC tümör hücrelerinin en az bir uzak organa yayılması olarak tanımlanır (Tablo 2.3) (Şekil 2.13) (30,113,121).

Tablo 2.3: Kolorektal kanser evrelemesi (30,121)

EVRE		T	N	M
0		Tis	N0	M0
1		T1	N0	M0
T2		N0	M0	
2	A	T3	N0	M0
	B	T4a	N0	M0
	C	T4b	N0	M0
3	A	T1-T2	N1	M0
		T1	N2a	M0
	B	T3-T4a	N1	M0
		T2-T3	N2a	M0
		T1-T2	N2b	M0
	C	T4a	N2a	M0
		T3-T4a	N2b	M0
		T4b	N1-N2	M0
4	A	Herhangi T	Herhangi N	M1a
	B	Herhangi T	Herhangi N	M1b
	C	Herhangi T	Herhangi N	M1c



Şekil 2.13: Kolorektal kanser evreleri (113)

2.12. KOLOREKTAL KANSER TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Kolorektal kanserin tedavisi, geç tanı, yüksek nüks oranları, metastaz ve çoklu ilaç direnci nedeniyle zordur. KRK'nın tedavi yöntemi kişiden kişiye, tümörün büyüklüğüne, tümörün kolon ve/veya rektumdaki yerine dağılımına ve tanı evresine göre değişkenlik göstermektedir. Başlıca tedavi yöntemleri cerrahi, kemoterapi, radyoterapidir ve bunların kombine rejimidir (122).

Kolorektal kanser tedavi yönetimindeki ana prensip, primer tümörü ve drene olduğu bölgesel lenfatikleri, temiz cerrahi sınırlarla çıkartmaktır. Tümör cerrahi girişimle tam olarak çıkartılamıyorsa, mevcut semptomların rahatlatılabilmesi ya da olası komplikasyonların önlenmesi amacıyla, kolostomi, ileostomi ya da bypass gibi palyatif işlemler de uygulanabilmektedir (123). KRK vakalarının yaklaşık dörtte biri ileri evrede teşhis edilmektedir ve kalan vakaların %20'si metakron metastazlar edinmektedir. Bu nedenle, tek başına küratif cerrahi kontrol genellikle zordur ve tümörle ilişkili mortalite sonuçlanmaktadır. KRK evresi, hastalığın şiddetini ve mevcut tedavi seçeneklerini belirlemektedir. Evre 0-II KRK'de standart tedavi seçeneği cerrahi olmasına rağmen, evre III KRK'de cerrahi ve adjuvan kemoterapi, evre IV ve tekrarlayan KRK'de ise cerrahi, kemoterapi ve hedefli tedavi gerekmektedir (124).

İnvaziv tümörler nedeniyle başlangıçta ameliyat edilemeyen ileri KRK'lı hastalar ameliyat öncesinde kemoterapi ile tedavi edilebilir ve buna neo-adjuvan tedavi denilmektedir**.** Mevcut kemoterapi, tek ajanlı tedaviyi 5-FU ile oksaliplatin (OX, Oxaliplatin), irinotekan (Irinotecan, IRI) ve kapesitabin (Capecitabine, CAP) dahil olmak üzere çoklu ajanlı rejimleri içerir. 5-FU, KRK tedavisinde en yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Kombine tedavi rejimleri FOLFOX (5-FU + OX), FOXFIRI (5-FU + IRI), CAPOX (CAP + OX) ve CAPIRI (CAP + OX), birinci basamak tedavide ana akım yaklaşımlar olmaya devam etmektedir (124,125).

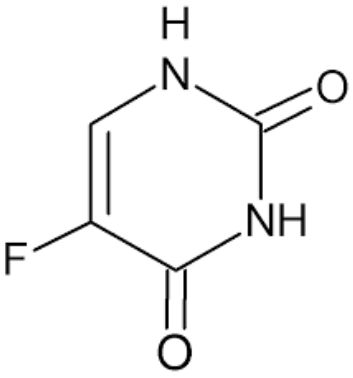
Hedefle yönelik kanser tedavileri, kanserin büyümesinde, ilerlemesinde ve yayılmasında rol oynayan spesifik moleküllere müdahale ederek tümörün büyümesini ve yayılmasını engelleyen ilaçlar veya diğer maddelerdir (126). Genelde anti-anjiyojenez tedaviler ve büyüme faktörü reseptör inhibitörleri kullanılır. KRK'yı başlatan/ilerleten/metastazı indükleyen VEGF/VEGFR, EGF/EGFR, hepatosit büyüme faktörü (hepatosite growth factor, HGF), TGF, Wnt/β-katenin gibi çeşitli sinyal yolakları ve molekülleri hedeflenmektedir. Setuksimab, panitumumab, nimotuzumab ve

necitumumab gibi antianjiyojenik monoklonal antikorlar EFGR'yi hedefler. Bevasizumab ve ramucirumab gibi antianjiyojenik monoklonal antikorlar sırasıyla vasküler EGF'yi ve reseptörünü hedeflemektedir (126,127).

Kolorektal kanser tedavilerinin yan etkilerinden kaynaklanan sorunlar ve iyileşme süreci üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle sürekli olarak farklı tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. KRK'de kemoterapi ajanlarının yaygın kullanımına rağmen, sınırlı etkinlikleri, seçicilikleri, düşük biyoyararlanımları, zayıf çözünürlükleri ve kanser ile normal hücreler/dokular arasında spesifik olmayan biyolojik dağılımları önemli zorluklar oluşturmaktadır. Artan kanser ölümleri ve tedavinin yüksek maliyeti, yeni terapötik yaklaşımlara olan ilgiyi ve doğal kaynaklardan kemoterapi önleyici ajanların keşfini artırmaktadır (127,128).

2.13. 5-FLUOROURASİL VE İLAÇ DİRENÇ MEKANİZMALARI

5-Fluorourasil, C-5 pozisyonunda bir flor atomu bulunan bir urasil analoğudur (Şekil 2.14) (129). Antimetabolitler olarak bilinen antikanser ilaç grubuna dahildir ve KRK tedavisinde 40 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır. Sistemik florourasil, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından gastrik adenokarsinom, pankreas adenokarsinomu, meme adenokarsinomu ve kolorektal adenokarsinom tedavisi için onaylanmıştır. İntravenöz olarak uygulanmaktadır. İleri KRK'da tek bir ajan olarak genel yanıt oranı yaklaşık %10-15 ile oldukça sınırlı kalmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda, 5- FU'nun anti-kanser aktivitesini arttırmak ve klinik direncin üstesinden gelmek için çeşitli stratejiler geliştirilmektedir (5).



Şekil 2.14: 5-Fluorourasil (129)

İntravenöz enjeksiyondan sonra, 5-FU'nun sadece %1-5'i aktif sitotoksik metabolitlere metabolize edilmekte yaklaşık %20'si idrarla atılırken kalan %80'i karaciğerde hızla parçalanmaktadır (130):

5-Fluorourasil, hücrelere urasil taşıma sistemi tarafından aktif taşımayla ve pasif difüzyonla da alınabilmektedir. Hedef hücrelerde şu aktif metabolitlerine dönüşmektedir:

1) Florodeoksiüridin trifosfat (FdUTP)

2) Floroüridin trifosfat (FUTP)

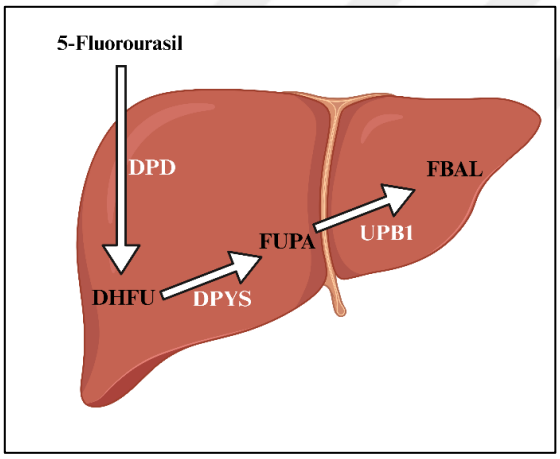
3) Florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP) (131).

5-Fluorourasil'in sitotoksik mekanizması, timidilat sentazın (TS) inhibisyonu ve 5-FU metabolitlerinin RNA ve/veya DNA'ya dahil edilmesi yoluyla hücre ölümünün indüklenmesi olarak açıklanmaktadır. 5-FU öncelikle orotat fosforibozil transferaz enzimi tarafından doğrudan FUMP'a dönüştürülmektedir. Daha sonra FUMP, ribonükleotid redüktaz (RR) tarafından aktif RNA hasarı veren metabolit FUTP veya florodeoksiuridin difosfata (FdUDP) dönüştürülebilen florouridin difosfata (FUDP) fosforile edilmektedir. Son olarak, FdUDP, her ikisi de doğrudan veya dolaylı olarak DNA hasarına neden olan aktif 5-FU metabolitleri olan FdUTP veya FdUMP'ye dönüştürülebilmektedir. FdUTP, DNA'ya FUTP ise RNA'ya dahil edilerek doğrudan hasara neden olmaktadır (132). FdUMP, Timidilat sentaz (TS) enzimini inhibe etmekte, nükleotid dengesizlikleri ve yüksek deoksiüridin trifosfat seviyeleri yoluyla dolaylı DNA hasarına yol açmaktadır. TS, normalde metil verici olarak 5,10-metilen tetrahidrofolat (CH_2THF) kullanarak deoksiüridin monofosfatın (dUMP) deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüşümünü katalize etmektedir. Ancak dUMP yerine TS'ye florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP)'ın dahil edilmesi, dUMP'nin nükleotid bağlama bölgesine erişimini bloke etmekte ve dTMP sentezini inhibe eder. Sonuç olarak, DNA replikasyonu ve onarımı için gerekli olan timidin monofosfat sentezi azalmakta, bu da deoksiüridin trifosfat (dUTP) dengesizliklerine, artan dUTP'ye, DNA hasarına neden olmakta ve son olarak kanserli hücreleri ölüme sürüklemektedir (129).

5-Fluorourasil'in parçalanması, 5-FU'nun inaktif metabolit olarak 5,6-dihidro-5-florourasile (DHFU) dönüşümünü katabolize eden ve hız sınırlayıcı enizm olan dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD) enzimi tarafından kolaylaştırılmaktadır.

Katabolizma süreci daha sonra DHFU'nun dihidropirimidinaz (DPYS) tarafından α-floro-β-üreidopropiyonik aside (FUPA) dönüştürülmesi ve daha sonra β-üreidopropiyonaz (UPB1) tarafından dekarboksilasyon ve deaminasyo reaksiyonlarının α-floro-β-alanine (FBAL) dönüştürülmesiyle devam etmektedir (131). (Şekil 2.15).

5-Fluorourasil'in esas etkileri, hızlı bölünen hücreler olan olan gastrointestinal mukoza ve kemik iliğinde hücrelerinde görülmektedir. Diyare en sık görülen yan etki iken, gastrointestinal sistemde epitelyal ülserasyon ve mukozit, bulantı ve kusma da sık görülmektedir. Kemik iliğinde supresyon, sıklıkla granülositopeni ve trombositopeni olarak görülmektedir. Dermatolojik olarak alopesi, dermatit, el-ayak sendromu görülebilmektedir. Daha az yaygın olarak, nörotoksisiteye ve kardiyovasküler komplikasyonlara neden olabilmektedir. Kardiyolojik olarak angina pektoris benzeri göğüs ağrısı, hipotansiyon, kalp ritim bozuklukları ve sol ventrikül disfonksiyonu görülebilmektedir (133,134).



Şekil 2.15: 5-Fluorourasil'in karaciğerde katabolizması (61)

DPD: Dihidropirimidin Dehidrogenaz, DHFU: Dihidro-5-Florourasil, DPYS: Dihidropirimidinaz, FBAL: α-Fluoro-β-alanin, FUPA: 5-Fluorourasil Profosfat, UPB1: β-Ureidopropiyonaz.

Günümüzde, 5-FU'nun kanser hücrelerindeki duyarlılığını artırmak ve yeni kombinasyon terapileri, kapsüllenmiş ilaçlar vb. kullanarak terapötik etkinliğini artırmak için çeşitli araştırmalar devam etmektedir. 5-FU ve diğer terapötik ajanların kombinasyonu, çeşitli kanserlerde ilaç yanıt oranlarını artırır (5).

Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla anti-kanser ilaç uygulanmakta, ancak sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide var olan ilaç direnci, kemoterapide başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Bu duruma çoklu ilaç direnci (MDR, multiple drug resistance) denilmektedir. İlaç dozları artırıldığı zaman ise hastalarda yan etkiler açığa çıkmakta ve tedavi giderek zorlaşmaktadır (135).

İlaç direnci, gelişim zamanına göre içsel ve edinilmiş direnç olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır. İçsel direnç, tedaviye başlanmadan önce var olan dirençtir. İçsel dirence; tümörlerin çoğunda önceden var olan genetik mutasyonlar, tedaviye duyarsız alt klonların ilaç tedavisinden sonra çoğalabilmesi ve ksenobiyotiklere karşı kullanılan içsel yolların tümör hücrelerinde aktivasyonu neden olmaktadır (136)

Bir ilacın terapötik etkileri, çevresel toksinlere karşı savunma olarak kullanılan içsel yolların aktivasyonu ile azaltılabilmektedir. Buna örnek olarak ATP bağlayıcı kaset (ATP-binding cassette, ABC) proteinleri gösterilebilir. ABC proteinleri ksenobiyotiklerin ve dolayısıyla ilaçların hücre dışına atılmasını kolaylaştıran proteinlerdir. ABC proteinleri, substratlar için bir geçit oluşturan iki transmembran alandan ve ATP'yi bağlayan ve hidrolize eden iki nükleotid bağlayıcı alandan oluşur. ATP'nin bağlanması ve ardından hidrolizi, taşıyıcıdaki konformasyonel değişikliklerle birleştirilir ve taşıyıcı substratların dışarı pompalanmasına yol açmaktadır (137). ABC proteinleri yedi alt aileye: ABCA-ABCG sınıflandırılmaktadır. KRK'de, ABCB1 (P-gp/MDR1), ABCC1 (MRP1) ve ABCG2 (BCRP) gibi ABC proteinlerinin ekspresyonu artmakta ve 5-FU gibi kemoterapötik ajanların hücre dışına atılması kolaylaşmaktadır. Bu durum, hücre içinde yeterli ilaç konsantrasyonuna ulaşamamasına ve ilacın etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca *p53* mutasyonları, bu proteinlerin ekspresyonunu artırarak ilaç direncini daha da güçlendirebilmektedir (137).

Edinilmiş direnç, ilaç tedavisinden sonra ilacın antikanser etkinliğinin kademeli olarak azalmasıyla tanımlanmaktadır. Yeni proto-onkogenlerin aktivasyonu, ilaç hedef genlerinin mutasyonları veya değişmiş ekspresyon seviyeleri ve tümör mikroçevresindeki değişiklikler edinilmiş dirence sebep olmaktadır (136).

Kanser hücreleri, hedef proteinleri kodlayan genler yeni mutasyonlar geliştirdiğinde veya ekspresyon seviyeleri değiştiğinde hedeflenen ilaçlara karşı direnç kazanmaktadır. Bcl-2 ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik proteinler çeşitli kanserlerde aşırı ekspre edilirken, p53 ve Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonu

baskılanmaktadır. Bu proteinlerin değişimi, kanser hücrelerinin DNA'ya zarar veren ajanlara olan duyarlılığını azaltmakta ve apoptoza karşı direncine yol açmaktadır (137).

Tümörle ilişkili sert ve yoğunlaştırılmış ECM, ilaç taşınımını azaltarak ve ilaçları doğrudan bağlayarak hapsedip ilaç yanıtını etkilemektedir. Ayrıca kanserle ilişkili fibroblastlar, HGF ve EGF gibi çeşitli büyüme faktörlerini ve IL-6 gibi sitokinleri salgılayan ve tümör büyümesinde, metastazda ve kanser tedavisine dirençte önemli roller oynayan başka bir tümör mikro çevresi bileşenidir. İlaç dirençli kanser hücrelerinin ekstraselüler vezikülleri de ilaçları hapsedebilmektedir (138).

Sonuç olarak, kanserde ilaç direnci, genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimleri ile şekillenir. Bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması, daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

2.14. ANTİOKSİDAN SİSTEM VE KOLOREKTAL KANSER

Reaktif oksijern türleri, genellikle çeşitli endojen ve ekzojen kaynaklar tarafından üretilen, oldukça aktif ve kararsız oksijen içeren metabolik ürünlerdir (139). ROS iki farklı formda bulunmaktadır. Birinci formu, süperoksit, hidroksil radikalleri, nitrik oksit, alkoksil radikalleri ve peroksil radikalleri dahil olmak üzere serbest oksijen radikallerini içermektedir. İkinci form ise, hidrojen peroksit (H_2O_2), organik hidroperoksitler ve hipoklorit dahil olmak üzere radikal olmayan ROS'u içermektedir (140). ROS'un endojen kaynakları arasında, başlıca elektron taşıma zinciri ve trikarboksilik asit döngüsü olmak üzere mitokondri bazlı metabolik yollar, p450 metabolizması, endoplazmik retikulum, peroksisom, aktive edilmiş makrofajlar ve nötrofiller esas olarak ROS oluşumuna katkıda bulunur (139). Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX), ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz, siklooksijenazlar, sitokrom P450 enzimleri ve lipoksijenazlar gibi birçok enzim de ROS üretimini teşvik etmektedir. Ekzojen olarak ise iyonlaştırıcı radyasyon, kemoterapötik ilaçlar ve çevresel etkiler ROS oluşumunu indüklemektedir (141). ROS, hücre içi lipitleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyebilir ve böylece hasarlı biyolojik moleküllerin birikmesine yol açabilir. ROS kaynaklı DNA hasarı, tek veya çift zincirli kırılma, baz modifikasyonları, deoksiriboz modifikasyonu ve DNA çapraz bağlanmasını içerebilmekedir. Lipit peroksidasyonu, protein ve DNA'ya karşı yüksek reaktiviteye sahip olan malondialdehit ve 4-hidroksi-2-nonenal dahil olmak üzere reaktif aldehitlerin

oluşumuyla sonuçlanmaktadır. ROS, hücresel çoğalmayı, farklılaşmayı, hayatta kalmayı ve apoptoz sürecini düzenlemektedir (140).

Oksidatif stres, ROS üretimi ile antioksidanların etkinliği arasındaki dengenin bozulması durumudur. Hem endojen hem de eksojen antioksidanlar ROS süpürücü olarak hareket etmektedir. Antioksidanlar, radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/ peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddelerdir. (142). Antioksidanların rolleri; serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirmek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı sağlamak olarak sayılabilir (143). Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GPx) ve Glutatyon redüktaz (GR) enzimatik savunma hattını oluşturan endojen enzimsel antioksidanlardır. Endojen enzimsel olmayan antioksidanlar arasında glutatyon, melatonin, ürik asit, bilurubin, albümin, koenzim Q10, selenyum, α-lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin bulunmaktadır. Eksojen kaynaklı antioksidanlar ise α-Tokoferol (Vitamin E), β-karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C) ve folik asit (Vitamin B9), ilaç olarak kullanılan antioksidanlar ve polifenollerdir (144).

Kolon içeriği mukus, safra, epitel hücreleri, çeşitli mikroorganizmalar ve bunların fermantasyon ürünleri, sindirilmemiş veya emilmemiş gıdalar ve metaller, tuzlar, toksinler, mutajenler, kanserojenler ve çözünmüş gazlar (nitrojen, hidrojen, karbondioksit, metan, oksijen) gibi metabolik ürünlerin çeşitli karışımlarından oluşur. Mukozanın sürekli bir şekilde diyet ve bakteri kaynaklı oksidanlar ve kanserojenlerle tehdit edildiği belirtilmektedir. Bu tür zorlu koşullara kronik maruz kalma, kontrolsüz serbest radikal oluşumuna, redoks dengesizliğine ve DNA hasarına yol açabilir ve bu da metabolik homeostazisi etkileyebilir ve kanseri indükleyebilmektedir (142).

Kolorektal kanser gelişiminden sorumlu birçok mekanizma ROS içermektedir. Örneğin, alkol ve sigara tüketimi gibi KRK patogenezi ile yaygın olarak ilişkilendirilen risk faktörleri ROS'un indükleyicileridir. Ek olarak, kronik bağırsak iltihabı redoks homeostazının bozulmasından kaynaklanır. Bu, ROS üretiminin şiddetlendiği ve karsinogenezle ilişkili genlerin aktivasyonuna yol açarak bu hastalarda KRK riskini artırdığı inflamatuvar bağırsak hastalığı ve Crohn hastalığında görülmektedir. Dahası, tüm KRK vakalarının yaklaşık %35-45'inde mutasyona uğramış bir onkogen olan *K-Ras*'ın anormal aktivasyonu, redoks dengesini bozar ve pro-oksidan programların aktivasyonunda rol oynar. Özellikle, *Ras* proto-onkogeni, MAPK yolağı aktivasyonu

yoluyla süperoksit üreten bir enzim olan NOX1 ekspresyonunu arttırarak süperoksit üretimini teşvik eder (145). Yükselmiş ROS seviyeleri, NF-κB'yi aktive edebilir ve E-kadherin ekspresyonunu azaltıp, nöral kaderin ve vimentin ekspresyonunu arttırarak transkripsiyon faktörü Snail'in ekspresyonunu desteklemektedir, böylece hücre-hücre bağlantılarının bozulmasına ve EMT sürecinin tetiklenmesine neden olmaktadır. ROS TGF-β ekspresyonunu arttırarak *Snail*, *Twist*, *Slug* ve *ZEB1* genlerini aktive etmekte, vimentin ve fibronektin ekspresyonunu arttırmakta ve E-kadherin ekspresyonunu baskılamaktadır. Dolayısıyla ROS, EMT'yi desteklemektedir (141).

Kanserin başlatılması, gelişmesi ve ilerlemesinde ROS önemli bir rol oynar. Kanser hücrelerindeki yükselmiş ROS seviyesi, konsantrasyona bağlı olarak protümörojenik veya sitotoksik etkilere sahip olarak iki yönlüdür. Sitotoksik bir eşiğin üzerindeki seviyelerde, ROS, DNA, lipid ve protein hasarı yoluyla kanser hücresi ölümüne neden olmaktadır. Sitotoksik eşiğin altında ise ROS tümör büyümesini ve ilerlemesini uyarmaktadır (141). Kanser hücreleri, yüksek metabolik hız ve artan enerji ve besin ihtiyacı nedeniyle normal hücrelere kıyasla yüksek düzeyde ROS üretmektedir. Ayrıca, mitokondriyal DNA mutasyonları elektron taşıma zinciri boyunca solunum komplekslerinde kusurlara ve buna bağlı olarak aşırı ROS üretimine yol açmaktadır. Üçüncüsü, onkojenik mutasyonlar metabolizmayı ve protein translasyonunu etkileyen önemli hücre içi sinyal yollarını değiştirerek ROS birikimine yol açmaktadır. Birden fazla kaynak yoluyla bu artan ROS seviyeleri çeşitli temel sinyal moleküleriyle etkileşime girerek EGF ve İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1, Insulin-like growth factor) gibi çeşitli büyüme faktörlerini aktive edip reseptörlerinde mutasyona neden olmaktadır (146).

Artmış ROS üretimi nedeniyle, kanser hücreleri ROS birikimini sitotoksik eşiğin altında sınırlamak için geliştirilmiş antioksidan savunma mekanizmalarını kullanmaktadır. Bu mekanizmaların en önemlisi, Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat dehidrogenaz kinon 1 (NQO1) gibi antioksidan enzimlerin ifadesini kontrol eden bir ana transkripsiyon faktörü ve redoks dengesinin temel düzenleyicisi olan nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'nin (nuclear factor-erythroid 2 related factor 2, NRF2) yukarı düzenlenmesidir . Kanser hücrelerinin oksidatif stresi sınırlamak için kullandığı bir diğer mekanizma, oksijenin varlığından bağımsız olarak hücresel metabolizmanın oksidatif fosforilasyondan uzaklaşıp aerobik glikolize doğru yeniden programlanmasıdır (147).

Reaktif oksijen türleri, makrofajlar ve nötrofiller tarafından kanser hücrelerini yok etmek, T ve NK hücrelerini aktive etmek için kullanıldığından tümörlere karşı bağışıklık tepkisini etkilemektedir (148). Tüm bu bilgiler ışığında genel olarak, oksidatif stresin etkileri ROS seviyelerine bağlı gibi görünmektedir. Dahası kanser hastalarında antioksidan alımının artırılmasının veya azaltılmasının kanser tedavisi için yararlı mı yoksa zararlı mı olduğu hala güncel bir tartışma konusudur. Antioksidanların tümör mikroçevresinde kanser hücrelerinin adaptasyonunu ve hayatta kalmasını destekleyebileceği de düşünülmektedir (140).

Antioksidan kapasiteleri değerlendirebilmek için çeşitli *in vitro* antioksidan model sistemleri geliştirilmiştir. Reaksiyon mekanizmalarına göre antioksidan kapasite tayinleri, hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar ve tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Hidrojen transferine dayanan başlıca tayin yöntemleri oksijen radikal absorbsiyon kapasitesi yöntemi (ORAC, Oxygen Radical Absorption Capacity), toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter, TRAP) ve karotenoid ağartma yöntemidir. Tek elektron transferine dayanan başlıca tayin yöntemleri Folin-Ciocalteu reaktifi yöntemi, Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC), demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi ve Bakır(II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite (Cupric Reducing Antioxidant Capacity, CUPRAC)'dir (149). DPPH yöntemi, koyu mor renkte, kararlı ve organik bir radikal olan DPPH'nin renginin antioksidanlarca giderilebilmesi özelliğinden yararlanılan, Blois (150) tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Antioksidan madde, DPPH'ye bir hidrojen atomu vermekte ve mor renk, renksiz α,α-difenil-β-pikrilhidrazil molekülüne dönüşmektedir. DPPH radikali 517 nm'de karakteristik bir emilim gösterir ve antioksidan tarafından DPPH serbest radikaline proton transferi reaksiyonu 517nm'de absorbansın azalmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak antioksidan miktarı arttıkça DPPH konsantrasyonu azalacaktır. DPPH yöntemi basit ve hızlıdır. Doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar vermekte çok sayıda örnek analizi mikroplaka kullanılarak aynı anda yapılabilmektedir (149).

Gıdaların fenolik madde içerikleri, sahip oldukları antioksidan aktivite ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle birbirini desteklediklerinden çalışmalarda toplam fenol analizlerine sıkça yer verilmektedir. Günümüzde sıklıkla, toplam fenolik madde miktarı tayininde; Singleton ve diğ. (152) tarafından antioksidanların toplam fenol miktarlarını ölçmek için geliştirdikleri bir yöntem kullanılmaktadır. Bu analizin temeli, mevcut fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu ayıracını indirgemesine ve kendilerinin oksitlenmiş forma dönüşmesine dayanmaktadır. Yöntemin temeli kısaca fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyum'a elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon sonunda mavi renkli bir kompleks oluşmakta ve 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Genellikle gallik asit ile standart eğri çizilmekte ve sonuçlar bu eğri yardımıyla yorumlanmaktadır. Folin-Ciocalteu yöntemi, gıdaların ve bitkisel ekstraktların antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntemdir (149).

2.15. BOR VE KANSER

Bor, ülkemizin beyaz altını olarak bilinmekte olan, doğada elementel halde bulunmayıp bileşik halinde bulunan, "B" simgesiyle gösterilen ve atom numarası 5 olan bir elementtir (8). "Elektronu eksik olan element" olarak bilinen bor, oktetini tamamlamak için çok sayıda farklı bileşikler oluşturmaktadır. Oksijene olan yüksek affinitesi nedeniyle borat olarak bilinen çok çeşitli bor-oksijen bileşikleri doğada bulunmaktadır. Bunlar arasında yapısal olarak en basit olanlar ise bor oksit (B_2O_3) ve borik asit (H_3BO_3)'tir. SPP, disodyum pentaborat dekahidrat ve sodyum perborat tetrahidrat da borat ailesindendir (10).

Ülkemiz, dünya bor rezervlerinin yaklaşık %73'üne sahiptir. Türkiye'de bor yatakları Bigadiç-Susurluk/Balıkesir, Emet/Kütahya, Kestelek/Bursa ve Kırka/Eskişehir'de bulunmakta ve bu yataklardan çıkarılan madenler, Balıkesir ve Eskişehir'deki fabrikalarda işlenmektedir (153). Çeşitili bor bileşikleri, antimikrobiyal ve ağartıcı olarak temizleme ve beyazlatma sanayide; çizilmeye karşı dayanıklaştırıcı ve paslanmayı önleyici olarak seramik sanayide; sertlik ve dayanıklılık arttırıcı ve ısı izolasyonu sağlayıcı olarak cam sanayide; atom reaktörlerinde nötron absorblayıcı olarak nükleer sanayide ve yakıt pili üretiminde ve hidrojen depolayıcı olarak enerji sektöründe kullanılmaktadır (154).

1857 yılında bitkilerin bor ihtiva ettiği tespit edilmiş olup ve 1870'li yılları takiben borik asit ve boraks, gıdaları korumak amacı ile kullanılmaya başlanmıştır. 20. yüzyılın başlarında yapılan bazı kısıtlı araştırmalarda borun insan sağlığına negatif etkileri olabileceği sonucuna varılmış ve bu nedenle borun gıda korumasında kullanılması yasaklanmıştır. Bu durum, borun uzun yıllar boyunca canlılar üzerinde olumlu etkilerinin olabileceği düşüncesini göz ardı edilmesine sebep olmuştur (9,155).

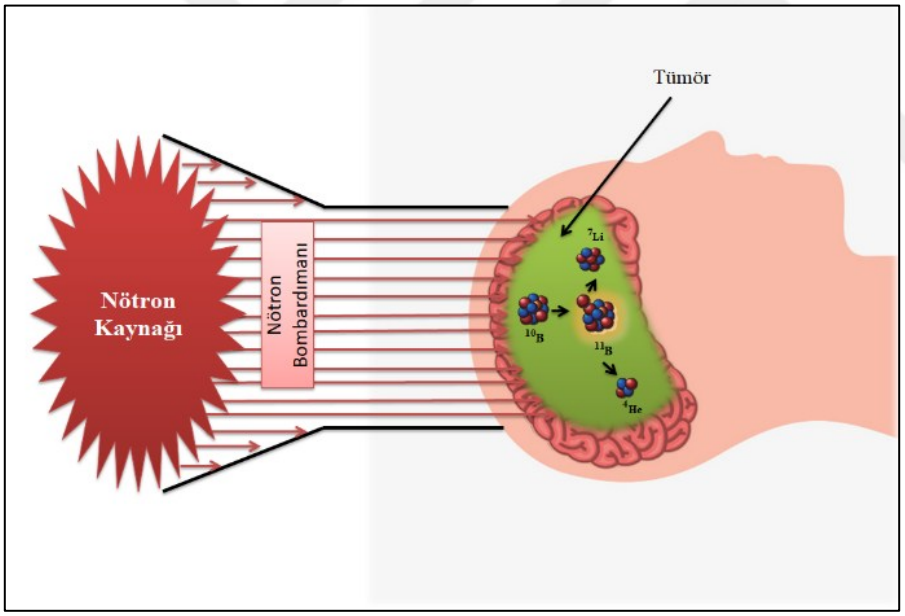
Son yıllarda borun ve bor bileşiklerinin biyolojik önemleri anlaşılmış; borun insanlarda yara iyileşmesini hızlandırdığı (156), kemik gelişimine katkıda bulunduğu (157), enerji metabolizmasını ve vücut ağırlığını düzenlediği (158,159), besin ögelerinin sindirimini düzenlediği (160), antioksidan etki gösterdiği (161), antikanserojen etkisi olduğu (11,162) ile ilgili çeşitli çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Tüm bu olumlu etkilere rağmen bor, henüz insanlar için esansiyel bir element olarak kabul edilmemiştir. Ancak olası esansiyel element sınıfına eklenmiştir (163).

Bor temel olarak besinler ve içme suyu ile vücuda alınmaktadır. Ülkemizde bu yolla günlük bor alımını yaklaşık 1,85 mg/gün olarak hesaplanmıştır (164,165). Literatürde bor açısından zengin gıdalar kuruyemişler, meyveler, baklagiller ve sebzeler ve bor açısından fakir gıdalar ise tahıllar ve hayvansal kökenli gıdalar olarak bilinmektedir (166). Kozmetik ve temizlik ürünlerinin kullanımıyla da bor maruziyeti söz konusudur. Bor madenlerinin çıkarıldığı ve işlendiği yerlerde çalışan kişiler bor bileşiklerine maruz kalmaktadır (167).

Yapılan çalışmalarda diyetle veya gıda takviyesi olarak alınan bor'un 96 saat içerisinde %90'ından fazlasının idrar ile vücuttan atıldığı ve idrar bor miktarının, diyetle alınan bor miktarının büyük bir kısmını yansıtabileceği bildirilmektedir. Serum bor konsantrasyonun başlıca renal atılım ile kontrol altında tutulduğu da bilinmektedir. Gıdalar ve içme suyu ile bor alımının doğal bir sonucu olarak insan doku ve vücut sıvılarında bor bulunmaktadır (153).

Bor için tolere edilebilir üst seviye ABD İlaç, Besin ve Beslenme Komitesi (168) tarafından yetişkinler için 20 mg B/gün; Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 28 mg B/gün (70 kg ağırlığındaki bir yetişkin için) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safery Authority, EFSA) ise bunu 10 mg B/gün olarak bildirilmiştir (155,169).

Bor bileşikleri beyin tümörlerinin iyileştirilmesinde uygulanan Bor Nötron Yakalama Tedavisi (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT)'nde kullanılmaktadır (Şekil 2.16) (153). BNCT, iki bileşenli radyasyon tedavi yöntemidir. İlk bileşeni, tümör hücrelerinde toplanan kararlı bor iztotopu olan 10B, ikincisi bileşeni ise düşük enerjili bir nötron kaynağıdır (170). Radyoaktif olmayan bor bileşiği hastaya intravenöz olarak verilmekte ve hedef tümör hücreleri tarafından seçici olarak hücre içerisine alınması sağlanmaktadır. Nötron kaynağından gelen nötronlar tümör hücrelerindeki 10B tarafından yakalanır ve 10B, radyoaktif 11B izotopuna dönüşmekte, 7Li ve 4He gibi yüksek enerji yüklü iki parçacık ortaya çıkmaktadır. Bu parçacıklar tümör hücresinden çok uzağa gidemeyip ve tüm enerjilerini tümör hücresine bırakmaktadır. Böylece çevredeki normal sağlıklı hücreler herhangi bir zarar görmezken tümör hücrelerinin DNA'sı ise zarar görmektedir (153).

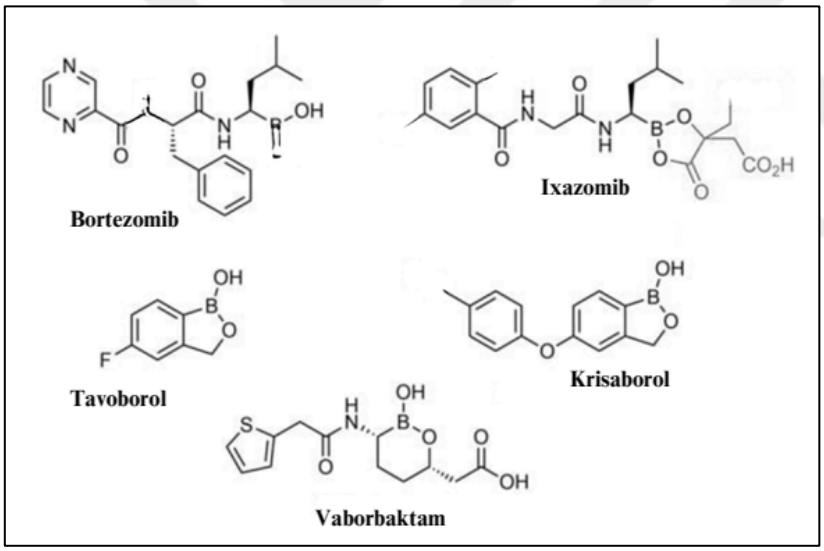


Şekil 2.16: Bor nötron yakalama tedavisi (153)

Borun boş p-orbitaline sahip olması ve güçlü bir Lewis asidi olması, borun enzim kalıntılarında, nükleik asit ve karbohidratlarda bulunan hidroksil ve amin grupları gibi biyolojik nükleofillerle datif bir bağ oluşturmasını sağlamaktadır. Bu sayede bor günümüzde bir çok farmasötik ürünün içeriğinde yer almaktadır (10).

Bir B atomu aktif bir moleküle yerleştirildiğinde hem kovalent hem de hidrojen bağlarını içeren hedef proteinle etkileşim meydana gelmekte ve bu etkileşimler güçlü bir biyolojik aktiviteyle de sonuçlanmaktadır. Yara ve yanık kremlerinde, özellikle romataid artrit, osteoporoz ve prostat sağlığı ile ilgili gıda takviyelerinde (bor sitrat, kalsiyum fruktoborat, bor aspartat, bor glisinat halinde), çeşitli göz damlalarında, lens solüsyonlarında, topikal antifungal solüsyonlarda, antibiyotiklerde ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır (171).

Multiple miyelom tedavisinde kullanılan Bortozemib® ve Ixazomib, atopik dermatit gibi inflamatuar cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılan Krisaborol, antifungal Tavaborole® ve antibakteriyel Vaborbaktam; FDA tarafından onaylı bor ihtiva eden ilaçlardır (Şekil 2.17) (172).

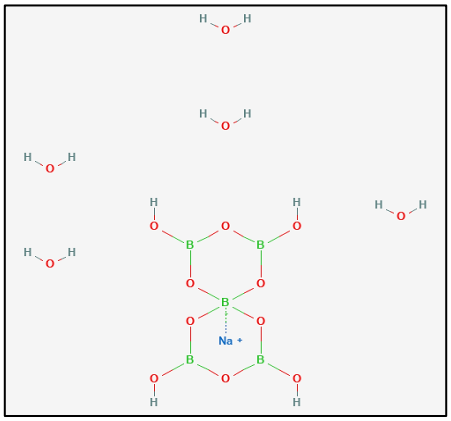


Şekil 2.17: FDA onaylı bor içeren ilaçlar (172)

Epidemiyolojik çalışmalarda insanlarda diyet ile bor alımı arttığında akciğer kanseri ve prostat kanseri azaldığı rapor edilmiştir. Akciğer kanseri olan 763 kadın hasta ve 853 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu ile yapılan bir çalışmada diyet ile bor alımı arttıkça akciğer kanseri görülme sıklığının azaldığı gösterilmiştir (173). Başka bir çalışmada ise 95 prostat kanseri olgusu ile 8720 sağlıklı birey karşılaştırılmış ve düşük bor alımının prostat kanseri riskini arttırdığı rapor edilmiştir (174). Prostat adenokarsinom oluşturulmuş farelerde, 8 hafta boyunca 1,7 mg/kg/gün bor içerecek

şekilde borik asitin içme sularına ilavesi sonucu serum prostat spesifik antijen düzeyinin %88,6 ve tümör büyüklüğünün ise %38 oranında azaldığı görülmüştür (175). Türkiye'de yapılan bir çalışmada, insan prostat kanser DU145 hücre hattında DPDe uygulanmasının proliferasyonunu baskıladığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (176). Başka bir çalışmada ise yine DU145 hücrelerine DPDe uygulamasının ardından Mitojen Aktiviteli Protein Kinaz Kinaz 3 (MAP2K3), Mitogen Aktiviteli Protein Kinaz Kinaz Kinaz 7 (MAP3K7) ve MAPK8 genlerinin mRNA seviyelerini artırdığı, bu hücrelerde apoptozu indüklediği belirlenmiş ve bu nedenle DPDe'nin prostat kanserinin tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (177).

Çeşitli bor bileşikleri ile yapılan *in vitro çalışmalarda* hepatoselüler karsinom, meme kanseri, kolon kanseri, akciğer kanseri ve glioblastoma gibi farklı kanser türlerinde SPP, borik asit, kalsiyum fruktoborat ve bor glisin esterleri gibi çeşitli bor bileşikleri yapılan *in vitro* çalışmalarda hepatoselüler karsinom, meme kanseri, kolon kanseri, akciğer kanseri ve glioblastoma gibi farklı kanser türlerinde sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdiği, apoptozu indükleyebildiği, çeşitli genlerin ekspresyonlarını değiştirebildiği, bazı kemoterapötik ilaçlarla sinerjistik etkiler oluşturabildiği gösterilmiştir (11,12,178-188). SPP ($NaB_5O_8 \cdot 5H_2O$), doğal olarak oluşan, borun pentahidrat sodyum tuzudur (Şekil 2.18) (189) ve potansiyel etkileri sayesinde sağlık alanında oldukça dikkat çekmektedir. Çeşitli çalışmalarda bu bileşiğin antioksidan, anti-inflamatuar (190), antimikrobiyal (191), yara iyileştirici (156), antiobezite (192) sahip olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.18: Sodyum pentaborat pentahidrat (189)

2.16. MİKROBİYOTA VE KOLOREKTAL KANSER

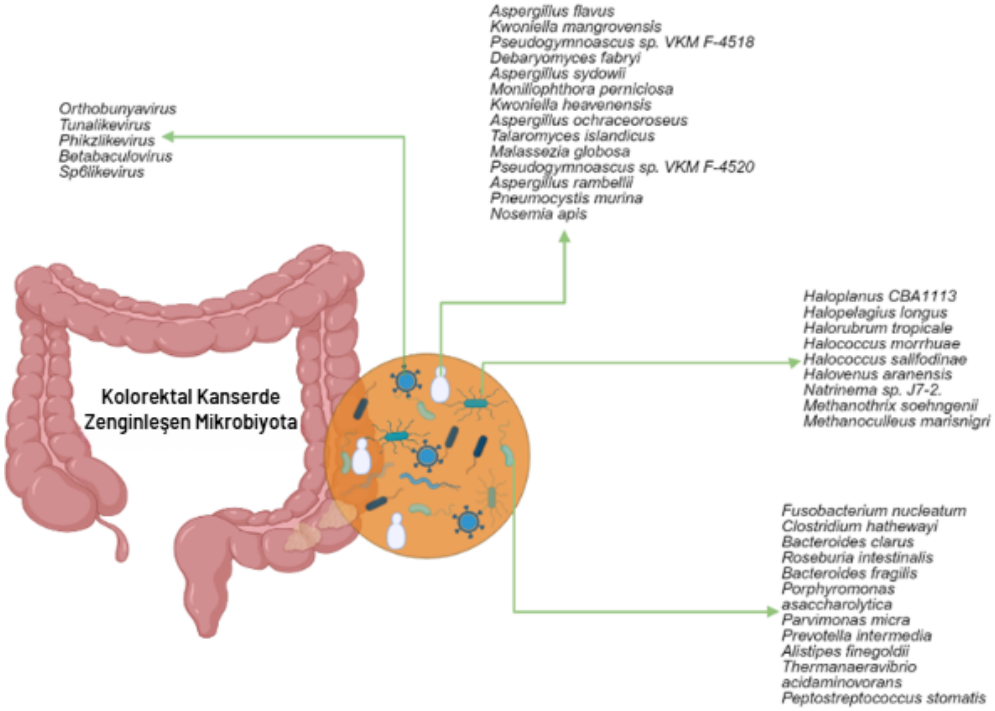
Mikrobiyota, cilt, akciğer, ağız mukozası ve ürogenital ve gastrointestinal yollar gibi insan dokularında bulunan bakteri, mantar, virüs ve arkea gibi mikroorganizma topluluğunu ifade etmektedir (193). Mikrobiyotanın insan vücudunda metabolizmada, sindirim sistemi ve bağışıklık sisteminde ve çeşitli süreçlerde giderek daha önemli bir rol oynadığı gösterilmektedir ve insan vücudunda bir "organ" olarak anılmaktadır (194). Bu mikropların yaklaşık %95'inin bağırsakta, özellikle de kalın bağırsakta olduğu tahmin edilmektedir. İnce bağırsak; yüksek safra konsantrasyonları ve kısa geçiş süresi göz önüne alındığında, mikrobiyal kolonizasyon için daha zorlu bir ortam sağlamaktadır. Buna karşın, nötr ila hafif asidik bir pH'a sahip ve yavaş akış hızı ile karakterize edilen kolon ise en büyük mikrobiyal topluluğa ev sahipliği yapmaktadır (195).

Mikrobiyota, gastrointestinal sindirim sisteminden kaçan besin ögelerini sindirmek için çok sayıda enzim sentezlemektedir. Bağırsak mikrobiyomu, ≥ 115 glikozit hidrolaz ailesi ve ≥21 polisakkarit liyaz ailesi dahil olmak üzere karbohidrat metabolizmasıyla ilgili genler açısından oldukça zengindir (196). Ayrıca bağırsak mikrobiyotası sistein, aspartik, serin ve metalo-proteazlar da üretebilmektedir (197). Mikrobiyota, konak tarafından hem endojen hem de ekzojen olarak alınan maddeleri biyokimyasal olarak değiştirebilir ve de novo metabolitler üretebilir (198). Kısa zincirli yağ asitleri (Short Chain Fatty Acids, SCFA'lar), esas olarak ince bağırsakta sindirimden ve emilimden kaçan karbohidratların sakkarolitik fermantasyonu ile üretilmektedir. SCFA'lar, mikrobiyom aracılığıyla diyetten konakçıya birincil karbon kaynağını temsil eder. Başlıca SCFA'lar arasında format, asetat, propiyonat ve bütirat bulunmaktadır. Mikrobiyota, patobiyontların çoğalmasını önlemekte, kolonda hücrelerin çoğalmasını ve vaskülarizasyonunu düzenlemektedir. Safra tuzlarını ve ksenobiyotikleri metabolize etmekte, mukus üretimini düzenlemekte, vitamin ve nörotransmitterleri sentezlemekte ve polifenollerin biyotransformasyonunu sağlamaktadır (199,200).

İnsan mikrobiyotası, birbirleri ile ve konakçı arasında oldukça karmaşık bir etkileşim ağı oluşturan bakteriler, arkeabiota, virobiyota ve mikobiyotadan oluşmaktadır. Eubiosis'te baskın bağırsak mikrobiyal filumları *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* ve *Verrucomicrobia*'dır. *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumları bağırsak mikrobiyotasının %90'ını temsil etmektedir. *Firmicutes* filumu, *Lactobacillus* , *Bacillus* , *Clostridium* , *Enterococcus* ve *Ruminicoccus* gibi

200'den fazla türden oluşur. *Clostridium* cinsi, Firmicutes filumunun %95'ini temsil eder. Bacteroidetes, *Bacteroides* ve *Prevotella gibi baskın cinslerden oluşur. Actinobacteria filumu orantısal olarak daha az yaygındır ve esas olarak Bifidobacterium* cinsi tarafından temsil edilir (201). Literatürde araştırmaların çoğu bağırsak bakterilerine odaklanmış, arkeabiyota, mikobiyota ve virobiyota'yı ihmal etmiştir. İnsan virobiyotası, temel olarak bakteriyofajlar, hayvan hücre virüsleri, endojen retrovirüslerden oluşur. Sağlıklı bir insan bağırsağı viromunda dsDNA Caudovirales ve ssDNA Microviridae baskındır. İnsan gastrointestinal sistem örneklerinde 1167 adet arkeal genom belirlenmiştir (202). Bağırsaktaki baskın arkealar, karbondioksiti anaerobik olarak metan gazına indirgeyen metanojenlerdir. En baskın metanojen ise yaklaşık %95,7'lik bir yaygınlığa sahip *Methanobrevibacter smithii'dir (*203). İnsan bağırsağında yaygın olarak bulunan mantar toplulukları; *Saccharomyces*, *Malassezia* ve *Candida*'dır (204).

Mikrobiyota ve KRK arasındaki etkileşim son zamanlarda araştırmaların odak noktası olmuştur. KRK, belirli mikrobiyota üyelerinin ve metabolik işlevlerinin tükenmesini ve/veya zenginleşmesini içeren disbiyoz olarak bilinen bir süreçle ilişkilidir (Şekil 2.19) (205).



Şekil 2.19: Kolorektal kanserde zenginleşmiş mikrobiyota (205)

Mikrobiyotanın kanser patogenezindeki rolünün daha iyi anlaşılmasıyla, mikrobiyota temelli terapötiklerin potansiyeli kanser tedavisinde giderek daha fazla araştırılan bir konu haline gelmiştir. Bağırsak mikrobiyotası, disbiyoz ve KRK arasındaki bağlantı, araştırmacıları KRK'nin önlenmesinde ve tedavisinde pro-, pre, postbiyotiklerin etkilerini keşfetmeye yöneltmiştir (206). KRK etiyolojisinde mikrobiyotadaki spesifik bir patojenden ziyade bütünsel disbiyozun rol oynadığı düşünülmektedir (207). Disbiyoz ile KRK arasındaki etkileşim sırasında altta yatan mekanizmalar arasında inflamasyonun teşviki, patolojik bakteriyel yapışma ve tümör oluşumunun indüklenmesi yer almaktadır (208). KRK'daki değişen mikrobiyotanın gelecekte tanıda kullanılabileceği ve KRK'nın önlenmesine/tedavisine katkıda bulunacağı belirtilmektedir (209).

Kolorektal kanser üzerinde mikrobiyotanın iki yönlü bir etkisi vardır. Bağırsak mikrobiyotası çeşitli mekanizmalar aracılığıyla KRK'yı desteklemekte veya ona karşı koruma sağlamaktadır. Kanseri teşvik eden mikrobiyota, doğrudan epitel hücrelerine yapışarak onkojenik sinyal aktivasyonuna neden olabilmektedir. Ayrıca sekonder safra asitleri, poliaminler ve hidrojen sülfür gibi zararlı metabolitler ve toksinler üretip, tümör ilişkili bağışıklık hücrelerini indükleyerek doku hasarını, inflamasyonu, hücre canlılığı ve proliferasyonunu ve ilaç direncini düzenleyebilmektedir. Tümör mikro çevresiyle etkileşime girerek tümör büyümesini ve ilerlemesini indükleyebilmektedir (209,210). Bunun tam tersi bir şekilde, bağırsak mikrobiyotası, epitel hücrelerinde doğrudan anti-tümöral sinyal aktivasyonlarını tetikleyebilir, yararlı metabolitler (SCFA'lar gibi) üretebilir ve tümör önleyici bağışıklık hücrelerini uyarabilmektedir. Mikrobiyota, gastrointestinal sistemi ve diyet faktörlerini onkometabolitlere ve tümör baskılayıcı metabolitlere metabolize edebilmektedir (211).

Kolorektal kanser, mikrobiyota ve disbiyoz arasındaki yukarıda bahsedilen bu kritik ilişki, araştırmacıları KRK'nın önlenmesi ve tedavisinde pro-, pre- ve postbiyotiklerin etkilerini araştırmaya yönlendirmiştir. Probiyotikler, yeterli miktarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (212). Prebiyotiğin güncel tanımı ise "Konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan ve sağlık yararı sağlayan bir substrat"tır (213). Bağışıklık sistemi zayıflamış, hassas kişilerde probiyotiklerin güvenlik profili, antibiyotik direnci ve virülans gen transferi geliştirme riski, üretim ve depolama sırasında canlılığı ve stabiliteyi korumayla ilgili sorunların varlığı ve sağlık yararlarının doğrudan canlı

hücrelerle ilişkili olmadığının gösterilmesi, araştırmacıları özellikle ısıyla öldürülmüş mikroorganizmalar, hücre özütleri, bileşenler ve metabolitler olmak üzere cansız hücreleri incelemeye yöneltmiştir. Bunlara literatürde 2021 yılından önce "hücresiz üst faz", "metabiyotik", "paraprobiyotik", "biyojenik", "hayalet probiyotikler", "abiyotik", "psödoprobiyotik" ve "postbiyotik" adı verilmekteydi (214,217). Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP), 2019 yılında postbiyotiklerin tanımını ve kapsamını gözden geçirmek ve açıklığa kavuşturmak için bir uzman paneli toplamış ve bu panelin sonucunda, 2021 yılında bir bildiri yayınlamıştır. Komite, postbiyotiği "konakçıya sağlık yararı sağlayan cansız mikroorganizmaların ve/veya bileşenlerinin bir preparatı" olarak tanımladı. Postbiyotikler, gözlenen sağlık yararlarına katkıda bulunan metabolitlerle veya metabolitler olmadan cansız mikrobiyal hücreler ve/veya hücre bileşenleri içermektedir (215,217).

2.17. BÜTİRAT VE KOLOREKTAL KANSER

Bütirat, toplam SCFA'ların yaklaşık %20'sini oluşturan 4 karbonlu bir yağ asitidir. Bağırsak mukozası için bir enerji kaynağı görevi görmekte ve hücre proliferasyonunu ve differasyonunu düzenlemektedir (218).

Bütirat, insan vücudunda bakteriyel fermantasyon yoluyla üretilen en önemli metabolitlerden biri olarak bilinmektedir. Bütiratın biyosentezi iki metabolik yolla yapılmaktadır. Birincisi, bütiril-CoA'nın bütiril-fosfata fosforilasyonunu ve ardından bütirat kinaz enzimiyle bütirata dönüşümünü içermektedir. İkinci metabolik yol ise, bütiril-CoA'nın asetata ve ardından bütirik aside dönüşümünden oluşmaktadır (219). Çoğunluğu *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteraia* ve *Proteobacteria* gruplarına ait olmak üzere, potansiyel olarak bütirik asit üreten 225 bakteri tanımlanmıştır (17).

Bütirat, mitokondride CO_2'ye oksitlenerek ATP üretilmektedir. Üretilen enerji, Na+/K+ ATPaz'ı aktive ederek sodyum elektrokimyasal gradyanını korumak için gereklidir ve dolayısıyla su ve elektrolit emilimi için önemlidir. Bu süreç, hücresel enerji dengesinin sağlanmasında kritik bir rol oynamaktadır (220).

En az üretilen SCFA olmasına rağmen, bütirat kolonositler için %70 gibi bir oranla ana enerji kaynağını oluşturmaktadır (221). Kolon epitel hücrelerinin

proliferasyonu için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Bütirat konsantrasyonu, bağırsak lümeninden sistemik dolaşıma doğru biyolojik bir gradyanla değişmektedir, çekum ve proksimal kolonda maksimum 100 mM düzeyine ulaşmaktadır (17).

Bütirat, vücut enerji harcamasını kontrol etmek ve metabolik homeostazı korumak için G-protein reseptörü (GPR)-41 aracılı sempatik sinir sistemi aktivitesini doğrudan düzenler. Bütirat GPR109A'yı da aktive etmektedir. GPR109A sinyalizasyonu, kolon makrofajlarında ve dendritik hücrelerde inflamazom yolunu aktive ederek düzenleyici T hücrelerinin ve IL-10 üreten T hücrelerinin farklılaşmasına neden olur. Dolayısıyla bütirat bir immünmodülatördür. Pro- ve anti-inflamatuar mediyatörlerin ekspresyonunu düzenleyerek bağışıklık sistemini etkilemektedir (219).

Sağlıklı kolon hücreleri bütiratı ana enerji kaynağı olarak kullanmakta ve oksidatif metabolizma ile bütiratı metabolize etmektedir. Ancak, kanserli kolon hücreleri Warburg etkisi nedeniyle bütiratı yeterince metabolize edememektedir. Bu durum, bütiratın çekirdekte birikmesine ve HDAC inhibitörü olarak işlev görmesini sağlamaktadır. HDAC inhibisyonu, histon proteinlerinin asetilasyonunu artırarak gen ekspresyonunu düzenlemekte ve kanser hücrelerinde antiproliferatif etki göstermektedir (195, 213).

2.18. KEFİR VE KOLOREKTAL KANSER

Geleneksel fermente süt ürünü olan kefirin çıkış yerinin Kafkas dağları, Tibet ve Moğolistan olduğu bilinmektedir. Kefir kelimesinin Türkçe "hoş" anlamına gelen "keyif" kelimesinden türediği varsayılmaktadır (222).

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre ise kefir, fermentasyonda, kefir danesine özgü karakteristik mikroorganizmalar olan *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*'dan en az ikisini, laktozu fermente eden mayalardan *Kluyveromyces marxianus* ve etmeyen mayalardan *Saccharomyces spp.*'yi zorunlu olarak içeren bunun yanında *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter* ve benzeri bakteri cinslerine ait türler ile farklı maya türlerini de bulundurabilen kefir danelerinin veya starter kültürlerin kullanıldığı fermente süt ürününü tanımlanmaktadır (13).

Kefir; rahatlatıcı, asidik, homojen bir tekstüre sahip, yoğun kıvamlı ve hafif maya aromasına sahiptir. Ülkemizde genellikle inek, keçi, koyun sütlerinden üretilmekle birlikte; deve sütünden de elde edilebilmektedir (223).

Kefir danesi, minyatür karnabahara veya patlamış mısıra benzeyen küçük, yaklaşık 3-20 mm çapında, düzensiz şekilli, bakteri ve mayaların içine yerleştiği, kefiran adı verilen dallı glukogalaktan yapıda bir polisakkarit matriksten oluşmaktadır (224).

Kefiran oluşumu, genellikle danelerdeki *Lactobacillus kefiranofaciens* ve *Lactobacillus kefiri* ile ilişkilidir. Kefir tanelerinde, çevresel kısım neredeyse sadece bakterilerden, baskın olarak *Bacillus*'tan oluşurken, tanenin iç kısmı mayaları içermekte, iç ve dış kısımların arası ise karışık bir içeriğe sahiptir, burada uzun polisakkarit filamentlerine sahip bakteriler, mayalar ve mantarlar bulunmaktadır (225).

Danelerde bulunan farklı türlerdeki bakteri ve mayaların simbiyotik aktiviteleri sayesinde kefirin özel yapısı, lezzeti ve aroması oluşmaktadır. Kefir danesi yapısında bulunan laktik asit bakterilerinin ve mayaların sütü homofermentatif ve heterofermantatif yollarla fermente etmeleri sonucu oluşan başlıca ürünler laktik asit, etanol ve CO_2'dir (226). Diğer bileşenler ise pirüvik, hippurik, propiyonik ve bütirik asit gibi organik asitler, biyoaktif peptidler, ekzopolisakkaritler, antibiyotikler, bakteriyosinler, aminoasitler, izopentil asetat, etil hekzanoat, etil oktanoat, fenetil asetat ve etil dekanoat gibi uçucu esterlerdir (227).

Kefir geleneksel ve endüstriyel yöntem olmak üzere iki şekilde üretilmektedir. Geleneksel yöntemde başlangıç kültürü olarak kefir daneleri kullanılmaktadır. Kefir daneleri pastörize süte eklenmekte, kapalı bir kapta tutulmakta yaygın olarak 20-25°C've 18-24 saatlik fermantasyon tercih edilmektedir. Fermantasyondan sonra, daneler bir süzgeç yardımıyla fermente olan sütten ayrılmaktadır. Daneler ayrıldıktan hemen sonra kefir tüketilebilir ya da daha sonra tüketilmesi için buzdolabında saklanabilmektedir. Kefirin pH değeri 4,2-4,6 arasında değişmektedir. İhtiva ettiği mikroorganizmaların çeşitliliği, sütün kalitesi, kefirin üretimin endüstriyel veya geleneksel oluşu, kuru madde içeriği, sütün fermantasyon sıcaklığı ve süresi ile üretimden tüketime kadar geçen süre kefirin bileşimini etkilemektedir (228).

Kefirin kimyasal bileşimi açısından incelediğimizde baskın bileşen nemdir, bunu karbohidrat, yağ, protein ve kül takip etmektedir. Fermantasyon sırasında, proteinler asit koagülasyonunun ve proteolizin etkisiyle kolayca sindirilebilir hale gelmektedir. Süt laktozunun yaklaşık %30'u β-galaktozidaz enzimi tarafından hidrolize edilmekte, laktoz glikoz ve galaktoza dönüştürür. Ayrıca laktoz fermantasyon süreci sırasında laktik aside de dönüşmekte, bu durum pH düşüşüne ve kıvamın artmasına neden olmaktadır.

Kefirdeki lipid içeriği (mono-, di-, triaçilgliseroller, non-ester yağ asitleri, steroidler) fermantasyonda kullanılan süt türüne bağlı olarak değişebilmektedir. Kefirde B1, B2, B5, B7, B9, B12 C, A ve K vitaminleri ve karoten bulunmaktadır. Mg, Ca, P, Zn, Cu, Mn, Fe, Co ve Mo gibi mineraller de kefirde bulunmaktadır (225). Türkiye Ulusal Gıda Kompozisyonu Veri Tabanı'nda iki farklı kefirin besin ögesi içeriği paylaşılmıştır (Tablo 2.4) (229).

Tablo 2.4: Kefirin enerji ve besin ögesi içeriği (229)

Bileşenler	**Kefir (Kars)**	**Kefir (Ankara)**	**Bileşenler**	**Kefir (Kars)**	**Kefir (Ankara)**
Enerji (kcal)	52	58	Magnezyum, Mg (mg)	9	10
Enerji (kJ)	217	245	Potasyum, K (mg)	181	162
Su (g)	88,36	89,13	Sodyum, Na (mg)	34	38
Kül (g)	0,68	0,82	Çinko, Zn (mg)	0,34	0,35
Protein (g)	3	3,29	Selenyum, Se (µg)	2	2
Azot (g)	0,47	0,52	Tiamin (B1) (mg)	0,05	0,06
Yağ, toplam (g)	1,62	3,65	Riboflavin (B2) (mg)	0,16	0,16
Karbonhidrat (g)	6,34	3,11	Niasin (B3) eşdeğerleri (NE)	0,66	0,89
Sakkaroz (g)	0	0	Niasin (B3) (mg)	0,10	0,09
Glukoz (g)	0	0	B6 Vitamini, toplam (mg)	0,01	0,01
Fruktoz (g)	0	0	B12 Vitamini (µg)	0,16	0,16
Laktoz (g)	0,43	1,99	A Vitamini (RE)	0	24
Maltoz (g)	0	0	Retinol (µg)	0	24
Tuz (mg)	85	96	E Vitamini (α-TE)	0,13	0,20
Demir, Fe (mg)	0,03	0,42	E Vitamini (IU)	0,19	0,30
Fosfor, P (mg)	86	69	Alfa-tokoferol (mg)	0,13	0,20

Kefirin, antibakteriyel (14,230), anti-hiperlipidemik, anti-hipertansif etki (231), anti-hiperglisemik (232), anti-inflamatuar etki, antioksidan (233), antiobezite (234), nöroprotektif (235), antikarsinojenik (236), immünmodülatör ve mikrobiyota düzenleyici aktiviteleri gösterilmiştir (225,237).

Bir çalışmada kefir daneleriyle üretilen kefir ve starter kültürle üretilen kefir *in vitro* sindirime tabi tutulmuş, kefir daneleriyle üretilen kefirin sindirim sonrası mikroorganizma canlılığında daha düşük bir azalma olduğunu ortaya koyulmuş ve bu nedenle kefir daneleriyle üretilen kefir olası sağlık yararları nedeniyle daha fazla tercih edilmesi gerektiği öne sürülmüştür (238). Ülkemizde yapılan bir çalışmada geleneksel

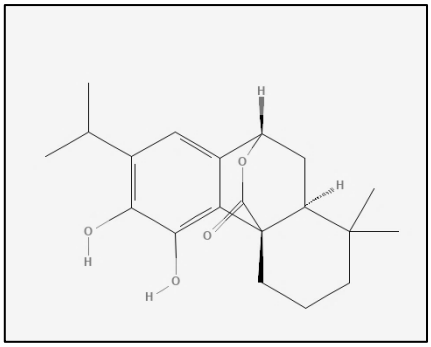
olarak üretilen kefirin *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrası biyoaktivitesinin arttığı, total fenolik madde içeriğinin, Anjiyotensin dönüştürücü enzim (Angiotensin converting enzyme, ACE) inhibitör aktivitesinin, DPPH antioksidan aktivitesinin, DPP-IV (Dipeptidil peptidaz-IV) inhibitör aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Sindirim öncesinde kefirde antimikrobiyal herhangi bir etki görülmezken, sindirim sonrasında intestinal fazdan çıkan örneklerde *Escherichia Coli*'ye karşı antimikrobiyal etki görülmüştür. Yazarlar bir fermente ürünün biyolojik açıdan yararlılığını tayin etmek için sindirim prosesinin gerekli bir metot olduğunu rapor etmişlerdir (14).

Literatürde kefirin 5-FU ile olan ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışma yoktur. Dahası sindirilmiş kefirin kolon kanseri üzerinde olan etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

2.19. KARNOSOL VE KOLOREKTAL KANSER

Son yıllarda biyoaktif fitokimyasallar, çeşitli hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için kullanılmaktadır. Birçok çalışma, diyet fitokimyasallarının tümör başlangıcını ve ilerlemesini önleme ve geciktirme yeteneğini kanıtlamıştır. Farmakolojik olarak aktif kısımlar arasında, terpenoidler en önemli sınıflardan biri olarak kabul edilmektedir (239). Doğal ürünlerdeki en bol bulunan bileşikler olan terpenoidler, bitkilerde çeşitli yapılara sahip önemli bir sekonder metabolit grubudur. Terpenoidler, bitki büyümesinde ve gelişiminde, çevreye tepkide ve fizyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır. Hammadde olarak terpenoidler ayrıca ilaç, gıda ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Terpenoidler, çok sayıda izopren (C5) yapısal biriminden oluşan mevalonik asitten türetilen bir doğal ürün sınıfıdır. Terpenoidler, birkaç izopren yapısal birimi içeren bir bileşik sınıfı için genel bir terimdir. İzopren birimlerinin sayısına göre, bunlar esas olarak monoterpen (C10), seskiterpen (C15), diterpen (C20), triterpen (C30), tetraterpen (C40) ve politerpen (C> 40) vb. olarak sınıflandırılmaktadır (240).

Karnosol; ülkemizde güney ve batı kıyı şeridinde yetişen, *Lamiaceae* ailesine ait olan *Rosmarinus officinalis* (biberiye), *Salvia officinalis* (adaçayı) ve *Ocimum basilicum* (fesleğen) gibi bitkilerin yapraklarında bulunan fenolik bir diterpendir. $C_{20}H_{26}O_4$ moleküler formülüne sahiptir. C-11 ve C-12 pozisyonlarında hidroksil grupları bulunmakta olup B halkası boyunca lakton içeren abietan karbon iskeletine sahiptir (239,240). Şekil 2.20'de karnosolün yapısı gösterilmiştir (241).



Şekil 2.20: Karnosolün yapısı (241)

Karnosolün; antioksidan, antikanserojen, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özellikler de dahil olmak üzere bir dizi biyoaktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (239,242,243). Literatürdeki karnosolün KRK üzerine olan etkilerini inceleyen hiçbir çalışma, sağlıklı hücre üzerinde olan etkilerini incelememiştir. Hem kanserli hem de normal dokulardaki etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, karnasolün insanlarda biyoyararlanımı ve metabolizmasını araştıran hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KEFİR ÜRETİMİ

Pastörize edilmiş 200 mL günlük tam yağlı inek sütü (Sütaş), Danem marka kefir danesinden 20 g ilave edilip 25°C'de 22 saat boyunca cam şişede ağzı kapalı şekilde inkübatörde (Nüve EN 120, Türkiye) tutuldu. Fermantasyon sonrasında süzülüp analizlere alındı. Tez deneylerinde yeterli hacmi elde edebilmek için bu işlemler tekrarlandı.

3.2. KEFİR VE SÜTÜN *İN VİTRO* GASTROİNTESTİNAL SİNDİRİMİ

Kefirin ve sütün *in vitro* gastrointestinal sindirimi uluslararası konsensusla kabul edilen Minekus ve diğ. (244)'nin yöntemi referans alınarak gerçekleştirildi. Kefir ve süt, sıvı gıda olmalarınedeniyle simülasyona oral faz dahil edilmedi. Sindirime doğrudan gastrik faz ile başlandı, intestinal faz ile işleme devam edildi. Bu sebeple simüle gastrik sıvı (Simulated Gastric Fluid, SGF) ve simüle intestinal sıvı (Simulated Intestinal Fluid, SIF) hazırlandı (Şekil 3.1). Gerekli çözeltiler, Tablo 3.1'deki belirtilen şekilde hazırlandı.

Şekil 3.1: Simüle gastrik ve intestinal sıvı

Tablo 3.1: Simüle gastrik sıvı ve intesinal sıvının hazırlanması

Stok Çözeltiler		Simüle Gastrik Sıvı	Simüle İntestinal Sıvı
Kimyasallar	**Konsantrasyon (M)**	**Eklenen Hacim (mL)**	**Eklenen Hacim (mL)**
KCl (Riedel 12636)	0,5	6,9	6,8
KH_2PO_4 (AFG Bioscience 292188)	0,5	0,9	0,8
$NaHCO_3$ (AFG Bioscience 232356)	1	12,5	42,5
NaCl (AFG Bioscience 405633)	2	11,8	9,6
$MgCl_2(H_2O)_6$ (AFG 223905)	0,15	0,4	1,1
$(NH_4)_2CO_3$ (AFG Scientific 288746)	0,5	0,5	-
		Son hacim ultra saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.	

3.2.1. Gastrik Faz Simülasyonu

Gerekli çözeltiler

- **HCl (6 N):** Balon jojeye bir miktar distile su alındı, üzerine 49,6 mL HCl (Isolab, 932.106.2501) yavaşça ilave edilip son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlandı (pH ayarlama çözeltisi olarak kullanıldı).
- **$CaCl_2(H_20)_2$ (0,3M):** 0,332 g $CaCl_2(H_20)_2$ (AFG Bioscience, 347762) tartıldı, bir miktar distile suda çözdürülüp son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.
- **Pepsin (100 mg/mL):** 160 mg pepsin (Sigma, P7000) tartılarak 1,6 ml su içerisinde çözüldü.

Deneyin yapılışı

Kefir ve sütün gastrik faz simülasyonları için öncelikle 50 mL falkon tüpüne, 10 mL kefir/süt alındı, üzerine 7,5 mL SGF ve 5 µL $CaCl_2$ eklendi. pH, 6 N HCl ile pH metre (Mettler Toledo, S220-K SevenCompact™, İsviçre) kullanılarak 3'e ayarlandı. Ardından 1,6 mL pepsin eklendi ve son hacim 20 mL'ye ultra saf su ile tamamlandı. 150 rpm'de 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Devamında intestinal faza geçildi.

3.2.2. İntestinal Faz Simülasyonu

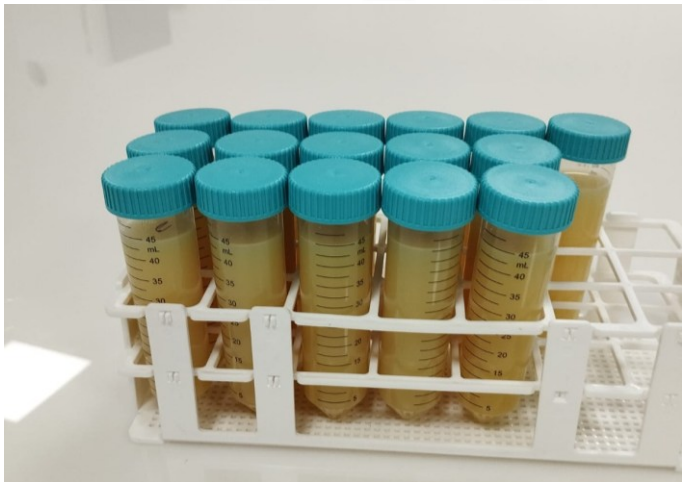
Gerekli çözeltiler

- **NaOH (1 M):** 4 g NaOH (AFG Bioscience, 250938) tartılıp, bir miktar distile su içinde çözüldü ve sonra hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı (pH ayarlama çözeltisi olarak kullanıldı).

- **$CaCl_2(H_20)_2$ (0,3M):** 0,332 g $CaCl_2(H_20)_2$ (AFG 347762) tartılıp, bir miktar distile suda çözdürülüp son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.
- **Safra tuzu (160 mM):** 0,7072 g safra tuzu (Sigma, B8631) tartılıp, bir miktar distile suda çözdürülüp son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.
- **Pankreatin:** 25 mg pankreatin (Sigma, P7545) tartılıp, bir miktar distile suda çözdürülüp son hacim distile su ile 5 mL'ye tamamlandı.
- **Pefabloc:** 11,9 mg pefabloc (Sigma, 76307) tartılıp, bir miktar distile suda çözdürülüp son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı

Gastrik fazın sonunda alınan örnek üzerine 11 mL SIF çözeltisi ve 40 µl $CaCl_2(H_20)_2$ eklendi. pH, 1 M NaOH ile 7'e ayarlandı. Üzerine 5 mL pankreatin ve 2,5 mL safra tuzu eklendi. Toplam hacim 40 ml'ye saf su ile tamamlandı. Karışım 150 rpm'de 37C°'de 2 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyon 8 µl Pefabloc ile durduruldu (Şekil 3.2).

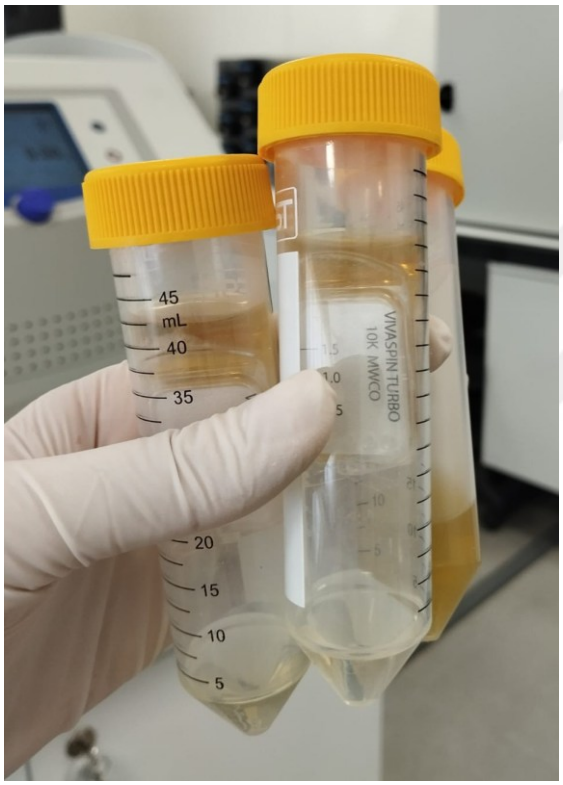


Şekil 3.2: İntestinal faz simülasyonu sonrası kefir ve süt örnekleri

3.2.3. Santrifügal Filtrasyon

İntestinal faz tamamlandıktan sonra örnekler Whatman filtre kağıdından geçirilip sırasıyla 0,45 ve 0,2 µm şırınga ucu filtreler ile mikrofiltrasyon gerçekleştirildi. Ardından

10 kDa moleküler ağırlık kesim değerine sahip ultrafiltrasyon tüpleri (Sartorious, VS15T01, Vivaspin Turbo 15) kullanılarak 30 dakika boyunca 9500 g'de santrifüj (SIGMA, 3-30KS, Almanya) edildi, retantat (filtre üstü kalan kısım) ve permeat (filtre altı geçen kısım) ayrıldı (Şekil 3.3). Bu işlem hem sindirilmiş süt ve kefir hem de sindirilmemiş kefir için gerçekleştirildi. Böylece tüm örneklerin 10 kDa altı fraksiyonları elde edildi. Tüm tez metninde, "sindirilmiş kefir", "sindirilmiş süt" ve "sindirilmemiş kefir" ifadeleri, ilgili örneklerin ultrafiltrasyon sonrası elde edilen 10 kDa'nın altındaki fraksiyonlarını tanımlamak amacıyla kullanıldı.



Şekil 3.3: Ultrafiltre edilmiş kefir ve süt örnekleri

3.3. KEFİR VE SÜT ÖRNEKLERİNDE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Deneyin prensibi: DPPH; koyu mor renkte, kararlı ve organik bir radikaldir. Antioksidan madde, DPPH'e bir hidrojen atomu vermekte mor renk, renksiz α,α-difenil-β-pikrilhidrazil molekülüne dönüşmektedir (150,151).

Gerekli çözeltiler

- **DPPH çözeltisi (0,2 mM):** 7,88 mg DPPH tartılıp bir miktar metanol ile çözüldü ve hacmi metanol ile 100 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.
- **Stok Trolox Çözeltisi (2,5 mM):** 31,286 mg trolox tartılıp, bir miktar metanol ile çözüldü ve hacmi metanol ile 50 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden Tablo 3.2'de belirtilen standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 3.2: Standart trolox çözeltilerinin hazırlanması

	Standart Çözeltiler (mM)									
	Kör	**0,05**	**0,075**	**0,1**	**0,125**	**0,15**	**0,25**	**0,5**	**0,75**	**1**
Trolox (µL)	0	20	30	40	50	60	100	200	300	400
Distile Su (µL)	1000	980	970	960	950	940	900	800	700	600

Deneyin yapılışı

560 µL DPPH, 40 µL köre, standartlara, örneklere ve metanol'e eklenip ependorflar içerisinde 30 dakika süresince karanlık bir ortamda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip süpernatanttan 200 µL alınıp 96 mikroplate'e aktarıldı, 517 nm'de absorbanslar okundu (Biotek, Synergy H1, Vermont, ABD) ve kaydedildi. Standart kalibrasyon grafiği çizilmiş (R^2=0,9975) ve örneklerin DPPH radikalini süpürme aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplandı. Hesaplama Denklem 3.1'e göre yapıldı.

Denklem 3.1: DPPH radikalini süpürme aktivitesi hesaplama

$$\% \text{ Aktivite} = 1 - \left(\frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Blank}}\right) \times 100$$

3.4. KEFİR VE SÜT ÖRNEKLERINDE TOPLAM FENOLİK MADDE TAYINI

Deneyin prensibi: Folin-Ciocalteu yöntemi, fenolik bileşiklerin molibdenyum'a elektron transfer etmesine dayanmaktadır. Mavi renkli kompleks oluşumu 750-765 nm'de

spektrofotometrik olarak belirlemektedir. Gallik asit standart bileşik olarak sıklıkla kullanılıp ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) (mg/L) olarak verilmektedir (152).

Gerekli çözeltiler

- **Folin-Ciocalteu çözeltisi:** 1 mL Folin (Merck, 109001, Almanya) balon jojeye alındı ve hacmi 10 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- **Sodyum karbonat çözeltisi:** 3,75 g sodyum karbonat (Merck, 106392, Almanya) tartıldı ve hacmi 50 ml'ye saf su ile tamamlandı.
- **Stok Gallik asit çözeltisi (500 mg/L)**: 25 mg gallik asit (Merck, 842649, Almanya) tartılıp son hacmi 50 mL'ye 2 ml metanol ve 48 mL saf su ile tamamlandı. Stok çözeltiden Tablo 3.3'te belirtilen standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 3.3: Gallik asit standart çözeltilerin hazırlanması

	Standart Çözeltiler (mg/L)							
	Kör	**10**	**25**	**75**	**100**	**150**	**200**	**250**
Gallik Asit (µL)	0	20	50	150	200	300	400	500
Distile Su (µL)	1000	980	950	850	800	700	600	500

Deneyin yapılışı

40 µL örnek ve standarda, 200 µL folin eklendi 3 dakika inkübasyondan sonra 160 µL sodyum karbonat eklenip vortekslendi. Bir saat karanlıkta inkübasyon bırakıldı. 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip süpernatanttan 200 µL alınıp 96 kuyucuklu mikroplak'a aktarıldı. 765 nm'de köre karşı absorbanslar okundu ve kaydedildi. Standart kalibrasyon grafiği çizildi (R^2=0,9906) ve denklem yardımıyla örneklerin toplam fenolik madde içeriği, gallik asit eşdeğeri (mg/L) olarak hesaplandı.

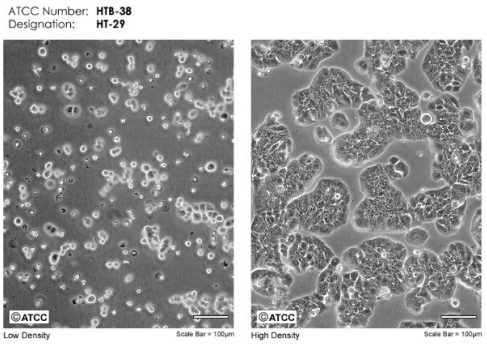
3.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürü deneyleri, hücrelerinin çoğaltılmasını, pasajlanmasını, dondurulmasını, çözülmesini ve sayılarak istenen flask ya da plaklara ekilmesini kapsamaktadır.

3.5.1. Hücre Hatları

Çalışmada, insan kolon adenokarsinoma HT29 (ATCC® HTB-38) hücre hattı ve insan kolon normal epitel FHC hücre hattı (ATCC® CRL-1831) kullanıldı.

HT-29, kolorektal adenokarsinomlu bir hastadan elde edilen primer tümörden izole edilen yapışık bir epitel hücre hattıdır (Şekil 3.4). HT-29, kemoterapötik ilaçlara duyarlıdır. Kanser ve ilaç araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. p53 geninin 273. kodonunda Arjinin->Histidin mutasyonu ile sonuçlanan bir Guanin->Adenin nükleotid değişimi vardır (Tablo 3.4) (245).

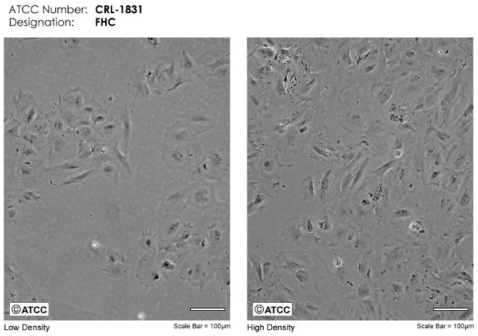


Şekil 3.4: HT29 hücre hattının mikroskop görüntüleri (245)

Tablo 3.4: HT29 hücre hattının özellikleri (245)

Organizma	*Homo Sapiens*
Hücre tipi	Kolonosit
Morfoloji	Epitel
Doku	Kolon
Hastalık	Adenokarsinom, kolorektal
Mutasyon	*p53* gen mutasyonu

FHC, sağlıklı bir donörün kolonundan izole edilen yapışık bir hücre hattıdır (Şekil 3.5). Bu hücre hattı gastrointestinal araştırmalarda insan kolonunun gelişimi ve işlevlerini incelemek için kullanılmaktadır (Tablo 3.5). FHC ayrıca kolon epitel hücreleri üzerinde farmakolojik ve toksikolojik çalışmalar için de kullanılmaktadır (246).



Şekil 3.5: FHC hücre hattının mikroskop görüntüleri (246)

Tablo 3.5: FHC hücre hattının özellikleri

Organizma	Homo Sapiens
Hücre tipi	Kolonosit
Morfoloji	Epitel
Doku	Kolon
Hastalık	Normal
Mutasyon	Yok

3.5.2. Hücrelerin Kültüre Ekimi

Kullanılan hücre hatlarını çoğaltmak amacıyla cryotüp içerisinde donmuş halde bulunan hücreler Tablo 3.6'da belirtildiği şekilde hücre tipine uygun hazırlanan besiyeri içerisine ekilerek çoğaltıldı.

Tablo 3.6: Besiyeri içeriği

BİLEŞEN	**HACİM (mL)**
Bazal Kültür Ortamı • FHC hücreleri: L-Glutamin içeren DMEM:F12 ortamı (DMEM-12-A, Capricorn) • HT29 hücreleri: L-Glutamin içeren McCoy's 5A ortamı (MCC-A, Capricorn)	44
2mM L-Glutamin (GLN-B, Capricorn)	0,5
10% Isı ile inaktive edilmiş gelişmiş fetal bovin serumu (FBS-11A, Capricorn)	5
%1 Penisilin/Streptomisin (100x) (PS-B, Capricorn)	0,5
Toplam Hacim	50

DMEM: Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle besiyeri ve F-12 besin karışımı (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)

Deney protokolü

- Hücre hatları açılmadan ve ekilmeden önce laminar kabin %70'lik etil alkol ile steril hale getirildi.
- Ardından 37°C'lik su banyosunda kriyoviyal tüp kapağı suyun içine girmeyecek şekilde dairesel hareketlerle 40-60 saniye boyunca yarı eriyik hale gelene kadar hızlıca çözüldü.
- Laminar kabinin içerisine kriyoviyal alınmadan önce; %70'lik etil alkolle sterilize edildi.
- Tablo 3.6'da belirtilen şekilde hazırlanan besiyerinden 3 ml çekildi.
- Kriyoviyal tüpteki hücreler, çekilen besiyeri ile süspanse edildi.
- Hücrelere zarar vermeden yavaşça pipetaj yapıldı, 5 dk 2000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
- Pelete 4 mL taze besiyeri eklendi ve yavaşça pipetaj yapıldı. Hücreler 25 cm^2'lik steril flasklara (07-8025, Biologix) ekilip, 37°C'de, %5 CO_2 ve nemli ortam içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.5.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

Ters ışık mikroskobunda hücrelerin kültür yüzeyini %75-80'ini kapladığı (konfluent oldukları) gözlemlendikten sonra pasajlama işlemine geçildi. Pasajlama hücreler belirli sayıdan sonra plato fazına geçtiği için gereklidir.

Deney protokolü

- Flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Ölü hücre atıklarını ve kalan besiyerini uzaklaştırmak için 3 ml 1 x Fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS, Phosphate-Buffered Saline) yavaş bir şekilde flaska eklendi ve geri çekildi.
- HT29 ve FHC hücrelerini yüzeyden kaldırmak için 3 ml %0.25'lik Tripsin yavaşça T25'lik flaska eklendi.
- Tripsin aktivasyonunu arttırmak için; hücreler 37°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Hücrelerin yüzeyden kalkıp kalmadığı invert mikroskopta incelendi. Flask yüzeyine halen yapışık halde duran hücreleri kaldırmak için mekanik etki uygulandı.
- Tripsin inaktivasyonu için eklenen tripsin miktarının 3 katı kadar (9 ml) taze besiyeri eklendi.

- Flask içindeki tüm sıvı çekilerek falkona alındı. 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pelet üzerine 3 ml taze besiyeri eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı.
- Hücreler daha sonra tripan mavisi ile thoma lamında sayılarak hücre sayısı belirlendi ve pasaj numarası bir artırılarak uygun flasklara aktarıldı.
- Flasklar 37°C, %5 CO_2'li nemli inkübatöre kültür için kaldırıldı. Dondurma işlemi için santrifüj sonrası pellet 900 µl FBS ile çözdürüldü. İçerisine kriyoprotektan özellikte olan dimetil sülfoksit (DMSO)'ten 100 µl alınarak damla damla yavaşça hücre süspansiyonu içerisine koyuldu.
- Tüm sıvı dikkatlice alınıp kriyoviyal tüp içine koyuldu. Önce -20°C'de 30 dakika tutulduktan sonra -80°C'ye kaldırıldı ardından -146°C'lik azot tankında saklandı.

3.5.4. Hücre Sayısının Belirlenmesi

Deneylerde belirli sayıda hücrenin flasklara ekilmesi için hücre süspansiyonundaki hücre sayısının belirlenmesi gerekmektedir. Bunu belirlemek amacıyla tripan mavisi ile boya dışlama testi yapıldı. Bu yöntemin prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin Tripan mavisi boyasını hücre içerisine almaları dolayısıyla ölü hücre olarak değerlendirilmeleri ve membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin ise membrandan boya geçişine izin vermemelerine dayanmaktadır (247).

Deney protokolü

- Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldı.
- Hücreler 1 mm2'lik inceleme alanına ve 0,1 mm derinliğe sahip Thoma lamında incelendi.
- İnceleme alanında yer alan 16 büyük kareden 4'ü köşeler biri orta olmak üzere 5 büyük karedeki hücreler sayıldı.
- Canlı hücreler sağlam hücre zarına sahip oldukları için berrak renkli sitoplazmalarıyla, ölü hücreler ise mavi-koyu renkli sitoplazmalarıyla ayırt edildi.

Denklem 3.2: Tripan Blue ile toplam hücre sayısının hesaplanması

$$\text{Hücre sayısı/mL} = \text{Ortalama sayım değeri (n: 5)} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

3.6. HÜCRELERE UYGULANACAK MADDELERİN HAZIRLANMASI

3.6.1. 5-Fluorourasil'in Dozlarının Hazırlanması

Kolorektal kanser tedavisinde sıklıkla uygulanan 5-FU, bu çalışmada hem pozitif kontrol olarak hem de kombinasyon deneylerinde kullanıldı. Stok çözelti hazırlamak için 5-FU (Fagron, ABD)'dan 12,2 mg tartıldı ve 1 mL distile suda çözdürüldü. Stok 5-FU çözeltisinden Tablo 3.7'de belirtildiği üzere besiyeri ile seyreltilerek hücrelere uygulanacak dozlar olan 15,6; 31,25; 62,5; 125; 185; 250 ve 500 µg/mL 5-FU konsantrasyonları hazırlandı (248).

Tablo 3.7: 5-Fluorourasil uygulama dozlarının hazırlanması

Konsantrasyon (µg/ml)	Stoktan alınan miktar (µl)	Eklenen besiyeri (µl)
500	36,89	863,11
250	18,44	881,56
125	9,22	890,78
62,5	4,61	895,39
31,25	2,31	897,69
15,6	1,15	898,85

3.6.2. Kefir Ve Süt Dozlarının Hazırlanması

Bu çalışmada sindirilmiş kefir, sindirilmemiş kefir ve sindirilmiş sütün HT29 ve FHC hücreleri üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu amaçla sindirilmiş kefir, sindirilmemiş kefir ve sindirilmiş süt Tablo 3.8'deki belirtildiği üzere besiyeri ile seyreltilerek hücrelere uygulanacak konsantrasyonlar olan %5, 10, 15, 20, 40 ve 50 dozları hazırlandı (236).

Tablo 3.8: Kefir ve süt dozlarının hazırlanması

Konsantrasyon (%)	Stoktan alınan miktar (ul)	Eklenen besiyeri (ul)
50	50,00	50,00
40	40,00	60,00
20	20,00	80,00
15	15,00	85,00
10	10,00	90,00
5	5,00	95,00

3.6.3. Sodyum Pentaborat Pentahidrat Dozlarının Hazırlanması

Çalışmada HT29 ve FHC hücrelerinde etkisi araştırılan bir madde olan SPP (Ulkar Kimya, Nobel, Türkiye)'den stok çözelti hazırlamak için 10 mg tartılıp 1 ml soğuk PBS'de çözüldü. Stok SPP çözeltisinden Tablo 3.9'da belirtildiği üzere besiyeri ile seyreltilerek hücrelere uygulanacak dozlar olan 375, 750, 1500, 3000, 6000 ve 7000 µg/mL SPP konsantrasyonları hazırlandı (11).

Tablo 3.9: Sodyum pentaborat dozlarının hazırlanması

Konsantrasyon (µg/mL)	Stoktan alınan miktar (µl)	Eklenen besiyeri (µl)
7000	700,00	300,00
6000	600,00	400,00
3000	300,00	700,00
1500	150,00	850,00
750	75,00	925,00
375	37,50	962,50

3.6.4. Sodyum Bütirat Dozlarının Hazırlanması

Çalışmada HT29 ve FHC hücrelerinde etkisi araştırılan diğer bir madde olan sodyum bütirat (Sigma, 303410)'tan stok çözelti hazırlamak için 5,5 mg tartılıp, 1 mL distile suda çözdürüldü. Stok sodyum bütirat çözeltisinden Tablo 3.10'da belirtildiği üzere besiyeri ile seyreltilerek hücrelere uygulanacak dozlar olan 1, 2, 5, 7,5, 10 ve 20 mM sodyum bütirat konsantrasyonları hazırlandı (249).

Tablo 3.10: Sodyum bütirat uygulama dozlarının hazırlanması

Konsantrasyon (mM)	Stoktan alınan miktar (µl)	Eklenen besiyeri (µl)
20	400,00	600,00
10	200,00	800,00
7,5	150,00	850,00
5	100,00	900,00
2	40,00	960,00
1	20,00	980,00

3.6.5. Karnosol Dozlarının Hazırlanması

Karnosol (MedChemEkspress, ABD)'den stok çözelti hazırlamak için 1 mg tartılıp, 0,3026 mL DMSO'da çözdürüldü. Stok karnosol çözeltisinden Tablo 3.11'de belirtildiği üzere besiyeri ile seyreltilerek hücrelere uygulanacak dozlar olan 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL karnosol konsantrasyonları hazırlandı (250)

Tablo 3.11: Karnosol uygulama dozlarının hazırlanması

Konsantrasyon (µM)	Stoktan alınan miktar (µl)	Eklenen besiyeri (µl)
100	10,00	990,00
75	7,50	992,50
50	5,00	995,00
25	2,50	997,50
10	1,00	999,00
5	0,50	999,50

3.7. HÜCRE CANLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada, HT29 kolorektal kanser hücre hattı ve FHC normal kolon epitel hücrelerinde, 5-FU, SPP, sindirilmiş kefir ve süt, sindirilmemiş kefir, sodyum bütirat ve karnosolun sitotoksik etkileri, XTT [(2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid)] testi ile değerlendirildi. Hücreler, her maddeye farklı dozlarda maruz bırakılarak 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda canlılık oranları belirlendi. Uygulanan maddelerin, %50 hücre ölümüne neden olan konsantrasyonları olan yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC_{50}, Half Maximal Inhibitory Concentration) değerleri hesaplandı. Bu deney için XTT kiti (Biotium, 30007) kullanıldı. Kit içeriğinde XTT solüsyonu (Steril, 5 x 10 mL) ve aktivasyon reaktifi olan N-Metil-Dibenzopirazin Metilsülfat (PMS) (Steril, 5 x 10 mL) bulunmaktadır.

Deneyin prensibi: Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan XTT, metabolik olarak aktif olan canlı hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz enzimi aracılığıyla suda çözünebilen turuncu renkli bir formazan boyaya dönüşmektedir. Bu indirgenme tepkimesinin verimli şekilde gerçekleşebilmesi için, elektron taşıyıcı görevi gören PMS aktivasyon reaktifi kullanılmaktadır. Formazan miktarı hücrelerin metabolik aktivitesine, dolayısıyla canlılığına karşılık gelmekte ve 450-490 nm dalga boyları arasında spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirilmektedir (251).

Deney protokolü

- Test edilecek her 96 kuyucuklu plaka (well kültür plate) için 25 µl PMS, 5 mL XTT solüsyonu ile karıştırıldı. Çalışma solüsyonu çalışma gerçekleştirilmeden hemen önce hazırlandı.
- Her bir kuyudaki kültür ortamı hacmi 100 µl olarak ayarlandı.
- HT29 hücreleri plakaya ekildikten sonra hücrelerin yüzeye tutunması beklendi. Daha sonra, her bir kuyucuğa yukarıda bahsedilen dozlarda 5-FU, SPP, sodyum bütirat, karnosol ve sindirilmiş kefir, sindirilmemiş kefir ve sindirilmiş süt ilave edildi. Uygulamanın ardından hücreler, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerine göre değerlendirilmek üzere inkübatöre alındı.
- İnkübasyon sürelerinin sonunda, her bir kuyucuğa 25 µL XTT çalışma solüsyonu eklendi. Orbital karıştırıcı kullanılarak plakadaki ortamın XTT çözeltisi ile homojen karışması sağlandı.
- Plate, 37°C'de 3 saat arasında inkübe edildi.
- Mikroplaka okuyucuda (Heales MB-580, Çin) 450 nm dalga boyunda absorbanslar okundu. Arkaplan absorbansı için 630 nm dalga boyu kullanıldı. Sinyal absorbans değerinden arkaplan absorbans değeri çıkarılarak normalize edilmiş absorbans değerine ulaşıldı. Bu işlemin amacı, plaka, ortam ve reaktif kaynaklı arka plan sinyallerini belirlemektir. Bu değer, sadece XTT indirgenmesi sonucu oluşan formazan ürününe ait net absorbans değerinin elde edilmesini sağlamaktadır.
- Sadece besiyeri içeren ancak hücre içermeyen kuyucuklar kör olarak belirlendi ve absorbans değeri diğer tüm kuyucukların absorbans değerinden çıkarıldı. Her madde için en az üç teknik tekrar yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ortalama değer hesaplandı. Negatif kontrol (NC, Negative control) olarak belirlenen, madde uygulanmayan sadece besiyeri ve hücre içeren kuyucukların hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edildi. Örneklerin ortalama absorbans değerleri, NC'nin ortalama absorbans değerine oranlanarak kontrol hücrelerine karşı rölatif absorbanslar elde edildi. Bu oran 100 ile çarpılarak her bir örnek için yüzde canlılık değeri hesaplandı (Denklem 3.3).

Denklem 3.3: XTT ile % Canlılık Hesaplama

$$\%\text{Canlılık} = \frac{\text{Örnek Absorbansı (Ortalama)}}{\text{Negatif Kontrol Absorbansı (Ortalama)}} \times 100$$

3.8. KOMBİNASYONLARIN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yukarıda belirtilen maddelerin ayrı ayrı XTT deneyi sonuçlarının alınmasından sonra, kombinasyon deneyleri için 5-FU, SPP ve sindirilmiş kefirle çalışmaya devam etmeye karar verildi. Bu amaçla aşağıdaki madde dozlarının ve kombinasyonlarının 24,48 ve 72. saat inkübasyon süreleri sonunda HT29 ve FHC hücre canlılığı üzerine olan etkileri yukarıda belirtilen XTT metodu ile tayin edildi. Kombinasyonların HT29 ve FHC hücrelerinde IC50 değerleri belirlendi.

Bu kapsamda, seçilen maddeler, dozları ve kombinasyon grupları aşağıda belirtildi:

- 15,6 µg/mL 5-FU
- 185 µg/ml 5-FU
- %2,5 sindirilmiş kefir
- %8,25 sindirilmiş kefir
- %15 sindirilmiş kefir
- 1500 µg/ml SPP
- 15,6 ug/ml 5-FU+ %2,5 sindirilmiş kefir
- 15,6 ug/ml 5-FU+ %15 sindirilmiş kefir
- 185 ug/mL 5-FU+ %8,25 sindirilmiş kefir
- 185 ug/ml 5-FU + 1500 ug/ml SPP

3.9. KOMBİNASYON İNDEKSİNİN HESAPLANMASI

5-Fluorourasil, SPP ve sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının HT29 hücrelerinde XTT deney sonuçları kullanılarak sinerjizm, additif ve antagonist etkilerin belirlenmesi amacıyla kombinasyon indeksi (CI) hesaplandı. Bunun için CompuSyn 1.0

programı (252) ve SnergyFinder 2.0 web uygulaması (253) kullanıldı CompuSyn programında hem CI değerleri belirlendi hem de doz-etki grafikleri oluşturuldu. CompuSyn yazılımında belirlenen CI'nın sınıflandırması Tablo 3.12'de verildi. Bu tabloya göre kombinasyonlar değerlendirildi.

Tablo 3.12: Kombinasyon indeksi sınıflandırması

Kombinasyon İndeks	**Sınıflandırma**
< 0.1	Çok güçlü sinerjizm
0,1-0,3	Güçlü sinerjizm
0,3-0,7	Sinerjizm
0,7-0,85	Orta sinerjizm
0,85-0,90	Az sinerjizm
0,90-1,10	Additif etki
1,10-1,20	Az antagonizm
1,20-1,45	Orta antagonizm
1,45-3,3	Antagonizm
3,3-10	Güçlü antagonizm
>10	Çok güçlü antagonizm

SnergyFinder 2.0 web uygulamasında ise kombinasyonların ısı haritaları oluşturuldu. Ayrıca ilaç kombinasyonlarında beklenen yanıtların değerlendirilmesi için önerilen en son referans modellerinden biri olan ve ilaçların bağımsız etkileşim göstermesi durumunda beklenen etkinliği ile gerçek kombinasyon etkisini karşılaştırarak hesaplanan Sıfır Etkileşim Potansiyeli (Zero Interaction Potency, ZIP) skoru belirlendi. Bunun değerlendirilmesi için gerekli skorlama Tablo 3.13'te verildi. SnergyFinder uygulamasındaki diğer modeler olan Bliss Bağımsızlık Modeli (Bliss Independence), Loewe Ekleme Modeli (Loewe Additivity) ve En Etkili Tek Ajan Modeli (Highest Single Agent, HSA) skorları da belirlendi. Bliss Bağımsızlık Modeli, iki ajanın birbirinden bağımsız etki gösterdiği varsayımına dayanarak, kombinasyon etkisinin olasılıksal olarak beklenen inhibisyon düzeyini hesaplayan sinerji modelidir. Loewe Ekleme Modeli, iki ajanın aynı biyolojik hedefe etki ettiği varsayımıyla, bir ajanın etkisinin diğerinin dozu ile telafi edilebileceği prensibine dayanan sinerji modelidir. HSA Modeli ise

kombinasyonun etkisini, içindeki en yüksek inhibisyonu sağlayan tek ajanın etkisiyle karşılaştıran ve buna göre sinerji ya da antagonizm belirleyen modeldir. Bu skorların sınıflandırılması ise Tablo 3.14'te verildi.

Tablo 3.13: Sıfır etkileşim potansiyeli skorlaması

Sıfır Etkileşim Potansiyeli Skoru	Etki
<-10	Antagonist
-10 ile 10 arası	Additif
>10	Sinerjik

Tablo 3.14: Diğer modellerin skorlaması

Elde Edilen Skor	Etki
>0:	Sinerji
0:	Additif
<0:	Antagonizm

3.10. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

Bu çalışmada, test edilen madde ve kombinasyonlarının HT29 hücrelerinde 72. saat sonucunda *KASPAZ-3*, *-8*, *-9, BAX*, *BCL-2*, *MMP-2* ve *-9* gen ekspresyonları, Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT qPCR) yöntemi ile belirlendi. Bunun için hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı, devamında Tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA) sentezi yapıldı ve gen ekspresyon düzeyleri kantitatif olarak analiz edildi.

3.10.1. RNA İzolasyonu

72 saatlik inkübasyon süresince HT29 hücreleri, farklı konsantrasyonlarda 5-FU, SPP, sindirilmiş kefir ve kombinasyonları ile muamele edildi. İnkübasyon süresi sonunda RNA izolasyonu, Riboex (GeneAll, 301-001) ve Hybrid-R (Gene All, 305-101) kitleri kullanılarak aşağıdaki şekilde yapıldı.

Deney protokolü

- Hücre örnekleri well plate üzerinden cell scraper (hücre kazıyıcı) (NEST, 710001) yardımıyla kazındı.

- Toplanan hücreler santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletine 1 mL RiboEx eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Karışım 11.000 rpm'de 10 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.
- Üzerine 200 µL kloroform eklendi, vortekslendi ve 2 dakika inkübe edildi.
- +4°C'de 12.000×g'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice temiz bir tüpe aktarıldı.
- Süpernatantın hacmi kadar RNA Binding Buffer 1 (RB1 Buffer) eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- 700 µL karışım kolona aktarıldı. 10.000×g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü (collection tüp) yenisiyle değiştirildi.
- Karışımdan arta kalan hacim bulunması durumunda 7. ve 8. işlemler tekrarlandı.
- Kolon üzerine 500 µL Güçlü Yıkama Tamponu 1 (Strong Wash Buffer 1, SW1) eklendi.
- 10.000×g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
- Kolon üzerine 500 µL RNA Yıkama Tamponu (RNW Buffer, RNA Wash Buffer) eklendi.
- 10.000×g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
- Kolon içinde kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için 10.000×g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra kolon temiz bir tüpe alındı.
- Kolon üzerine 50 µL RNaz-free su eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 10.000×g'de 1 dakika santrifüj yapılarak elde edilen RNA örnekleri -80°C sıcaklıkta donduruldu.

3.10.2. Tamamlayıcı DNA Sentezi

RNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçildi. cDNA sentezi için RNaz İnhibitörlü cDNA Sentez Kiti (A.B.T.™, C03-01-05) kullanıldı. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımının (mastermix) bilgileri aşağıdaki Tablo 3.15'de belirtildi.

Tablo 3.15: Tamamlayıcı DNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımının bilgileri

Bileşen	**Hacim (µl)**
10 x reaksiyon tamponu	2
20 x deoksinükleotid trifosfat mix	1
Random hekzamer	2
RTase (Ters transkriptaz)	1
Ribonükleaz İnhibitörü	0,5
Ribonükleaz free Water (Ribonükleaz içermeyen su)	3,5
Örnek (RNA)	10
Toplam	20

cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra reverse (ters) transkripsiyon işlemi ProFlex™ PCR Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Bu reaksiyonun koşulları aşağıdaki Tablo 3.16'da belirtildi. Reverse transkripsiyon sonrası elde edilen cDNA örnekleri, Real-Time PCR aşamasına kadar -80°C sıcaklıkta muhafaza edildi.

Tablo 3.16: Tamamlayıcı DNA sentez reaksiyonu koşulları

	1. Aşama	2. Aşama	3. Aşama	4. Aşama
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk.	120 dk.	5 dk.	-

3.10.3. Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA elde edildikten sonra Real-Time qPCR aşamasına geçildi ve bunun için SYBR Mastermix (A.B.T.™, Q03-01-05) kiti kullanıldı. Bu kit DNA polimeraz, deoksinükleotid trifosfat, $MgCl_2$ ve optimize edilmiş tampon çözeltilerini içermektedir (Tablo 3.17). SYBR Green I boyası, çift sarmallı DNA'ya bağlanarak floresan sinyal üretmekte ve bu sayede DNA amplifikasyonunu gerçek zamanlı olarak izlemeyi sağlamaktadır. Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçildi. Real-Time qPCR reaksiyonu Applied Biosystems™ QuantStudio5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Bunun için kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 3.18'de belirtildi. Gen ekpresyon analizinde kullanılan primer dizilerine ait bilgiler Tablo 3.19'da sunuldu. Bu çalışmada, referans gen olarak *ACTB* (Beta-Actin) geni tercih edildi.

Tablo 3.17: Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan mastermix

Bileşen	Hacim (µl)
2 x MasterMix (SYBR-Green içeren)	10
Pasif referans boyası (ROX, Carboxy-X-Rhodamine)	1
Forward (İleri) Primer (10 µM)	1
Reverse (Geri) Primer (10 µM)	1
Tamamlayıcı DNA kalıbı	4
Ribonükleaz free Water (Ribonükleaz içermeyen su)	3
Toplam	20

Tablo 3.18: Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	Döngü
İlk Denatürasyon	95	300	1
Denatürasyon	95	15	40
Eşleşme	60	60	40

Tablo 3.19: Primer bilgileri

Primer	Primer Dizisi
HS-ACTB-F	CATCCTCACCCTGAAGTACC
HS-ACTB-R	TGAAGGTCTCAAACATGATCTG
HS-CASPASE3-F	ATTTGGAACCAAAGATCATACATGG
HS-CASPASE3-R	TTCCCTGAGGTTTGCTGCAT
HS-CASPASE8-F	GCGGAGGGTCGATCATCTAT
HS-CASPASE8-R	CACAACTCCTCCCCTTTGCTG
HS-CASPASE9-F	GGCTCTTCCTTTGTTCATCTCC
HS-CASPASE9-R	ATCACCAAATCCTCCAGAACCAT
HS-BAX-F	CGATCCTGGATGAAACCCTGA
HS-BAX-R	GATGGACGGGTCCGGGG
HS-BCL2-F	CTGCACCTGACGCCCTTCACC
HS-BCL2-R	CACATGACCCCACCGAACTCAAAGA
HS-MMP2-F	TGACGGAAAGATGTGGTGTG
HS-MMP2-R	CTCCTGAATGCCCTTGATGT
HS-MMP9-F	CATCGTCATCCAGTTTGGTGT
HS-MMP9-R	AGGGTTTCCCATCAGCATT

ACTB: Beta-Actin (Beta-aktin), BAX: Bcl-2-associated X protein (Bcl-2 ile ilişkili X proteini), BCL2: B-cell lymphoma 2 (B-hücreli lenfoma 2), CASPASE: Cysteine-aspartic acid protease (Sistein-aspartik asit proteaz), F: Forward primer (ileri primer), HS: Homo sapiens, MMP: Matrix Metalloproteinase (Matriks metalloproteinaz), R: Reverse primer (Geri primer)

Real-Time qPCR sonucu elde edilen eşik döngü (Cycle threshold, Ct) değerleri kullanılarak gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildi.

3.10.4. Relatif Kantitasyon Hesaplanması

Bu çalışmada, gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre karşılaştırmalı analizi için ΔΔCt yöntemi kullanıldı. Hesaplama süreci aşağıda açıklanan adımlara göre gerçekleştirildi.

- Hem çalışmadaki madde ve kombinasyonlarının uygulandığı hücrelerde (deney grubu) hem de negatif kontrolde (referans grubu), her bir örnek için hedef genler (*CASPASE-3, -8, -9, BAX, BCL2, MMP2, MMP9*) ve referans gen (*ACTB*)'ye ait Ct değerleri elde edildi. Her örnek üç tekrar ile çalışıldı ve elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınarak ΔCt hesaplamalarına geçildi.
- Hem deney grubunda hem de referans grubunda hedef gen Ct değerlerinden referans gen Ct değerleri çıkarılarak ΔCt değerleri elde edildi.
- Hedef grup ΔCt değerlerinden referans grup ΔCt değerleri çıkarılarak ΔΔCt değerleri elde edildi.
- ΔΔCt değerleri ile 2^(-ΔΔCt) formülü kullanılarak kat değişimi (Fold Change, FC) hesaplandı. FC değerinin 1'in üzerinde olması, hedef genin mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre relatif olarak arttığını, 1'in altında olması ise ekspresyonun relatif olarak azaldığını göstermektedir.

3.11. HT29 HÜCRE ÖLÜMLERİNİN FLORESAN BOYAMA İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada, test edilen madde ve kombinasyonlarının HT29 hücre hattında apoptoz ve nekroz indüksiyon potansiyelini belirlemek amacıyla Fluorescein İzotiyosiyanat (FITC)-Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyaları kullanılarak çift boyamalı floresan görüntüleme yöntemi uygulandı (254). Bu deney için FITC Annexin V and PI apoptoz kiti (ABP, A026) kullanıldı. Kit; FITC Anneksin V (500 µL), PI (200 µL) ve 5 x Anneksin-bağlama tamponu (50 mL) içermektedir.

Deneyin prensibi: PS, sağlıklı hücrelerde plazma membranının sitozolik yüzeyinde bulunakta olup apoptozun erken evrelerinde, sitotoksik ajanların etkisiyle membranın dışına transloke olmaktadır. Annexin V, PS'ye yüksek afinite ile bağlanan kalsiyum bağımlı bir fosfolipit bağlayıcı proteindir ve bu değişikliği saptamak için kullanılmaktadır. Böylece Annexin V ile pozitif boyanma, erken apoptoz göstergesi

olarak kabul edilmektedir. PI boyası ise membran bütünlüğü bozulan hücrelere girebildiğinden, geç apoptotik ve ölü hücreleri boyamaktadır (255).

Deney protokolü

- Hücrelere farklı konsantrasyonlarda uygulanan maddeler ve kombinasyonları aracılığıyla apoptoz indüklendi.
- Uygulama süresinin (72 saat) ardından hücreler toplandı ve soğutulmuş 1 x Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS) ile iki kez yıkandı.
- Annexin bağlanma tamponu, 10 mM 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit, 140 mM NaCl ve 2,5 mM $CaCl_2$ içerecek şekilde, pH 7,4 olacak biçimde hazırlandı.
- Hücreler, $1x10^6$ hücre/mL yoğunlukta olacak şekilde Annexin bağlanma tamponu içinde süspanse edildi.
- Her 100 µL hücre süspansiyonuna 5 µL FITC Annexin V ve 2 µL PI eklendi.
- Hücreler, oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler 1 x Annexin bağlanma tamponu ile yıkandı.
- Hazırlanan hücre süspansiyonu lam üzerine alındı ve uygun filtreler kullanılarak floresan mikroskop altında incelendi. FITC sinyali için 494/518 nm (yeşil), PI sinyali için ise 535/617 nm (kırmızı) dalga boylarında görüntüleme yapıldı. FITC Annexin V ve PI sinyal pozitifliklerine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırıldı (Tablo 3.20).

Tablo 3.20: Hücre ölüm tiplerinin sınıflandırılması

	PI	FITC
Erken Apoptotik	-	+
Geç Apoptotik	+	+
Nekrotik	+	-

FITC: Fluorescein İzotiyosiyanat, PI: Propidyum iyodür

- Elde edilen FITC ve PI görüntüleri ImageJ yazılımına aktarıldı. ImageJ programında FITC ve PI kanallarındaki hücreler, eşikleme yöntemi ('thresholding') ve parçacık analizi ('Analyze Particles') kullanılarak sayıldı, ardından kanal görüntüleri birleştirilerek geç apoptoz (sarı) gösteren hücreler belirlendi.

- Erken, geç apoptoz ve nekroz olarak sınıflandırılan hücre sayıları, aynı görüntüde pozitif boyama gösteren toplam hücre sayısına oranlanarak yüzdelik değerler elde edildi. Bu sayede her bir örnek için hücre ölüm tiplerinin göreli dağılımı belirlendi.

3.12. PROTEOMİK ANALİZ

3.12.1. Protein Ekstraksiyonu

HT29 hücreleri, 6-well hücre kültürü plakalarından kazınarak 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine alındı. Hücre süspansiyonları, 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve tüp dibinde kalan hücre pelletinin üzerine 1 mL ProtinEX™ Hücre Lizi Reaktifi (GeneAll, 701-001) eklendi. Pellet, reaktif içerisinde tamamen çözüldü. Çözünme sonrasında örnekler, soğuk blok üzerinde 15 dakika inkübe edildi. Ardından, +4°C'de 15 dakika santrifüj uygulandı. Elde edilen süpernatantlar yeni 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve protein analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.12.2. Protein Miktar Tayini

Protein ekstraksiyonunun ardından, her bir örnekteki toplam protein miktarı bicinchoninic asit (BCA) yöntemi ile belirlendi. Ölçümler, ticari bir BCA Protein Assay Kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Ölçüm öncesinde, her örnek üç teknik tekrarla çalışıldı. Absorbans değerleri mikroplaka okuyucusunda 562 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen veriler, standart eğri yardımıyla mg/mL cinsinden hesaplandı.

3.12.3. Çözelti İçinde Sindirim

Hücre lizatından elde edilen protein örneği 0.1 M pH 8.0 amonyum bikarbonat ile çözüldü. Proteinlerin indirgenmesi için 100 mM Dithiothreitol ile 1 saat boyunca muamele edildi. Ardından 25 mM iyodoasetamid ile 30 dakika boyunca karanlıkta alkilasyon adımı uygulandı. Örnekler solüsyon ortamında tripsin (Promega, Madison, WI, USA) ile 16 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra Kütle Spektrometrisi (MS, Mass Spectrometry) analizi için örnekler C18 SPE kartuşuyla tuzdan arındırıldı.

3.12.4. Nano Sıvı Kromatografi-Elektrosprey İyonizasyon Tandem Kütle Spektrometrisi

Elde edilen triptik peptid karışımları, Bruker compact QTOF kütle spektrometresine bağlı Dionex Ultimate 3000 RSLC nanosistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak nLC-MS/MS ile analiz edildi. Nano sıvı kromatografi (nLC) ayırma işlemi, mobil faz A (H_2O içerisinde %0,1 formik asit) ve mobil faz B (asetonitril içerisinde %0,1 formik asit) kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler, 300 nL/dak akış hızıyla Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonuna (75 µm iç çap × 15 cm uzunluk, 2 µm partikül boyutu, 100 Å gözenek çapı) yüklendi. Triptik peptitlerin ayrımı şu gradyan programı ile gerçekleştirildi: 0–5. dakika arası %2 B, 5120. dakika arası %2-35 B, 120-130. dakika arası %35-98 B, 130-140. dakika arası %98 B ve 141-155. dakika arası %2 B.

3.12.5. Veri Analizi

Tüm MS/MS verileri Mascot yazılımı (Matrix Science, Version 2.5.1) kullanılarak UniProt protein veritabanı ile eşleştirildi. Aramalarda öncül kütle toleransı 10 ppm ve ürün iyon toleransı 0,1 Da olarak belirlendi. Sistein için sabit modifikasyon olarak karbamidometilasyon, metiyonin oksidasyonu, lizin ve N-terminal asetilasyonu ile metilasyon için opsiyonel modifikasyonlar kullanıldı.

3.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

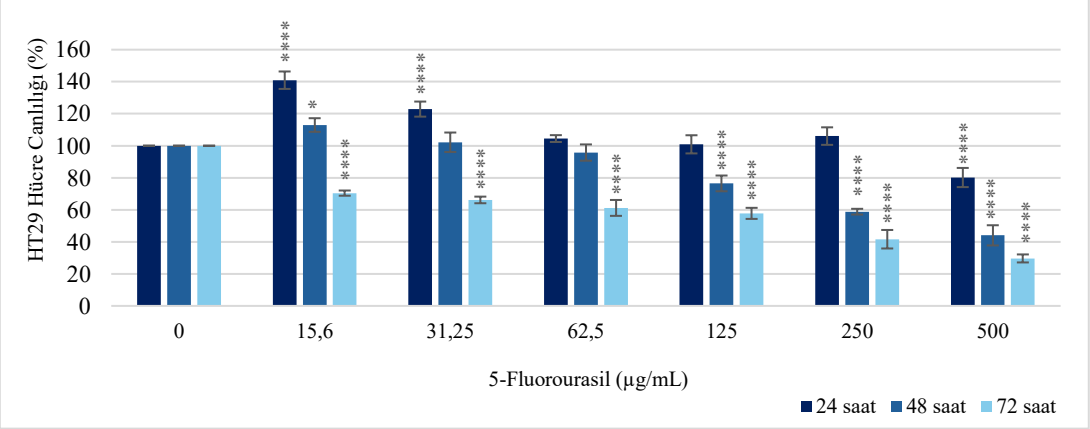
Tüm istatistiksel analizler, GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler, ortalama ± standart sapma (mean ± SD) şeklinde ifade edildi. Üç teknik tekrarla elde edilen veriler üzerinden yapılan değerlendirmelerde, dağılımın normalliği göz önünde bulundurularak gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) veya iki yönlü varyans analizi (Two-way ANOVA) uygulandı. Anlamlı fark saptanan analizlerde, çoklu karşılaştırmalar için post-hoc test olarak Tukey testi kullanıldı. Tüm analizlerde $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. 5-FLUOROURASİL'İN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

4.1.1. 5-Fluorourasil'in HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU'nun 0, 15,6, 31,25, 62,5, 125, 250 ve 500 µg/mL dozları ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen HT-29 hücrelerinin canlılığı, XTT testi ile tayin edildi. 0 µg/ml 5-FU'nun canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edildi ve diğer dozlara ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı (Şekil 4.1). 5-FU'nun HT29 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, doz ve inkübasyon süresi faktörleri açısından incelendi. Analiz sonucunda, hem dozun ($p<0,0001$) hem de inkübasyon süresinin ($p<0,0001$) hücre canlılığı üzerinde anlamlı etkileri olduğu belirlendi ($p<0,0001$). Varyans analizi, hücre canlılığındaki değişkenliğin inkübasyon süresi (%45,27) ve uygulanan doz (%41,36) faktörlerinden kaynaklandığını gösterdi. 72. saatlik inkübasyon süresinde, hücre canlılığında belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi.

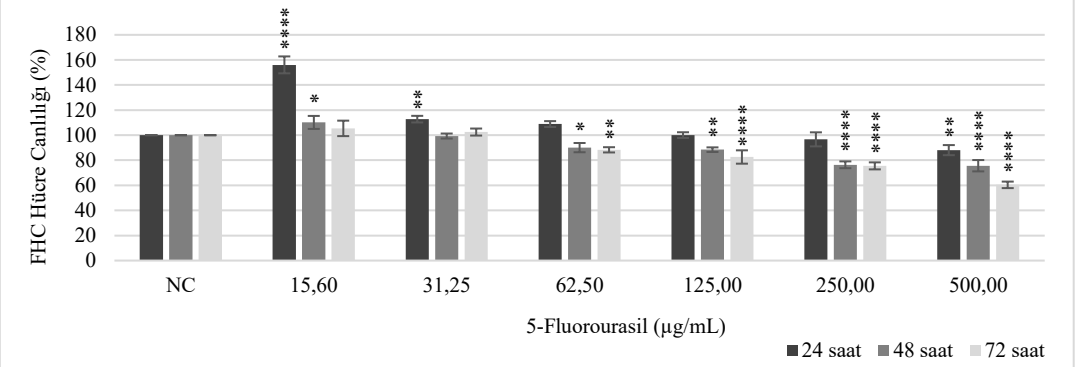


Şekil 4.1: 5-Fluorourasil'in HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). 5-FU: 5-Fluorourasil, NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *$p<0,05$, ****$p<0,0001$ (NC'ye göre).

4.1.2. 5-Fluorourasil'in FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

0; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 ve 500 µg/ml 5-FU ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen FHC hücrelerinin canlılığı, XTT testi ile tayin edildi. 0 µg/ml 5-FU'nun canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edildi ve diğer dozlara ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı (Şekil 4.2). Analiz sonucunda, hem dozun ($p<0,0001$) hem de inkübasyon süresinin ($p<0,0001$) hücre canlılığı üzerinde anlamlı etkileri olduğu belirlendi. Varyans analizi, hücre canlılığındaki değişkenliğin inkübasyon süresi (%23,71) ve uygulanan doz (%60,96) faktörlerinden kaynaklandığını gösterdi. Kontrol grubuna göre FHC hücrelerinde istatistiksel olarak ilk anlamlı azalma 48. saatte 62,50 µg/mL 5-FU uygulaması ile oldu ($p<0,05$).



Şekil 4.2: 5-Fluorourasil'in FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi

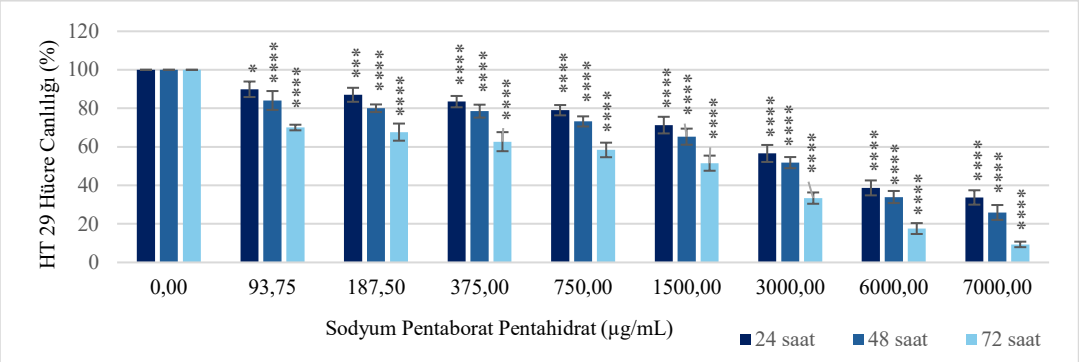
Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). 5-FU: 5-Fluorourasil, NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *$p<0,05$, **$p<0,01$, ****$p<0,0001$ (NC'ye göre)

4.2. SODYUM PENTABORAT PENTAHİDRAT'IN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

4.2.1. Sodyum Pentaborat Pentahidrat'ın HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

SPP'nin 0, 93,75, 187,5, 375, 750, 1500, 3000, 6000 ve 7000 µg/mL dozları ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen HT-29 hücrelerinin canlılığı, XTT testi ile değerlendirildi. 0 ug/ml SPP'nin canlılık üzerine etkisi tüm zaman dilimleri için %100 kabul edildi ve

diğer dozlara ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı (Şekil 4.3). SPP uygulamasıyla birlikte HT29 hücre canlılığı hem doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak anlamlı şekilde azaldı ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %87,27'sinin uygulanan dozdan, %10,31'inin ise inkübasyon süresinden kaynaklandığı belirlendi. Tüm SPP dozları, HT29 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağladı. Dozun artmasıyla birlikte hücrelerde kademeli sitotoksisite gözlemlendi.



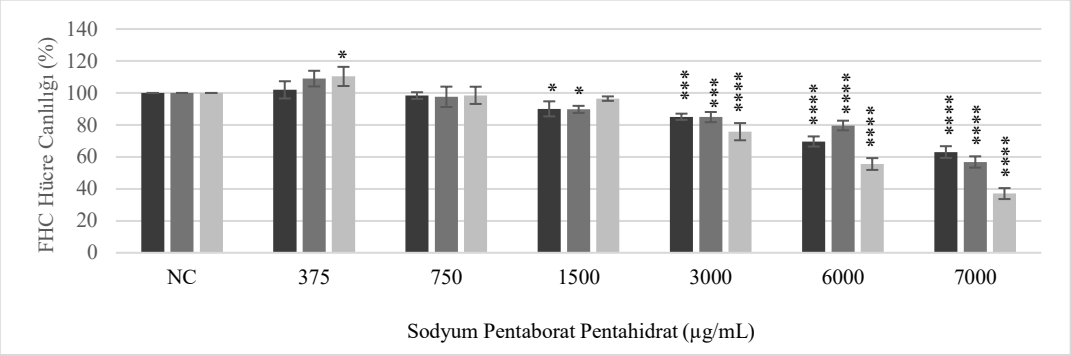
Şekil 4.3: Sodyum pentaborat pentahidrat'ın HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

4.2.2. Sodyum Pentaborat Pentahidrat'ın FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

SPP'nin 0, 375, 750, 1500, 3000, 6000 ve 7000 µg/mL dozları ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen FHC hücrelerinin canlılığı, XTT testi ile tayin edildi. 0 µg/ml SPP'nin canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edildi ve diğer dozlara ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı (Şekil 4.4). SPP uygulamasıyla birlikte FHC hücre canlılığı hem doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak anlamlı şekilde azaldı ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %87,38'i uygulanan dozdan, %1,94'ü inkübasyon süresinden kaynaklandı. 375 µg/mL SPP 24., 48. ve 72. saatte FHC hücre canlılığında bir artışa neden oldu ve bu artış 72 saatlik inkübasyon sonrası istatistiki olarak negatif kontrole göre anlamlı bulundu. 750 µg/mL SPP 24., 48. ve 72. saatte FHC hücre canlılığını etkilemedi ($p=0,9983$; 0,9857; 0,9990). 1500 µg/mL SPP 24., 48. saatte FHC hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden

oldu (p<0,05). Aynı dozda 72. saatte hücre canlılığı arttı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,9117). Artan diğer dozlarda ise hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlendi.



Şekil 4.4: Sodyum pentaborat pentahidrat'ın FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi

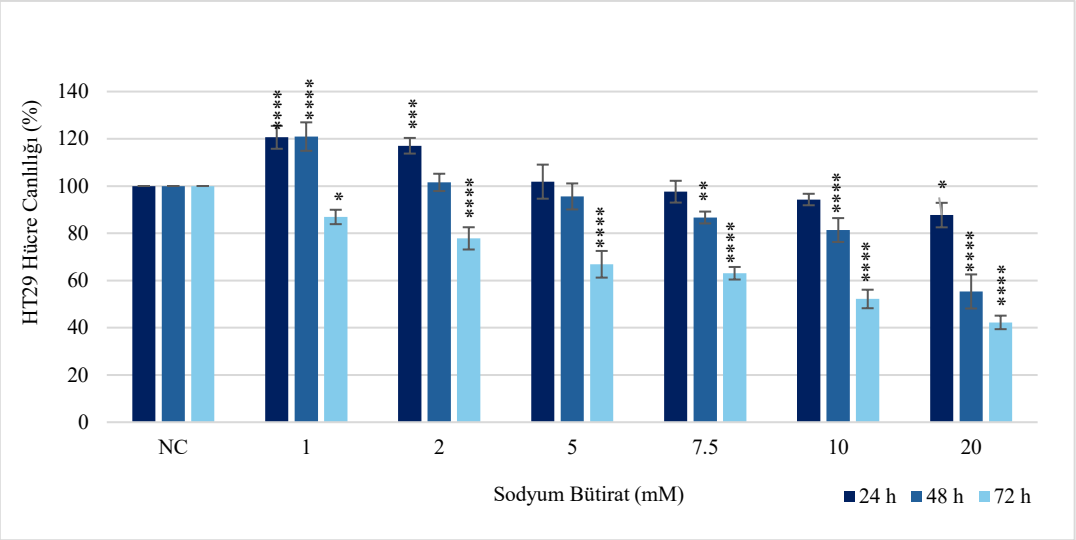
Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

4.3. SODYUM BÜTİRAT'IN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

4.3.1. Bütirat'ın HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Sodyum bütirat'ın 0, 1, 2, 5, 7.5, 10 ve 20 mM konsantrasyonlarında HT29 hücrelerine uygulanmasının ardından 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerine göre hücre canlılığı, XTT testi ile belirlendi. Kontrol grubu (0 µg/mL bütirat) %100 kabul edilerek, diğer dozlara ait hücre canlılık oranları ortalama absorbans değerlerine göre hesaplandı (Şekil 4.5). Varyans analizi sonuçlarına göre, bütiratın hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (p<0,0001). Toplam varyasyonun %48,01'inin uygulanan dozdan, %39,45'inin inkübasyon süresinden kaynaklandığı belirlendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda, 1 ve 2 mM bütirat dozları, HT29 hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla belirgin artışa neden oldu (p<0,0001). 24 saatlik inkübasyon sonunda istatistiksel olarak anlamlı tek azalma 20 mM dozunda gerçekleşti. 48 saatlik inkübasyon süresinde 1,00 mM (p<0,0001) ve 2,00 mM (p=0,9861) dozlarında canlılık kontrol

grubunun üzerinde seyretti. Ancak 7,5 mM dozunda hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldı, daha yüksek dozlarda ise azalma daha belirgin hale geldi. 72 saatlik inkübasyonda ise tüm dozlarda HT29 hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldı.



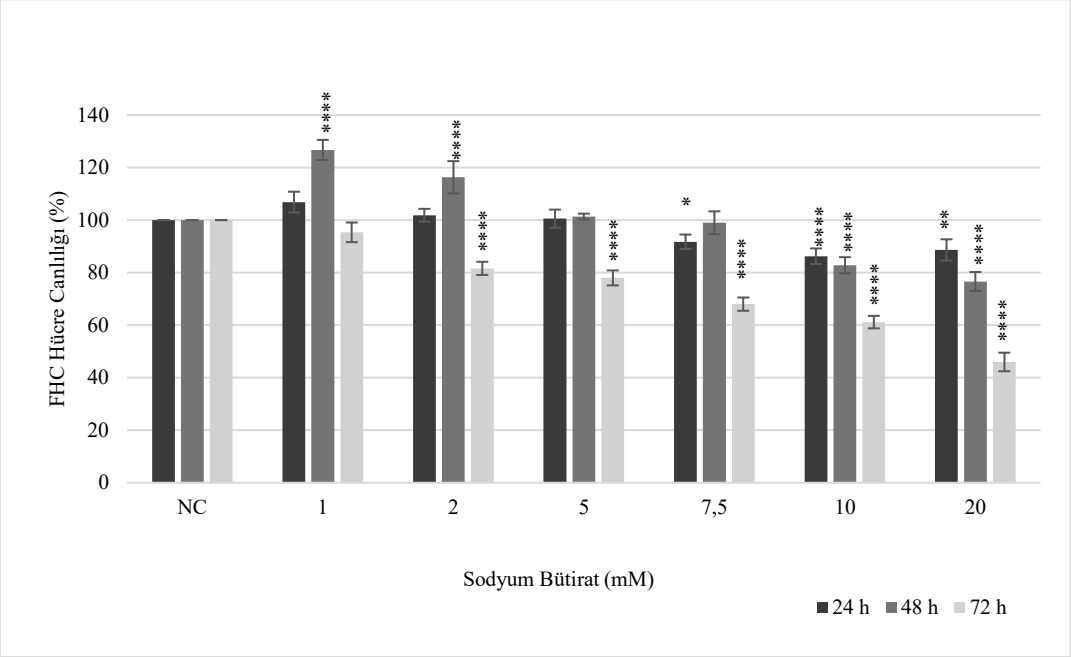
Şekil 4.5: Sodyum bütirat'ın HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

4.3.2. Bütirat'ın FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Sodyum bütirat'ın 0, 1, 2, 5, 7.5, 10 ve 20 mM konsantrasyonlarında FHC hücrelerine uygulanmasının ardından 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerine göre hücre canlılığı, XTT testi ile belirlendi. 0 mM sodyum bütirat uygulanan kontrol grubunun hücre canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edilerek, diğer dozlara ait canlılık oranları ortalama absorbans değerlerine göre hesaplandı (Şekil 4.6). İki yönlü varyans analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre, sodyum bütiratın FHC hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %50,15'inin uygulanan dozdan ve %35,44'ünün inkübasyon süresinden kaynakladığı belirlendi. 1, 2 ve 3 mM sodyum bütirat uygulaması 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda hücre canlılığında artışa yol açarken, sadece 48 saatlik inkübasyonlardaki farklılık anlamlı bulundu. 24

saatlik inkübasyon sonucunda ilk anlamlı azalma 7,5 mM sodyum bütirat dozunda (p=0,0420) görülürken 10 ve 20 mM dozlarında hücre canlılığı kademeli bir şekilde azaldı (p<0,0001). 48 saatlik inkübasyon sonucunda ilk anlamlı azalma 10 mM dozunda gerçekleşti (p<0,0001). 72. saatte ise 1 µg/mL sodyum bütirat (p=0,5655) haricinde tüm dozlarda FHC hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (p<0,0001).



Şekil 4.6: Bütirat'ın FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi

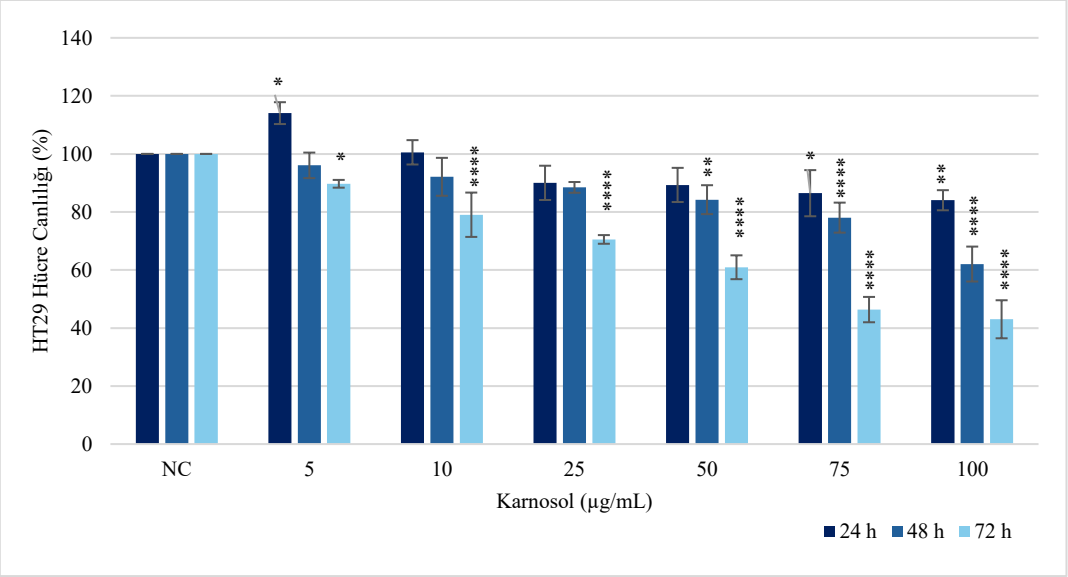
Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre)

4.4. KARNOSOL'ÜN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

4.4.1. Karnosol'ün HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Karnosol'ün 0, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL dozlarında HT29 hücrelerine uygulanmasının ardından 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerine göre hücre canlılığı, XTT testi ile değerlendirildi. Kontrol grubu (0 µg/mL) %100 kabul edilerek, diğer dozlara ait hücre canlılık oranları ortalama absorbans değerlerine göre hesaplandı (Şekil 4.7).

Karnosolün HT29 hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %52,49'unun uygulanan dozdan ve %32,25'inin inkübasyon süresinden kaynaklandığı belirlendi. 24 saatlik sürede 5 µg/mL karnosol HT29 hücre canlılığını arttırdı ($p=0,0123$) ve 75 µg/mL karnosol dozlarından itibaren hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azaldı. 72 saatlik inkübasyon sonunda tüm dozların kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde sitotoksik etki oluşturduğu saptandı. HT29 hücre canlılığı, uygulanan dozlar ve inkübasyon süreleri arasında ilk defa 72. Saatte 75 µg/mL karnosol ile %50'nin altına indiği belirlendi.



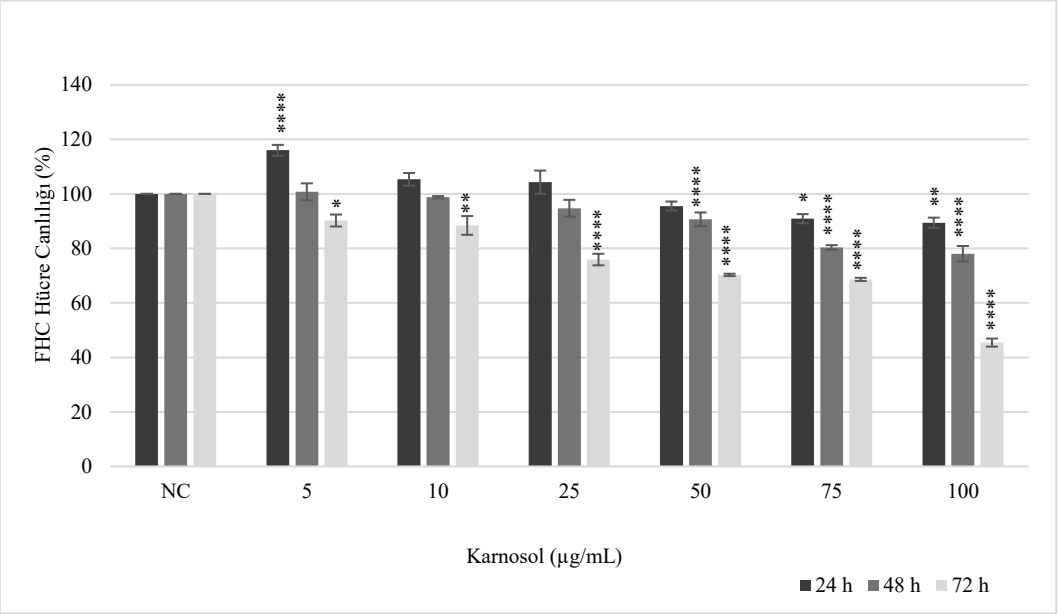
Şekil 4.7: Karnosol'ün HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ****p <0,0001 (NC'ye göre).

4.4.2. Karnosol'ün FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Karnosol'ün 0, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL dozları ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilen FHC hücrelerinin canlılığı, XTT testi ile değerlendirildi. Kontrol grubu (0 µg/mL karnosol) %100 kabul edilerek diğer grupların canlılık oranları hesaplandı (Şekil 4.8). Karnosolün FHC hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %46,91'inin uygulanan dozdan ve %38,18'inin inkübasyon süresinden

kaynakladığı belirlendi. 24 saatlik inkübasyon sonrası 5 µg/mL karnosol uygulamasıyla FHC hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldi ($p<0,0001$). 75 ve 100 µg/mL karnosol uygulamasıyla ise FHC hücre canlılığı azaldı ($p=0,0213$, $0,0045$). 48. saatte FHC hücre canlılığında ilk anlamlı azalma 50 µg/mL karnosol uygulamasındaydı ve bunu 75 ve 100 µg/mL karnosol uygulaması izledi ($p<0,0001$). 72 saatlik sürede ise tüm dozlar kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük hücre canlılığına neden oldu.



Şekil 4.8: Karnosol'ün FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi

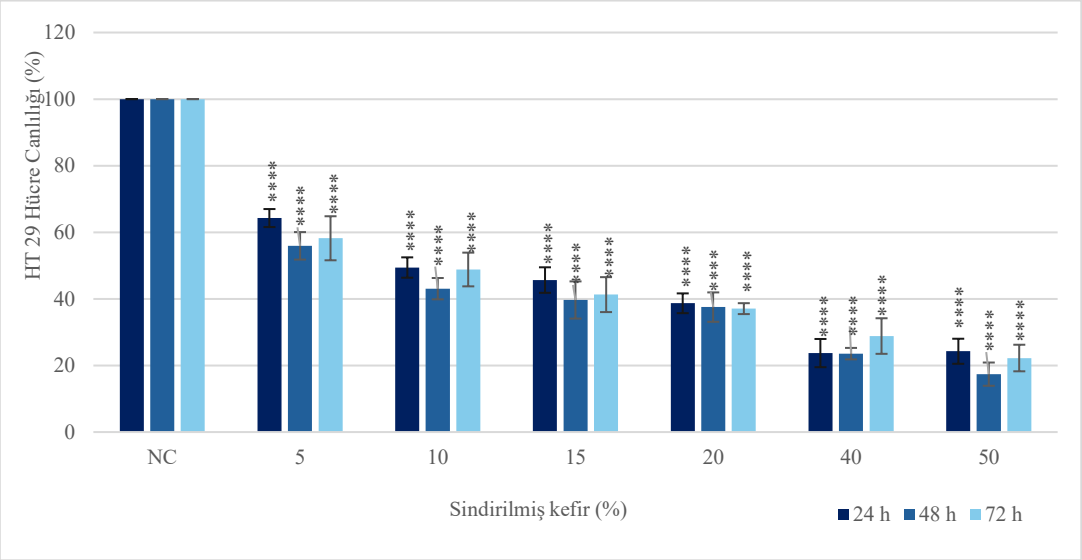
Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ****p <0,0001 (NC'ye göre).

4.5. SİNDİRİLMİŞ KEFİR'İN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

4.5.1. Sindirilmiş Kefirin HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Sindirilmiş kefirin %5, 10, 15, 20, 40 ve 50 konsantrasyonlarında, HT29 hücrelerine uygulanmasının ardından 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerine göre hücre canlılığı, XTT testi ile değerlendirildi. Kontrol grubu, %100 kabul edilerek diğer

dozlara ait hücre canlılık oranları hesaplandı (Şekil 4.9). Sindirilmiş kefirin HT29 hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza ($p<0,0001$) hem de inkübasyon süresine ($p=0,0041$) bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Toplam varyasyonun %97,43'ünün uygulanan dozdan ve %0,48'inin inkübasyon süresinden kaynakladığı belirlendi. Tüm zaman noktalarında tüm dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hücre canlılığında azalma gözlendi ($p<0,0001$). %5 kefir, 72. Saatte HT29 hücre canlılığını %58,21'e düşürürken, %50 kefir %22,24'e düşürdü.



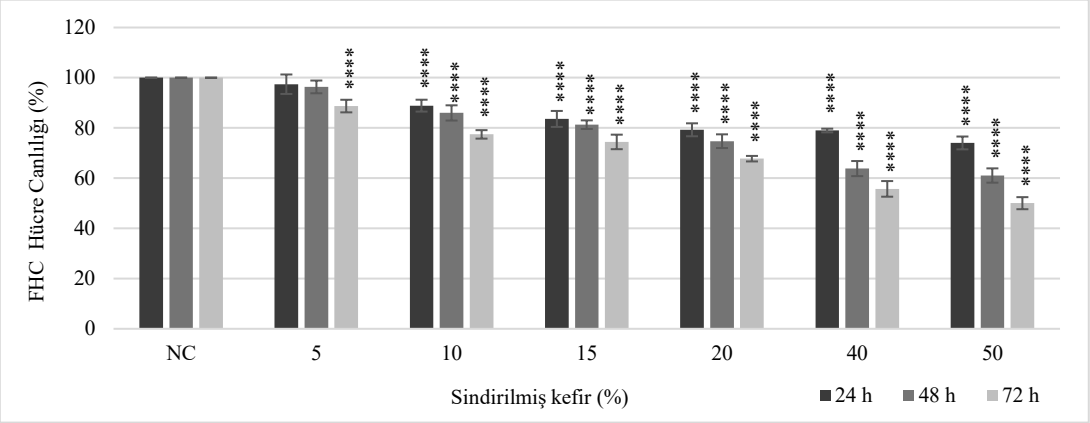
Şekil 4.9: Sindirilmiş kefirin HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. ****p<0,0001 (NC'ye göre).

4.5.2. Sindirilmiş Kefirin FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Sindirilmiş kefirin %5, 10, 15, 20, 40 ve 50 konsantrasyonlarında, FHC hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanarak XTT testi ile hücre canlılıkları değerlendirildi. Kontrol grubu %100 kabul edilerek diğer grupların canlılık oranları hesaplandı (Şekil 4.10). Sindirilmiş kefirin FHC hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %80,16'sının uygulanan dozdan ve %12,59'unun inkübasyon süresinden kaynakladığı belirlendi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm zamanlarda %10, 15, 20, 40 ve 50 sindirilmiş kefir uygulamasıyla FHC hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,0001$). %5

sindirilmiş kefir dozunda ise yalnızca 72. saatte anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,0001$). %5 sindirilmiş kefir, 72. saatte FHC hücre canlılığını %88,72'ye, %50 sindirilmiş kefir ise %50,03'e düşürdü.



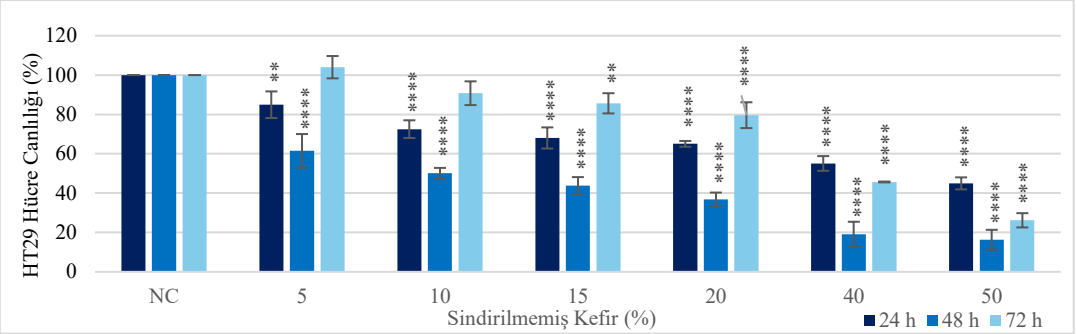
Şekil 4.10: Sindirilmiş kefirin FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. ****$p<0,0001$ (NC'ye göre).

4.6. SİNDİRİLMEMİŞ KEFİRİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

4.6.1. Sindirilmemiş Kefirin HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Sindirilmemiş kefirin HT29 hücreleri üzerindeki etkileri, %5, 10, 15, 20, 40 ve 50 konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri boyunca XTT testi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı, kontrol grubu %100 kabul edilerek oransal olarak hesaplandı (Şekil 4.11). Sindirilmemiş kefirin HT29 hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %68,03'ünün uygulanan dozdan ve %21,37'sinin inkübasyon süresinden kaynakladığı belirlendi. 24. ve 48. saatte tüm dozlarda HT29 hücre canlılığında azalma görüldü. Zaman karşılaştırmalarına göre ise 48. saatten 72. saate geçildiğinde tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı hücre canlılığı artışı gözlemlendi ($p<0,05$).

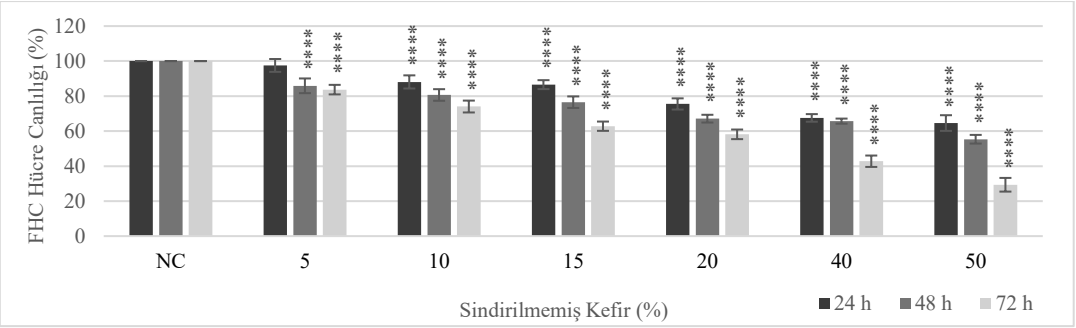


Şekil 4.11: Sindirilmemiş kefirin HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. **p<0,01, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

4.6.2. Sindirilmemiş Kefirin FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Sindirilmemiş kefirin FHC hücreleri üzerindeki etkileri, %5, 10, 15, 20, 40 ve 50 konsantrasyonlarında, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri boyunca XTT testi ile değerlendirildi. Sindirilmemiş kefirin FHC hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %75,10'unun uygulanan dozdan ve %16,65'inin inkübasyon süresinden kaynakladığı belirlendi. 24 saatlik %5 sindirilmemiş kefir uygulaması haricinde tüm dozlarda ve zaman noktalarında FHC hücre canlılığında azalma görüldü.



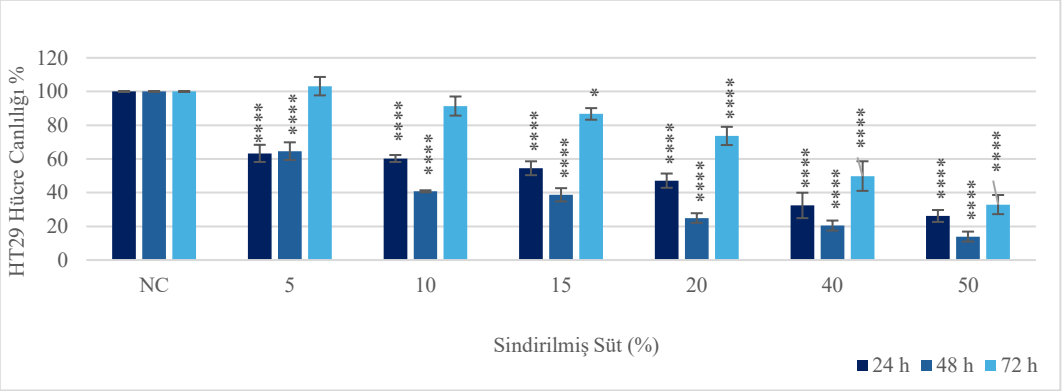
Şekil 4.12: Sindirilmemiş kefirin FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). NC: Negatif kontrol (hücre + besiyeri), İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. ****p<0,0001 (NC'ye göre).

4.7. SİNDİRİLMİŞ SÜTÜN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

4.7.1. Sindirilmiş Sütün HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Sindirilmiş süt, HT29 hücrelerine %5, 10, 15, 20, 40 ve 50 konsantrasyonlarında, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri boyunca uygulandı ve XTT testi ile hücre canlılıkları değerlendirildi. Kontrol grubu (%100) baz alınarak, diğer dozların hücre canlılıkları oranlarla hesaplandı (Şekil 4.13). Sindirilmiş sütün HT29 hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %67,88'inin uygulanan dozdan ve %23,16'sınınn inkübasyon süresinden kaynakladığı belirlendi. Kontrol grubuna göre HT29 hücrelerine uygulanan tüm sindirilmiş süt dozlarında 24 ve 48. saatte istatistiki olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. 72. saat ile 48. saatler karşılaştırıldığında ise tüm dozlarda hücre canlılıkları 72. saatte arttı, bu artış tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,0001$). %5 sindirilmiş süt uygulaması kontrol grubuna göre 72. saatte HT29 hücre canlılığında artışa neden oldu, ancak bu artış istatistiki olarak anlamlı değildi. 72. saatteki %15 sindirilmiş süt uygulamasından itibaren tüm dozlarda kontrol grubuna göre hücre canlılığında azalma belirlendi.

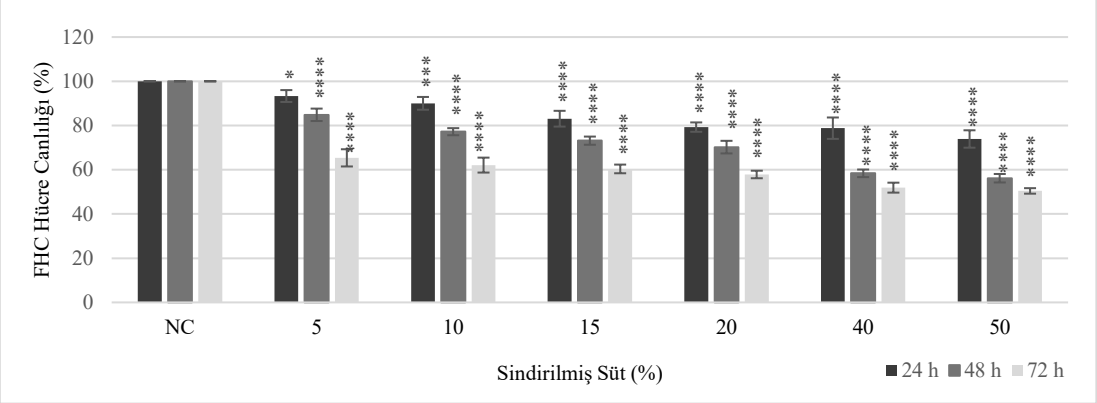


Şekil 4.13: Sindirilmiş sütün HT29 hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *$p<0,05$, ****$p<0,0001$ (NC'ye göre).

4.7.2. Sindirilmiş Sütün FHC Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Sindirilmiş sütün FHC hücreleri üzerindeki etkileri, %5, 10, 15, 20, 40 ve 50 konsantrasyonlarında, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri boyunca XTT testi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı, kontrol grubu (%100) ile karşılaştırılarak hesaplandı (Şekil 4.14). Sindirilmiş sütün FHC hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem uygulanan doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Toplam varyasyonun %60,68'inin uygulanan dozdan ve %30,57'sinin inkübasyon süresinden kaynakladığı belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla tüm dozlarda ve tüm zaman noktalarında FHC hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü.



Şekil 4.14: Sindirilmiş Sütün FHC hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

4.8. HT29 HÜCRELERİNDE SİNDİRİLMİŞ SÜT, SİNDİRİLMİŞ VE SİNDİRİLMEMİŞ KEFİRİN ETKİLERİNİN ZAMANA VE DOZA BAĞLI KARŞILAŞTIRILMASI

Farklı dozlarda (%5, %10, %15, %20, %40 ve %50) ve zamanlarda (24, 48 ve 72 saat) sindirilmiş süt, sindirilmiş kefir ve sindirilmemiş kefirin HT29 hücre canlılığı üzerine etkileri karşılaştırıldı. Sindirilmiş kefir hem sindirilmiş süte hem de sindirilmemiş kefire kıyasla, HT29 hücrelerinde genel olarak anlamlı şekilde daha düşük canlılık değerleri ile ilişkilendirildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: HT29 hücrelerinde sindirilmiş süt, sindirilmiş ve sindirilmemiş kefirin etkilerinin zamana ve doza bağlı karşılaştırılması

	Zaman Noktaları	24 h		48 h		72 h	
Doz	**Karşılaştırma**	**Ortalama farkı**	**P**	**Ortalama farkı**	**P**	**Ortalama farkı**	**P**
%50	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	-18,79	**<0,0001**	-2,40	0,7456	6,73	0,2262
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	1,89	0,8286	-3,49	0,5420	10,68	**0,0290**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	20,68	**<0,0001**	-1,08	0,9417	3,95	0,5906
%40	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	-22,67	**<0,0001**	1,36	0,9102	4,16	0,5591
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	8,69	**0,0265**	-3,08	0,6196	20,99	**<0,0001**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	31,36	**<0,0001**	-4,43	0,3752	16,84	**0,0004**
%20	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	-17,94	**<0,0001**	-11,89	**0,0022**	-5,96	**0,3086**
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	8,42	**0,0325**	-12,59	**0,0012**	36,57	**<0,0001**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	26,36	**<0,0001**	-0,70	0,9752	42,53	**<0,0001**
%15	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	-13,57	**0,0004**	-5,15	0,2692	1,06	**0,9626**
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	8,82	**0,0241**	-0,94	0,9558	45,42	**<0,0001**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	22,38	**<0,0001**	4,21	0,4116	44,36	**<0,0001**
%10	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	-12,25	**0,0013**	-9,29	**0,019**	0,59	0,9880
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	10,84	**0,0046**	-2,28	0,7676	42,54	**<0,0001**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	23,09	**<0,0001**	7,01	0,0947	41,95	**<0,0001**
%5	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	-21,64	**<0,0001**	3,12	0,6113	-0,82	0,9773
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	-0,99	0,9497	8,66	**0,0305**	44,97	**<0,0001**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	20,65	**<0,0001**	5,54	0,2212	45,79	**<0,0001**

İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

4.9. FHC HÜCRELERİNDE SİNDİRİLMİŞ SÜT, SİNDİRİLMİŞ VE SİNDİRİLMEMİŞ KEFİRİN ETKİLERİNİN ZAMANA VE DOZA BAĞLI KARŞILAŞTIRILMASI

Sindirilmiş süt, sindirilmemiş kefir ve sindirilmiş kefir uygulamaları FHC hücrelerinde farklı dozlarda (%5-%50) ve farklı sürelerde (24 h, 48 h, 72 h) hücre canlılığı üzerindeki etkileri karşılaştırıldı (Tablo 4.2). FHC hücrelerine uygulanan aynı dozlarda sindirilmiş süt, sindirilmiş kefir ve sindirilmemiş kefirin etkileri karşılaştırıldığında sindirilmiş kefirin genellikle daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladığı, daha az toksik etki oluşturduğu gözlemlendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda çoğu dozda anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak %50 ve %40 dozlarında, sindirilmiş kefirin, sindirilmemiş kefire kıyasla FHC hücre canlılığını daha fazla koruduğu tespit edildi. 48 saatlik inkübasyon süresinde ise, birçok dozda (özellikle %20, %15, %10 ve %5) sindirilmiş kefirin,

sindirilmemiş kefire göre FHC hücre canlılığını anlamlı düzeyde daha fazla koruduğu belirlendi ($p<0.05$). 72 saat sonunda da benzer şekilde, sindirilmiş kefirin FHC hücre canlılığını sindirilmemiş kefire kıyasla daha iyi koruduğu gözlendi ($p<0.0001$). Özellikle %10 ve %5 dozlarında, sindirilmiş kefir uygulamasının hücre canlılığını sindirilmemiş kefire göre anlamlı şekilde daha yüksek tuttuğu tespit edildi.

Tablo 4.2: FHC hücrelerinde sindirilmiş süt, sindirilmiş ve sindirilmemiş kefirin etkilerinin zamana ve doza bağlı karşılaştırılması

		24 h		48 h		72 h	
Doz	**Karşılaştırılan Madde**	**Ortalama farkı**	**P**	**Ortalama farkı**	**P**	**Ortalama farkı**	**P**
%50	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	9,31	**0,0012**	0,81	0,9136	21,08	**<0,0001**
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	-0,12	0,9987	-4,89	**0,0466**	0,39	0,9800
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	-9,43	**0,001**	-5,70	**0,0174**	-20,68	**<0,0001**
%40	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	11,27	**<0,0001**	-7,31	**0,0019**	9,11	**0,0002**
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	-0,17	0,9972	-5,43	**0,0244**	-3,83	0,1630
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	-11,44	**<0,0001**	1,88	0,6136	-12,94	**<0,0001**
%20	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	3,77	0,2759	3,12	0,2691	-0,30	0,9885
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	0,02	>0,9999	-4,50	0,0722	-9,90	**<0,0001**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	-3,75	0,2803	-7,62	**0,0012**	-9,60	**<0,0001**
%15	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	-3,47	0,3355	-3,38	0,216	-2,44	0,4673
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	-0,52	0,9755	-8,17	**0,0005**	-14,06	**<0,0001**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	2,95	0,4502	-4,78	0,0526	-11,62	**<0,0001**
%10	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	1,95	0,7041	-3,43	0,2081	-11,94	**<0,0001**
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	1,15	0,8833	-8,77	**0,0002**	-15,34	**<0,0001**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	-0,79	0,9430	-5,34	**0,0271**	-3,40	0,2361
%5	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmemiş kefir	-4,18	0,2085	-1,04	0,8608	-18,31	**<0,0001**
	Sindirilmiş süt vs. Sindirilmiş kefir	-4,08	0,2238	-11,50	**<0,0001**	-23,35	**<0,0001**
	Sindirilmemiş kefir vs. Sindirilmiş kefir	0,10	0,9991	-10,46	**<0,0001**	-5,03	**0,0003**

İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

4.10. TÜM MADDELERİN 72. SAATTE FHC VE HT29 HÜCRELERİNDE IC50 VE TERAPÖTİK İNDEKS DEĞERLERİ

HT29 ve FHC hücrelerinde 72. saatte IC50 değerleri ve bunlara dayanarak terapötik indeks değerleri hesaplandı (Tablo 4.3). Sindirilmiş kefirin terapötik indeks (TI) değeri 5,77 olarak bulundu. 5-FU için TI 3,15, SPP için ise 3,90 olarak hesaplandı. Diğer maddelere ait TI'lar sodyum bütirat için 1,16, karnosol için 1,33, sindirilmiş süt için 1,20

ve sindirilmemiş kefir için 0,82 olarak belirlendi. TI değerlerine bakıldığında 5-FU, sindirilmiş kefir ve SPP ile kombinasyon çalışmalarını gerçekleştirmeye karar verildi.

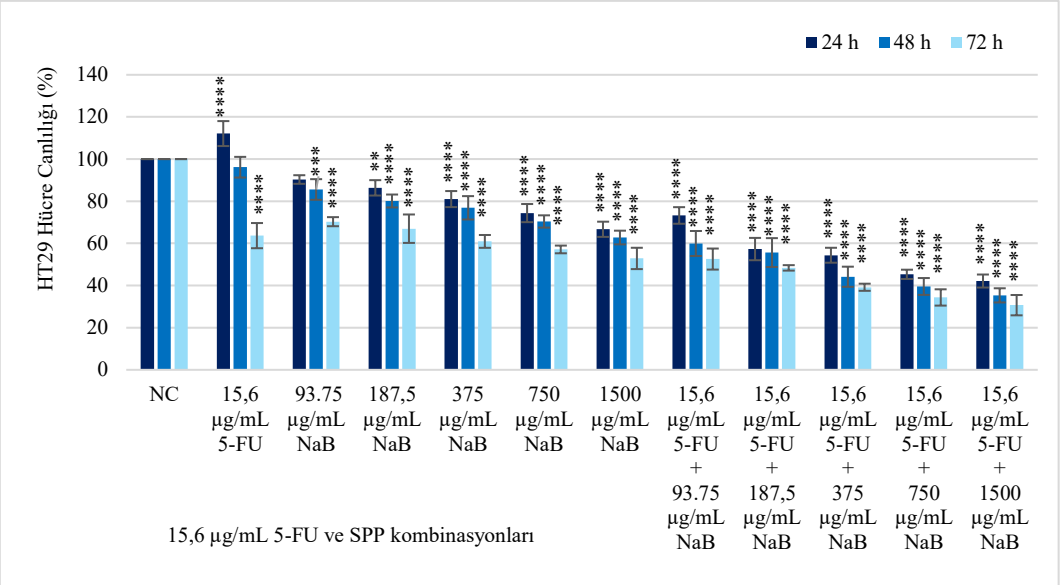
Tablo 4.3: Maddelerin 72. saatte HT29 ve FHC hücrelerinde terapötik indeks değerleri

Madde	FHC IC50	HT29 IC50	Terapötik İndeks
5-Fluorourasil	583,00	185,00	3,15
Sodyum pentaborat pentahidrat	5992,00	1537,50	3,90
Sodyum bütirat	16,77	14,40	1,16
Karnosol	101,14	75,88	1,33
Sindirilmiş kefir	47,58	8,25	5,77
Sindirilmiş süt	48,05	40,19	1,20
Sindirilmemiş kefir	31,03	37,96	0,82

4.11. KOMBİNASYONLARIN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

4.11.1. Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HT29 hücrelerine uygulanan 15,6 µg/mL 5-FU, farklı konsantrasyonlardaki SPP (93,75-1500 µg/mL) ve bu iki maddenin kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle değerlendirildi. Tek başına 5-FU uygulaması hücre canlılığını zamanla azaltırken, SPP uygulamalarında da benzer şekilde doza bağlı azalma saptandı. Her iki ajanın birlikte uygulandığı kombinasyon gruplarında ise hücre canlılığı, hem 5-FU'ya hem de SPP'ye göre daha düşük seviyelerde ölçüldü. Yapılan istatistiksel analizlerde, kombinasyon grupları ile karşılaştırılan 5-FU ve SPP tekli uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu (Şekil 4.15 ve Tablo 4.4).



Şekil 4.15: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidart. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. **p < 0,01, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

Tablo 4.4: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi

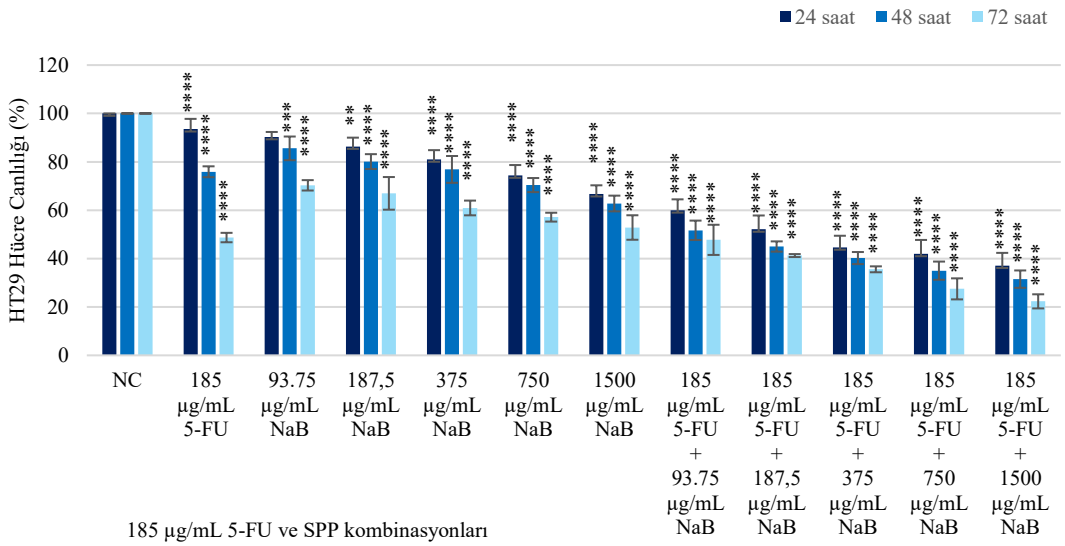
Zaman	24 h		48 h		72 h	
Karşılaştırma	Ortalama farkı	P	Ortalama farkı	P	Ortalama farkı	P
93,75 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 93,75 µg/mL SPP	17,06	**0,0001**	25,62	**<0,0001**	17,74	**<0,0001**
187,5 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	29,05	**<0,0001**	24,48	**<0,0001**	18,59	**<0,0001**
375 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	26,66	**<0,0001**	32,71	**<0,0001**	21,76	**<0,0001**
750 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	29,06	**<0,0001**	30,85	**<0,0001**	22,79	**<0,0001**
1500 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	24,55	**<0,0001**	27,45	**<0,0001**	22,17	**<0,0001**
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 93.75 µg/mL SPP	38,86	**<0,0001**	36,20	**<0,0001**	11,13	0,0557
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	54,80	**<0,0001**	40,51	**<0,0001**	15,31	**0,0010**

Tablo 4.4 (Devam)

15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	57,74	**<0,0001**	51,99	**<0,0001**	24,50	**<0,0001**
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	66,79	**<0,0001**	56,60	**<0,0001**	29,34	**<0,0001**
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	69,97	**<0,0001**	60,82	**<0,0001**	33,00	**<0,0001**

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidrat. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

HT29 hücrelerine 185 µg/mL ile farklı konsantrasyonlarda SPP (93,75-1500 µg/mL) kombinasyonları uygulanarak, hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde değerlendirildi. Kombinasyon gruplarında hücre canlılığı, hem 5-FU'ya hem de SPP'ye kıyasla daha düşük oranlarda ölçüldü. Elde edilen verilere göre, canlılık düzeyindeki azalma hem doza hem de süreye bağlı olarak arttı. Yapılan istatistiksel analizlerde, kombinasyon gruplarının çoğunlukla tekli uygulamalara göre anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlendi (Şekil 4.16 ve Tablo 4.5).



Şekil 4.16: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi

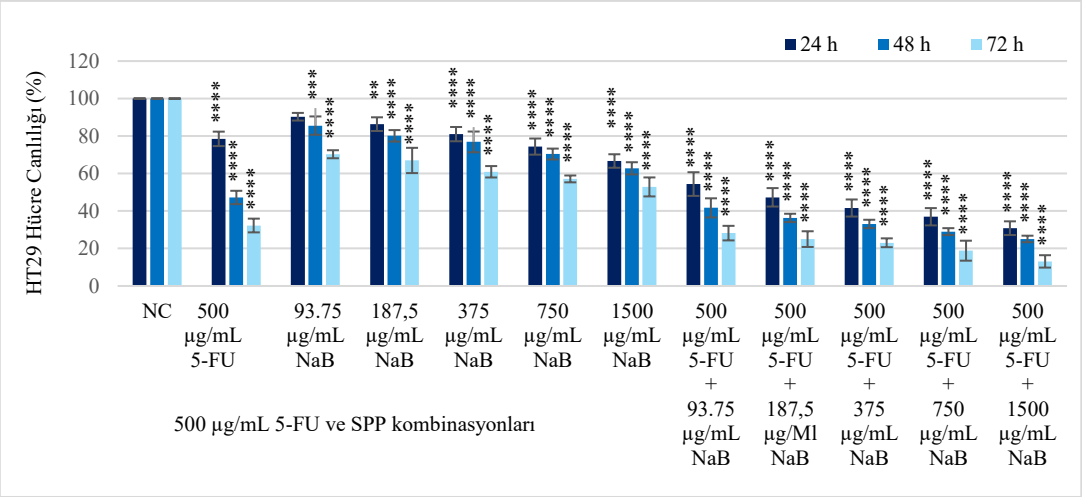
5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidrat. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

Tablo 4.5: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi

Zaman	24 h		48 h		72 h	
Karşılaştırma	Ortalama Farkları	P	Ortalama Farkları	P	Ortalama Farkları	P
93,75 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 93,75 µg/mL SPP	30,30	**<0,0001**	33,87	**<0,0001**	22,54	**<0,0001**
187,5 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	34,25	**<0,0001**	35,12	**<0,0001**	25,72	**<0,0001**
375 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	36,35	**<0,0001**	36,65	**<0,0001**	25,36	**<0,0001**
750 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	32,39	**<0,0001**	35,39	**<0,0001**	29,64	**<0,0001**
1500 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	29,58	**<0,0001**	31,27	**<0,0001**	30,53	**<0,0001**
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 93.75 µg/mL SPP	33,52	**<0,0001**	24,21	**<0,0001**	0,95	>0,9999
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	41,43	**<0,0001**	30,91	**<0,0001**	7,45	0,4194
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	48,85	**<0,0001**	35,68	**<0,0001**	13,13	**0,0037**
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	51,55	**<0,0001**	40,90	**<0,0001**	21,21	**<0,0001**
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	56,42	**<0,0001**	44,39	**<0,0001**	26,37	**<0,0001**

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidrat. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

HT29 hücrelerine 500 µg/mL dozunda 5-FU ve farklı konsantrasyonlardaki SPP (93,75-1500 µg/mL) birlikte uygulanarak hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle değerlendirildi. Kombinasyon uygulamalarında hücre canlılığı, hem 5-FU'ya hem de SPP'ye kıyasla daha düşük düzeylerde ölçüldü. Elde edilen verilere göre, canlılık düzeyindeki azalma hem doza hem de süreye bağlı olarak arttı. Yapılan istatistiksel analizlerde, kombinasyon gruplarının çoğunlukla tekli uygulamalara göre anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlendi (Şekil 4.17 ve Tablo 4.6).



Şekil 4.17: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidrat. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 (NC'ye göre).

Tablo 4.6: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi

Maddeler	Ortalama Farkları	P	Ortalama Farkları	P	Ortalama Farkları	P
93,75 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 93,75 µg/mL SPP	35,92	**<0,0001**	43,89	**<0,0001**	42,09	**<0,0001**
187,5 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	39,04	**<0,0001**	43,80	**<0,0001**	41,96	**<0,0001**
375 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	39,43	**<0,0001**	43,76	**<0,0001**	37,89	**<0,0001**
750 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	37,44	**<0,0001**	41,39	**<0,0001**	38,30	**<0,0001**
1500 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	35,85	**<0,0001**	37,68	**<0,0001**	39,74	**<0,0001**
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 93.75 µg/mL SPP	24,12	**<0,0001**	5,55	0,8144	4,07	0,9743
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	31,20	**<0,0001**	10,91	**0,0326**	7,26	0,4517
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	36,90	**<0,0001**	14,11	**0,0011**	9,22	0,1351

Tablo 4.6 (Devam)

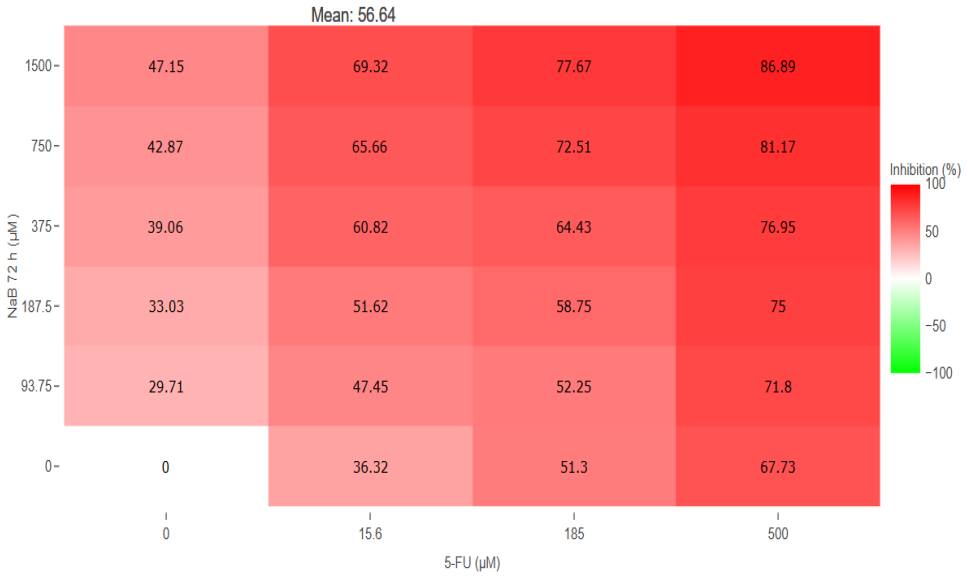
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	41,56	**<0,0001**	18,22	**<0,0001**	13,44	**0,0024**
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	47,66	**<0,0001**	22,13	**<0,0001**	19,15	**<0,0001**

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidrat. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

4.11.2. Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının Sinerjik Etki Analiz Bulguları

5-Fluorourasil ve SPP kombinasyonunun etkileşimleri, SynergyFinder 2.0 platformunda ZIP, Bliss Bağımsızlık Modeli, Loewe Ekleme Modeli ve HSA kullanılarak ve CompuSyn yazılımı ile CI uygulanarak ayrı ayrı değerlendirildi.

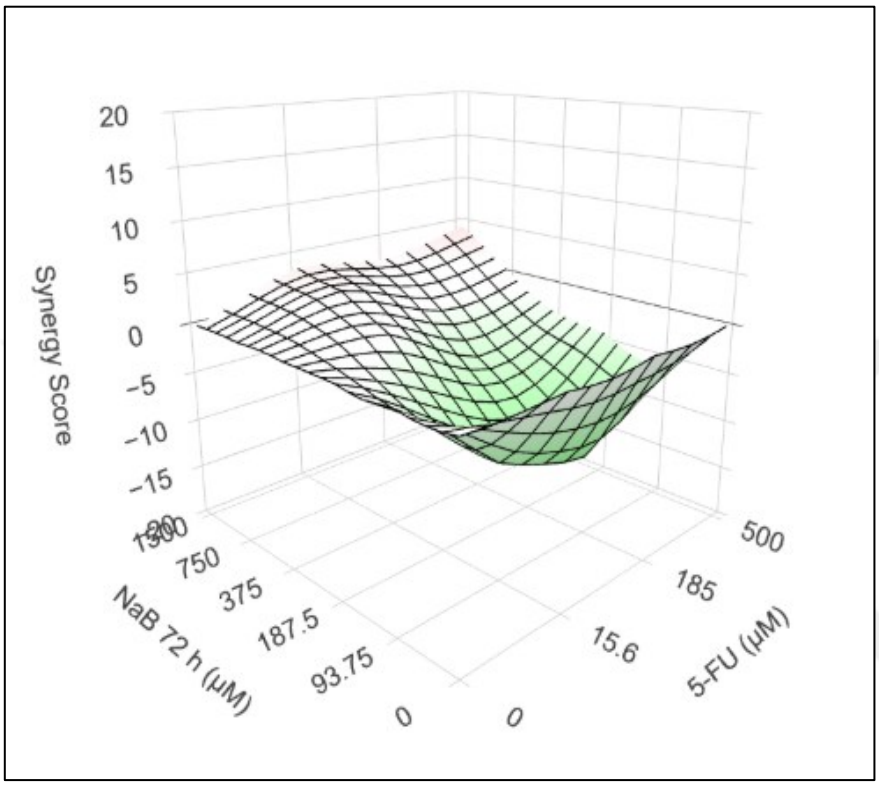
SynergyFinder 2.0 ile oluşturulan doz yanıt matriks ısı haritası incelendiğinde SPP ve 5-FU kombinasyonlarının tüm konsantrasyon düzeylerinde, 72 saatlik sürede HT29 hücre canlılığında ortalama %56,64 inhibisyon etkisi oluşturduğu belirlendi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: Sodyum pentaborat pentahidrat ve 5-Fluorourasil kombinasyonlarının HT29 hücrelerinde 72 saatlik inkübasyon sonrası oluşturduğu inhibisyon etkisi (%) ısı haritası.

5-FU: 5-Fluorourasil, NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat

ZIP modeli temel alınarak yapılan sinerji analizinde, ortalama sinerji skoru -2,79 (p=0,0496) olarak hesaplandı (Şekil 4.19). Bu skor değerlendirildiğinde SPP ile 5-FU'nun kombinasyonlarının bu modele göre additif etki gösterdiği belirledi.

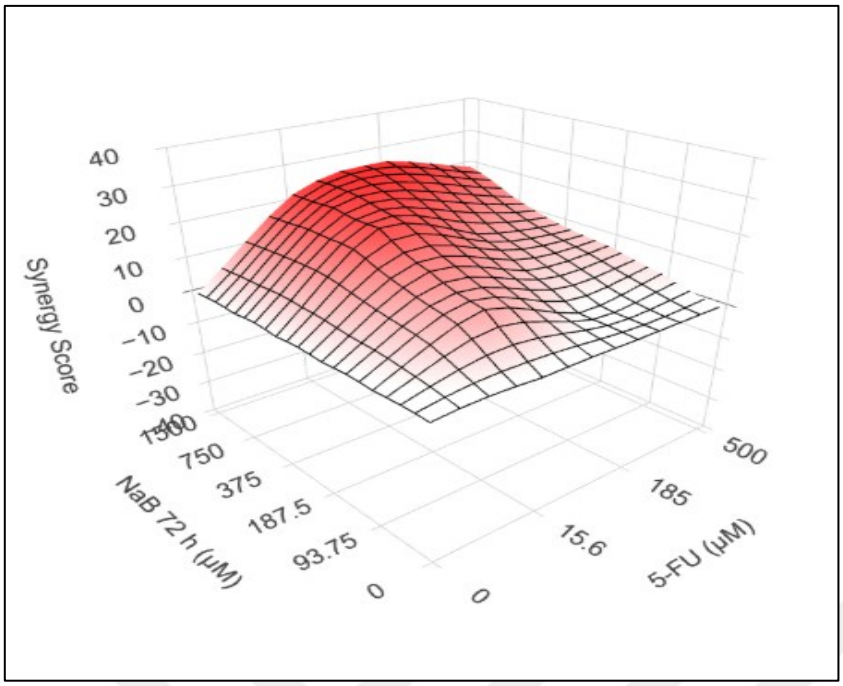


Şekil 4.19: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saatte sıfır etkileşim gücü modeli yüzey grafiği

5-FU: 5-Fluorourasil, NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat

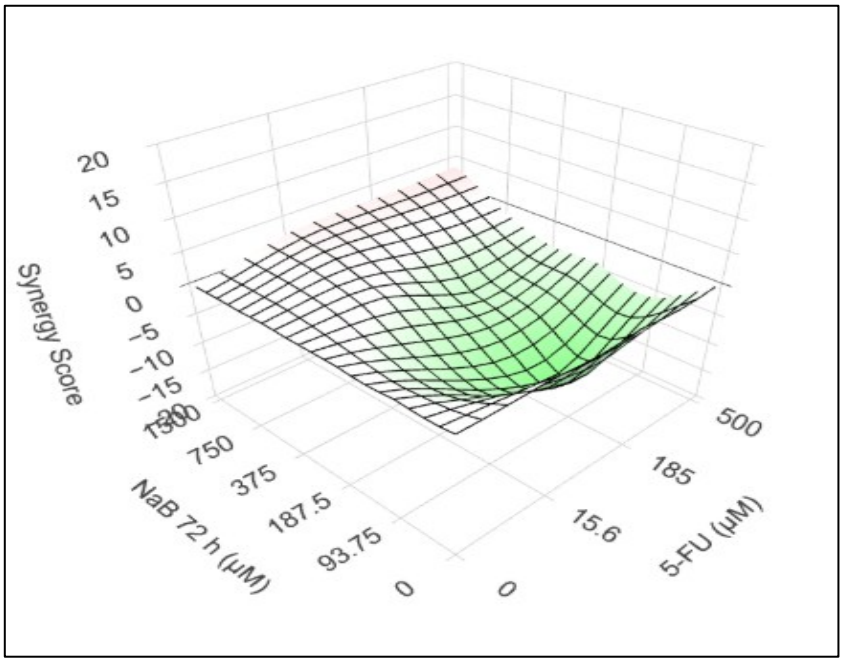
HSA modeli üç boyutlu yüzey grafiği sonuçlarına göre, kombinasyona ait ortalama sinerji skoru 14,36 olarak belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=4,25 \times 10^{-6}$). Üç boyutlu yüzey grafiğinde, sinerji skorlarının özellikle orta düzeydeki doz kombinasyonlarında belirgin şekilde pozitif değerlere ulaştığı ve bu bölgelerde sinerjistik etkinin yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 4.20).

Bliss bağımsızlık modeli kullanılarak oluşturulan üç boyutlu sinerji yüzey grafiği sonuçlarına göre ise kombinasyona ait ortalama sinerji skoru -2,8 olup bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,0516) (Şekil 4.21).



Şekil 4.20: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saatte en etkili tek ajan yüzey grafiği

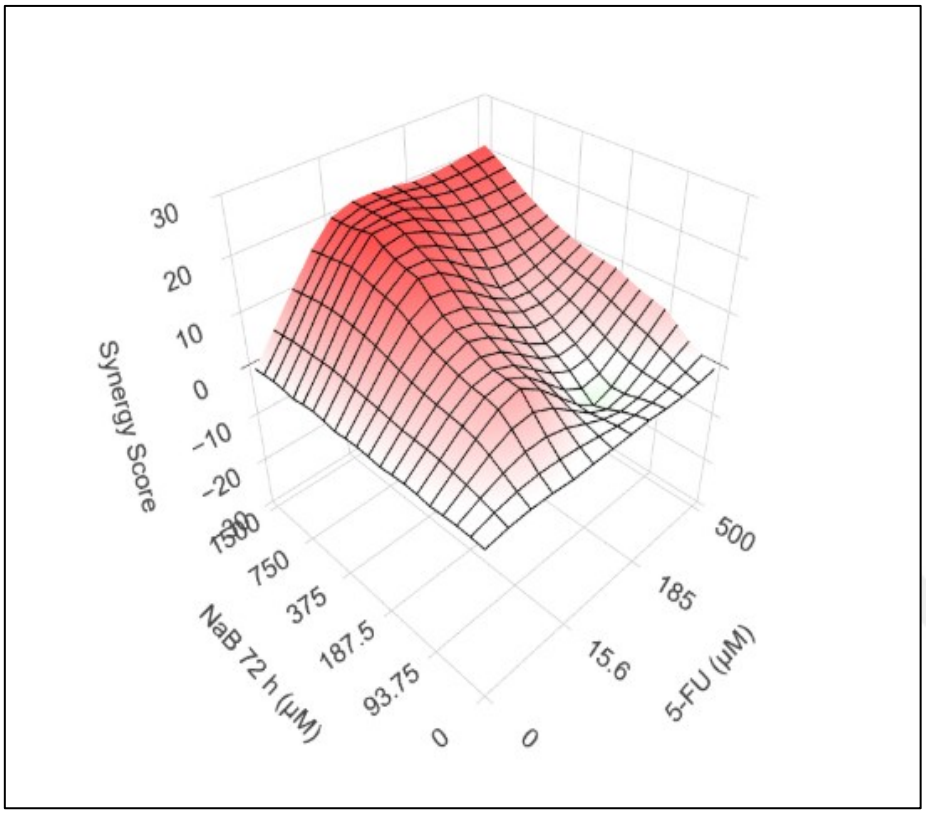
5-FU: 5-Fluorourasil, NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat



Şekil 4.21: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saatte Bliss yüzey grafiği

5-FU: 5-Fluorourasil, NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat

Loewe Ekleme Modeli kullanılarak oluşturulan üç boyutlu sinerji yüzey grafiğine göre, ortalama sinerji skoru 12,86 olarak hesaplandı ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=8,74\times10^{-6}$). Sinerji skorları belirli doz kombinasyonlarında 20 puanın üzerine çıktı (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saat Loewe ekleme modeli yüzey grafiği

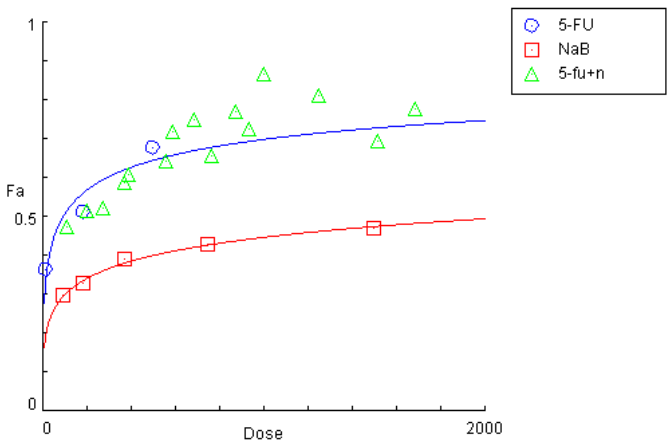
5-FU: 5-Fluorourasil, NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat

HT29 hücrelerine uygulanan 5-FU ve SPP'nin kombinasyonlarının sinerjik etkileri, 72 saatlik inkübasyon sonunda CompuSyn yazılımı kullanılarak hesaplanan CI değerleri ile Tablo 4.7'de sunuldu. 15.6 µg/mL 5-FU ile kombine edilen SPP (93,75 187,5, 375, 750 ve 1500 µg/mL) dozlarında CI değerleri 0,05-0,29 arasında değişti. 185 µg/mL 5-FU ile kombine edilen SPP uygulamalarında CI değerleri 0.07-1,61 aralığında bulundu. 500 µg/mL 5-FU ile kombine edilen SPP kombinasyonlarda ise CI değerleri 0,03 ile 0,39 arasında belirlendi. IC50 SPP (1500 µg/mL) ve IC50 5-FU (185 µg/mL) ile yapılan kombinasyonun etki türünün çok güçlü sinerji olduğu belirlendi.

Tablo 4.7: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat kombinasyonlarının 72. saatte kombinasyon indeksleri

5-FU (µg/mL)	Sodyum pentaborat pentahidrat (µg/mL)	Kombinasyon İndeksi	Etki Türü
15,6	93,75	0,29	Güçlü sinerji
15,6	187,5	0,21	Güçlü sinerji
15,6	375,0	0,08	Çok güçlü sinerji
15,6	750,0	0,06	Çok güçlü sinerji
15,6	1500,0	0,05	Çok güçlü sinerji
185	93,75	1,61	Antagonistik
185	187,5	0,77	Orta sinerji
185	375,0	0,40	Sinerjik
185	750,0	0,14	Güçlü sinerji
185	1500,0	0,07	Çok güçlü sinerji
500	93,75	0,39	Sinerjik
500	187,5	0,24	Güçlü sinerji
500	375,0	0,18	Güçlü sinerji
500	750,0	0,09	Çok güçlü sinerji
500	1500,0	0,03	Çok güçlü sinerji

Doz-tepki eğrisinin analizinde, SPP ve 5-FU'nun kombinasyonu, her doz aralığında tek başına uygulanan SPP'ye kıyasla belirgin şekilde daha yüksek hücre ölüm oranı gösterdi. Ayrıca, çoğu doz noktasında kombinasyon grubu, tek başına uygulanan 5-FU'dan da daha yüksek etki göstererek sinerjistik etki potansiyelini ortaya koydu (Şekil 4.23).

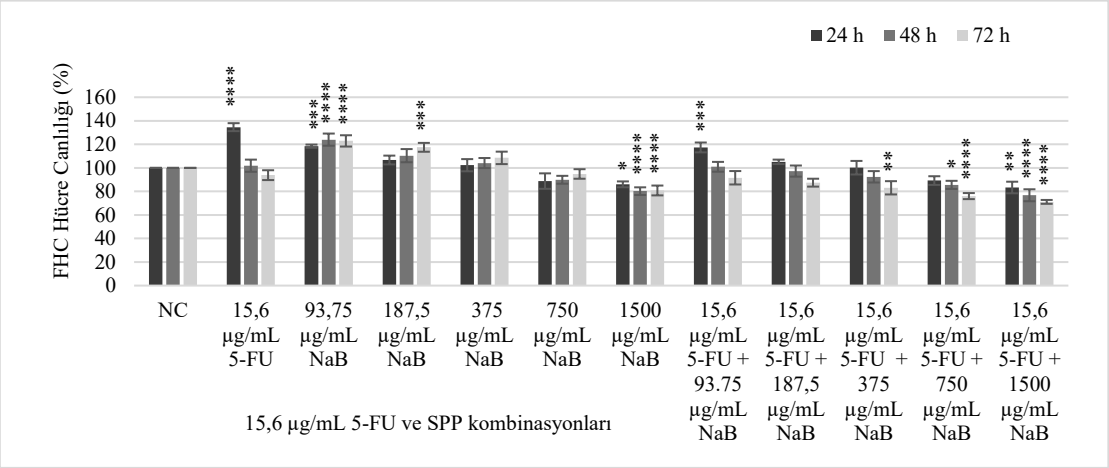


Şekil 4.23: 5-Fluorourasil ve sodyum pentaborat pentahidrat'ın fraksiyon-doz eğrisi.

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum Pentaborat Pentahidrat, 5-fu +n: kombinasyon, Fa: fraksiyon etkisi

4.11.3. Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının FHC Hücreleri Üzerine Etkisi

FHC hücrelerine uygulanan 15.6 µg/mL 5-FU, farklı konsantrasyonlardaki SPP (93,75-1500 µg/mL) ve bu kombinasyonların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresince hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirildi (Şekil 4.24). 24. Saatte 15,6 µg/mL 5-FU ve 93,75 µg/mL SPP kombinasyonu hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla arttırdı ($p<0,0001$). Kombinasyonlar arasında 24. saatte istatistiki olarak ilk anlamlı azalma 15,6 µg/mL 5-FU ile kombinasyondaki en yüksek SPP dozu olan 1500 µg/mL birlikte uygulandığında görüldü ($p=0,0020$). 48. saatte 15,6 µg/mL 5-FU ile 750 ($p=0,0234$) ve 1500 µg/mL SPP ($p<0,0001$) kombinasyonları FHC hücre canlılığını istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azalttı. 72. saatte de bu azalma devam etti ($p<0,0001$). 15,6 µg/mL 5-FU ile 1500 µg/mL SPP birlikte uygulandığında FHC hücre canlılığı %71,11'e düştü.



Şekil 4.24: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidart. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p < 0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

15,6 µg/mL 5-FU ile SPP kombinasyonları, FHC hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda tek başına 15,6 µg/mL 5-FU'ya kıyasla anlamlı düzeyde hücre canlılığını azalttı (Tablo 4.8). Buna karşın, bu kombinasyonların tek başına SPP uygulamalarıyla karşılaştırıldığında farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,9999$). 48 ve 72 saatlik

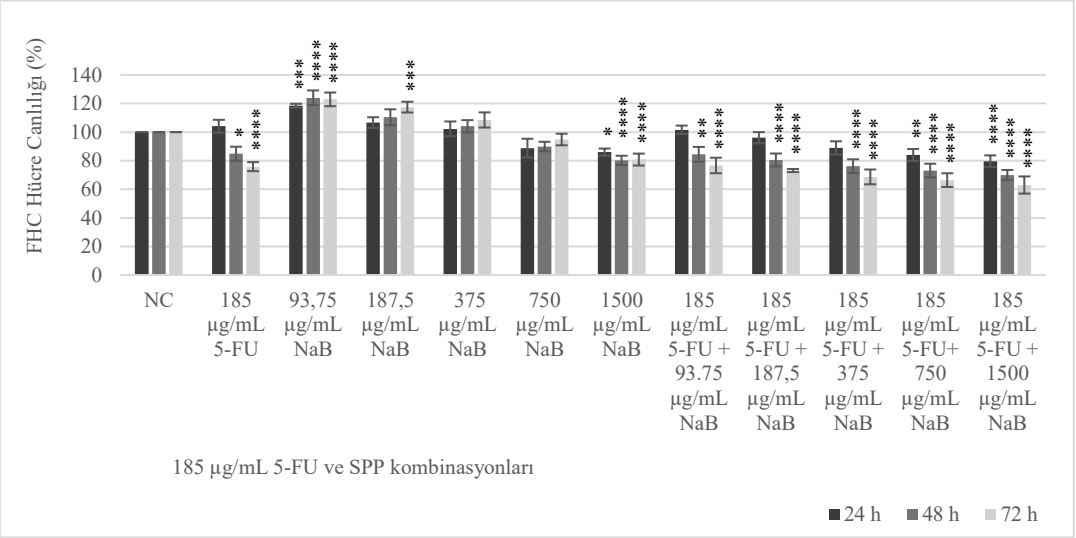
inkübasyonda, FHC hücrelerinde kominasyonlar hem tek başına SPP'ye hem de tek başına 5-FU'ya kıyasla hücre canlılığını azalttı. Bu azalma 48. saatte 15,6 µg/mL 5-FU ile 93,75 µg/mL SPP kombinasyonunda SPP'ye karşı ($p<0,0001$); 15,6 µg/mL 5-FU ile 750 ($p=0,0031$) ve 1500 µg/mL ($p<0,0001$) SPP kombinasyonlarında 5-FU'ya karşı anlamlıydı. 72. saatte ise 1500 µg/mL SPP ile yapılan kombinasyon hariç tüm kombinasyonlar, tek başına SPP'ye göre istatistiksel olarak anlamlı daha düşük hücre canlılığına neden oldu. 15,6 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP ($p=0,0005$) ve 15,6 µg/mL 5-FU+ 1500 µg/mL SPP ($p<0,0001$) kombinasyonları tek başına SPP'ye göre anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azalttı

Tablo 4.8: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

Zaman	**24 h**		**48 h**		**72 h**	
Maddeler	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**
93,75 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 93,75 µg/mL SPP	1,08	>0,9999	23,07	**<0,0001**	31,32	**<0,0001**
187,5 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	1,57	>0,9999	13,10	0,0807	30,03	**<0,0001**
375 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	2,14	>0,9999	11,68	0,2368	25,44	**<0,0001**
750 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	-0,44	>0,9999	4,32	>0,9999	18,80	**0,0001**
1500 µg/mL SPP vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	2,69	>0,9999	3,48	>0,9999	9,69	0,6509
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 93.75 µg/mL SPP	17,21	**0,0010**	0,94	>0,9999	2,23	>0,9999
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	29,47	**<0,0001**	4,57	>0,9999	6,37	0,9972
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	34,44	**<0,0001**	9,44	0,7049	10,75	0,4118
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	45,37	**<0,0001**	16,29	**0,0031**	17,79	**0,0005**
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	51,26	**<0,0001**	25,22	**<0,0001**	22,71	**<0,0001**

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidart. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

FHC hücrelerine uygulanan 185 µg/mL 5-FU ve farklı SPP dozlarının kombinasyonları 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda değerlendirildi. 185 µg/mL 5-FU ve 93,75 µg/mL SPP kombinasyonu 24. saatte kontrol grubuna göre hücre canlılığını artırdı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,9999) (Şekil 4.25). 48. ve 72. saatlerde 185 µg/mL 5-FU ve 93,75, 187,5, 375, 750 ve 1500 µg/mL SPP kombinasyonları hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttı. 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP kombinasyonunda FHC hücre canlılığı, %62,99 düzeyine kadar geriledi.



Şekil 4.25: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidart. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

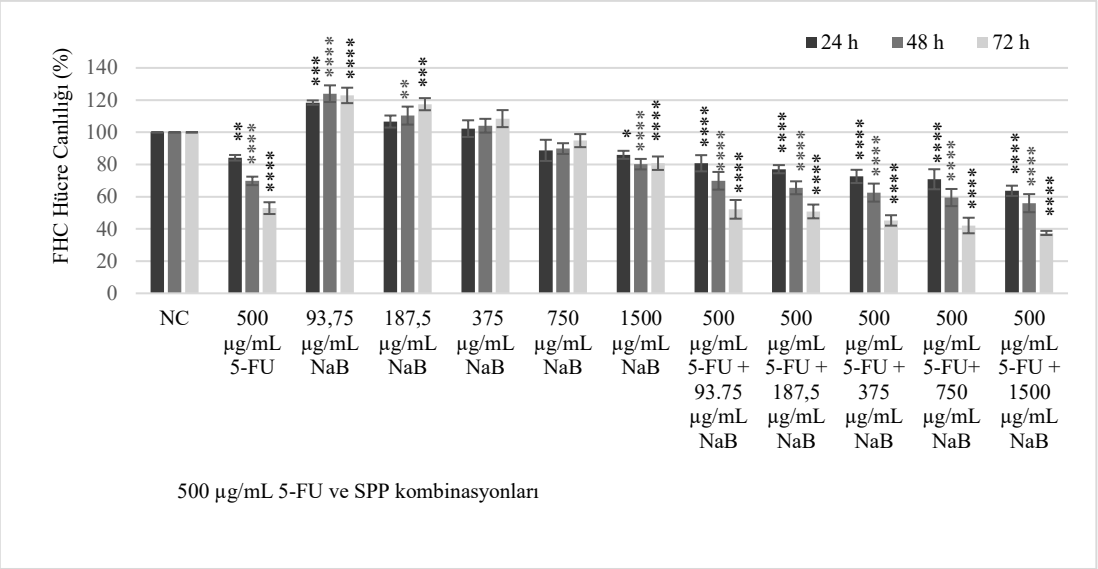
Tablo 4.9'da belirtildiği üzere 93,75, 187,5 ve 375 µg/mL SPP dozları ile 185 µg/mL 5-FU ile olan kombinasyonlar, SPP'nin tekli uygulamalarına kıyasla 24, 48 ve 72 saatlerde hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttı. 750 µg/mL SPP ile bu azalma yalnızca 72. saatte, 1500 µg/mL SPP ile ise 48 ve 72. saatte anlamlı oldu. 185 µg/mL 5-FU'ya kıyasla, 375, 750 ve 1500 µg/mL SPP ile olan kombinasyonlar 24. saatte hücre canlılığını anlamlı olarak düşürdü. 48 saatte yalnızca 750 ve 1500 µg/mL SPP ile oluşturulan kombinasyonlar anlamlı azalma sağlarken 72. saatte ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.

Tablo 4.9: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

Zaman	24 h		48 h		72 h	
Maddeler	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**
93,75 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 93,75 µg/mL SPP	16,86	**0,0016**	39,55	**<0,0001**	46,25	**<0,0001**
187,5 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	10,62	**0,4392**	29,87	**<0,0001**	44,35	**<0,0001**
375 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	13,29	**0,0685**	27,91	**<0,0001**	39,85	**<0,0001**
750 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	4,720	>0,9999	16,81	**0,0017**	28,42	**<0,0001**
1500 µg/mL SPP vs. 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	6,35	0,9973	10,28	0,5170	17,82	**0,0005**
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 93.75 µg/mL SPP	2,51	>0,9999	0,42	>0,9999	-0,82	>0,9999
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	8,04	0,9294	4,34	>0,9999	2,72	>0,9999
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	15,11	**0,0116**	8,67	0,8502	7,18	0,9824
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	20,04	**<0,0001**	11,77	**0,2229**	9,43	0,7084
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	24,44	**<0,0001**	14,91	**0,0143**	12,86	0,0987

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidart. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

FHC hücrelerine 500 µg/mL 5-FU ve farklı konsantrasyonlardaki SPP ile kombinasyonları 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde uygulandı. Kombinasyon gruplarında hücre canlılığı, her üç zaman noktasında kontrole kıyasla daha düşük düzeylerde ölçüldü. 500 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP kombinasyonunda FHC hücre canlılığı %37,50 düzeyine kadar geriledi (Şekil 4.26). Tablo 4.10'da görüldüğü üzere 500 µg/mL 5-FU ile SPP kombinasyonları, tek başına SPP ile karşılaştırıldığında tüm zaman noktalarında istatistiksel olarak anlamlı canlılık azalması gösterdi. 5-FU ile karşılaştırıldığında, 24. ve 72. saatte 750 ve 1500 µg/mL ve 48. saatte ise 187,5, 375, 750 ve 1500 SPP ile kombinasyonlarda istatistiksel olarak daha düşük hücre canlılığı görüldü.



Şekil 4.26: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidart. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

Tablo 4.10: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sodyum pentaborat pentahidrat dozlarının kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

Zaman	**24 h**		**48 h**		**72 h**	
Maddeler	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**
93,75 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 93,75 µg/mL SPP	37,69	**<0,0001**	54,09	**<0,0001**	70,75	**<0,0001**
187,5 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	29,59	**<0,0001**	46,84	**<0,0001**	41,96	**<0,0001**
375 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	29,68	**<0,0001**	41,55	**<0,0001**	63,24	**<0,0001**
750 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 750 µg/mL SPP	17,93	**0,0004**	30,40	**<0,0001**	52,72	**<0,0001**
1500 µg/mL SPP vs. 500 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP	22,34	**<0,0001**	24,22	**<0,0001**	43,30	**<0,0001**
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 93.75 µg/mL SPP	3,417	>0,9999	5,550	0,8144	0,74	>0,9999
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	7,087	0,9855	10,91	**0,0326**	2,05	>0,9999

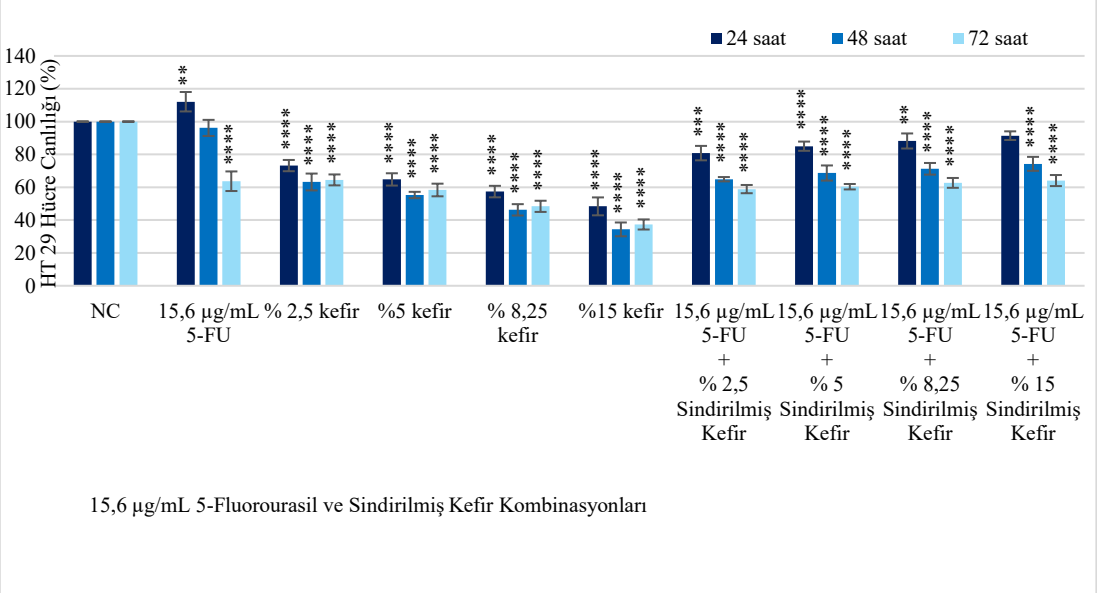
Tablo 4.10 (devam)

500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 93.75 µg/mL SPP	11,582	0,2534	14,11	**0,0011**	7,63	0,9611
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 187,5 µg/mL SPP	13,34	**0,0656**	18,22	**<0,0001**	10,79	**0,4040**
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + 375 µg/mL SPP	20,51	**<0,0001**	22,13	**<0,0001**	15,40	**0,0085**

5-FU: 5-Fluorourasil, SPP: Sodyum pentaborat pentahidart. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

4.11.4. Sindirilmiş Kefir Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının HT29 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HT29 hücrelerine uygulanan 15,6 µg/mL 5-FU, sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirildi. Tüm kombinasyonlar tüm zaman noktalarında kontrole göre HT29 hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttı (Şekil 4.27).



Şekil 4.27: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi

5-FU: 5-Fluorourasil. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

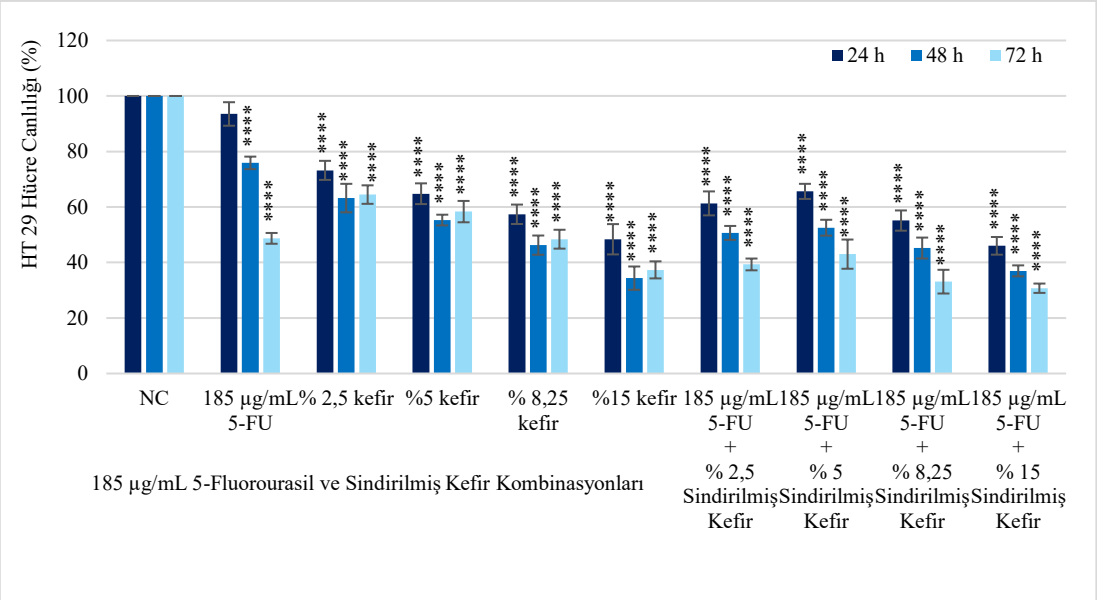
15,6 µg/mL 5-FU ile farklı oranlarda sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde tüm kombinasyonların 5-FU'ya kıyasla hücre canlılığını azalttığı belirlendi ($p<0,0001$). Ancak 72 saatlik inkübasyon sonunda gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlılığını yitirdi ($p>0,9$) ve ortalama farklar belirgin şekilde azaldı. Yalnızca sindirilmiş kefir ile 15,6 µg/mL 5-FU + sindirilmiş kefir kombinasyonlarının karşılaştırıldığı analizde, %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonu hariç diğer kombinasyonlarda anlamlı farklılıklar gözlemlendi. %5, %8,25 ve %15 sindirilmiş kefir içeren kombinasyonlar, tek başına kefire kıyasla 24 ve 48 saatte anlamlı düzeyde daha fazla hücre canlılığı azalmasına neden oldu ($p<0,0001$). 72 saat sonunda yalnızca %8,25 ($p=0,0003$) ve %15 ($p<0,0001$) kefir kombinasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar sürerken; %2,5 ve %5 kefir gruplarında anlamlılık kayboldu ($p>0,9$).

Tablo 4.11: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkilerinin karşılaştırılması

Zaman	**24 h**		**48 h**		**72 h**	
Maddeler	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	31,29	**<0,0001**	31,24	**<0,0001**	4,797	0,9786
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	27,08	**<0,0001**	27,48	**<0,0001**	3,333	0,9998
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	23,91	**<0,0001**	24,9	**<0,0001**	1,01	>0,9999
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	20,67	**<0,0001**	21,89	**<0,0001**	-0,41	>0,9999
%2,5 sindirilmiş kefir vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	-7,61	0,4632	-1,69	>0,9999	5,60	0,9112
%5 sindirilmiş kefir vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	-20,23	**<0,0001**	-13,37	0,0012	-2,01	>0,9999
%8,25 sindirilmiş kefir vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	-30,81	**<0,0001**	-24,99	**<0,0001**	-14,27	**0,0003**
%15 sindirilmiş kefir vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	-43,06	**<0,0001**	-39,90	**<0,0001**	-26,74	**<0,0001**

5-FU: 5-Fluorourasil. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

HT29 hücrelerine uygulanan 185 µg/mL 5-FU, sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirildi. Tüm kombinasyonlar tüm zaman noktalarında kontrole göre HT29 hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi

Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

185 µg/mL 5-FU ile farklı oranlarda sindirilmiş kefir kombinasyonlarının etkileri incelendiğinde (Tablo 4.12), 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde tüm kefir oranlarında kombinasyonlar, yalnızca 5-FU'ya kıyasla anlamlı düzeyde hücre canlılığı azalmasına yol açtı (p<0,0001). 72 saatlik inkübasyonda ise yalnızca %8,25 ve %15 kefir gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar sürdü (p<0,0001). Buna karşılık, %2,5 ve %5 kefir kombinasyonlarında 72. saatte anlamlılık kayboldu (p>0,1). %2,5 sindirilmiş kefir ile 185 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonu karşılaştırıldığında; kombinasyon uygulamasında 24. saatte (p=0,0084), 48. saatte (p=0,0036) ve 72. saatte (p<0,0001) hücre canlılığı, tek başına kefir uygulamasına göre istatistiksel olarak daha az bulundu. Buna karşılık, %5, %8,25 ve %15 sindirilmiş kefir ile yapılan kombinasyonlar, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde tek başına sindirilmiş kefir ile karşılaştırıldığında

hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark oluşturmadı (p>0,9999). 72. saatte ise %5 (p<0,0001) ve %8,25 (p<0,0001) ile yapılan sindirilmiş kefir kombinasyonlarında tek başına sindirilmiş kefir uygulamasına göre hücre canlılığında anlamlı azalmalar gözlenirken, %15 sindirilmiş kefir kombinasyonunda ise anlamlı bir değişiklik saptanmadı (p=0,7186).

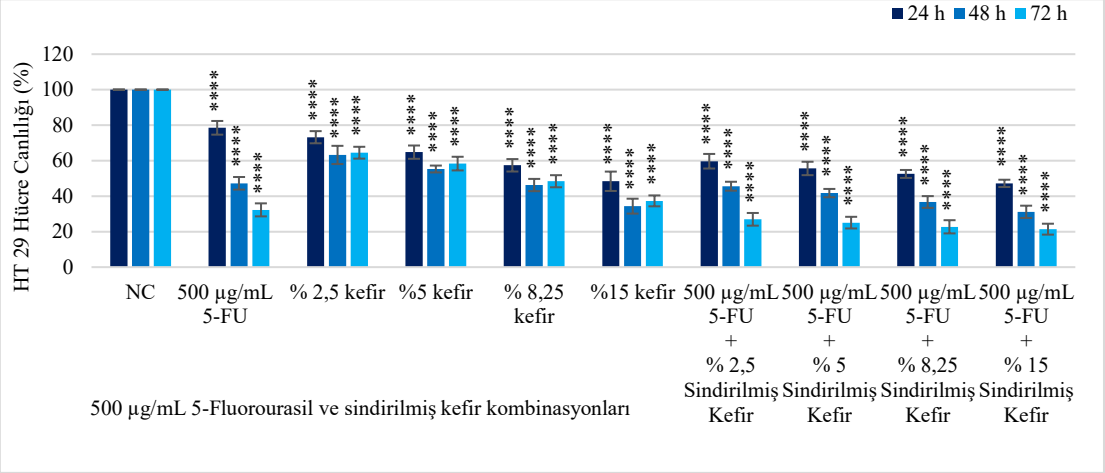
Tablo 4.12: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisinin karşılaştırılması

Zaman	**24 h**		**48 h**		**72 h**	
Maddeler	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	32,22	**<0,0001**	25,24	**<0,0001**	9,39	0,1258
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	27,90	**<0,0001**	23,37	**<0,0001**	5,69	0,8990
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	38,42	**<0,0001**	30,69	**<0,0001**	15,60	**<0,0001**
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	47,52	**<0,0001**	38,91	**<0,0001**	17,97	**<0,0001**
%2,5 sindirilmiş kefir vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	11,90	**0,0084**	12,56	**0,0036**	25,17	**<0,0001**
%5 sindirilmiş kefir vs. 185 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	-0,84	>0,9999	2,76	>0,9999	15,33	**<0,0001**
%8,25 sindirilmiş kefir vs. 185 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	2,27	>0,9999	1,04	>0,9999	15,29	**<0,0001**
%15 sindirilmiş kefir vs. 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	2,37	>0,9999	-2,63	>0,9999	6,61	0,7186

5-FU: 5-Fluorourasil. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

HT29 hücrelerine uygulanan 500 µg/mL 5-FU, sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirildi. Tüm kombinasyonlar tüm zaman noktalarında kontrole göre HT29 hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttı (Şekil 4.29). Tek başına 500 µg/mL 5-FU ve %2,5 sindirilmiş kefir 72. saatte HT29 hücre canlılığını sırasıyla %32,27 ve %64,48'e; (p<0,0001) bu ikisinin kombinasyonu ise %26,95'e azalttı (p<0,0001). Tek başına %15 sindirilmiş kefir 72. saatte hücre canlılığını %37,34'e (p<0,0001) düşürürken 5-FU ile kombinasyonu %21,39'a düşürdü (p<0,0001).

Şekil 4.29: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi



5-FU: 5-Fluorourasil. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

500 µg/mL 5-FU ile farklı oranlarda sindirilmiş kefir kombinasyonları karşılaştırıldığında (Tablo 4.13), 24 saatte tüm kefir konsantrasyonları ile yapılan kombinasyonlar, yalnızca 5-FU uygulamasına kıyasla HT29 hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı (p<0,0001). 48 saatlik inkübasyonda ise %8,25 (p=0,0416) ve %15 (p<0,0001) kefir kombinasyonlarında bu anlamlı azalma devam etti. Buna karşılık, %2,5 (p>0,9999) ve %5 (p=0,9223) kefir kombinasyonlarında bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. 72 saatlik inkübasyonda yalnızca %15 kefir kombinasyonu, tek başına %15 sindirilmiş kefire göre anlamlı düzeyde hücre canlılığını azalttı (p=0,0281); diğer kefir kombinasyonlarında ise anlamlı bir farklılık gözlenmedi. %2,5 sindirilmiş kefir ile 500 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonu karşılaştırıldığında, kombinasyon uygulamasında hücre canlılığı; 24. saatte (p = 0,0010), 48. saatte (p<0,0001) ve 72. saatte (p<0,0001) tek başına kefir uygulamasına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük bulundu. Buna karşılık, %5, %8,25 ve %15 oranlarındaki sindirilmiş kefir ile yapılan kombinasyonlar, 24 saatte tek başına kefir ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadı (sırasıyla p=0,1508, p=0,9752, p>0,9999). 48. saatte ise tüm kombinasyonlar daha düşük hücre canlılığına neden oldu. Ancak bunların arasında yukarıda belirtilen %2,5 sindirilmiş kefirin haricinde %5 sindirilmiş kefir kombinasyonunda anlamlı bir fark gözlendi (p=0,0009), diğerlerinde

ise anlamlılık saptanmadı (p>0,1). 72. saatte ise tüm kombinasyonlarda tek başına sindirilmiş kefir uygulamasına göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlendi (p<0,0001).

Tablo 4.13: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerine etkisi

Zaman	24 h		48 h		72 h	
Maddeler	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	18,82	**<0,0001**	1,63	>0,9999	5,31	0,9430
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	22,90	**<0,0001**	5,51	0,9223	7,19	0,5716
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	25,99	**<0,0001**	10,52	**0,0416**	9,54	0,1105
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	31,31	**<0,0001**	16,07	**<0,0001**	10,88	**0,0281**
%2,5 sindirilmiş kefir vs. 500 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	13,53	**0,0010**	17,62	**<0,0001**	37,53	**<0,0001**
%5 sindirilmiş kefir vs. 500 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	9,19	0,1508	13,58	**0,0009**	33,26	**<0,0001**
%8,25 sindirilmiş kefir vs. 500 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	4,87	0,9752	9,55	0,1091	25,67	**<0,0001**
%15 sindirilmiş kefir vs. 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	1,18	>0,9999	3,21	0,9999	15,95	**<0,0001**

5-FU: 5-Fluorourasil. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

Sindirilmiş kefir ve 5-FU kombinasyonlarının HT29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında; 24 saatlik inkübasyonda, 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir; 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla %10,62 daha fazla hücre canlılığına neden oldu (p = 0,0373) (Tablo 4.14). Ancak 48 ve 72. saatte bu anlamlı fark ortadan kalktı. 24 saatlik inkübasyonda, 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir; %5 ve %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonlarına göre sırasıyla %19,62 (p<0,0001) ve %15,3 (p=0,0005) daha düşük hücre canlılığı gösterdi. 185 µg/mL 5-FU ve %8,25 sindirilmiş kefirle olan kombinasyon, %5 sindirilmiş kefir ile olan kombinasyona kıyasla da hücre canlılığını %10,52 (p=0,0415) farkla azalttı. 48 saatlik inkübasyonda, 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonu; %5 ve 2,5 sindirilmiş kefir

kombinasyonlarına göre HT29 hücre canlılığını %13,67 (p=0,0008) ve %15,55 (p<0,0001) farkla azalttı. 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonu; %5 ve 2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonlarına göre HT29 hücre canlılığını %15,55 (p=0,0395) ve %14,44 (p=0,0003) farkla daha çok azalttı. 72 saat sonunda, 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir, %2,5 sindirilmiş kefir ile olan kombinasyon göre %12,28'lik daha düşük hücre canlılığına neden oldu (p=0,0052). Diğer kombinasyonlar arasında gözlenen hücre canlılığı farkları istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05).

Tablo 4.14: Sindirilmiş kefir ve 5-Fluorourasil kombinasyonlarının tüm inkübasyon zamanlarında HT29 hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

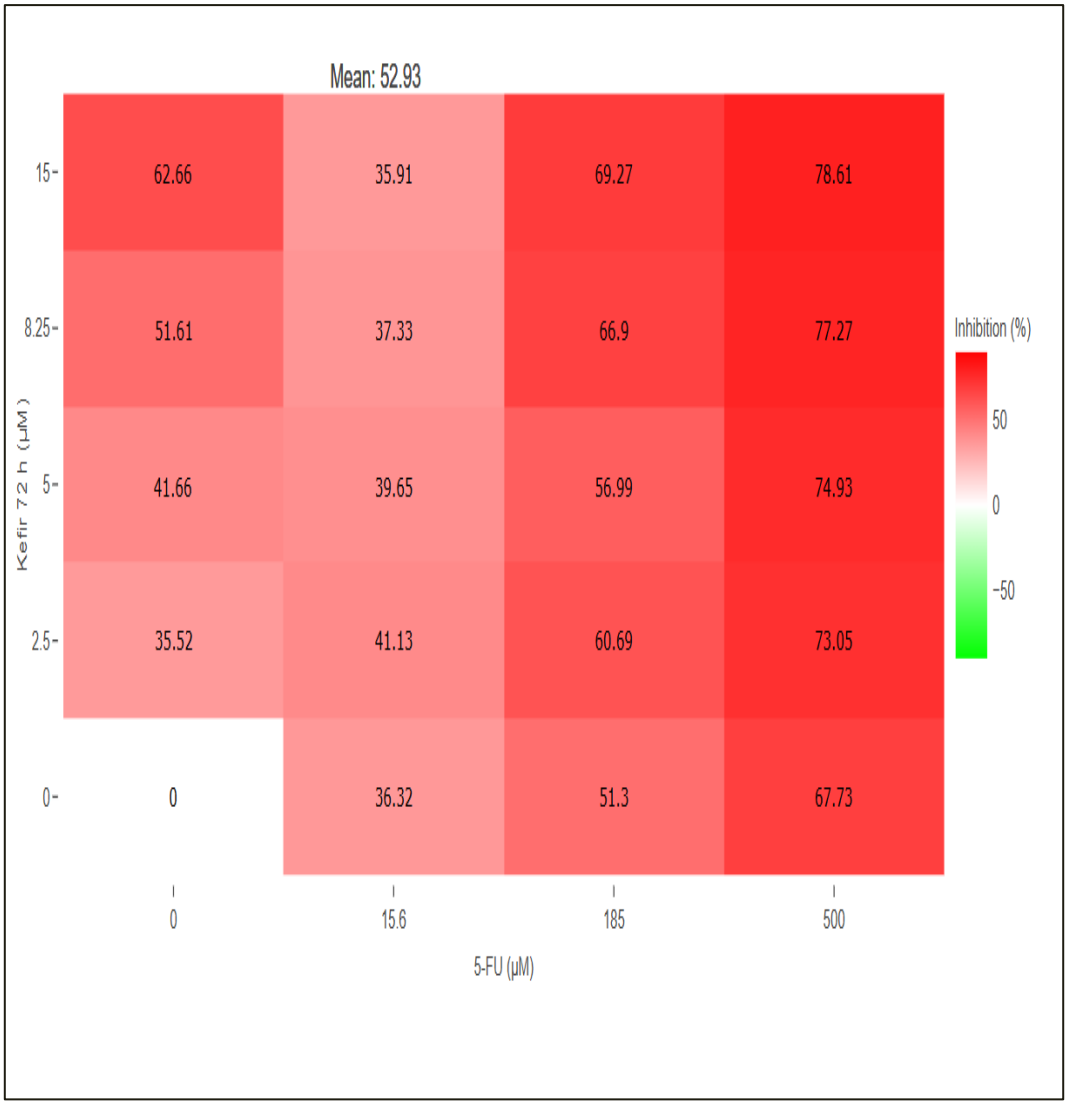
Zaman Noktaları	**24 saat**		**48 saat**		**72 saat**	
Kombinasyonlar	**Ortalama Farkı**	**P**	**Ortalama Farkı**	**P**	**Ortalama Farkı**	**P**
15,6 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 SK	3,24	0,9998	3,01	>0,9999	1,42	>0,9999
15,6 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %5 SK	6,41	0,7658	5,58	0,9129	3,74	0,9989
15,6 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	10,62	**0,0373**	9,35	0,1311	5,20	0,9528
15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %5 SK	3,17	0,9999	2,57	>0,9999	2,32	>0,9999
15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	7,38	0,5217	6,34	0,7813	3,79	0,9987
15,6 µg/mL 5-FU +%5 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	4,21	0,9950	3,76	0,9988	1,46	>0,9999
185 µg/mL 5-FU +%15 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %8,25 SK	-9,10	0,1619	-8,23	0,3163	-2,37	>0,9999
185 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %5 SK	-19,62	**<0,0001**	-15,55	**<0,0001**	-12,28	**0,0052**
185 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-15,30	**<0,0001**	-13,67	**0,0008**	-8,58	0,2464
185 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %5 SK	-10,52	**0,0415**	-7,32	0,5375	-9,91	0,0775
185 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-6,20	0,8113	-5,44	0,9296	-6,20	0,8100
185 µg/mL 5-FU + %5 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	4,32	0,9932	1,88	>0,9999	3,71	0,9990
500 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %8,25 SK	-5,32	0,9426	-5,56	0,9162	-1,34	>0,9999
500 µg/mL 5-FU +%15 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %5 SK	-8,41	0,2790	-10,57	**0,0395**	-3,69	0,9991
500 µg/mL 5-FU +%15 SK vs. 5500 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-12,48	**0,0040**	-14,44	**0,0003**	-5,56	0,9154
500 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %5 SK	-3,09	>0,9999	-5,01	0,9670	-2,35	>0,9999
500 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-7,17	0,5777	-8,89	0,1936	-4,22	0,9948
500 µg/mL 5-FU + %5 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-4,08	0,9966	-3,88	0,9982	-1,88	>0,9999

5-FU: 5-Fluorourasil. SK: Sindirilmiş kefir. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

4.11.5. Sindirilmiş Kefir Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının Sinerjik Etki Analiz Bulguları

5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonunun etkileşimleri, SynergyFinder 2.0 platformunda ZIP, Bliss Bağımsızlık Modeli, Loewe Ekleme Modeli

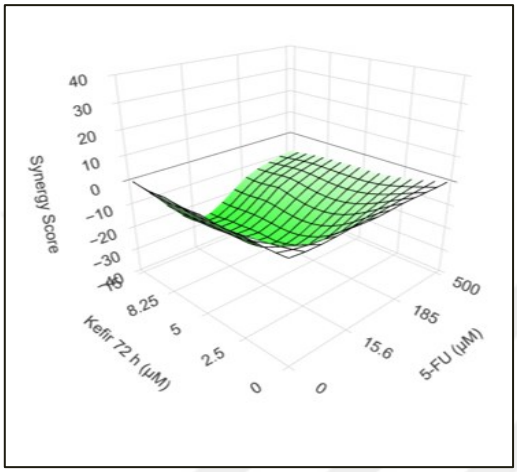
ve HSA kullanılarak ve CompuSyn yazılımı ile CI belirlenerek değerlendirildi. SynergyFinder 2.0 ile oluşturulan doz yanıt matriks ısı haritası incelendiğinde sindirilmiş kefir ve 5-FU kombinasyonlarının tüm konsantrasyon düzeylerinde, 72 saatlik sürede HT29 hücre canlılığında ortalama %52,93 inhibisyon etkisi oluşturduğu belirlendi (Şekil 4.30).



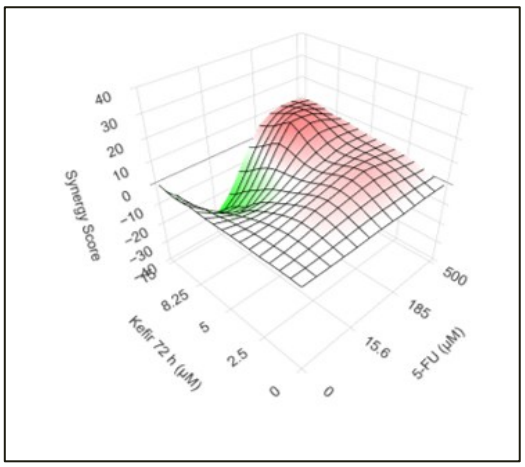
Şekil 4.30: Sindirilmiş kefir ve 5-Fluorourasil kombinasyonlarının HT29 hücrelerinde 72 saatte oluşturduğu inhibisyon etkisi (%) ısı haritası.

ZIP modeli temel alınarak yapılan sinerji analizinde, ortalama sinerji skoru -13,83 olarak belirlendi (Şekil 4.31). Belirlenen bu değer 5-FU ve sindirilmiş kefir

kombinasyonunun genel olarak antagonistik etki gösterdiğini ortaya koydu ve bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=4,81e^{-05}$). HSA modeline göre ise 5-FU ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, ortalama sinerji skoru 2,64 olarak hesaplandı, bu skor additif sınırlar içinde kaldı ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,457) (Şekil 4.32).

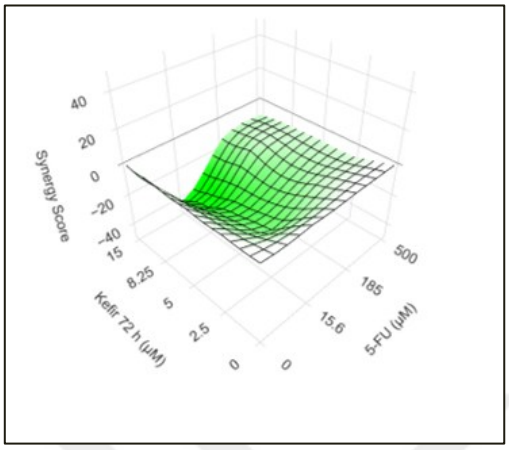


Şekil 4.31: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının 72. saatte sıfır etkileşim gücü yüzey grafiği



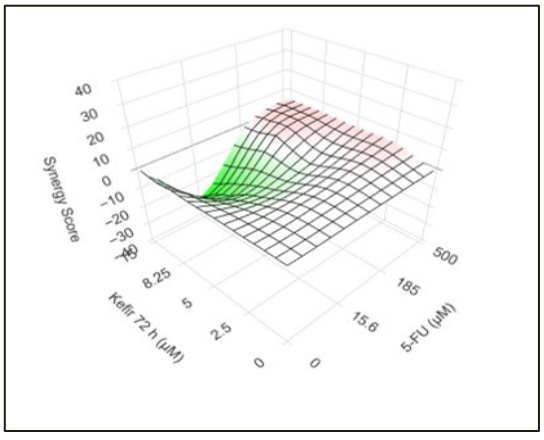
Şekil 4.32: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının 72. saatte en etkili tek ajan yüzey grafiği

Bliss modeline göre ortalama sinerji skoru -15,55 belirlendi (Şekil 4.33). Bu değer kombinasyonun genel olarak antagonistik etki gösterdiğini ortaya koydu ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 4{,}75e^{-4}$).



Şekil 4.33: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının 72. saatte Bliss yüzey grafiği

Loewe Ekleme Modeli kullanılarak oluşturulan üç boyutlu sinerji yüzey grafiğine göre, 5-FU ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının HT29 hücreleri üzerindeki sinerji skoru -1,89 olarak belirlendi, bu değer additif sınırlar içinde kaldı ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,546) (Şekil 4.34).

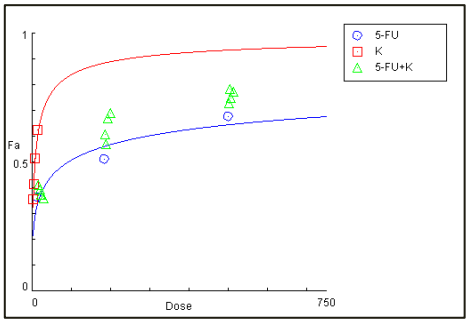


Şekil 4.34: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının Loewe ekleme modeli yüzey grafiği

HT29 hücrelerine uygulanan 5-FU ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının sinerjik etkileri, 72 saatlik inkübasyon sonunda başka bir yazılım olan CompuSyn kullanılarak da değerlendirildi. Hesaplanan CI değerleri ile Tablo 4.15'te sunuldu. 15,6 µg/mL 5-FU ile tüm sindirilmiş kefir kombinasyonlarında CI değerleri 1'in üzerindeydi. 15,6 µg/mL 5-FU ile %15 sindirilmiş kefir en yüksek CI skorunu verdi ve çok güçlü antagonist etki gösterdi. 185 µg/mL 5-FU ile %5 sindirilmiş kefir kombinasyonunda CI değeri 1,36 iken %5, 8,25 ve 15 ile olan kombinasyonlarda 1'in altındaydı. 500 µg/mL 5-FU içeren sindirilmiş kefir kombinasyonlarda ise tüm CI değerleri 1'in altındaydı. Şekil 4.35'te sunulan doz-tepki eğrisine göre, 5-FU ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının fraksiyon etki değerleri, yalnızca kefir uygulamasına göre daha düşük ancak 5-FU uygulamasına göre çoğunlukla daha yüksek belirlendi.

Tablo 4.15: 5-Fluorourasil ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının 72. saatte kombinasyon indeksleri

5-Fluorourasil (µg/mL)	Sindirilmiş Kefir (%)	Kombinasyon İndeksi	Etki Türü
15,6	2,5	1,09	Additif
15,6	5,0	1,92	Antagonist
15,6	8,25	3,35	Güçlü antagonist
15,6	15,0	6,10	Çok güçlü antagonist etki
185,0	2,5	0,76	Orta sinerjik etki
185,0	5,0	1,36	Antagonist etki
185,0	8,25	0,65	Sinerjik etki
185,0	15,0	0,77	Orta sinerjik etki
500,0	2,5	0,39	Sinerjik etki
500,0	5,0	0,22	Güçlü Sinerjik etki
500,0	8,25	0,45	Sinerjik etki
500,0	15,0	0,47	Sinerjik etki

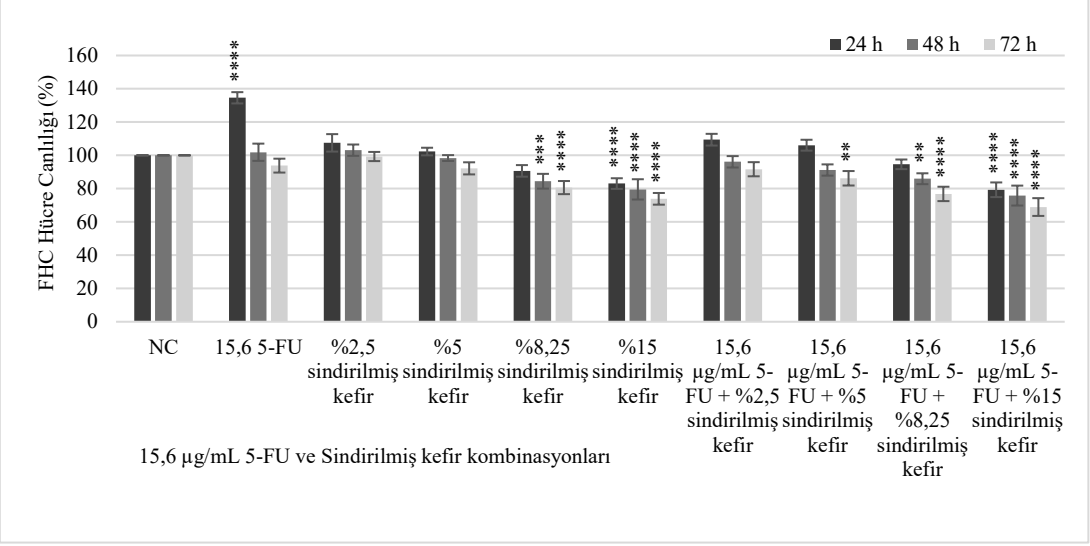


Şekil 4.35: Sindirilmiş kefir ve 5-Fluorourasil kombinasyonlarının fraksiyon-doz eğrisi

5-FU: 5-Fluorourasil, K: Sindirilmiş Kefir, 5-FU + K: kombinasyon, Fa: fraksiyon etkisi

4.11.6. Sindirilmiş Kefir Ve 5-Fluorourasil Kombinasyonlarının FHC Hücreleri Üzerine Etkisi

15,6 µg/mL 5-FU ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, tek başına 15,6 µg/mL 5-FU uygulaması, özellikle 24 saatlik inkübasyonda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde hücre canlılığını arttırdı ($p<0,0001$), ancak bu proliferatif etki 72 saatte azaldı (Şekil 4.36). 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma %15 sindirilmiş kefir ve 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonunda görüldü. 48. saatte ise hücre canlılığında azalma %8,25, %15 sindirilmiş kefir, 15,6 µg/mL 5-FU ile beraber %8,25 ve %15 kombinasyonlarında görüldü. 72. saatte de bunlara ek olarak 15,6 µg/mL 5-FU ile %5 sindirilmiş kefir kombinasyonunda da hücre canlılığı istatistiksel olarak azaldı. Genel olarak bakıldığında 15,6 µg/mL 5-FU ile %2,5 kefir kombinasyonu hücre canlılığını önemli ölçüde değiştirmezken %5, %8,25 ve %15 kefir ve bunların 15,6 µg/mL 5-FU ile kombinasyonları hücre canlılığını kontrol grubuna göre azalttı. 15,6 µg/mL 5-FU + %15 kefir kombinasyonu, 72. saatte FHC hücre canlılığını %68,94'e kadar azalttı ($p<0,0001$).



Şekil 4.36: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

5-FU: 5-Fluorourasil. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapılmıştır. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

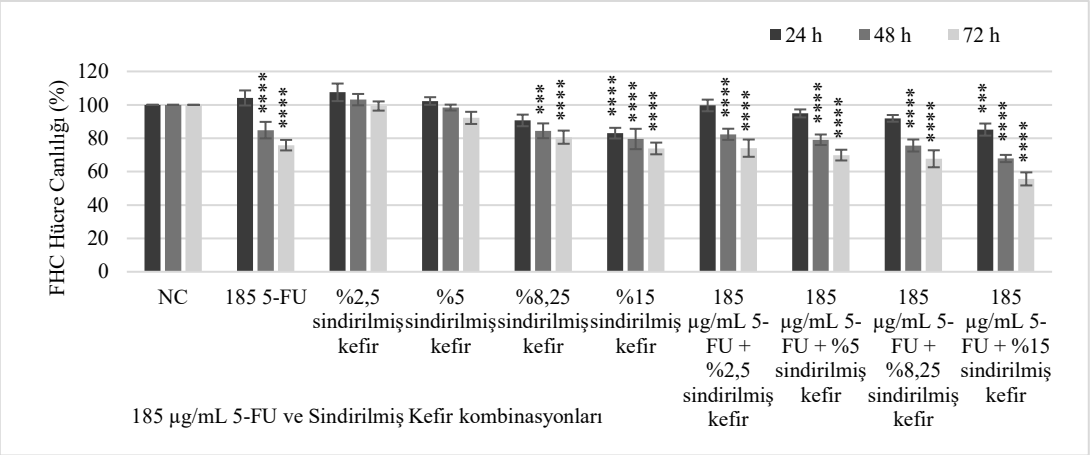
15,6 µg/mL 5-FU ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkileri karşılaştırıldığında, 24 saatlik inkübasyonda, FHC hücrelerine tek başına uygulanan 15,6 µg/mL 5-FU; %2,5 sindirilmiş kefir ile kombinasyonuna göre %25,19, %5 sindirilmiş kefire göre %28,49, %8,25 sindirilmiş kefire göre %39,99 ve %15 sindirilmiş kefire göre ise %55,28 daha yüksek hücre canlılığı gösterdi (p<0,0001) (Tablo 4.16). 48 saatlik inkübasyonda, 15,6 µg/mL 5-FU; %8,25 ve %15 sindirilmiş kefir ile olan kombinasyonlara göre sırasıyla %15,92 (p=0,0001) ve %26,04 (p<0,0001) daha yüksek hücre canlılığı gösterdi. 72 saatlik süre sonunda ise 15,6 µg/mL 5-FU, %8,25 ve %15 sindirilmiş kefir kombinasyonlarına göre sırasıyla %17,01 ve %24,83 daha yüksek hücre canlılığına sahipti (p<0,0001). Tek başına uygulanan %5 sindirilmiş kefir 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda 15,6 µg/mL 5-FU ile olan kombinasyonuna kıyasla daha yüksek hücre canlılığını sağladı (p<0,0001).

Tablo 4.16: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisinin karşılaştırılması

Zaman	**24 h**		**48 h**		**72 h**	
Maddeler	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	25,19	**<0,0001**	5,75	0,9213	2,17	>0,9999
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	28,49	**<0,0001**	10,69	0,0554	7,60	0,0901
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	39,99	**<0,0001**	15,92	**0,0001**	17,01	**<0,0001**
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	55,28	**<0,0001**	26,04	**<0,0001**	24,88	**<0,0001**
%2,5 sindirilmiş kefir vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	-1,90	>0,9999	7,00	0,6940	7,64	0,5364
%5 sindirilmiş kefir vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	7,86	0,4821	20,76	**<0,0001**	25,24	**<0,0001**
%8,25 sindirilmiş kefir vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	-3,50	0,9991	-1,49	>0,9999	3,81	0,9994
%15 sindirilmiş kefir vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	3,73	0,9996	3,72	0,9996	4,93	0,9867

5-FU: 5-Fluorourasil. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi

185 µg/mL 5-FU ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, tek başına 185 µg/mL 5-FU uygulaması, 48 ve 72. saatte kontrol grubuna göre anlamlı şekilde FHC hücre canlılığını azalttı ($p<0,0001$) (Şekil 4.37). 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma, %15 kefir ($p<0,0001$) ve 185 µg/mL 5-FU ile %15 sindirilmiş kefir kombinasyonunda ($p<0,001$) gözlendi. 48. ve 72. saatlerde ise %8,25, %15 sindirilmiş kefir ve 185 µg/mL 5-FU ile olan tüm dozlardaki sindirilmiş kefir kombinasyonları, hücre canlılığını anlamlı düzeyde düşürdü ($p<0,0001$). En belirgin etki, 72. saatte 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonunda görüldü ve hücre canlılığı %55,63'e düştü ($p<0,0001$).



Şekil 4.37: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

5-FU: 5-Fluorourasil. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

24 saatlik inkübasyonda 185 µg/mL 5-FU, %8,25 sindirilmiş kefir ile olan kombinasyona göre %12,2 ($p=0,0108$), %15 sindirilmiş kefir ile oluşturulan kombinasyona göre ise %18,93 daha yüksek hücre canlılığı gösterdi ($p<0,0001$) (Tablo 4.17). 185 µg/mL 5-FU grubu, %15 sindirilmiş kefir ile olan kombinasyona göre 48. v e 72. saatte %16,99 ve %20,21 daha yüksek hücre canlılığı gösterdi ($p<0,0001$). %2,5 sindirilmiş kefir uygulaması, 185 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna

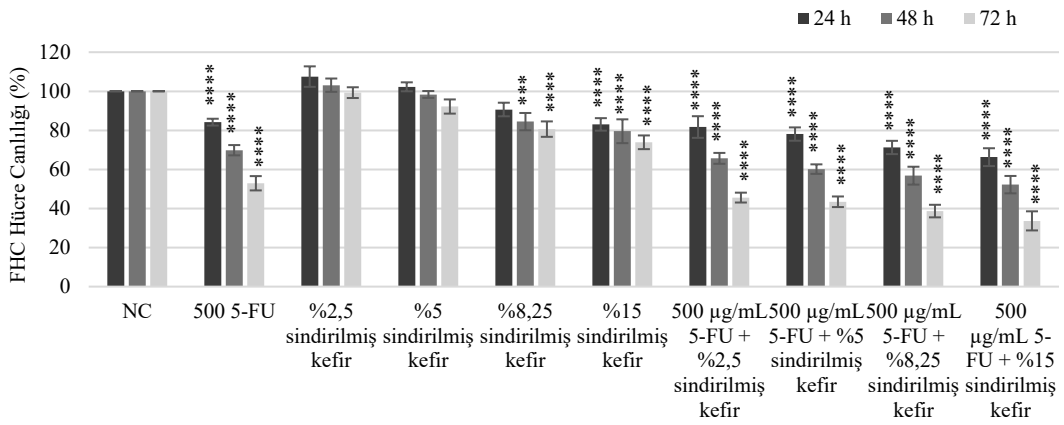
kıyasla 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %25,8 (p<0,0001), %37,46 (p<0,0001) ve %53,73 (p<0,0001) daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladı. %5 sindirilmiş kefir uygulaması, 185 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla 24 saatlik inkübasyonda %7,857 (p=0,4821) fark göstermesine rağmen anlamlı bulunmadı; 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda ise sırasıyla %20,76 (p<0,0001) ve %25,24 (p<0,0001) daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladı. %8,25 sindirilmiş kefir uygulaması, 185 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %-1,251 (p>0,9999) ve %8,792 (p=0,2747) fark gösterddmesine rağmen anlamlı bulunmadı; 72 saatte ise %12,94 (p=0,0044) daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladı. %15 sindirilmiş kefir uygulaması, 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %-2,148 (p>0,9999), %11,67 (p=0,0197) ve %2,576 (p>0,9999) fark gösterdi; yalnızca 48.saatteki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

Tablo 4.17: 185 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

Zaman	**24 h**		**48 h**		**72 h**	
Maddeler	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	4,471	0,938	2,499	>0,9999	1,794	>0,9999
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	9,243	0,1978	5,766	0,6488	5,951	0,8945
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	12,2	**0,0108**	9,2	0,2044	8,164	0,4085
185 µg/mL 5-FU vs. 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	18,93	**<0,0001**	16,99	**<0,0001**	20,21	**<0,0001**
%2,5 sindirilmiş kefir vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	25,8	**<0,0001**	37,46	**<0,0001**	53,73	**<0,0001**
%5 sindirilmiş kefir vs. 185 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	7,857	0,4821	20,76	**<0,0001**	25,24	**<0,0001**
%8,25 sindirilmiş kefir vs. 185 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	-1,251	>0,9999	8,792	0,2747	12,94	**0,0044**
%15 sindirilmiş kefir vs. 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	-2,148	>0,9999	11,67	**0,0197**	2,576	>0,9999

5-FU: 5-Fluorourasil. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

500 µg/mL 5-FU ve sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, tek başına 500 µg/mL 5-FU uygulaması, tüm zaman noktalarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde FHC hücre canlılığını azalttı ($p<0,0001$) (Şekil 4.38). 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma, %15 kefir ($p<0,0001$) ve 500 µg/mL 5-FU ile tüm dozlardaki sindirilmiş kefir kombinasyonlarında ($p<0,0001$) gözlendi. 48. ve 72. saatlerde ise %8,25, %15 sindirilmiş kefir ve 500 µg/mL 5-FU ile olan tüm dozlardaki sindirilmiş kefir kombinasyonları, hücre canlılığını anlamlı düzeyde düşürdü ($p<0,0001$). En belirgin etki, 72. saatte 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonunda görüldü ve hücre canlılığı %33,65'e düştü ($p<0,0001$).



Şekil 4.38: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

5-FU: 5-Fluorourasil. Barlar ortalama ± standart sapmayı göstermektedir (n=3). İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

500 µg/mL 5-FU uygulaması, 500 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %12,97 ($p=0,0003$), %9,2 ($p=0,2044$) ve %15,7 ($p=0,0001$) daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladı (Tablo 4.18). 500 µg/mL 5-FU uygulaması, 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %17,92

(p<0,0001), %16,99 (p<0,0001) ve %19,26 (p<0,0001) daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladı. %2,5 sindirilmiş kefir uygulaması, 500 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %25,8 (p<0,0001), %37,46 (p<0,0001) ve %53,73 (p<0,0001) daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladı. %5 sindirilmiş kefir uygulaması, 500 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %24,18 (p<0,0001), %25,24 (p<0,0001) ve %25,24 (p<0,0001) daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladı. %8,25 sindirilmiş kefir uygulaması, 500 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %19,43 (p<0,0001), %27,65 (p<0,0001) ve %41,95 (p<0,0001) daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladı. %15 sindirilmiş kefir uygulaması, 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonuna kıyasla 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %16,76 (p<0,0001), %27,35 (p<0,0001) ve %40,22 (p<0,0001) daha yüksek FHC hücre canlılığı sağladı.

Tablo 4.18: 500 µg/mL 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerine etkisi

Zaman	**24 h**		**48 h**		**72 h**	
Maddeler	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**	**Ortalama Farkları**	**P**
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	2,495	>0,9999	1,794	>0,9999	7,34	0,6117
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	6,096	0,8753	5,766	0,6488	9,479	0,1642
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	12,97	**0,0003**	9,2	0,2044	15,7	**0,0001**
500 µg/mL 5-FU vs. 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	17,92	**<0,0001**	16,99	**<0,0001**	19,26	**<0,0001**
%2,5 sindirilmiş kefir vs. 500 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir	25,8	**<0,0001**	37,46	**<0,0001**	53,73	**<0,0001**
%5 sindirilmiş kefir vs. 500 µg/mL 5-FU + %5 sindirilmiş kefir	24,18	**<0,0001**	25,24	**<0,0001**	25,24	**<0,0001**
%8,25 sindirilmiş kefir vs. 500 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir	19,43	**<0,0001**	27,65	**<0,0001**	41,95	**<0,0001**
%15 sindirilmiş kefir vs. 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir	16,76	**<0,0001**	27,35	**<0,0001**	40,22	**<0,0001**

5-FU: 5-Fluorourasil. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında; 24 saatlik inkübasyonda, 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonu, %8,25 ve %5 sindirilmiş kefir kombinasyonlarına göre sırasıyla %15,30 (p=0,0004) ve %26,79 (p<0,0001) daha düşük hücre canlılığına neden oldu. %15 sindirilmiş kefir kombinasyonu, %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna göre %30,09 (p<0,0001) daha düşük hücre canlılığına neden oldu. %8,25 sindirilmiş kefir kombinasyonu, %5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna göre %11,49 (p=0,0343) ve %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna göre %14,79 (p=0,0007) daha düşük hücre canlılığı tespit edildi. Diğer kombinasyonlar arasında gözlenen farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05). 48 saatlik inkübasyonda, 15,6 µg/mL 5-FU ve %15 sindirilmiş kefir kombinasyonu, %5 ve %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonlarına göre sırasıyla %15,35 (p=0,0003) ve %20,29 (p<0,0001) daha düşük hücre canlılığına neden oldu. 185 µg/mL 5-FU ve %15 sindirilmiş kefir kombinasyonunda %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna göre %14,49 (p=0,0010) daha düşük hücre canlılığı görüldü. 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonu, %5 ve %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonlarına göre sırasıyla %13,46 (p=0,0038) ve %11,91 (p=0,0221) daha düşük hücre canlılığı tespit edildi. Diğer kombinasyonlar arasında gözlenen farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05). 72 saatlik inkübasyonda ise 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir ile %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonu arasında %22,71'lik anlamlı canlılık farkı saptandı (p<0,0001). 185 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonu, %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonuna göre %18,42 (p<0,0001) daha düşük hücre canlılığına neden oldu. 500 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonu, %5 ve %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonlarına göre sırasıyla %14,91 (p=0,0221) ve %11,91 (p=0,0221) daha düşük hücre canlılığı sağladı. Diğer kombinasyonlar arasında anlamlı fark bulunmadı (p>0,05).

Tablo 4.19: 5-Fluorourasil ile sindirilmiş kefir kombinasyonlarının FHC hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

Zaman noktaları	**24 saat**		**48 saat**		**72 saat**	
Kombinasyonlar	**Ortalama Farkı**	**P**	**Ortalama Farkı**	**P**	**Ortalama Farkı**	**P**
15,6 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 SK	-15,30	**0,0004**	-10,12	0,1229	-7,873	0,5353
15,6 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %5 SK	-26,79	**<0,0001**	-15,35	**0,0003**	-17,28	**<0,0001**
15,6 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-30,09	**<0,0001**	-20,29	**<0,0001**	-22,71	**<0,0001**
15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %5 SK	-11,49	**0,0343**	-5,234	0,9750	-9,403	0,2155

Tablo 4.19 (Devam)

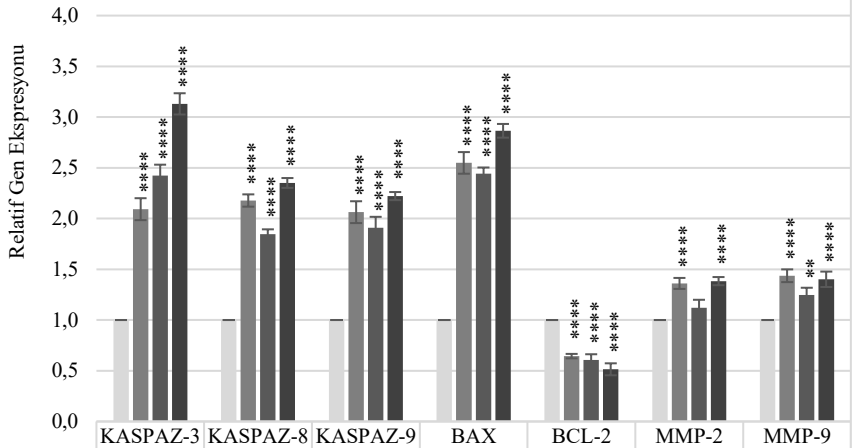
15,6 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-14,79	**0,0007**	-10,17	0,1181	-14,84	**0,0007**
15,6 µg/mL 5-FU +%5 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-3,299	>0,9999	-4,933	0,9866	-5,433	0,9639
185 µg/mL 5-FU +%15 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %8,25 SK	-6,728	0,7979	-7,789	0,5560	-12,05	0,0191
185 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %5 SK	-9,686	0,1743	-11,22	**0,0449**	-14,26	**0,0014**
185 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-14,46	**0,0011**	-14,49	**0,0010**	-18,42	**<0,0001**
185 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %5 SK	-2,959	>0,9999	-3,433	0,9999	-2,212	>0,9999
185 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-7,730	0,5703	-6,700	0,8032	-6,370	0,8613
185 µg/mL 5-FU + %5 SK vs. 185 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-4,772	0,9907	-3,267	>0,9999	-4,158	0,9982
500 µg/mL 5-FU + %15 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %8,25 SK	-4,952	0,9860	-4,602	0,9939	-5,019	0,9838
500 µg/mL 5-FU +%15 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %5 SK	-11,82	**0,0243**	-7,954	0,5158	-9,776	0,1625
500 µg/mL 5-FU +%15 SK vs. 5500 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-15,42	**0,0003**	-13,46	**0,0038**	-11,91	**0,0221**
500 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %5 SK	-6,871	0,7692	-3,351	>0,9999	-4,758	0,9910
500 µg/mL 5-FU + %8,25 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-10,47	0,0908	-8,858	0,3124	-6,896	0,7639
500 µg/mL 5-FU + %5 SK vs. 500 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	-3,601	0,9997	-5,507	0,9589	-2,138	>0,9999

5-FU: 5-Fluorourasil. SK: Sindirilmiş kefir. İstatistiksel analiz Two-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

4.12. HT29 HÜCRELERİNDE PCR BULGULARI

4.12.1. 5-Fluorourasil, Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve Kombinasyonlarının HT29 Hücrelerinde Apoptotik, Anti-Apoptotik ve İnvazyonla İlişkili Gen Ekspresyonları

185 µg/mL 5-FU, 1500 µg/mL SPP ve bu iki ajanın kombinasyonu ile yapılan 72.saatteki uygulamalarda *KASPAZ-3*, *-8*, *-9* ve *BAX* gen ekspresyonları kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artış gösterdi ($p<0,001$). *BCL2* gen ekspresyonu ise tüm uygulamalarda anlamlı şekilde azaldı ($p<0,001$). *MMP-2* gen ekspresyonu da kontrol grubuna göre tüm uygulamalarda arttı. Ancak 1500 µg/mL SPP uygulamasında bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,2543$). *MMP-9* gen ekspresyonlarının ise her uygulamada kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı belirlendi (Şekil 4.39).



	KASPAZ-3	KASPAZ-8	KASPAZ-9	BAX	BCL-2	MMP-2	MMP-9
NC	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
185 µg/ml 5-FU	2,09	2,18	2,06	2,55	0,64	1,36	1,44
1500 µg/ml SPP	2,42	1,85	1,91	2,44	0,61	1,12	1,25
185 µg/ml 5-FU + 1500 µg/ml SPP	3,13	2,35	2,22	2,86	0,51	1,38	1,40

Şekil 4.39: 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat ve kombinasyon tedavisinin gen ekspresyonları üzerindeki etkileri

5-FU: 5-Fluorourasil. SPP: Sodyum pentaborat pentahidrat. NC: Negatif Kontrol. Gen ekspresyon seviyeleri 2^–ΔΔCt yöntemiyle normalize edildi. Değerler relatif gen ekspresyonunu (fold change) temsil etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n=3) olarak sunuldu. İstatistiksel analiz One-way ANOVA ve Tukey post-hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

Kombinasyon, *KASPAZ-3* gen ekspresyonunu tek başına 5-FU'ya göre anlamlı düzeyde artırdı (p=0,0017), ancak SPP uygulamasına kıyasla anlamlı bir fark oluşturmadı (p=0,1008). *KASPAZ-8* düzeyi kombinasyon uygulaması; 5-FU'ya kıyasla anlamlı farklılık göstermedi (p=0,9208), ancak SPP'ye göre anlamlı düzeyde artış gösterdi (p=0,0055). *KASPAZ-9* ve *BAX* gen ekspresyonları açısından kombinasyon uygulaması ile tek başına 5-FU veya tek başına SPP arasında anlamlı bir fark yoktu (p>0,05). *BCL-2* gen düzeyi, kombinasyon uygulamasında hem 5-FU (p=0,0001) hem de SPP (p=0,0055) uygulamalarına kıyasla anlamlı olarak daha düşüktü. *MMP*-2 düzeyi, 5-FU uygulamasında SPP uygulamasına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksekti (p=0,0045). Kombinasyon uygulaması ile 5-FU arasında anlamlı fark bulunmazken (p>0,9999), kombinasyon uygulaması SPP'ye göre anlamlı düzeyde daha yüksek *MMP*-2 ekspresyonuna neden oldu (p=0,0018). *MMP*-9 ekspresyonu açısından uygulamalar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0,05) (Tablo 4.20).

Tablo 4.20: 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki karşılaştırmalı etkileri

	185 ug/ml 5-FU vs. 1500 ug/ml SPP	**185 ug/ml 5-FU vs. 185 ug/ml 5-fu+1500 ug/ml SPP**	**1500 ug/ml SPP vs. 185 ug/ml 5-fu+1500 ug/ml SPP**
Gen	p	p	P
KASPAZ-3	0,7386	**0,0017**	0,1008
KASPAZ-8	0,1248	0,9208	**0,0055**
KASPAZ-9	0,9884	0,9894	0,5594
BAX	0,9999	0,7630	0,3918
BCL-2	0,8513	**0,0001**	**0,0055**
MMP-2	**0,0045**	>0,9999	**0,0018**
MMP-9	0,1392	>0,9999	0,3448

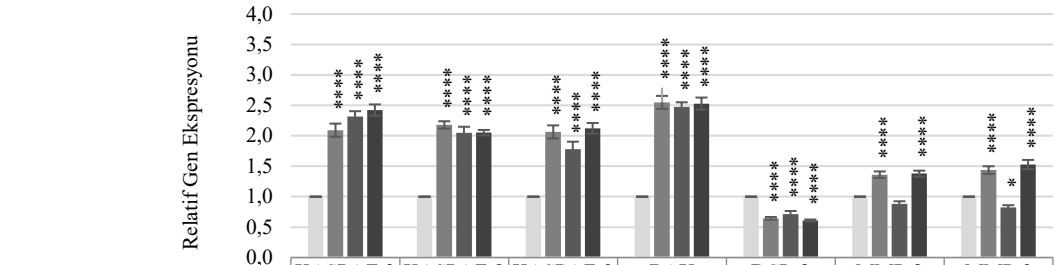
5-FU: 5-Fluorourasil. SPP: Sodyum pentaborat pentahidrat. İstatistiksel analiz One-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

4.12.2. 5-Fluorourasil, Sindirilmiş Kefir ve Kombinasyonlarının HT29 Hücrelerinde Apoptotik, Anti-Apoptotik Ve İnvazyonla İlişkili Gen Ekspresyonları

185 µg/mL 5-FU, %8,25 sindirilmiş kefir ve bu iki ajanın kombinasyonu ile yapılan 72. saatteki uygulamalarda *KASPAZ-3*, -8, -9 ve *BAX* gen ekspresyonları, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artış gösterdi ($p<0,0001$). *BCL-2* gen ekspresyonu ise tüm uygulamalarda anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,0001$). *MMP-2* gen ekspresyonu, %8,25 sindirilmiş kefir uygulamasında kontrol grubuna kıyasla daha düşük olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,1684$). Buna karşılık, 5-FU ve kombinasyon uygulamaları, *MMP-2* ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdı ($p<0,0001$). *MMP-9* gen ekspresyonu ise %8,25 sindirilmiş kefir uygulamasında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldı ($p=0,0131$), buna karşın 5-FU ve kombinasyon gruplarında anlamlı artış gözlendi ($p<0,0001$) (Şekil 4.40).

185 µg/mL 5-FU, %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının karşılaştırmalı gen ekspresyon analizinde, *KASPAZ-3*, *-8*, *-9* ve *BAX* genleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). *BCL-2* gen ekspresyonu ise kombinasyon grubunda %8,25 sindirilmiş kefire kıyasla anlamlı şekilde daha düşüktü ($p=0,0113$) ancak 5-FU'ya kıyasla anlamlı bir fark yoktu ($p=0,9117$). MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonları açısından 5-FU, %8,25 sindirilmiş kefire göre anlamlı artış gösterdi ($p<0,0001$). Benzer şekilde kombinasyon uygulaması, %8,25 sindirilmiş kefire göre bu genlerin

ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttırdı ($p<0,0001$). Ancak, kombinasyon ile 5-FU uygulaması arasında *MMP-2* ve *MMP-9* için anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$) (Tablo 4.21).



	KASPAZ-3	KASPAZ-8	KASPAZ-9	BAX	BCL-2	MMP-2	MMP-9
NC	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
185 µg/ml 5-FU	2,09	2,18	2,06	2,55	0,64	1,36	1,44
%8,25 SK	2,32	2,05	1,78	2,47	0,71	0,88	0,82
185 µg/mL 5-FU + %8,25 SK	2,42	2,05	2,12	2,53	0,61	1,38	1,53

Şekil 4.40: 185 µg/mL 5-Fluorourasil, %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki etkileri

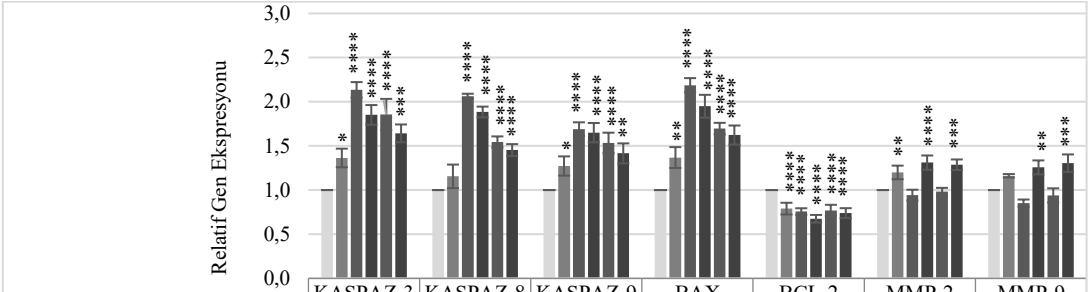
5-FU: 5-Fluorourasil, SK: Sindirilmiş Kefir, NC: Negatif Kontrol. Gen ekspresyon seviyeleri 2^–ΔΔCt yöntemiyle normalize edildi. Değerler relatif gen ekspresyonunu (fold change) temsil etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n=3) olarak sunuldu. İstatistiksel analiz One-way ANOVA ve Tukey post-hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

Tablo 4.21: 185 µg/mL 5-Fluorourasil, %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki karşılaştırmalı etkileri

	185 µg/ml 5-FU vs. %8,25 SK	**185 µg/ml 5-FU vs. 185 µg/ml 5-FU + %8,25 SK**	**%8,25 SK vs. 185 µg/ml 5-FU + %8,25 SK**
Gen	p	P	P
KASPAZ-3	0,9582	0,7332	>0,9999
KASPAZ-8	0,9787	0,9843	>0,9999
KASPAZ-9	0,6031	>0,9999	0,3583
BAX	>0,9999	>0,9999	>0,9999
BCL-2	0,2300	0,9117	**0,0113**
MMP-2	**<0,0001**	>0,9999	**<0,0001**
MMP-9	**<0,0001**	0,9569	**<0,0001**

5-FU: 5-Fluorourasil. SK: Sindirilmiş kefir. İstatistiksel analiz One-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

15,6 µg/mL 5-FU tek başına uygulandığında HT29 hücrelerinde *BCL-2* gen ekspresyon seviyesini azaltırken (p<0,0001) diğer incelenen tüm gen ekspresyonlarını arttırdı (Şekil 4.41). Ancak bu artışlardan yalnızca *KASPAZ-3*, *-9*, *BAX* ve *MMP-2* istatistiksel olarak anlamlıydı. %2,5 ve %15 sindirilmiş kefir uygulamalarında *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9* ve *BAX* genlerinin ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttı (p<0,0001) ve *BCL-2* gen ekspresyonu ise azaldı (p<0,0001). *MMP-2 ve MMP-9* gen ekspresyonu tek başına %2,5 sindirilmiş kefir uygulamasında azaldı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla p=0,9332, p=0,0680) %15 sindirilmiş kefir uygulamasında ise anlamlı bir şekilde arttı (sırasıyla p<0,0001, p=0,0027). 15,6 µg/mL 5-FU ile %2,5 sindirilmiş kefir kombinasyonunda *KASPAZ-3*, *-8*, *-9*, *BAX* gen ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarken (p<0,0001) *BCL-2* ise anlamlı bir şekilde azaldı (p<0,0001). *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonları ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermedi (sırasıyla p>0,0009, p=0,9472) 15,6 µg/mL 5-FU ile %15 sindirilmiş kefir kombinasyonda ise *KASPAZ-3*, *-8*, *-9*, *BAX* gen ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarken *BCL-2* ise anlamlı bir şekilde azaldı. *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonları ise anlamlı bir şekilde arttı (p=0,0002, p=0,0004).



	KASPAZ-3	KASPAZ-8	KASPAZ-9	BAX	BCL-2	MMP-2	MMP-9
NC	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
15,6 µg/mL 5-FU	1,36	1,16	1,27	1,37	0,79	1,20	1,16
%2,5 SK	2,13	2,06	1,69	2,19	0,76	0,94	0,85
%15 SK	1,85	1,88	1,65	1,95	0,67	1,31	1,26
15,6 µg/ml 5-FU + %2,5 SK	1,85	1,54	1,53	1,70	0,77	0,98	0,94
15,6 µg/ml 5-FU + % 15 SK	1,64	1,45	1,42	1,62	0,74	1,29	1,30

Şekil 4.41: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil, %2,5 ve %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki etkileri

5-FU: 5-Fluorourasil, SK: Sindirilmiş Kefir, NC: Negatif Kontrol. Gen ekspresyon seviyeleri 2^–ΔΔCt yöntemiyle normalize edildi. Değerler relatif gen ekspresyonunu (fold change) temsil etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n=3) olarak sunuldu. İstatistiksel analiz One-way ANOVA ve Tukey post-hoc testi ile yapıldı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (NC'ye göre).

15,6 µg/mL 5-FU ile %2,5 sindirilmiş kefir karşılaştırıldığında %2,5 sindirilmiş kefir uygulamasında tek başına 15,6 µg/mL 5-FU'ya kıyasla *KASPAZ-3*, *-8*, *-9* ve *BAX* gen ekspresyonlarında anlamlı artış gözlenirken *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyon düzeyleri ise anlamlı şekilde azaldı (Tablo 4.22). *BCL-2* gen ekspresyonunda ise iki uygulama arasında anlamlı bir fark bulunmadı.15,6 µg/mL 5-FU ile %15 sindirilmiş kefir karşılaştırıldığında, *KASPAZ-3*, *-8*, *-9* ve *BAX* genleri %15 kefir uygulamasında anlamlı şekilde daha yüksek ekspresyon gösterdi. *BCL-2* geni ise %15 kefir grubunda anlamlı olarak daha düşük düzeydeydi. *MMP-2* ve *MMP-9* genleri açısından iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu. 15,6 µg/mL 5-FU ile 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir karşılaştırıldığında, kombinasyon grubunda *KASPAZ-3* ve *-8* gen ekspresyonları anlamlı şekilde daha yüksek bulundu. *MMP-2* ve *MMP-9* genleri ise kombinasyon grubunda anlamlı şekilde daha düşük düzeydeydi. Diğer genler açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Tablo 4.22: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil, %2,5 ve %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının gen ekspresyonları üzerindeki karşılaştırmalı etkileri

Gen	*KASPAZ-3*	*KASPAZ-8*	*KASPAZ-9*	*BAX*	*BCL-2*	*MMP-2*	*MMP-9*
Karşılaştırma	P	P	P	P	P	P	P
15,6 µg/mL 5-FU vs. %2,5 SK	**0,0004**	**<0,0001**	**0,0213**	**<0,0001**	0,9816	**0,0004**	**<0,0001**
15,6 µg/mL 5-FU vs. %15 SK	**0,0278**	**<0,0001**	**0,0452**	**0,0009**	**0,0096**	0,5807	0,8426
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 ug/mL 5-FU + %2,5 SK	**0,0295**	**0,0006**	0,3082	0,0856	0,9997	**0,0035**	**0,0054**
15,6 µg/mL 5-FU vs. 15,6 ug/mL 5-FU + %15 SK	0,4381	**0,0083**	0,9101	0,3006	0,7504	0,825	0,3871
%2,5 SK vs. %15 SK	0,7592	0,8064	>0,9999	0,7696	0,1116	**<0,0001**	**<0,0001**
%2,5 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 SK	0,7441	**0,0007**	0,9419	**0,0268**	>0,9999	0,9943	0,6067
%15 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %15 SK	0,9046	**0,0025**	0,5654	0,2324	0,3564	>0,9999	0,999
15,6 µg/mL 5-FU + +2,5 SK vs. 15,6 µg/mL 5-FU + %15 SK	0,9136	0,9816	0,9859	0,9996	0,9836	**<0,0001**	**<0,0001**

5-FU: 5-Fluorourasil. SK: Sindirilmiş kefir. İstatistiksel analiz One-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar koyu ile işaretlendi.

15,6 µg/mL 5-FU ile 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir karşılaştırıldığında, kombinasyonda yalnızca *KASPAZ-8* geninde anlamlı azalma görüldü (p=0,0083). Diğer genlerde anlamlı bir farklılık saptanmadı. %2,5 ve %15 sindirilmiş

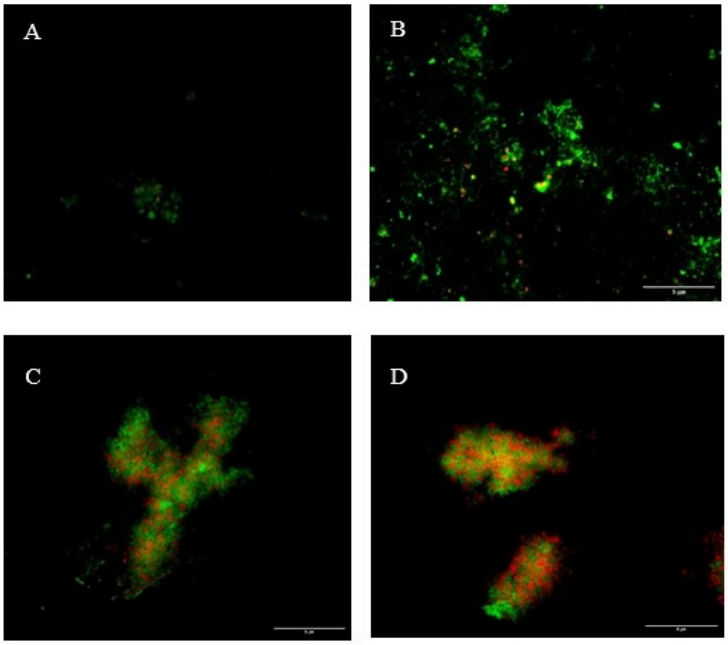
kefir grupları karşılaştırıldığında, %15 kefir uygulamasında *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonları anlamlı olarak daha yüksek bulundu. %2,5 sindirilmiş kefir ile 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 kefir kombinasyonu karşılaştırıldığında, kombinasyon uygulamasında *KASPAZ-8* ve *BAX* gen ekspresyonu anlamlı olarak daha yüksekti. %15 sindirilmiş kefir ile 15,6 µg/mL 5-FU + %15 kefir kombinasyonu karşılaştırıldığında, kombinasyon uygulamasında *KASPAZ-8* gen ekspresyonu anlamlı olarak daha yüksekti. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 kefir ile 15,6 µg/mL 5-FU + %15 kefir kombinasyonu karşılaştırıldığında, %15 kefir kombinasyon uygulamasında *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı. Diğer gen ekspresyonlarında anlamlı fark tespit edilmedi.

4.13. HT29 HÜCRELERİNDE FLORESAN MİKROSKOPİ ile BELİRLENEN HÜCRE ÖLÜM TİPLERİ

4.13.1. 5-Fluorourasil, Sodyum Pentaborat Pentahidrat Ve Kombinasyonlarının HT29 Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisinin Floresan Görüntüleme Bulguları

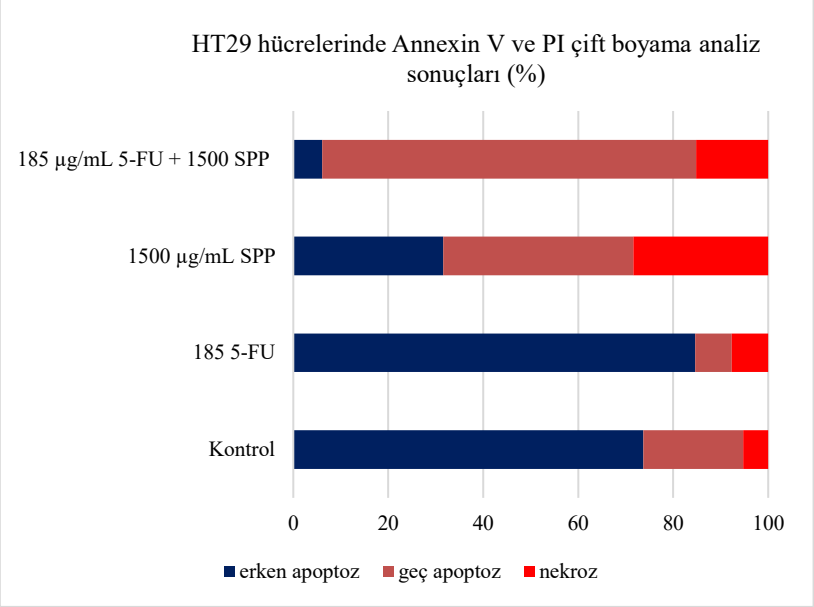
HT29 hücrelerinde 185 µg/mL 5-FU, 1500 µg/mL SPP ve kombinasyonunun hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkileri, Annexin V-FITC ve PI çift boyama yöntemiyle floresan mikroskop altında incelendi (Resim 4.1).

Kontrol grubunda hücrelerin %73,68'i erken apoptozda, %21,05'i geç apoptozda ve %5,26'sı nekrozda yer aldı. 185 µg/mL 5-FU uygulaması ile erken apoptoz oranı %84,62'ye yükselirken, geç apoptoz %7,69 ve nekroz oranı %7,69 olarak belirlendi. 1500 µg/mL SPP uygulanan grupta erken apoptoz %31,58'e düşerken, geç apoptoz %40 ve nekroz %28,42'ye çıktı. Kombinasyon grubunda ise erken apoptoz oranı %6,06'ya kadar düşerken, geç apoptoz oranı %78,79'a yükselmiş ve nekroz %15,15 olarak saptandı (Şekil 4.42).



Resim 4.1. HT29 hücrelerinde 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat ve kombinasyonlarının floresan mikroskopi görüntüleri

A: Negatif kontrol (Hücre + besiyeri); B: 185 µg/mL 5-FU uygulaması; C: 1500 µg/mL sodyum pentraborat pentrahidrat uygulaması; D: 5: 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL sodyum pentraborat pentrahidrat kombinasyonu. Yeşil sinyal: FITC Annexin V (Erken apoptoz); Kırmızı sinyal: Propidyum iyodür (nekroz). Sarı: Geç Apoptoz

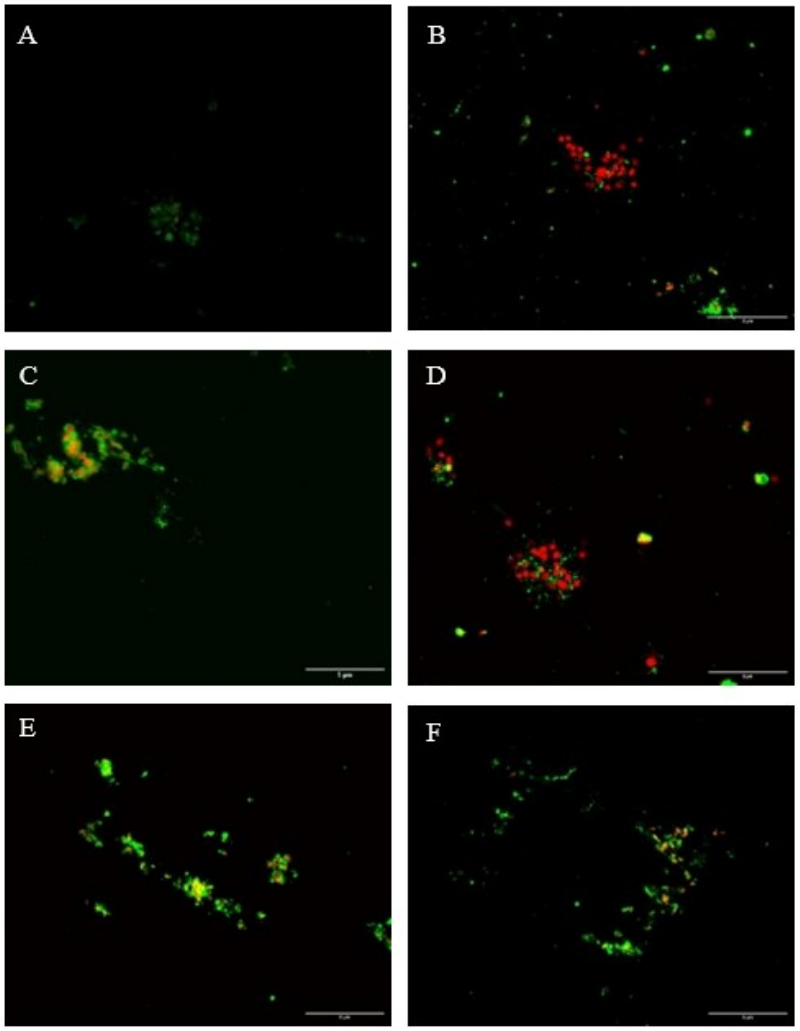


Şekil 4.42: HT29 hücrelerinde 5-Fluorourasil, sodyum pentaborat pentahidrat ve kombinasyonlarının erken ve geç apoptoz/nekroz oranlara etkisinin yüzde dağılımı

5-FU: 5-Fluorourasil. SPP: Sodyum pentaborat pentahidrat

4.13.2. 5-Fluorourasil, Sindirilmiş Kefir Ve Kombinasyonlarının HT29 Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisinin Floresan Görüntüleme Bulguları

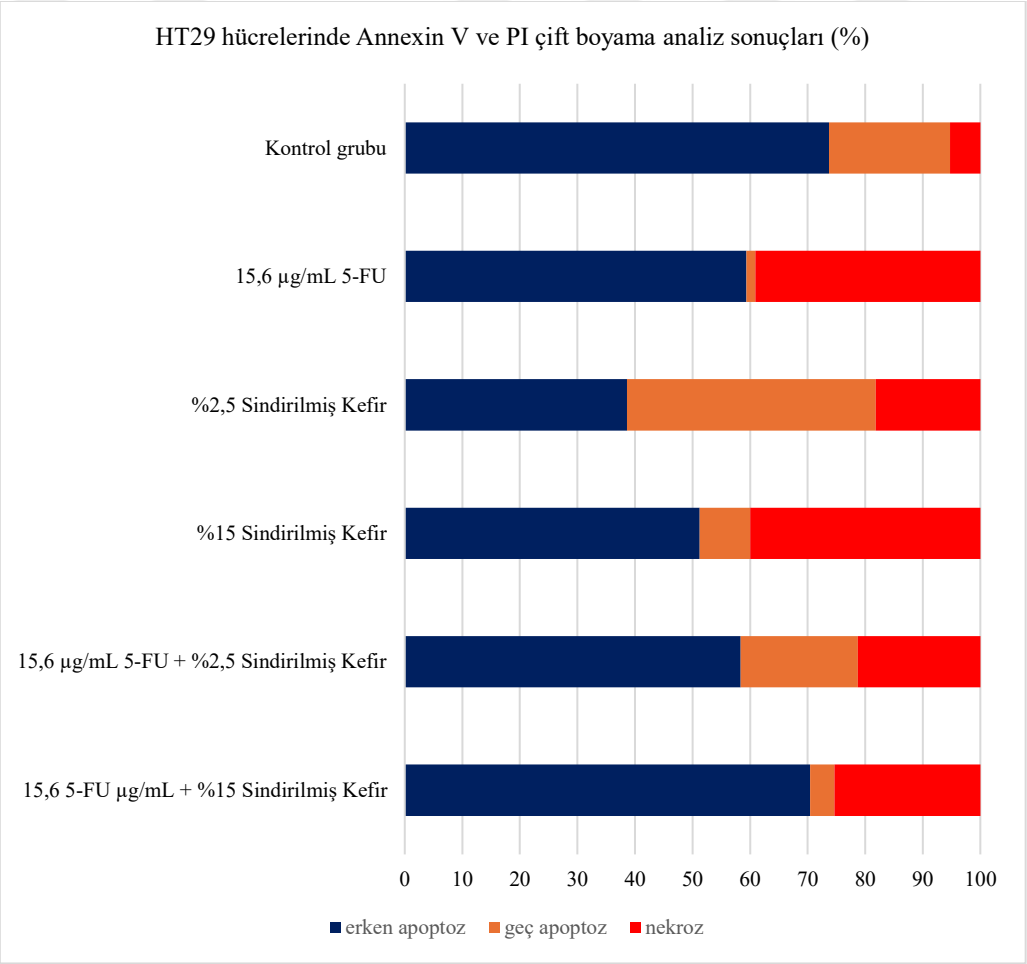
HT29 hücrelerinde 15,6 µg/mL 5-FU, sindirilmiş kefir (%2,5 ve %15) ve kombinasyonlarının hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkileri, Annexin V-FITC ve PI çift boyama yöntemiyle floresan mikroskop altında incelendi (Resim 4.2).



Resim 4.2: HT29 hücrelerinde 15,6 µg/mL5-Fluorourasil, kefir ve kombinasyonlarının floresan mikroskopi ile erken ve geç apoptoz/nekroz analizine ait görüntüler

A: Negatif kontrol (Hücre + besiyeri), B: 15,6 µg/mL 5-FU, C: %2,5 sindirilmiş kefir, D: %15 sindirilmiş kefir, E: 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 Sindirilmiş kefir, F: 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir. Yeşil sinyal: FITC Annexin V (Erken apoptoz); Kırmızı sinyal: Propidyum iyodür (nekroz). Sarı: Geç Apoptoz

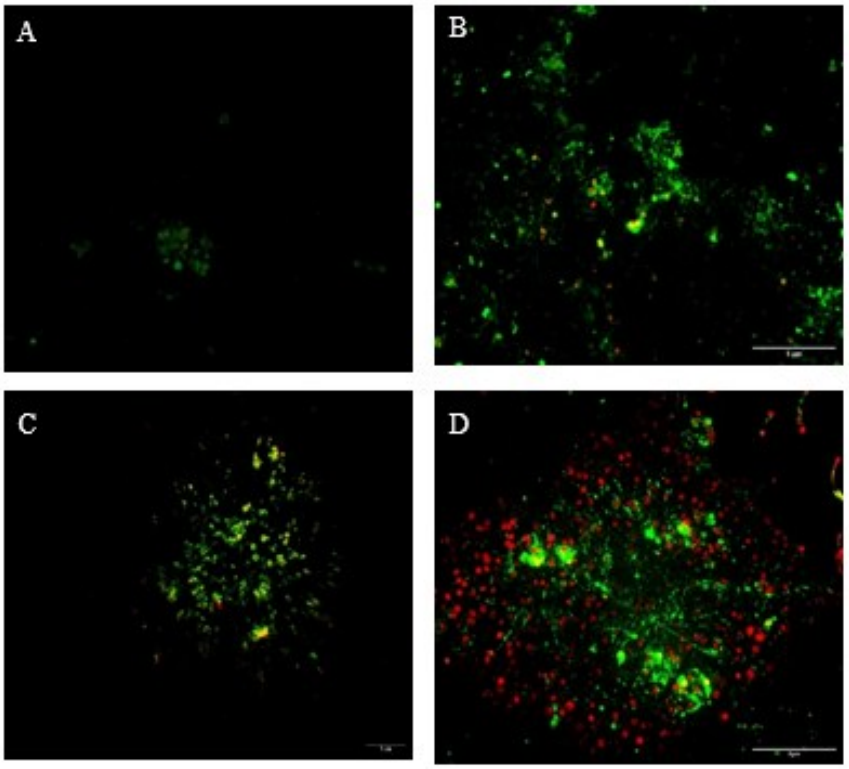
Kontrol grubunda erken apoptoz %73,68, geç apoptoz %21,05 ve nekroz %5,26 olarak saptandı. 15,6 µg/mL 5-FU uygulamasında erken apoptoz %59,38, geç apoptoz %1,56 ve nekroz %39,06 oranında belirlendi. %2,5 sindirilmiş kefir uygulamasında erken apoptoz %38,64, geç apoptoz %43,18 ve nekroz %18,18 düzeyindeydi. %15 sindirilmiş kefir grubunda ise erken apoptoz %51,25, geç apoptoz %8,75 ve nekroz %40,00 olarak tespit edildi. Kombinasyon gruplarından 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir uygulamasında erken apoptoz %58,33, geç apoptoz %20,37 ve nekroz %21,30 oranında iken, 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir grubunda erken apoptoz %70,42, geç apoptoz %4,23 ve nekroz %25,35 olarak belirlendi (Şekil 4.43).



Şekil 4.43: HT29 hücrelerinde 15,6 µg/mL5-Fluorourasil, kefir ve kombinasyonlarının erken ve geç apoptoz/nekroz oranlara etkisinin yüzde dağılımı

5-FU: 5-Fluorourasil

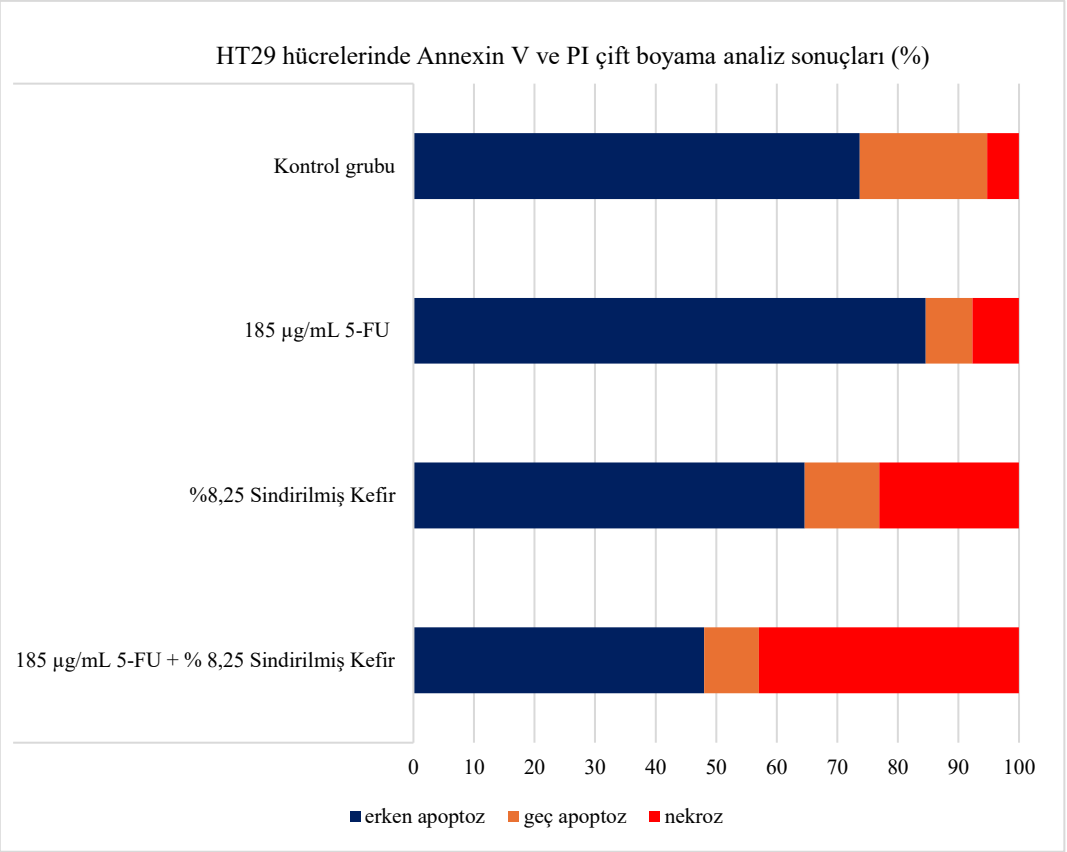
HT29 hücrelerinde 185 µg/mL 5-FU, %8,25 sindirilmiş kefir ve bunların kombinasyonunun etkileri Annexin V-FITC ve PI boyamalarıyla değerlendirildi. Floresan mikroskop görüntülerinde A panelinde düşük sinyal (kontrol), B panelinde yoğun yeşil sinyal (erken apoptoz), C panelinde yeşil ve sarı sinyaller (erken ve geç apoptoz), D panelinde ise yaygın kırmızı sinyal (nekroz) gözlendi (Resim 4.3).



Resim 4.3: HT29 hücrelerinde 185 µg/mL5-Fluorourasil, kefir ve kombinasyonlarının floresan mikroskopi ile erken ve geç apoptoz/nekroz analizine ait görüntüler

A: Negatif kontrol (Hücre + besiyeri); B: 185 µg/mL 5-FU uygulaması; C: %8,25 sindirilmiş kefir; D: 185 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir kombinasyonu. Yeşil sinyal: FITC Annexin V (Erken apoptoz); Kırmızı sinyal: Propidyum iyodür (nekroz). Sarı: Geç Apoptoz

Kontrol grubunda erken apoptoz %73,68, geç apoptoz %21,05 ve nekroz %5,26 olarak belirlendi. 185 µg/mL 5-FU uygulanan grupta erken apoptoz %84,62, geç apoptoz %7,69 ve nekroz %7,69 oranındaydı. %8,25 sindirilmiş kefir grubunda erken apoptoz %64,62, geç apoptoz %12,31 ve nekroz %23,08 düzeyinde saptandı. Kombinasyon grubunda ise erken apoptoz %48'e düşerken, geç apoptoz %9,07 ve nekroz %42,93'e yükseldi (Şekil 4.44).

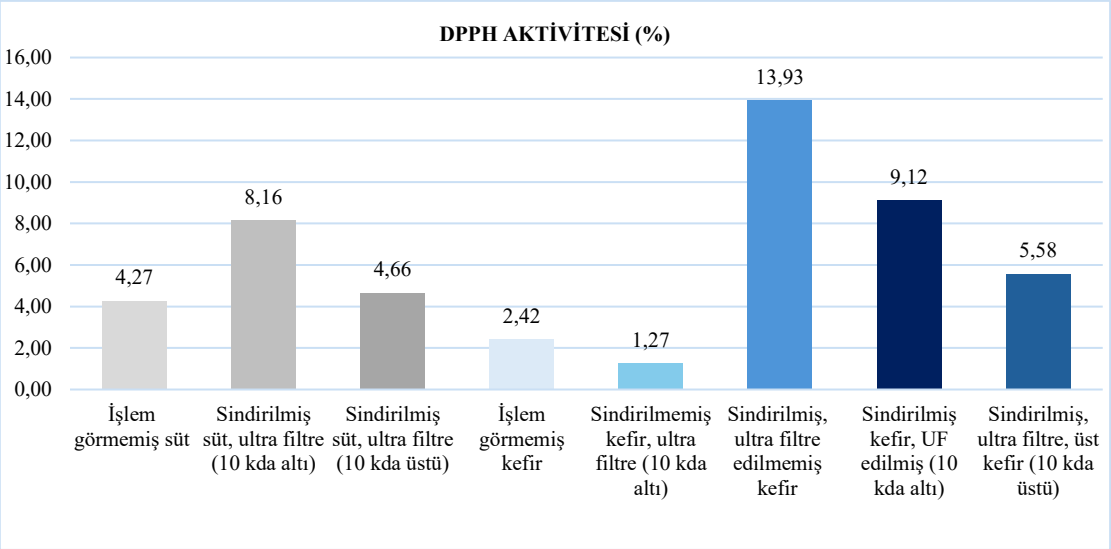


Şekil 4.44: HT29 hücrelerinde 185 µg/mL5-Fluorourasil, kefir ve kombinasyonlarının erken ve geç apoptoz/nekroz oranlara etkisinin yüzde dağılımı

5-FU: 5-Fluorourasil

4.14. KEFİR VE SÜT ÖRNEKLERİNDE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE VE TOPLAM FENOLİK MADDE İÇERİĞİ

Bu çalışmada, sindirilmiş kefir, sindirilmiş süt ve sindirilmemiş kefir örnekleri ile 10 kDa altı ve 10 kDa üstü fraksiyonlarının DPPH radikal giderme kapasitesi ve TFC'leri değerlendirildi. DPPH analizinde, sindirilmiş kefir örneğinin %13,93 ile en yüksek radikal giderme kapasitesine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.45). Sindirilmiş kefirin 10 kDa altı fraksiyonunda DPPH kapasitesi %9,12 iken, 10 kDa üstü fraksiyonunda bu değer %5,58 olarak ölçüldü. Sindirilmemiş kefirde ise tam örneğin DPPH kapasitesi %2,42, 10 kDa altı fraksiyonunda ise bu değer %1,27 olarak bulundu. İşlem görmemiş süt örneğinde DPPH kapasitesi %4,27, sindirilmiş sütte 10 kDa altı fraksiyonda %8,16, 10 kDa üstü fraksiyonda ise %4,66 olarak belirlendi.

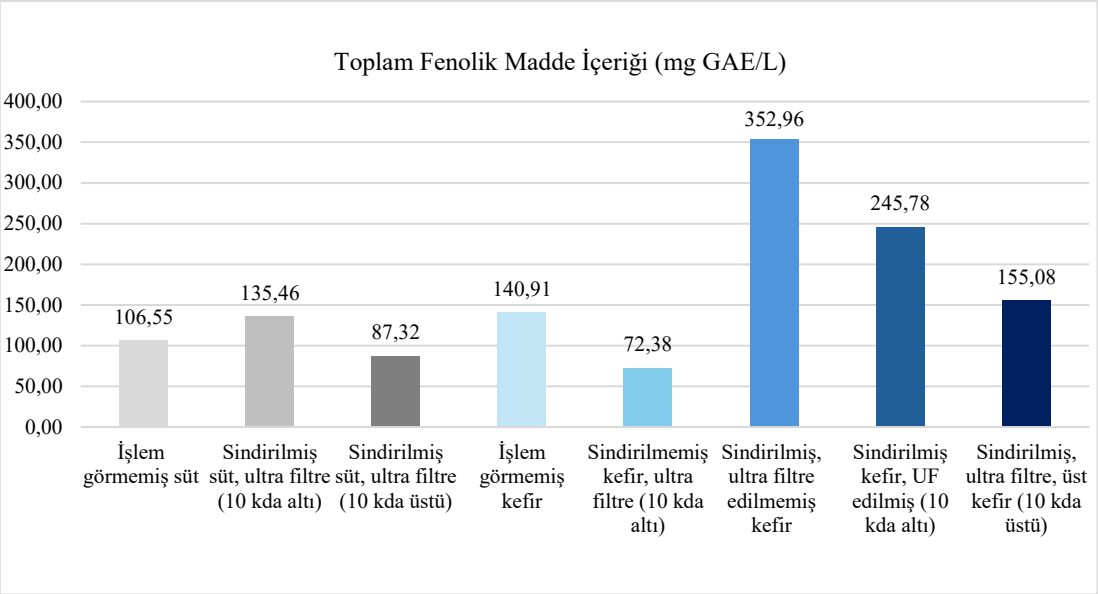


Şekil 4.45: Kefir ve süt örneklerinin antioksidan aktiviteleri

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

Sindirilmiş kefirin tam örneğinde 352,96 mg GAE/L ile en yüksek fenolik içerik gözlendi (Şekil 4.46). Sindirilmiş kefirin 10 kDa altı fraksiyonu 245,78 mg GAE/L fenolik içeriğe sahipken, 10 kDa üstü fraksiyonunda bu değer 155,08 mg GAE/L olarak kaydedildi. İşlem görmemiş kefirde tam örnek 140,91 mg GAE/L fenolik içerik gösterdi, 10 kDa altı fraksiyonda 72,38 mg GAE/L ölçüldü. Sindirilmemiş süt örneğinde ise tam örnek 106,55 mg GAE/L fenolik içeriğe sahipken, 10 kDa altı fraksiyonda 135,46 mg GAE/L ve 10 kDa üstü fraksiyonda 87,32 mg GAE/L olarak belirlendi.

Hem DPPH hem de TFC deneyi açısından sindirilmiş kefir tam örneği ve 10 kDa altı fraksiyonu en yüksek antioksidan kapasite ve fenolik içeriğe sahip bulunurken; sindirilmemiş kefir ve sindirilmiş süt örnekleri bunlara kıyasla daha düşük değerler sergiledi.



Şekil 4.46. Kefir ve süt örneklerinde toplam fenolik madde içeriği

GAE: Gallik asit eşdeğeri

4.15. HT29 HÜCRELERİNİN TOPLAM PROTEİN DÜZEYLERİ

HT29 hücrelerine uygulanan maddeler ve kombinasyonları hücrelerde toplam protein miktarı BCA yöntemi ile belirlendi. Kontrol grubunda toplam protein düzeyi en yüksek seviyede tespit edildi. 5-FU uygulamaları protein düzeyini doz bağımlı olarak azalttı. SPP uygulamasında da toplam protein düzeyi azaldı. Sindirilmiş kefir uygulanan gruplarda protein düzeyleri genel olarak korundu. Kombinasyon uygulamalarında ise protein düzeyi tek başına kefir uygulamalarına kıyasla azaldı. En düşük protein düzeyi ise 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP kombinasyonunda gözlendi (Tablo 4.23).

Tablo 4.23: HT29 hücrelerinde toplam protein düzeyleri

Maddeler ve Kombinasyonlar	BCA ± SD (mg/mL)
Kontrol	1,50 + 0,11
15,6 µg/mL 5-FU	1,27 ± 0,06
185 µg/mL 5-FU	1,11 ± 0,04
1500 µg/mL SPP	0,86 ± 0,05
%2,5 Sindirilmiş kefir	1,42 ± 0,05
%8,25 Sindirilmiş kefir	1,50 ± 0,04
%15 Sindirilmiş kefir	1,44 ± 0,10
15,6 µg/mL 5-FU+ %2,5 Sindirilmiş kefir	1,19 ± 0,05

Tablo 4.23 (Devam)

15,6 µg/mL 5-FU+ %15 Sindirilmiş kefir	1,15 ± 0,03
185 µg/mL 5-FU+ %8.25 Sindirilmiş kefir	1,09 ± 0,08
185 µg/mL 5-FU+ 1500 µg/mL SPP	0,75 ± 0,03

5-FU: 5-Fluorourasil, BCA: bicinchoninic asit, SD: Standart sapma, SPP: Sodyum pentaborat pentahidrat

4.15. HT29 HÜCRELERİNDE PROTEOMİK ANALİZ SONUÇLARI

Bu çalışmada, HT29 hücrelerine uygulanan 5-FU, SPP, sindirilmiş kefir ve kombinasyonların hücresel düzeyde oluşturduğu protein profili değişimlerini belirlemek amacıyla proteomik analiz gerçekleştirildi. Uygulamalar sonrasında hücrelerden elde edilen toplam protein miktarı BCA yöntemi ile nicel olarak belirlendi ve örnekler proteomik analize tabi tutuldu. Toplamda 25 farklı proteinin tanımlandığı ve bazı proteinlerin yalnızca belirli uygulamalarda ifade edildiği saptandı.

HT29 hücrelerine uygulanan farklı gruplarda bazı proteinlerin ekspresyon düzeyleri farklılık gösterdi. Albumin proteini; 15,6 ve 185 µg/mL 5-FU, 1500 µg/mL SPP, %2,5 ve %15 sindirilmiş kefir, 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 sindirilmiş kefir ve 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP kombinasyonlarında; Histon H2B/H4 proteini kontrolde ve 185 µg/mL 5-FU uygulamasında tespit edildi. Annexin-A2, kontrol ve 185 µg/mL 5-FU uygulamalarında görüldü. Aktive Protein C Kinaz 1 Reseptörü, Moesin ve Sitokrom b-c1 Kompleksi Alt Birimi 1 ve pirüvat kinaz sadece 1500 µg/mL SPP uygulamasında tespit edildi. Tolloid-benzeri protein-1 (TLL-1), Nöronal pentraxin reseptörü (NPTxR) ve Proton-bağımlı çinko taşıyıcısı (SLC30A5) yalnızca 185 µg/mL 5-FU ve 1500 µg/mL SPP kombinasyonlarında tespit edildi. İnsülinle indüklenen gen-2 proteini yalnızca 15,6 µg/mL 5-FU uygulamasında bulundu.

Kollapsin Yanıt Aracı Protein-4 kontrolde, %2,5 ve %15 sindirilmiş kefir uygulamalarında tespit edildi. Beta-tubulin, 185 µg/mL 5-FU, %8,25 sindirilmiş kefir, tüm sindirilmiş kefir kombinasyonlarında bulundu. Timosin beta-4, Annexin A2 benzeri protein %15 sindirilmiş kefirde, Protein S100-A11, Peptidil-prolil cis-trans izomeraz D, Çinko parmak proteini 469 %8,25 sindirilmiş kefirde, Ubukitin karboksil-terminal hidrolaz-2, Isı şok proteini, mitokondriyal (60 kda) ve Kollajen alfa-3(IX) zinciri %2,5 sindirilmiş kefir uygulanan HT29 hücrelerinde tespit edildi. Semaforin-4F, 185 µg/mL 5-FU, %8,25 sindirilmiş kefir, 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir, 185 µg/mL 5-FU + %8,25 sindirilmiş kefir uygulamalarında tespit edildi. Protein S100-A9, 15,6 µg/mL 5-

FU ve 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir uygulanan HT29 hücrelerinde ifade edildi. Tip II İskeletsel Keratin-1 ve SH3 domain bağlayan glutamik asit açısından zengin protein; 185 µg/mL 5-FU ve 185 µg/mL 5-FU + %8,25 kefir kombinasyonunda tespit edildi.

Tablo 4.24: HT29 hücrelerinde farklı madde ve kombinasyonlarına göre tespit edilen proteinler

PROTEİN	NC	A	B	C	D	E	F	A+D	A+F	B+E	B+C
Albumin		✓	✓	✓	✓		✓	✓			✓
Beta-Tubulin			✓			✓		✓	✓	✓	
Histon H2B/H4	✓		✓								
Kollapsin Yanıt Aracı Protein-4	✓				✓		✓				
Annexin-A2	✓		✓							✓	
Aktive Protein C Kinaz 1 Reseptörü			✓								
Moesin			✓								
Sitokrom b-c1 Kompleksi Alt Birimi 1			✓								
Pirüvat Kinaz			✓								
Semaforin-4F			✓			✓			✓	✓	
Protein S100-A9							✓		✓		
Protein S100-A11					✓						
Timosin beta-4							✓				
Annexin A2 benzeri protein							✓				
Peptidil-prolil cis-trans izomeraz D					✓						
İnsülinle indüklenen gen 2 proteini		✓									
Keratin, Tip II İskeletsel 1			✓							✓	
SH3 domain bağlayan glutamik asit açısından zengin protein			✓							✓	
Çinko parmak proteini 469					✓						
Ubukitin karboksil-terminal hidrolaz 2				✓							
Isı şok proteini, mitokondriyal (60 kda)				✓							
Kollajen alfa-3(IX) zinciri				✓							
Tolloid-benzeri protein 1											✓
Nöronal pentraxin reseptörü											✓
Proton-bağımlı çinko taşıyıcısı											✓

A: 15,6 µg/mL 5-Fluorourasil, B: 185 µg/mL 5-Fluorourasil, C: 1500 µg/mL sodyum pentaborat pentahidrat, D: %2,5 sindirilmiş kefir E: %8,25 sindirilmiş kefir, F: %15 sindirilmiş kefir

5. TARTIŞMA

5.1. 5-FLUOROURASİL HAKKINDA TARTIŞMA

Bu çalışmada 5-FU'nun HT29 ve FHC hücreleri üzerindeki etkileri, doz ve inkübasyon süresi faktörleri göz önünde bulundurularak karşılaştırıldı. Elde edilen bulgular, 5-FU'nun her iki hücre tipinde hücre canlılığını zaman ve doz bağımlı olarak azalttı. Ancak bu etki, beklenildiği üzere hücre tipine göre farklılık gösterdi. HT29 hücrelerinde, 5-FU uygulaması sonrası 24 saatte hücre canlılığı 500 µg/mL haricinde %100'ün üzerinde seyretti. Bu durum, düşük doz kemoterapötik ajanların kanser hücrelerinde de kısa süreli bir proliferatif yanıt oluşturabileceğini gösterdi. Ancak zamanla bu artış ortadan kalktı ve canlılıkta azalma başladı. 48 saatlik inkübasyonda 5-FU dozları arttıkça canlılıkta belirgin bir azalma gözlendi; 500 µg/mL dozunda canlılık %44,06'ya kadar geriledi. 72 saatlik inkübasyon sonucunda ise canlılık daha da azalarak 500 µg/mL dozunda %29,64'e indi. Bu sonuçlar, HT29 hücrelerinin zamana ve doza bağlı olarak 5-FU'ya karşı yüksek düzeyde duyarlılık gösterdiğini belirledi.

FHC hücrelerinde ise düşük doz 5-FU uygulamasında özellikle 24. saatte dikkat çekici bir proliferatif yanıt gözlendi. Bu artış, düşük doz 5-FU'nun normal hücrelerde adaptif bir proliferatif yanıtı tetiklediğini düşündürdü. Ancak doz arttıkça ve zaman ilerledikçe hücre canlılığında azalma gerçekleşti. 72. saatte 500 µg/mL dozunda FHC hücre canlılığı %60,39'a düştü. FHC hücreleri de zamanla ve doz artışıyla birlikte 5-FU'nun sitotoksik etkilerine duyarlı hale geldi.

Düşük doz 5-FU'nun hem FHC hem de HT29 hücrelerinde erken dönemde hücre canlılığını artırması, literatürde "hormesis" olarak tanımlanan biyolojik bir yanıtla açıklanmaktadır. Hormesis, düşük dozda toksik bir ajana maruz kalındığında hücresel savunma ve proliferasyon mekanizmalarının aktive edilmesi ile karakterizedir (256). Sağlıklı hücrelerde bu süreç büyüme faktörlerinin artışı veya DNA onarım mekanizmalarının devreye girmesi ile sağlanabilirken, kanser hücrelerinde bozulmuş hücresel kontrol mekanizmaları nedeniyle anormal proliferatif yanıtlar oluşabilir (257). Bununla birlikte, daha uzun inkübasyon süresi ve daha yüksek dozlarda her iki hücre tipinde de proliferasyon yanıtı yerini belirgin bir hücre ölümüne bıraktı.

Varyans analizi sonuçlarına göre HT29 hücrelerinde hücre canlılığındaki değişkenliğin %41,36'sı uygulanan dozdan, %45,27'si inkübasyon süresinden kaynaklandı. Buna karşılık, FHC hücre canlılığındaki değişkenliğin %23,71'i inkübasyon süresinden, %60,96'sı dozdan kaynaklandı. Bu bulgu, normal hücrelerde doza bağlı hasarın daha belirgin olduğunu, kanser hücrelerinde ise zaman etkisinin daha baskın olduğunu gösterdi.

5.2. SODYUM PENTABORAT PENTAHİDRAT'IN VE 5-FU İLE KOMBİNASYONLARI ile İLGİLİ TARTIŞMA

Bu çalışmada, SPP uygulamasının HT29 ve FHC hücreleri üzerindeki etkileri farklı dozlar ve inkübasyon süreleri boyunca değerlendirildi. Bulgular, SPP'nin her iki hücre tipi üzerinde doza ve zamana bağlı etkiler gösterdiğini, ancak bu etkilerin hücre tipine göre farklılık sergilediğini ortaya koydu. HT29 hücrelerinde, SPP uygulamasıyla hücre canlılığı tüm dozlarda anlamlı şekilde azaldı. İki yönlü varyans analizi sonuçları, hücre canlılığındaki değişimin %87,27'sininn uygulanan dozdan kaynaklandığını, inkübasyon süresinin etkisinin ise %10,31 düzeyinde kaldığını gösterdi. FHC hücrelerinde ise düşük doz SPP uygulamasında (375 µg/mL) hücre canlılığında artış meydana geldi ve bu artış 72. saatten itibaren negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ancak daha yüksek dozlarda ve özellikle 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda FHC hücre canlılığında belirgin azalmalar meydana geldi. İki yönlü varyans analizi, FHC hücrelerinde de toplam varyasyonun %87,38'inin dozdan kaynaklandığını, zamanın etkisinin ise sadece %1,94 olduğunu ortaya koydu. Her iki hücre tipi karşılaştırıldığında, SPP'nin HT29 hücrelerinde FHC hücrelerine kıyasla daha erken ve daha belirgin bir sitotoksik etki oluşturduğu görüldü. Kanser hücrelerinin proliferatif yapıları ve bozulan hücresel kontrol mekanizmaları, SPP gibi ajanlara karşı daha duyarlı olmalarına neden olurken, normal hücreler düşük dozlarda adaptif proliferatif yanıtlar geliştirdi, ancak yüksek dozlar ve uzun süreli maruziyet sonunda onlar da sitotoksik etkilerden etkilendi. SPP'nin TI değeri 72. saatte 3,90 olarak hesaplandı bu değer 5-FU'da 3,15 idi. Dolayısıyla SPP, 5-FU'dan daha yüksek bir TI değerine sahipti.

Literatür taramasında, SPP'nin KRK hücreleri üzerinde etkisini doğrudan gösteren ve 5-FU ile beraber kombinasyonunu araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak sodyum tetraborat ve borik asit gibi bor bileşiklerinin KRK hücre hatlarında yapılmış çalışmaları bulunmaktadır. SPP'nin ise Küçük hücreli akciğer kanseri

hücre hattı DMS-114 (179), hepatoselüler karsinom hücre hatları olan HePG2 ve Hep3B (11,12) kanser hücre hatlarında değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle SPP'nin bulguları literatürdeki bu çalışmalar çerçevesinde ve diğer bor bileşiklerinin kanser üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar çerçevesinde tartışılmıştır. Tablo 5.1'de bazı bor bileşiklerinin antikanser etkilerini inceleyen in vitro çalışmaların özeti verilmiştir.

Tablo 5.1: Bazı bor bileşiklerinin antikanser etkilerini inceleyen çalışmalar

Bor Bileşiği	**Hücre Türü**	**Doz**	**Süre**	**Etkiler**	**Kaynak**
Borik Asit	A549: İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hattı	10; 30; 50; 100 µM	24 s	MMP-9 immünreaktivitesi ↓ Bax ve Caspase-3 immünreaktivitesi ↑ Vimentin ve VEGF immünreaktivitesi ↔ Migrasyon inhibisyonu ↑	178
Borik asit, SPP, Sodyum perborat tetrahidrat	DMS-114: Küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı, MRC-5: İnsan embriyonik akciğer fibroblastları	Borik asit ve sodyum pentaborat pentahidrat: 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000 µg/mL, Sodyum perborat tetrahidrat: 15,625; 31,25; 62,5; 78,125; 125; 250 µg/Ml	72 s	Hücre canlılığı inhibisyonu, Koloni birim sayısı ↓ *BIRC2*, *BIRC5* ve *BCL-2* ↓ Apoptoz, *BAX*, *P53* ve *KASPAZ-3*↑ *TP63*↑ Her 3 madde de MRC-5 hücrelerine zarar vermemiş.	179
Borik Asit	A549	1, 10, 25, 50, 75 mM	24 s, 48 s	Hücre canlılığı, *TGF-β* ↓ Geç evre Apoptoz ↑ SMAD-2, KASPAZ-3 immünreaktivitesi ↑	180
Bor glisin mono- ve di- ester	U87MG glioblastoma hücreleri	0,5; 1; 5; 10; 25; 50 mM	48 s	Sitotoksisite ↑ Katalaz aktivitesi ve asit fosfataz aktivitesi ↓ Alkalen fosfataz ↔ MDA↑	181
SPP	HepG2, Hep3B: İnsan hepatoselüler karsinom hücre hatları	1700, 2500, 3400, 5000, 6300 8500 µM	24 s, 48 s, 72 s	Doza ve zamana bağlı; Sitotoksisite↑, Apoptoz↑ *SERPINE1*, *PMAIP1*, *GADD45A*, *CDKN1A*, *BBC3*↑ Kurkumin ve piperin ile sinerjistik etki	11
SPP ve Kalsitriol	HepG2, HHSC: Sağlıklı insan hepatik yıldız hücreleri	SPP: 0,34; 0,85; 1,7; 3,3; 5,1; 6,7, 8,4; 10,1; 11,8; 19,9 mM, Kalsitriol: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 µM	24 s, 48 s, 72 s	3,3 mM SPP ve 1 µM kalsitriol sinerjik etki Sitotoksite, *P53*, *CDKN1A*, *GADD45A* ve *p27* ↑, *AKT1*, *MDM2*, *CYP27B1* ↓ HHSC hücrelerinde toksik etki görülmedi.	12

Tablo 5.1 (Devam)

Borik Asit	CCL-233: İnsan kolorektal adenokarsinom hücre hattı	10, 25, 50, 75, 100 mM	24 s, 48 s, 72 s	Proliferasyon inhibisyonu, VEGF↔ PARP ↓	182
Borik Asit	Caco-2: İnsan kolorektal adenokarsinom hücre hattı	0,1; 0,25; 0,5; 1 mM	7 gün	Doza bağlı proliferasyon inhibisyonu, Büyüme inhibisyonu, BCL-2 ↓	183
Borik Asit	HT29: İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı	1, 10, 25, 50, 100 mM	24 s	50, 100 mM: antiproliferatif ve 5-FU ile sinerjik, 1,10, 25 mM: etkisiz ve 5-FU ile antagonist	184
Boraks	HCT-116: İnsan kolorektal karsinom hücre hattı	1, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 mM	24 s	Sitotoksisite, Ferroptoz indüksiyonu, *ACSL4*, *MDA*, *8- OHdG* ↑ *GPx4* ↓	185
Kalsiyum Fruktoborat ve Borik Asit (ayrı ayrı)	MDA-MB-231: İnsan üçlü negatif meme kanseri hücresi	0,45; 2,25; 5; 11,25; 22,5 mM	24 s	Her ikisi de: Büyüme inhibisyonu, *p53* ↓ *BCL-2* ↓ *PRO-KASPAZ-3* ↑ *Sitozolik Sitokrom C* ↑ *Kaspaz-3 Aktivitesi* ↑	186
Borik Asit	MIA PaCa-2: İnsan pankreatik duktal adenokarsinom ve PANC-1: İnsan pankreatik epitelyal adenokarsinom hücresi	10, 50, 250, 1250, 2500, 5000, 15000, 25000 µM	24 s, 48 s, 72 s	Doza ve zamana bağlı hücre canlılığı ve koloni oluşum inhibisyonu, *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CYCS* ve *FAS* ↑ *ATF4*, *HSP47* ve *XBP1* ↑	187

8-OHdG: 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin, ACSL4: Uzun Zincirli Açil-KoA Sentetaz Ailesi Üye 4 (Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 4), AKT1: Protein Kinaz B, ALP: Alkalen Fosfataz (Alkaline Phosphatase), ATF4: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4, Bax: Bcl-2 ile İlişkili X Proteini (Bcl-2-associated X protein), Bcl-2: B-hücre Lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2), BBC3: Bcl-2 Bağlanma Bileşeni 3 (BCL2 Binding Component 3), BIRC2: Baculoviral IAP Tekrar İçeren 2 (Baculoviral IAP Repeat Containing 2), CASP: Kaspaz (Caspase), CDKN1A: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A), CYP27B1: Sitokrom P450 Ailesi 27 Alt Ailesi B Üye 1 (Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1), CYCS: Sitokrom C (Cytochrome C), FAS: Fas Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü (Fas Cell Surface Death Receptor), GADD45A: Büyüme Durdurma ve DNA Hasarına Yanıt Veren Alfa (Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha), GPx4: Glutatyon Peroksidaz 4 (Glutathione Peroxidase 4), HSP47: Isı Şok Proteini 47 (Heat Shock Protein 47), MDA: Malondialdehit, MMP-9: Matriks Metalloproteinaz-9, MDM2: Mouse Double Minute 2 Homolog, PARP: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz, PMAIP1: Phorbol-12-Miristat-13-Asetat İndüklenen Protein 1 (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1), SERPINE1: Plazminojen Aktivator İnhibitörü-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), SMAD2: SMAD Ailesi Üyesi 2 (SMAD Family Member 2), TGF-β: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (Transforming Growth Factor Beta), VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor), XBP1: X-Kutusu Bağlanma Proteini 1 (X-box Binding Protein 1).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, sodyum tetraboratın HCT-116 KRK hücrelerinde ferroptozu indüklediği ve antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi sonuçlarına göre 24 saatlik IC25 ve IC50 konsantrasyonları bu hücrelerde sırasıyla 12,5 ve 20,8 mM olarak belirlenmiştir. 24 saatlik sodyum tetraborat maruziyeti sonucunda, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerini aktive eden ve ferroptoz duyarlılığını artırarak kanser hücrelerinin ölümünde kritik rol oynayan bir enzim olan Uzun Zincirli Açil-CoA Sentetaz-4 seviyeleri artmıştır. Hücre zarında bulunan lipit peroksitleri detoksifiye eden ve ferroptozu önleyen bir antioksidan enzim olan Glutatyon Peroksidaz-4 seviyeleri doz bağımlı olarak azalmıştır. Ayrıca Malondialdehit ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin seviyeleri artmış ve böylece lipit peroksidasyonu ve DNA hasarı tetiklenmiştir. Tüm bu verilerin sonucunda yazarlar, sodyum tetraboratın KRK'de potansiyel bir anti-kanser ajanı olabileceğini ancak bunu inceleyen farklı KRK hücre hatları ve *in vivo* modelleri içeren çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır (258).

Kırlangıç ve arkadaşları (259), sodyum tetraborat ve 5-FU kombinasyonunun insan KRK hücre hattı olan DLD-1 üzerindeki etkilerini incelemiştir. Sodyum tetraboratın 48 saat sonunda IC50 değeri 500 µM, 5-FU'nun ise 50 µg/mL olarak belirlenmiştir. 150 µM sodyum tetraborat ve 50 µg/mL 5-FU kombinasyonu, DLD-1 hücre canlılığını %38,59'a düşürdüğü rapor edilmiştir. Sodyum tetraborat ve 5-FU kombinasyonu, her iki ajanın tek başına uygulanmasına göre daha güçlü sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Sodyum tetraborat tek başına %46,8, 5-FU tek başına %33,2 oranında apoptoza neden olurken, kombine tedavi ile bu oran %66,3'e çıkmıştır. Kombinasyonun *TP53* gen ekspresyonunu arttırdığı, anti-apoptotik *BCL-2* gen ekspresyonunu ise baskıladığı belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada, borik asit'in HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki etkilerini ve 5-FU ile kombinasyonunun kemoterapötik etkinliği nasıl değiştirdiğini incelenmiştir. Yüksek doz borik asitin (50-100 mM) sitotoksik etki göstererek hücre canlılığını azalttığı, ancak düşük doz borik asitin (1-25 mM)'nın 5-FU'nun hücre öldürücü etkisini zayıflatabildiği rapor edilmiştir. Tek başına uygulanan 5-FU, hücre ölümünü artırırken BAX/BCL-2 oranını ve apoptotik proteinleri (*P53*, *KASPAZ-3*) yükselttiği, ancak 10 mM borik asit ile kombine edildiğinde bu etkilerin baskılandığı ve genotoksisitenin azaldığı, dolayısıyla borik asit'in 5-FU'nun etkisini azaltabileceği

gösterilmiştir. Bu nedenle borik asit'in doza bağlı olarak iki farklı etki gösterdiği, yüksek dozda sitotoksik ve kemoterapiye destekleyici, düşük dozlarda ise 5-FU'nun etkinliğini azaltarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkı sağladığı belirlenmiştir (184).

Bu çalışmada hem FHC hem de HT29 hücrelerinde uygulanan 5-FU ve SPP kombinasyonları, zaman ve doz bağımlı olarak hem kontrole göre hem de tekli uygulamalarına göre hücre canlılığını azaltmıştır. Elde edilen verilere göre, 185 µg/mL 5-FU uygulaması sonrasında HT29 hücrelerinin canlılığı %48,70'e, FHC hücrelerinin canlılığı ise %75,84'e düşmüştür. Tek başına 1500 µg/mL SPP uygulandığında HT29 hücre canlılığı %52,85, FHC hücre canlılığı ise %80,80 olarak ölçülmüştür. Ancak 185 µg/mL 5-FU ve 1500 µg/mL SPP kombinasyonu uygulandığında, HT29 hücrelerinde canlılık %22,23'e, FHC hücrelerinde ise %62,99'a kadar gerilemiştir. Bu sonuçlar, kombinasyonun her iki hücre hattında da tekli uygulamalara göre daha güçlü bir sitotoksik etki oluşturduğunu ve bu etkinin özellikle HT29 kanser hücrelerinde daha belirgin olduğunu göstermektedir.

72 saatlik inkübasyon sonunda 185 µg/mL 5-FU ve 1500 µg/mL SPP kombinasyonu ile yapılan Snergyfinder analizlerinde, ZIP ve Bliss modelleri additif ya da sınıra yakın etkiler bildirirken, HSA ve Loewe modelleri anlamlı düzeyde pozitif sinerji gösterdi. ZIP ve Bliss bağımsızlık modelleri, ajanlar arası etkileşimi "bağımsız" varsaymakta ve iki ajanın hedef hücre üzerinde tamamen farklı yollarla etki ettiğini kabul etmektedir. Bu nedenle kombinasyon etkisi bu modellerde sınırlı olarak hesaplanmış olabilir. Buna karşılık, HSA ve Loewe modelleri, ilaçların benzer veya örtüşen etki yolları üzerinden sinerji oluşturabileceğini ve özellikle Loewe modeli, iki ajanın benzer hedeflere yöneldiğini varsayarak doz etkileşimlerinin daha hassas biçimde değerlendirilmesini sağlamaktadır. Snergyfinder uygulaması daha genel bir sonuç çıkarırken CI ise doza spesifik bir sonuç vermektedir. 5-FU ve SPP kombinasyonlarının CI değerleri, HT29 hücrelerinde çoğunlukla güçlü ya da çok güçlü sinerjik etkiler oluştuğunu gösterdi. Yalnızca 93,75 µg/mL SPP ile elde edilen CI değeri 1,61 olup antagonistik etki göstermiştir. Diğer tüm kombinasyonlar ise sinerjik veya çok güçlü sinerjik etki oluşturmuştur. Bu veriler ışığında, çalışma için seçilen 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP kombinasyonu, CI=0,07 değeri ile "çok güçlü sinerji" kategorisinde yer almakta ve kombinasyonun yüksek düzeyde terapötik etki potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Seçilen bu kombinasyon, hem istatistiksel olarak anlamlı hücre

canlılığı azalması göstermesi hem de model temelli analizlerde güçlü sinerjik etkiyi sunması nedeniyle biyolojik olarak dikkat çekici ve terapötik açıdan umut verici bulundu. Bunu desteklemek adına, 185 µg/mL 5-FU, 1500 µg/mL SPP ve bu iki ajanın kombinasyonunun HT29 hücrelerinde apoptoz ve metastazla ilişkili genler üzerindeki etkisi değerlendirildi. *KASPAZ-3, -8, -9, BAX, BCL-2* ve *MMP-9* açısından SPP ve 5-FU arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Her iki madde de *KASPAZ*-3, -8, -9, *BAX*, *MMP*-9 ekspresyonlarını arttırırken *BCL*-2 ekspresyonlarını azalttı. Dolayısıyla her iki madde de apoptozu hem intrinsik hem de ekstrinsik yoldan aktive etti.5-FU *MMP-2* ekspresyonunu SPP'ye kıyasla anlamlı düzeyde arttırdı. SPP'nin etkisiyle *MMP-2* artışı kontrol grubuna göre anlamlı değildi ancak 5-FU MMP-2 ekspresyonunu SPP'ye göre anlamlı düzeyde arttırdı. Kombinasyon uygulamasında ise *KASPAZ-3, -8, -9* ve *BAX* genlerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttı. Kombinasyonda, *KASPAZ-3* ekspresyonunun, 5-FU'ya göre anlamlı şekilde artmış olması, kombinasyonun 5-FU'ya kıyasla apoptozun son yürütücü fazında daha etkili olduğunu ve SPP'nin bunu desteklediğini düşündürmektedir. *KASPAZ-8*'in SPP'ye kıyasla kombinasyonda anlamlı şekilde artması, ekstrinsik apoptoz yolunun 5-FU ile güçlendiğini belirtmektedir. Kombinasyonun, hem 5-FU'ya hem de SPP'ye kıyasla *BCL-2* gen ekspresyonunu daha fazla baskılaması apoptozda ve hücrenin hayatta kalma direncinin kırılmasında daha etkili olduğunu göstermektedir. *MMP-2* ve *MMP-9* genlerinin ekspresyon düzeylerinde gözlenen artış, kombinasyonun apoptoz yanında hücre iskelet yapısını ve invazyon potansiyelini de etkileyebileceğini düşündürmektedir. Özellikle *MMP-2* ekspresyonunun SPP'ye kıyasla kombinasyon grubunda anlamlı şekilde yüksek olması, bu ajanın 5-FU ile birlikte potansiyel bir hücresel yeniden şekillenme yanıtını indüklediğini düşündürmektedir. *MMP-9*'daki artış ise tüm gruplarda benzer düzeylerde olup, bu maddelerin ve kombinasyonunun invazyon üzerindeki etkisini belirlemek açısından ek fonksiyonel testler yapılmalı ve daha düşük dozlarla da çalışılmalıdır.

Annexin V-FITC ve PI boyama sonuçlarına göre, 5-FU, SPP ve bu iki ajanın kombinasyonu HT29 hücrelerinde farklı hücre ölüm paternleri oluşturdu. Kontrol grubunda hücrelerin büyük çoğunluğu erken apoptoz evresinde yer alırken (%73,68), 5-FU uygulaması bu oranı daha da artırarak %84,62'ye çıkarmış, geç apoptoz ve nekroz oranlarını düşük seviyede tutmuştur. Buna karşın, SPP uygulaması erken apoptozu %31,58'e indirirken geç apoptozu %40, nekrozu ise %28,42 seviyesine çıkarmıştır. Bu

durum, SPP'nin geç evre apoptoz ve nekroza yönelimi artırdığını göstermektedir. Kombinasyon uygulamasında ise erken apoptoz oranı dramatik şekilde azalmış (%6,06), geç apoptoz oranı ise %78,79'a yükselmiştir. Bu veriler, kombinasyonun hücreleri doğrudan geri dönüşsüz apoptotik evrelere ve hücre ölümüne sürüklediğini göstermekte; bu da apoptozun ilerletildiği ve hücresel geri dönüşümün engellendiği anlamına gelmektedir. Görüntüleme sonuçları, gen ekspresyon analizleriyle de uyumludur: özellikle *KASPAZ-3, -8, -9* ve *BAX* artışı ile *BCL-2* ekspresyonunun azalması, hücre ölüm yollarının moleküler düzeyde de aktive edildiğini desteklemektedir. Sonuç olarak, 5-FU ve SPP kombinasyonu, hücre ölümünü artıran ve apoptozu daha geç ve geri dönülmez fazlara taşıyan sinerjik bir etki oluşturmuştur. Ancak, kombinasyon uygulamasında nekroz oranının %15,15'e yükselmiş olması, tedavinin yalnızca apoptozu değil aynı zamanda hücresel bütünlüğü bozarak nekroza da yol açabileceğini göstermektedir. Bu durum, yüksek doz kombinasyonların hücre üzerinde aşırı stres oluşturarak programlı hücre ölümünün dışına çıktığını ve kontrolsüz hücre yıkımına neden olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim bu çalışmada her iki ajanın da IC_{50} dozları birlikte uygulanmıştır. Bu nedenle, hücre ölüm paternlerinin daha selektif ve apoptoza yönelimli olması için ilerleyen çalışmalarda daha düşük alt-IC_{50} dozlarda kombinasyonlar denenerek, optimum etkinlik ve minimal toksisite dengesinin sağlanması hedeflenmelidir. Böylece terapötik potansiyeli yüksek, ancak nekroza neden olmadan daha kontrollü bir hücre ölüm yanıtı oluşturulabilir.

Ömeroğlu-Ulu ve arkadaşları (11), SPP, kurkumin (Cur) ve piperin (Pip) kombinasyonlarının insan hepatoselüler karsinom hücre hatları olan HepG2 ve Hep3B üzerindeki etkilerini araştırmıştır. 48 saatlik IC50 değerleri, HepG2 hücreleri için SPP: 7664,5 µM, Cur: 44,8 µM; Hep3B hücreleri için ise SPP: 6561 µM, Cur: 41,4 µM olarak hesaplanmış, SPP ve Cur'un her iki hücre hattında doz ve zamana bağlı sitotoksik etki gösterdiği, ancak Pip'in belirgin bir toksik etkisi olmadığı belirlenmiştir. SPP ve Cur kombinasyonunun CI değerleri, HepG2 için 0,98 (2,5 mM SPP + 30 µM Cur), Hep3B için 0,97 (1,7 mM SPP + 30 µM Cur) olarak bulunmuş ve CI<1 olduğu için tutarlı bir sinerji etki gösterdikleri ortaya konmuştur. SPP, Cur ve Pip kombinasyonunun HCC hücrelerinde sitotoksisite, apoptoz ve hücre döngüsü analizlerinde sinerjik etki sağladığı, G0/G1 fazında hücre döngüsünü durdurarak hücre proliferasyonunu baskıladığı ve apoptozu arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, sağlıklı insan damar endotel hücrelerinden biri olan HUVEC hücrelerinde kombinasyon tedavisinin daha düşük toksisite gösterdiği

gözlemlenmiştir. Tüm bu bulgular ışığında yazarlar; SPP, Cur ve Pip'in HCC tedavisinde potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebileceğini öne sürmüştür.

Başka bir çalışmada, SPP ve kalsitriol kombinasyonunun HepG2 hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. SPP 72 saat IC50 değeri 8,4 mM olarak belirlenmiş kalsitriol ise tek başına anlamlı bir sitoksisite göstermemiştir. 3,3 mM SPP ve 1 μM kalsitriol kombinasyonunun belirgin sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Kombinasyon tedavisi, SPP'nin tek başına %13 olan apoptoz oranını %18'e yükselterek ve ROS seviyelerini arttırarak daha etkili bir anti-kanser etki gösterdiği rapor edilmiştir. Özellikle apoptozla ilişkili AKT serin/treonin kinaz 1 (*AKT1*) ve *MDM2* genlerinin ekspresyonunda bir azalma gözlenmiştir. Buna karşılık, p53, Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A, *CDKN1A*), *p27* ve büyümeyi durduran DNA hasar tepki proteini 45A (Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible Alpha, *GADD45A*) genlerinin ekspresyon seviyelerinde artış saptanmıştır. Ayrıca, hücre proliferasyonu ile ilişkili mini kromozom bakım kompleks bileşeni 2 (*MCM2*), *MCM5*, *MCM7* genlerinin baskılandığı belirlenmiştir. D vitamini metabolizmasıyla bağlantılı olarak ise, D vitamini reseptörü (*VDR*) ve sitozolik P450 ailesi 24A1 (*CYP24A1*) genlerinin yukarı regüle olduğu, buna karşın sitozolik P450 ailesi 27B1 (*CYP27B1*) geninin aşağı regüle olduğu saptanmıştır. Western Blot ve proteomik analizler, kombinasyon tedavisinin *MCM2* ve *MCM5* protein ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını doğrulamıştır. Bu bulguların sonucunda SPP ve kalsitriol kombinasyonunun HCC tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olabileceği bildirilmiştir (12).

2025 yılında yayınlanmış bir çalışmada, borik asit, sodyum perborat tetrahidrat ve SPP'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri grubuna ait insan akciğer adenokarsinom hücre hattı A549 ve insan fetal akciğer fibroblast hücre hattı olan sağlıklı MRC-5 üzerindeki etkileri incelenmiştir. Borik asit ve SPP'nin A549 hücrelerinde IC50 değeri sırasıyla 1000 ve 1250 μg/mL iken MRC5 hücrelerinde 5500 ve 6500 μg/mL olarak belirlenmiştir. Borik asit ve SPP'nin A549 hücreleri üzerinde seçici anti-kanser etkileri olduğu görülmüştür. Buna karşılık sodyum perborat tetrahidrat'ın ve pozitif kontrol olarak kullanılan sisplatin ilacını IC50 değerleri ise hem A549 hücrelerinde hem de MRS 150 μg/mL ve 13 μM olduğu dolayısıyla TI'larının 1 olduğu hesaplanmıştır. Borik asit ve SPP'nin A549 hücrelerinde G2/M fazında hücre döngüsünü duraklattıkları, *KASPAZ-3*, *TP53* genlerinin ekspresyonunu arttırırken, *BIRC5*'in ekspresyonunu azaltmıştır.

Çalışmanın sonucunda Borik asit ve SPP'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri *in vivo* modellerinde daha fazla değerlendirilmesini ve akciğer kanseri tedavisine yeni bor türevlerinin dahil edilmesinin önünün açılmasının gerektiği vurgulanmıştır (260).

MDR, kanser tedavisinde kemoterapötik başarının önündeki en önemli engellerden biri olarak kabul edilmektedir. Kemoterapide kullanılan ilaçların dozlarının artırılması ise sistemik toksisiteye yol açarak hastalarda ciddi yan etkilere neden olmakta, bu da tedavi sürecini hem klinik açıdan zorlaştırmakta hem de hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkilemektedir. MDR, kanserin nüks etmesinde başlıca etkenlerden biridir. Ayrıca hastalar arası biyolojik farklılıklar ve tümör içi heterojenite, bu direnç mekanizmalarının üstesinden gelinmesini daha da karmaşık hale getirmektedir (135). Bu bağlamda, geleneksel kemoterapötik ajanlara alternatif ya da tamamlayıcı olabilecek, toksisite profili daha düşük ve hedefe yönelik etkiler gösterebilen yeni bileşiklerin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada elde edilen bulgular, SPP'nin hem tek başına hem de 5-FU ile birlikte kullanıldığında KRK hücrelerinde anlamlı sitotoksik etki oluşturduğunu gösterdi. Ayrıca SPP, 5-FU'ya kıyasla daha yüksek TI değeriyle dikkat çekti ve kombinasyon uygulamalarında çoğunlukla sinerjistik etki gösterdi. Bu veriler, SPP'nin MDR gelişimini azaltabilecek ve kemoterapi etkinliğini artırabilecek potansiyel bir kemoterapötik ajan olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. SPP, özellikle 5-FU'ya karşı direnç gelişmiş vakalarda alternatif veya tamamlayıcı bir tedavi seçeneği olarak önemli bir aday olabilir.

5.3. SODYUM BÜTİRAT İLE İLGİLİ TARTIŞMA

Bu çalışmada, sodyum bütirat'ın farklı konsantrasyonlarının (1, 2, 5, 7,5, 10 ve 20 mM) HT29 ve FHC hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendi. Bulgular, sodyum bütiratın her iki hücre tipinde de hem doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak anlamlı etkiler oluşturduğunu gösterdi. HT29 hücrelerinde düşük doz sodyum bütirat (1 ve 2 mM) uygulamaları, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde hücre canlılığında geçici bir artışa neden oldu, ancak 72 saat sonunda bu artış kaybolarak hücre canlılığında belirgin azalmalar başladı. Daha yüksek dozlarda (5 mM ve üzeri) ise zaman ve doz bağımlı olarak hücre canlılığı kademeli şekilde azaldı ve 20 mM bütirat uygulamasında 72 saat sonunda hücre canlılığı %42,26'ya kadar düştü. FHC hücrelerinde ise 1 ve 2 mM sodyum bütirat uygulamasında özellikle 48 saatlik inkübasyonda canlılık anlamlı bir şekilde arttı, bu artış HT29 hücrelerine göre daha belirgin ve daha uzun süreli oldu. Ancak

5 mM ve üzeri dozlarda FHC hücrelerinde de zaman ve doz bağımlı şekilde canlılık azaldı, 72 saat sonunda yüksek dozlarda belirgin sitotoksik etkiler gözlemlendi. 72. saat sonunda 20 mM doz sodyum bütirat uygulanan hücrelerde canlılık 45,98'e geriledi.

Çalışmada 72 saatlik inkübasyon sonunda, sodyum bütirat'ın HT29 ve FHC hücreleri üzerindeki IC50 değerleri sırasıyla 14,4 mM ve 16,77 mM olarak belirlendi. Bu verilere göre hesaplanan TI 1,16 bulundu. TI'nın 1'in üzerinde olması, bütiratın kanser hücrelerine karşı belirli bir seçiciliğe sahip olduğunu göstermekte; ancak bu seçiciliğin sınırlı düzeyde olduğunu da ortaya koymaktadır. 72 saatte hem HT29 hem de FHC hücrelerinde sodyum bütiratın doza bağımlı sitotoksik etkisinin belirginleştiği gözlemlendi. Bu bulgular, bütiratın her iki hücre tipinde de uzun süreli maruziyet ve yüksek dozlarda belirgin sitotoksik etkiler oluşturduğunu gösterdi.

FHC hücrelerinde düşük doz bütirat uygulaması, proliferatif yanıtın daha uzun süre korunmasına yol açtı ve bu durum normal kolon epitelyal hücrelerinin düşük düzeyde bütiratla adaptif yanıt oluşturabileceğini düşündürdü. Bu bulgu, bütiratın düşük dozlarda kolonik epitel homeostazını destekleyebileceğini gösteren önceki literatürle uyumludur (261).

Son yıllarda, bağırsak mikrobiyal metabolitlerinin kanser inhibisyonu ve ilerlemesindeki rolü antikanser araştırmalarında önemli ilgi görmüştür (262). Diyet lifi tüketiminin artırılması daha düşük KRK insidansıyla bağlantılıdır ve bu antikanser etkisi, kolon bakterileri tarafından lifin fermentasyonuyla SCFA üretimine bağlıdır.

Literatüre göre, sağlıklı bireylerin kolonundaki SCFA'ların toplam konsantrasyonu 60-150 mmol/kg arasında değişmektedir; bunun yaklaşık 50-70 mmol'ü bütirattır ve günlük 5,5-7,5 gram üretime karşılık gelmektedir (263). Ancak bu kolonun her segmentinde aynı değildir.

Bu çalışmada kullanılan 96-kuyulu plakalardaki tek bir kuyunun taban alanı yaklaşık 0,32 cm^2'dir ve bu, insan kolonunun tahmini yüzey alanından (~20.000 cm^2) yaklaşık 62.500 kat daha küçüktür (264). Bu ölçeklemeye dayanarak, uygulanan in vitro dozların insan kolon eşdeğerleri 6,25 mmol (1 mM) ila 125 mmol (20 mM) arasında değişmektedir. 5-10 mM arasındaki dozlar fizyolojik olarak ilgili seviyelere uyarken, 20 mM suprafizyolojik bir maruziyeti temsil etmektedir (Tablo 5.2).

Tablo 5.2: İnsan kolonunda *in vitro* dozlara dayalı tahmini eşdeğer bütirat miktarları

Doz (mM)	Kuyu başına uygulanan sodyum bütirat (µmol)	İnsan kolonuna ölçeklenmiş tahmini sodyum bütirat (mmol)
1	0,1	6,25
2	0,2	12,5
5	0,5	31,25
7,5	0,5	46,88
10	1,0	62,5
20	2,0	125

Deneysel bulgularımız, 5-10 mM aralığındaki sodyum bütiratın HT29 CRC hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki yarattığını göstermektedir. Özellikle, 72 saatlik inkübasyondan sonra, 5 mM ve 10 mM sodyum bütirat, HT29 hücre canlılığını sırasıyla ortalama %66,85 ve %52,18'e düşürdü. Buna karşılık, aynı konsantrasyonların FHC normal kolon epitel hücreleri üzerinde daha ılımlı bir etkisi oldu ve hücre canlılığı 72 saat sonra %77,09 (5 mM) ve %61,16 (10 mM) olarak ölçüldü. Ancak, 20 mM konsantrasyonu hem HT29 hem de FHC hücrelerinde güçlü bir sitotoksik yanıta yol açtı ve bu da daha yüksek maruziyetlerde seçiciliğin kaybolduğunu gösterdi. Öte yandan, oral takviyelerde yaygın olarak kullanılan sodyum bütirat dozları tipik olarak 150-300 mg/gün (~1,36-2,72 mmol) aralığındadır; bu *in vitro* çalışmada gözlemlenen etkili konsantrasyonlardan önemli ölçüde düşüktür. Örneğin, 5 mM dozun tahmini kolon eşdeğeri yaklaşık 31,25 mmol iken, oral yoldan alınan 300 mg sodyum bütirat yalnızca yaklaşık 2,72 mmol sağlar. Dahası, ince bağırsakta hızlı emilimi nedeniyle, oral uygulamadan sonra yalnızca asgari miktarda bütirat kolona ulaşmaktadır (220).

Bir çalışmada 24, 48 ve 72 saatte bütiratın (0,0,25,0,5,1,2,4 mM) HCT116, HT-29 ve Caco-2 insan kolon kanseri hücreleri çoğalmasında IC50 değerleri sırasıyla 1,14, N/D, N/D; 0,83, 2,42, N/D; 0,86, 2,15, 2,15 olarak belirlenmiştir. Ancak HT-29 ve Caco-2 hücrelerine kıyasla HCT116 hücrelerinde apoptozun daha fazla indüklendiği gösterilmiştir. Yazarlar bu çalışmayı bütiratın inhibe edici etkinliğinin hücre tipine özgü olduğunu öne sürmüşlerdir (265). Başka bir çalışmada sodyum bütiratın HCT-116 KRK hücreleri üzerinde doza bağlı etkiler gösterdiği ve 5 mM'den itibaren konsantrasyonlarda canlılığı ve hücre çoğalmasını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. *BAX*, *CASP3* ve *PUMA* gibi pro-apoptotik genlerin yukarı regülasyonu ve *BCL-2*, *MCL-1*, *PCN* A ve *Ki-67* gibi anti-apoptotik ve çoğalma belirteçlerinin aşağı

regülasyonu yoluyla apoptozu ve hücre döngüsü durmasını indüklediği belirlenmiştir. HCT116 hücrelerinde IC50 değeri 24 saat için 26,85 mM olarak hesaplanmıştır (266).

Bütiratın *in vivo* etkileri doz ve/veya formülasyona bağlı olarak değişiklik gösterebilir, çünkü bütiratın *in vitro* kolonosit proliferasyonu üzerinde doz-spesifik bir etkisi vardır. Düşük dozlarda (yaklaşık 2 mM'nin altında), bütirat kolonosit proliferasyonunu uyarır. Buna karşılık, daha yüksek dozlarda bütiratın insan kolon epitel hücrelerinin in vitro ve ex vivo proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, serbest sodyum bütiratın ince bağırsakta daha fazla etkiye sahip olması muhtemeldir, çünkü emilim öncelikle bu bölgelerde gerçekleşir. Genel olarak, bu sonuçlar optimal kolonosit sağkalımı ve çoğalması için belirli bir eşik seviyesinde bütiratın gerekli olduğunu, ancak daha yüksek bütirat seviyelerinin tam tersi etkilere yol açabileceğini göstermektedir. Bütiratın bu görünüşte çelişkili etkileri farklı etki mekanizmalarından kaynaklanıyor olabilir. Düşük dozlarda bütirat mitokondri tarafından oksitlenerek Histon Asetil Transferaz (HAT)'i aktive ederken, daha yüksek dozlarda (β-oksidasyonu doyuran konsantrasyonlarda) bütiratın HDAC inhibisyon aktivitesi daha baskın hale gelir. HAT aktivasyonu veya HDAC inhibisyonu ile aktive edilen gen setlerinin önemli ölçüde farklı olması, bu çelişkili sonuçları kısmen açıklamaktadır. Ek olarak, doğrudan bütirat takviyesi (kapsüller veya lavmanlar yoluyla) endojen bütirat üretiminden farklıdır. Endojen bütirat üretimi, bağırsakta günlük ve ritmik olarak gerçekleşen fermantasyon süreçlerine bağlıdır ve genellikle ayrı, noktalı boluslar halinde üretilmez. Bu nedenle, bütiratın sürekli salımlı formülasyonları klinik değerlendirmeyi beklemektedir (220).

Bu çalışmada sodyum bütirat doğrudan hücre kültür ortamına uygulandığından, hücreler kısa sürede bolus şeklinde bütirata maruz kaldı. Bu uygulama, *in vivo* bağırsak ortamında bakteriyel fermantasyon sonucu oluşan ve zaman içinde daha ritmik ve sürekli şekilde değişen bütirat maruziyetinden farklılık göstermektedir. Bu farklılık, elde edilen hücre canlılık sonuçlarının *in vivo* koşullara doğrudan genellenmesini sınırlayabilir. Bu nedenle, bütiratın *in vivo* etkilerinin daha doğru şekilde değerlendirilebilmesi için sürekli salımlı uygulama modellerinin veya mikroakışkan sistemler gibi daha fizyolojik hücre kültür ortamlarının kullanılması gelecekteki çalışmalarda önemli olacaktır. Bütiratın çift yönlü etki mekanizması, doza bağlı olarak farklı gen ekspresyon profilleri oluşturmasına ve zıt biyolojik etkiler göstermesine neden olmaktadır. Ancak bütiratın optimal doz ve

süre kombinasyonlarının belirlenmesi, farklı hücre tiplerinde yanıt farklılıklarının daha iyi anlaşılması için ileri araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

5.4. KARNOSOL İLE İLGİLİ TARTIŞMA

Bu çalışmada, karnosolün farklı dozlarının (5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL) HT29 ve FHC hücre canlılığı üzerine olan etkileri değerlendirildi. Karnosol, HT29 hücrelerinde 5 µg/mL dozunda geçici proliferatif etkiler oluştururken, 75 µg/mL ve üzeri dozlarda ve uzayan inkübasyon sürelerinde anlamlı düzeyde sitotoksik etki geliştirdi. Benzer şekilde FHC hücrelerinde de 5 µg/mL karnosol dozu geçici proliferatif etkiler oluşturdu. Ancak artan dozlar ve uzayan inkübasyon süreleri ile birlikte FHC hücre canlılığında da azalmalar meydana geldi. Karnosolün HT29 ve FHC hücreleri üzerindeki IC50 değerleri sırasıyla 75,88 µg/mL ve 101,14 µg/mL olarak hesaplandı. Bu verilere göre karnosolün TI değeri 1,33 bulundu. TI'nın 1'in üzerinde olması, karnosolün kanser hücrelerine karşı belirli bir seçici toksisite eğilimi gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ancak, bu seçiciliğin sınırlı düzeyde olduğu ve normal hücreler üzerinde de belirli bir toksik etki potansiyelinin bulunduğu anlaşılmaktadır. Özellikle uzun süreli maruziyetlerde (72 saat), hem HT29 hem de FHC hücrelerinde canlılıkta belirgin azalmalar meydana geldi. Bu bulgular, karnosolün antikanser potansiyelinin değerlendirilmesinde dikkatli doz ayarlamalarının ve hedefe yönelik uygulamaların önemini vurgulamaktadır.

Güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu için karnosol, özellikle kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir biyolojik ajan olarak araştırılmaktadır (267,268). Sınırlı sayıda çalışmada karnosolün antikanserojen etkileri araştırılmış ve oral (269), meme (270), pankreas (271) ve kolon kanserlerinde (250,272-273) tespit edilmiştir. Park ve arkadaşları (272), karnosolün HCT116 hücrelerinde hücre canlılığını zamana ve doza bağlı bir şekilde azalttığını, apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada karnosolün Caco-2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, hücre döngüsünü G2/M ve S fazlarında durdurduğu gösterilmiştir (273). Başka bir çalışmada ise karnosolün HCT116 ve SW480 KRK hücrelerinin canlılığını doza bağlı olarak azalttığı, kaspaz-3'ü arttırdığı, Nrf2 sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (250).

Park ve arkadaşları (272), karnosolün (5, 20, 50 ve 100 µM) HCT-116 hücreleri üzerindeki etkilerini 24-72 saat boyunca incelemişler ve hücre canlılığının doza ve

zamana bağlı olarak azaldığını ve karnosolün apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. 20, 50 ve 100 μM karnosol dozlarının artan apoptotik hücre yüzdesine neden olduğu belirlenmiştir. Kaspaz-3 ve -9 aktivasyonunun, ROS seviyesinin arttığı, Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3, STAT3) sinyal yolunun inhibe olduğu, *BCL-2*, *BCL-XL* ve *MDM2* gen ekspresyonlarının azaldığı, *BAX* ve *p53* gen ekspresyonunun ise arttığı gösterilmiştir. Ancak çalışmada IC50 değeri belirtilmemiştir. 50-100 μM karnosolün belirgin bir sitotoksisiteye sahip olduğu görülmektedir. Sonuçlar eş zamanlı olarak pozitif bir kontrol ve sağlıklı bir hücre ile kıyaslanmamıştır. Başka bir çalışmada, karnosolün, Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde 20 saatlik uygulama sonucunda, hücre çoğalmasını 23 μM'lik IC50 değeri ile inhibe ettiği ve hücrelerin iki katına çıkma süresini belirgin şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Karnosol'ün hücre döngüsüne prometafazdan sonra etki ettiği ve Siklin B1 protein seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (273).

Yan ve arkadaşları (250), karnosol'ün (0,10,20,30,40,75,100 μM) HCT116 ve SW480 kolon kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik ve anti-kanser etkilerini 72. saatin sonunda incelemiştir. Karnosolün doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Kesilmiş (aktif) kaspaz-3 ekspresyonunun arttığı, Nrf-2 ve Protein kinaz R-benzeri endoplazmik retikulum kinazı (Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) sinyal yolaklarını aktive ederek hücresel stres yanıtlarını düzenlediği gösterilmiştir. HCT116 hücreleri, SW480 hücrelerine kıyasla karnosol'e daha duyarlı bulunmuş, bu da hücre içi farklı genetik profillerin tedaviye yanıtı nasıl değiştirdiğini ortaya koymuştur. IC50 değerleri belirtilmemiştir ancak 40-75 μM dozlarının etkili olduğu gösterilmiştir.

Literatürde karnosol'ün KRK hücrelerinde ve sağlıklı hücrelerde etkilerini eş zamanlı inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle karşılaştırma yapılamamıştır ancak karnosol ile ilgili şunlar düşünülmüştür: Karnosol HT29 hücrelerinde ekstra ROS üretimini tetikleyerek apoptozu indüklemiş olabilir ancak FHC hücrelerinde normalde düşük olan ROS seviyesinin aşırı artması hücre ölümüne neden olmuş olabilir. Yukarıda bahsedilen Yan ve arkadaşlarının çalışmasında (250) karnosolün Nrf2 yolağını aktive ettiği gösterilmiş, belki de sağlıklı hücrelerde de Nrf2'nin aşırı aktivasyonu paradoksal bir toksisiteye yol açmış olabilir. Ayrıca, HCT116 hücrelerini SW480 hücrelerine kıyasla daha duyarlı bulmuş olması da farklı hücre hatları üzerinde

karnosolün etkilerini inceleyen çalışmaların yapılması gerektiğini vurgulamaktadır. Hem kanserli hem de normal hücrelerdeki etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, karnosolün insanlarda biyoyararlanımı ve metabolizmasını araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Karnosolün artan dozlarla birlikte hem kanser hem de sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkilerin baskın hale gelmesi, karnosolün klinik kullanımında dikkatli doz ayarlamalarını zorunlu kılmaktadır. Özellikle 72 saatlik uzun süreli maruziyetlerde hem HT29 hem de FHC hücrelerinde canlılık kaybının belirginleşmesi, karnosolün tedavi edici doz aralığının dar olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, karnosolün terapötik uygulamalarında güvenli pencerenin belirlenmesi kritik önem taşımaktadır. Hem normal hem de kanserli hücrelerde oksidatif stres parametreleri, mitokondriyal disfonksiyon ve sinyal yolaklarının (örneğin, Nrf2, PERK, STAT3) detaylı şekilde araştırılması gerekmektedir. Ayrıca, karnosolün biyoyararlanımı, metabolik stabilitesi ve sistemik toksisite profili üzerine yapılan *in vivo* çalışmaların eksikliği, molekülün klinik potansiyelinin tam anlamıyla değerlendirilmesini sınırlamaktadır.

5.5. SİNDİRİLMİŞ KEFİR, SÜT VE SİNDİRİLMEMİŞ KEFİR, SİNDİRİLMİŞ KEFİR İLE 5-FLUOROURASİL KOMBİNASYONLARI HAKKINDA TARTIŞMA

Bu çalışmada sindirilmiş kefir, süt ve sindirilmemiş kefir örneklerinin HT29 ve FHC hücreleri üzerindeki etkileri, 10 kDa altı fraksiyonları kullanılarak değerlendirildi. Sindirilmiş kefir ve sindirilmiş süt örnekleri *in vitro* gastrointestinal sindirim protokolüne tabi tutuldu, ardından 10 kDa altı fraksiyonları izole edilerek hücre kültürüne uygulandı. Sindirilmemiş kefir örneği ise herhangi bir sindirim işlemine uğratılmadan 10 kDa altı fraksiyonu izole edilerek hücre kültürüne uygulandı. HT29 hücrelerinde, sindirilmiş kefir uygulamasının doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücre canlılığında anlamlı azalmaya yol açtığı belirlendi. Sindirilmiş kefirin FHC hücre canlılığını sindirilmemiş kefir ve sindirilmiş süte göre daha yüksek düzeyde koruduğu bulundu. IC50 değerleri de bu bulguları destekledi. Sindirilmiş kefirin HT29 hücrelerindeki IC50 değeri 8,25 µg/mL, FHC hücrelerindeki IC50 değeri ise 47,58 µg/mL olarak hesaplandı. TI değeri 5,77 olarak bulunan sindirilmiş kefir, kanser hücrelerinin canlılığını azaltırken sağlıklı hücrelerin canlılığını daha iyi koruyabildiğini gösterdi.

Sindirilmemiş kefir uygulamasında HT29 hücrelerinde başlangıçta hücre canlılığında azalma görülürken, 72. saat sonunda bazı dozlarda canlılık oranlarında toparlanmalar meydana geldi. FHC hücrelerinde ise sindirilmemiş kefirin sindirilmiş kefire kıyasla daha düşük hücre koruma kapasitesi sergilediği belirlendi. HT29 hücrelerinde sindirilmiş süt uygulaması, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda tüm dozlarda kontrol grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturdu. Ancak 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar karşılaştırıldığında, 72. Saatte tüm dozlarda hücre canlılığında artış gözlendi. %5 sindirilmiş süt uygulaması 72. saatte kontrol grubuna göre HT29 hücre canlılığını artırdı; ancak bu artış istatistiki olarak anlamlı değildi, diğer dozlarda (%15, %20, %40 ve %50) ise 72. saatte canlılıkta önceki zaman noktalarına kıyasla artışlar olsa da kontrol grubuna göre hücre canlılığı azalmış olarak devam etti. Sindirilmiş sütün HT29 IC50 değeri 40,19 µg/mL, FHC IC50 değeri ise 48,05 µg/mL olup TI değeri 1,20 olarak belirlendi. Sindirilmemiş kefirin IC50 değeri ise HT29 hücrelerinde 37,96 µg/mL, FHC hücrelerinde 31,03 µg/mL olarak bulundu ve TI değeri 0,82 olarak hesaplandı. Bu sonuçlar, sindirilmiş sütün ve sindirilmemiş kefirin seçiciliğinin sınırlı olduğunu ortaya koydu. Sindirilmiş kefirin HT29 hücrelerindeki sitotoksik etkisi, sindirim süreci sırasında ortaya çıkan yeni biyoaktif bileşiklerin kanser hücre proliferasyonunu baskılamadaki rolüne işaret ediyor olabileceğini düşündürmektedir. Sindirilmemiş kefirin ise HT29 hücrelerinde hücre canlılığını daha fazla koruduğu gözlendi. Bu sonuçlar, sindirilmiş kefirin KRK hücreleri üzerinde terapötik potansiyele sahip bir fonksiyonel gıda adayı olabileceğini destekledi. Ayrıca bu çalışma, gıdaların *in vitro* modellerde doğrudan değil, sindirim simülasyonu sonrasında uygulanmasının sonuçlar üzerinde önemli bir fark yaratabileceğini ortaya koydu. Dolayısıyla, fonksiyonel gıdaların kanser hücre kültürü çalışmalarında etkilerini daha doğru değerlendirebilmek için, sindirim simülasyonu sonrası elde edilen ürünlerin kullanılması gerektiği sonucuna varıldı. Gıda bileşenlerinin gerçek biyoyararlanımını ve hücresel etkilerini daha doğru yansıtabilmek adına*, in vitro* sindirim protokollerinin çalışmalara entegre edilmesi önemli bir gereklilik olarak öne çıktı. Bununla birlikte, sindirilmiş kefirin içerdiği spesifik aktif bileşiklerin tanımlanması ve etkili olduğu moleküler mekanizmaların aydınlatılması için ileri düzeyde çalışmalar yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

Sindirilmiş süt, sindirilmemiş kefir ve sindirilmiş kefir uygulamaları karşılaştırıldığında, özellikle sindirilmiş kefirin daha düşük toksik etki oluşturduğu ve

FHC hücre canlılığını daha yüksek düzeyde koruduğu gözlemlendi. Bu bulgular, sindirilmiş kefirin sindirilmemiş kefire kıyasla sağlıklı hücreler üzerinde daha güvenli bir biyolojik profil sergileyebileceğini düşündürdü. Sindirim işlemi sırasında kefir bileşiminde meydana gelen değişimlerin, biyoyararlanımı artmış, hücre dostu biyoaktif bileşiklerin oluşumuna katkı sağladığı öne sürülebilir. Böylelikle sindirilmiş kefir, sağlıklı hücreleri koruma potansiyeli ile fonksiyonel gıda uygulamalarında avantajlı bir aday olabileceğini göstermiştir. Ancak, bu etkinin moleküler düzeyde hangi mekanizmalarla gerçekleştiğinin belirlenmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kefirin 10 kDa altındaki küçük moleküller fraksiyonu, sindirim ve ultrafiltrasyon işlemleri sonucu serbest kalan bütirat, propiyonat ve asetat gibi SCFA'lar, laktik asit ve β-hidroksibutirik asit gibi organik asitler ile fenolik bileşenler (kafeik asit, ferulik asit) ve mikrobiyota kökenli indol türevlerini içerebilir. Bu bileşikler epigenetik düzenlemelere katılarak, serbest radikalleri nötralize ederek ve bağırsak bariyer fonksiyonlarını destekleyerek inflamasyonu baskılayabilir ve tümör oluşumunu engelleyebilir. 10 kDa üstü büyük molekül fraksiyonunda ise kazein türevli peptitler, laktalbumin, serum albumin, immünoglobulinler, müsinler, ekzopolisakkaritler, lipoteikoik asitler, peptidoglikanlar ve fosfolipidler gibi proteinler, polisakkaritler ve mikrobiyal yapılar yer alabilmektedir (274-276).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada kefir daneleriyle üretilen kefir ve starter kültürle üretilen kefir *in vitro* sindirime tabi tutulmuş, kefir daneleriyle üretilen kefirin sindirim sonrası mikroorganizma canlılığında daha düşük bir azalma olduğunu ortaya koyulmuş ve bu nedenle kefir daneleriyle üretilen kefir olası sağlık yararları nedeniyle daha fazla tercih edilmesi gerektiği öne sürülmüştür (238). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada geleneksel olarak üretilen kefirin *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrası biyoaktivitesinin arttığı, total fenolik madde içeriğinin, ACE inhibitör aktivitesinin, DPPH antioksidan aktivitesinin, DPP-IV inhibitör aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Yazarlar bir fermente ürünün biyolojik açıdan yararlılığını tayin etmek için sindirim prosesinin gerekli bir metot olduğunu rapor etmişlerdir. DPPH radikal giderme kapasitesinin %4,20'den %63,06'a, TFC'nin ise 43,76'den 668,16 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/L'ne yükseldiği gösterilmiştir (14). Bu çalışmada ise bu değerler sırasıyla %2,42'den 13,93'e, 140,91'den 352,96'ya yükseldiği gösterildi. DPPH radikal giderme kapasitesi analizlerinde hem sindirilmiş kefirin hem de özellikle 10 kDa altı fraksiyonunun en yüksek antioksidan kapasiteyi sergilediği belirlendi. 10 kDa üstü

fraksiyonlarında ise DPPH kapasitesi daha düşük düzeylerde bulundu. Benzer şekilde, TFC analizlerinde de sindirilmiş kefirin 10 kDa altı fraksiyonu en yüksek fenolik bileşik seviyesine sahipti. Sindirilmiş süt ve sindirilmemiş kefirin hem tam örneklerinde hem de fraksiyonlarında TFC düzeyleri sindirilmiş kefire kıyasla daha düşük bulunmuştur. Sindirilmiş kefirin 10 kDa altı fraksiyonlarındaki DPPH kapasitesi ve total fenolik içeriğinin yüksek olması ve HT29 hücre canlılığı üzerinde de en güçlü azalma etkisini oluşturması, elde edilen kimyasal parametrelerle hücresel yanıtlar arasında doğrudan bir ilişki olduğunu destekledi. Genel olarak, sindirim işleminin ve uygulanan ultrafiltrasyonun sindirilmiş kefirde biyoaktif moleküllerin serbest kalmasını ve fenolik içerik ile antioksidan kapasitenin artmasını sağladığı, bunun da hücre kültürü deneylerinde gözlenen biyolojik etkiler üzerinde belirleyici rol oynamış olabileceği değerlendirildi.

Bu çalışmada 5-FU ve sindirilmiş kefir ile yapılan tüm kombinasyonlar tüm zaman noktalarında kontrole göre HT29 hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttı. 72. saatte 15,6 µg/mL 5-FU ile yapılan %8,25 ve %15 sindirilmiş kefir kombinasyon uygulamaları tek başına uygulanan sindirilmiş kefire göre daha yüksek HT29 hücre canlılığı ile sonuçlandı. Bu durum sindirilmiş kefir ve 5-FU arasında bu dozlarda antagonist bir etkinin var olabileceğini düşündürdü. Ancak 15,6 µg/mL 5-FU ile yapılan %2,5 ve %5 sindirilmiş kefir kombinasyonlarında tek başına uygulanan sindirilmiş kefire göre HT29 hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik gerçekleşmedi. Kombinasyonlarda kefir dozu arttıkça HT29 hücre canlılığının da artması dikkat çekiciydi. 15,6 µg/mL 5-FU tek başına uygulandığında hücre canlılığı %63,68 düzeyinde ölçülürken, bu etki %2,5 sindirilmiş kefir ile kombinasyon halinde %58,88'e düştü; buna karşın %15 sindirilmiş kefir ile yapılan kombinasyonda canlılık tekrar %64,09'a yükseldi. Ancak 72. saat sonunda ise 15,6 µg/mL 5-FU ile yapılan %2,5 sindirilmiş kefir ve %15 sindirilmiş kefir arasında HT29 hücrelerinde istatistiksel olarak bir farklılık tespit edilmedi. Kombinasyonları, tek başına 15,6 µg/mL 5-FU uygulaması ile kıyasladığımızda ise HT29 hücre canlılığında anlamlı bir farklılık görülmedi. 185 µg/mL 5-FU ile yapılan sindirilmiş kefir kombinasyonlarında ise HT29 hücre canlılığı tek başına 5-FU uygulamasına kıyasla daha düşüktü. Ancak bu azalma yalnızca %8,25 ve %15 sindirilmiş kefir kombinasyonlarında istatistiksel olarak anlamlıydı. Kombinasyonlar, tek başına sindirilmiş kefir uygulamasına kıyasla daha düşük hücre canlılığına neden oldu ve %15 sindirilmiş kefir ile yapılan kombinasyon hariç diğer tüm kombinasyonlarda bu

istatistiksel olarak anlamlıydı. Ancak kefir dozu arttıkça kombinasyonların hücre canlılığını azaltma etkisi düştü. 185 µg/mL 5-FU ile yapılan uygulamalarda; tek başına uygulandığında %48,70 canlılık gözlenirken, %8,25 sindirilmiş kefir ile birlikte uygulandığında hücre canlılığı %33,10'a düştü. Bu sonuç, orta düzey kefir oranlarının HT29 hücrelerinde 5-FU'nun sitotoksik etkisini artırabileceğini ve sinerjistik bir yanıt oluşturabileceğini desteklemektedir. 500 5-FU ile yapılan sindirilmiş kefir kombinasyonlarında ise HT29 hücre canlılığı tek başına sindirilmiş kefir uygulamasına kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük bulundu. FHC hücrelerinde ise düşük dozlarda sindirilmiş kefir ve düşük dozlarda sindirilmiş kefir içeren kombinasyonların koruyucu etkisinin daha belirgindi. Bu yönüyle, uygun oranlarda kullanılan sindirilmiş kefirin hem kemoterapi etkinliğini artırıcı hem de sağlıklı dokuları koruyucu çift yönlü bir etki gösterebileceği değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada, sindirilmiş kefir ve 5-FU kombinasyonlarının HT29 hücreleri üzerindeki etkileri SynergyFinder 2.0 ve CompuSyn yazılımları kullanılarak çok yönlü olarak değerlendirildi. ZIP ve Bliss modellerine göre kombinasyonun genel etkisi istatistiksel olarak anlamlı antagonizm yönünde belirlendi, HSA ve Loewe modellerinde ise additif sınırlar içinde kaldı. CompuSyn ile hesaplanan CI değerleri de bu bulguları destekler nitelikte olup, özellikle 15,6 µg/mL 5-FU + %15 sindirilmiş kefir kombinasyonunda çok güçlü antagonistik etki (CI = 6,10) saptandı. Buna karşılık, 500 µg/mL 5-FU içeren kombinasyonlarda tüm CI değerleri <1 olup sinerjistik etki gösterdi. En güçlü sinerji, 500 µg/mL 5-FU + %5 kefir ile gözlendi (CI = 0,22). Bu bulgular, doz bağımlı bir yanıtın varlığını ortaya koymuştur. Nitekim doz-tepki eğrileriyle oluşturulan grafiksel analizde de görüldüğü gibi kombinasyon grubunun Fa'sının tekli 5-FU uygulamasına göre daha yüksek olduğu gözlendi. Bu da bazı dozlarda antagonistik etkilere rağmen, özellikle orta-yüksek dozlarda sinerjistik etkinin ön plana çıktığını göstermektedir. Ancak kombinasyon eğrisinin kefire göre daha düşük Fa'ya ulaşması, sindirilmiş kefirin yüksek dozlarda baskın etki gösterdiğini ve bu etkinin 5-FU'nun terapötik yanıtını sınırlayabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, sindirilmiş kefirin 5-FU ile kombinasyonu doz düzeyine ve kefir oranına bağlı olarak değişken etkiler göstermektedir. Bu etkileşimler dikkate alındığında, geleneksel fermente ürünlerin kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanımında rasyonel doz optimizasyonu yapılmadan uygulanmasının potansiyel riskler taşıyabileceği ve bazı durumlarda ilaç etkinliğini baskılayabileceği anlaşılmaktadır. Bu nedenle, daha düşük kefir oranları ve seçici bileşen

izolasyonuna dayalı ileri analizlerle etkileşim mekanizmalarının moleküler düzeyde aydınlatılması önem arz etmektedir.

Annexin V-FITC ve PI boyama sonuçlarına göre, 5-FU ve sindirilmiş kefir uygulamaları HT29 hücrelerinde farklı hücre ölüm mekanizmalarını tetikledi, kombinasyon gruplarında ise hücre ölüm paternlerinde değişiklikler gözlendi. 15,6 µg/mL 5-FU uygulaması apoptozu baskın olarak erken evrede (%59,38) indükledi, buna karşın %2,5 ve %15 oranlarında uygulanan sindirilmiş kefir tek başına geç apoptoz ve nekroz oranlarını arttırdı. %2,5 kefir ile yapılan kombinasyon, erken apoptoz (%58,33) ve geç apoptozu (%20,37) dengeli şekilde artırarak 5-FU'nun etkisini desteklerken; %15 kefir ile yapılan kombinasyon erken apoptozu %70,42'ye çıkarsa da nekroz oranını %25,35'e yükseltti. Bu bulgular, yüksek kefir oranlarının apoptotik süreci desteklemekle birlikte nekroz yönelimini de artırabileceğini göstermektedir. 185 µg/mL 5-FU HT29 hücrelerinde %84,62 oranında yüksek erken apoptoz gözlenirken, %8,25 kefir ile yapılan kombinasyonda bu oran %48'e düşmüş, buna karşın nekroz oranı %42,93'e çıktı. Bu sonuçlar, özellikle yüksek doz sindirilmiş kefir ile yapılan kombinasyonların nekroza neden olabileceğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla bu veriler, sindirilmiş kefirin doz bağımlı olarak apoptozu destekleyebileceği ancak yüksek konsantrasyonlarda nekrotik etkileri de artırabileceği yönünde yorumlanabilir.

Bu çalışmada, 5-FU, sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının HT29 hücrelerindeki apoptotik, anti-apoptotik ve invazyonla ilişkili genler üzerindeki etkileri qPCR yöntemi ile değerlendirildi. 185 µg/mL 5-FU ve %8,25 sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarda *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9* ve *BAX* gen ekspresyonlarında kontrole göre anlamlı düzeyde artarken *BCL-2* geninde ise anlamlı düzeyde bir azalma meydana geldi. *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9* ve *BAX* genleri bakımından kefir ve 5-FU uygulamaları birbirine benzer düzeyde gen ekspresyonu oluşturmuş ve kombinasyon uygulaması da bu genler açısından anlamlı bir fark yaratmadı ($p>0,05$). Bu durum, sindirilmiş kefirin tek başına apoptozu uyarabilme potansiyelinin transkripsiyon düzeyinde, 5-FU'ya yakın düzeyde olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın, *MMP-2* ve *MMP-9* genlerinde dikkat çekici farklılıklar saptanmıştır. *MMP-2* gen ekspresyonu 5-FU'ya kıyasla %8,25 kefir uygulamasında anlamlı düzeyde daha düşüktü, aynı şekilde *MMP-9* gen ekspresyonu da kefir grubunda 5-FU'ya göre belirgin biçimde daha düşük

bulundu. Kombinasyonlar kefire göre anlamlı düzeyde daha yüksek *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonuna neden oldu.

15,6 µg/mL 5-FU, %2,5 ve %15 sindirilmiş kefir ile bu ajanların kombinasyonlarının HT29 hücrelerinde apoptoz ve invazyonla ilişkili genler üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde ise 5-FU uygulaması, *KASPAZ-3*, *KASPAZ-9*, *BAX* ve *MMP-2* genlerinde anlamlı artışlara neden olurken, *BCL-2* geninde anlamlı düzeyde azalma oluşturdu. Bu durum, 5-FU'nun apoptozu özellikle mitokondriyal yol üzerinden aktive ettiğini ve hücre ölümünü başlattığını göstermektedir. Kefir uygulamaları da benzer şekilde apoptoza yönelik genlerde (*KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9* ve *BAX*) anlamlı artışa ve *BCL-2*'de anlamlı azalmaya neden oldu; bu etki özellikle %15 kefir grubunda daha güçlü gözlendi. Ancak *MMP-2* ve *MMP-9* genleri açısından bu iki kefir dozu arasında anlamlı fark saptandı; %2,5 kefir uygulamasında bu genlerde anlamlı olmamakla birlikte bir azalma olmuş, %15 kefir uygulamasında ise belirgin bir artış tespit edildi. Bu bulgular, düşük kefir oranlarının apoptozu destekleyici ancak metastatik potansiyeli sınırlayıcı, yüksek oranların ise *MMP* ekspresyonlarını artırıcı potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. 5-FU'ya kıyasla %2,5 sindirilmiş kefir *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *BAX* gen ekspresyonlarını anlamlı düzeyde arttırırken, *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonlarını anlamlı düzeyde azalttı. 5-FU'ya kıyasla %15 sindirilmiş kefir ise *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9*, *BAX* gen ekspresyonlarını anlamlı düzeyde arttırırken *BCL-2* gen ekspresyonunu azalttı, *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonlarını arttırdı ancak bu artış anlamlı değildi. Gen ekspresyonları incelendiğinde %2,5 ve %15 sindirilmiş kefir arasında *MMP-2* ve *MMP-9* haricinde hiçbir gende anlamlı bir farklılık görülmedi. 15,6 µg/mL 5-FU + %2,5 kefir uygulamasında kontrole göre *KASPAZ-3*, *KASPAZ-8*, *KASPAZ-9* ve *BAX* ekspresyonlarında anlamlı artışlar gözlendi, *BCL-2* ekspresyonu ise belirgin şekilde azaldı. Ancak bu kombinasyon grubunda *MMP-2* ve *MMP-9* genlerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik oluşmadı; bu da düşük oran kefirin, 5-FU'nun olası invazif etkilerini sınırlayarak daha dengeli bir antikanser yanıt oluşturduğunu düşündürmektedir. Buna karşın, 15,6 µg/mL 5-FU + %15 kefir kombinasyonu, *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonlarını anlamlı biçimde artırarak yüksek kefir dozunun, apoptozu güçlendirse de invazyonla ilişkili genleri de aktive edebileceğini ortaya koydu. Ayrıca bu kombinasyonda yalnızca *KASPAZ-8* geninde 5-FU'ya kıyasla anlamlı bir azalma meydana geldi, diğer genlerde anlamlı fark gözlenmedi. Bu veriler ışığında, sindirilmiş kefirin doza bağlı olarak farklı moleküler etkiler

gösterebildiği ve 5-FU ile birlikte kullanımında bu etkilerin sinerjik ya da antagonistik olabileceği anlaşılmaktadır. Düşük kefir dozu (özellikle %2,5), 5-FU'nun apoptotik etkinliğini artırırken *MMP* düzeylerini baskılayarak daha kontrollü bir hücre ölüm yanıtı oluşturabilirken; yüksek kefir dozu (%15), her ne kadar apoptozu desteklese de *MMP-2* ve *MMP-9* ekspresyonundaki artış nedeniyle potansiyel invazyon riskini artırabilmektedir. Hücre kültürü deneylerinde %2,5, %5, %8,25 ve %15 kefir konsantrasyonları, her biri 100 µL kültür ortamı içerisinde sırasıyla 2,5, 5, 8,25 ve 15 µL kefir içerecek şekilde hazırlandı. Deneysel koşullarda kullanılan kefir hacimlerinin insan kolonu ölçeğinde karşılığı bütirat'ın tartışma paragrafında anlatıldığı şekilde yapıldı ve şu sonuçlar bulundu: %2,5 kefir uygulaması yaklaşık 156 mL, %5 kefir uygulaması yaklaşık 313 mL, %8,25 kefir uygulaması yaklaşık 516 mL ve %15 kefir uygulaması ise yaklaşık 938 mL kefire eşdeğer olduğu hesaplandı. Özellikle %2,5 ve %5 kefir uygulamalarının, insan günlük kefir tüketim düzeyleriyle fizyolojik açıdan uyumlu olduğu; %15'in ise normal günlük tüketim miktarlarının oldukça üzerinde olduğu görülmektedir. Öte yandan, çalışmada kullanılan kefir, 10 kDa'nın altındaki molekülleri içeren bir fraksiyondan elde edilmiştir. Bu fraksiyonlama işlemiyle kefirdeki 10 kDa üzerindeki moleküller uzaklaştırılmıştır. Dolayısıyla, elde edilen bulgular tam kefir ürününün genel etkilerini değil, küçük molekül bileşenlerinin hücresel etkilerini daha doğrudan yansıtmaktadır. Ayrıca küçük moleküllerin hücre kültürü ortamında daha hızlı ve etkin difüze olması, *in vitro* koşullarda gözlenen etkilerin şiddetini artırabilmektedir. Ancak *in vivo* ortamda bu bileşiklerin emilim, biyotransformasyon ve biyoyararlanım süreçlerinden geçeceği, dolayısıyla sistemik etkilerin farklılık gösterebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, hücre kültürü deneylerinden elde edilen veriler insan fizyolojisine birebir yansımamakla birlikte, translasyonel değerlendirmeler açısından kıymetli bir referans oluşturmaktadır.

Khoury ve arkadaşları (236), %0, 5, 10, 15, 20 V/V konsantrasyonlarında sindirilmemiş kefirin HT29 ve CaCo2 hücreleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. IC50 değerlerini HT29 hücrelerinde 48 ve 72. saatlerde %12 ve 10; Caco2 hücrelerinde 24, 48, 72. saatlerde %18, 12 ve %10 olarak hesaplamışlardır. Kefirin G1 fazında hücre döngüsü durmasına neden olduğu, apoptozu indüklediği, *TGF-α* ve *TGF-β1* ekspresyonlarının azalttığı, *BAX*/*BCL2* oranını ve p21 ekspresyonunu arttırdığı, *p53, MMP-2* ve *MMP-9*'un ekspresyonlarını ise etkilemediği gösterilmiştir. Her iki hücre hattının canlılığı, aynı oranda süt konsantrasyonlarıyla tedaviden 24, 48 ve 72 saat sonra azalmamış, aksine hafif

bir artış tespit edilmiştir. Ancak sağlıklı hücre çalışmada değerlendirilmemiştir. Bizim çalışmamızda ise sindirilmiş kefir, HT29 hücrelerinde belirgin bir hücre ölümüne neden olmuş, benzer şekilde sindirilmiş süt 72. saatte HT29 hücre canlılığında artışa neden oldu.

Bir çalışmada kefirin, kolon epiteline yapışarak çeşitli mutasyonlara neden olan ve kolon kanserinin etiyogenezinden sorumlu olarak bilinen *Fusobacterium nucleatum*'a karşı inhibitör etkisinin olduğu gösterilmiştir (16). Melo ve arkadaşları (277), Azoksimetan ile kolon aberant kript'i indüklenmiş farelere 8 hafta boyunca günlük 5 mL/kg kefir verilmesinin anormal kript odaklarının yüksekliğini %43, genişliğini ise %20 oranında azalttığı gösterilmiştir. Başka bir deneysel çalışmada (278), neonatal dönemde aşırı beslenmenin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki uzun vadeli etkilerini ve bunun KRK gelişimiyle ilişkisini araştırmış, kefirin bu süreçteki koruyucu rolünü değerlendirmiştir. Yöntem olarak, gebe Wistar sıçanlar iki gruba ayrılmış ve gebelik boyunca bir gruba su, diğer gruba ise kefir verilmiştir. Doğum sonrası, neonatal aşırı beslenme modeli oluşturmak için bazı annelerde yavru sayısı 4'e düşürülerek, bu yavruların anne sütüne daha fazla erişimi sağlanmıştır. Kontrol grubundaki anneler ise standart bir yavru sayısını (8-12 yavru) emzirmeye devam etmiştir. Yavrular sütten kesildikten sonra bir gruba kefir bir gruba da su verilmeye devam edilmiştir. Neonatal dönemde aşırı beslenen yavruların, sütten kesildikten sonra kefir almadıklarında bağırsak mikrobiyotasında disbiyoz gözlemlenirken, gebelik ve emzirme sürecinde kefir tüketen annelerin yavrularında, sütten kesildikten sonra kefir verilmemesine rağmen mikrobiyota dengesinin daha iyi korunduğu belirlenmiştir. Sütten kesildikten sonra kefir tüketen yavrularda ise inflamatuar belirteç seviyelerinin düştüğü ve bağırsak bariyer bütünlüğünün daha iyi korunduğu saptanmıştır. En güçlü koruyucu etkinin, gebelikten itibaren kefir tüketen annelerden doğan ve sütten kesildikten sonra da kefir içmeye devam eden yavrularda olduğu ortaya konmuştur. Sonuç olarak, gebelikten itibaren başlayan kefir tüketiminin hem anneler hem de yavrular üzerinde bağırsak mikrobiyotası aracılığıyla uzun vadeli koruyucu etkiler sağlayabileceği ve neonatal aşırı beslenme ile ilişkili kolon kanseri riskini azaltabileceği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise 1,2-dimetilhidrazin ile indüklenen KRK oluşturulmuş Wistar sıçanlarda kefirin neoplastik lezyonları arttırdığı ve *Firmicutes* ve *Clostridium* bolluğunu arttırdığı gösterilmiştir (279).

Bir çalışmada Çin kefir tanesinden izole edilen *Lactobacillus kefiri* MSR101 tarafından üretilen bir ekzopolisakkarit olan MSR101EPS'nin HT-29 hücreleri üzerinde

olan etkileri incelenmiş ve apoptozu indüklediği, *BAX*, *BAD*, *KASPAZ -3,-8* ve *-9* ekspresyonunun arttırdığı ve *BCl-2*'yi ise azalttığı gösterilmiştir. Bu ekzopolisakkaritin glukoz ve galaktoz tekrarlayan birimlere sahip bir heteropolisakkarit olduğu gösterilmiştir. Yazarlar bunun çeşitli fonksiyonel gıda ürünlerine doğal anti-tümör ajan olarak eklenebileceğini ancak *in vivo* çalışmalarının yapılması gerektiğini vurgulamışlardır. (280).

Bu çalışmada sindirilmiş kefir ve 5-FU ile beraber kombinasyonları HT29 ve FHC hücreleri üzerinde değerlendirildi. Literatürde kefirin 5-FU ile olan ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamakta olup dahası sindirilmiş kefirin KRK üzerinde olan etkisini inceleyen herhangi bir çalışma da yoktur. Ülkemizde yapılan randomize kontrollü bir çalışmada, 5-FU tedavisi alan KRK hastalarında kefir kullanımının hastaların gastrointestinal şikayetlerine ve yaşam kalitesine olan etkisi incelenmiştir. Kırk KRK hastası, kontrol ve kefir grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Kefir grubuna her kemoterapi tedavisi sırasında bir hafta boyunca günde iki kez 250 mL kefir içirilmiş ve bir hafta sonra yan etkiler sorgulanmıştır. Başlangıçta, 3 ve 6 tedavi küründen sonra hastaların yaşam kaliteleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda kefir grubunda kontrol grubuna göre mide bulantısı, kusma ve kabızlık gibi bazı gastrointestinal şikayetlerin arttığı, yaşam kalitesi açısından bir fark olmadığı, ancak uyku kalitesini arttırdığı belirlenmiştir. Yazarlar gastrointestinal şikayetlerin artması nedeniyle 5-FU tedavisi alan KRK hastalarına kefir kullanımını önermediklerini bildirmişlerdir. (281). Yine ülkemizde yapılan 40 KRK hastasının dahil edildiği başka bir çalışmada, kefirin 5-FU bazlı kemoterapi tarafından indüklenen mukozit üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir (282). Hastalara her kemoterapi döngüsünün ilk 5 gününde kefir ile oral lavaj yaptırılmış ve ardından 250 mL kefir içirilmiştir. Kontrol grubuna ise günde 2 kez %0,09 NaCl ile oral lavaj yaptırılmıştır. Her döngü önccesi ve sonrası oral mukoza değerlendirilmiştir. Serum proinflamatuar sitokin düzeyleri, başlangıçtan önce ve üçüncü ve altıncı döngülerden sonra değerlendirilmiştir. Kefir uygulanan hastaların %27,3'ünde ve %0,09 NaCl grubunda ise %21,7'sinde mukozit gelişmiş ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İki grubun serum proinflamatuar sitokin seviyelerini başlangıçta ve üçüncü ve altıncı döngüleri takiben karşılaştırdığımızda, yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kim ve arkadaşları (15), doksorubisin (DOX) ilacına direnç geliştirmiş HT-29 hücrelerine kefir uygulanmasının ilaç direncini zayıfladığı, ROS ve DOX'un hücre içi birikimini arttığını, ABC taşıyıcılarının gen ve

protein ifadelerinin azaldığı gösterilmiştir. Yazarlar kefir tüketiminin, kemosensitize edici etkisi nedeniyle DOX kemoterapisi alan hastalarda faydalı olabileceğini öne sürmüşlerdir.

5.6. PROTEOMİK ANALİZ İLE İLGİLİ TARTIŞMA

HT29 hücrelerine uygulanan 5-FU, SPP, sindirilmiş kefir ve kombinasyonlarının, hücre içi protein profili üzerinde belirgin farklılıklar oluşturduğu görüldü. Tanımlanan 25 proteinin büyük bölümü; hücre iskeleti organizasyonu, enerji metabolizması, apoptoz, inflamasyon, stres yanıtı ve hücre dışı matriks yapısıyla ilişkili biyolojik süreçlerde rol almaktadır. Bu durum, uygulanan ajanların yalnızca hücre canlılığı üzerinde değil, aynı zamanda hücresel işlevlerin bütüncül yapısı üzerinde de etkili olduğunu göstermektedir. Albumin, bu çalışmada bazı uygulamalarda tespit edilmiş olup genellikle hücre dışı taşıyıcı bir protein olmasına rağmen, hücresel geçirgenlikteki değişiklikler veya kültür ortamına sızma nedeniyle hücre içi düzeyde de saptanabilmektedir. Hücre içi varlığı, tedavi kaynaklı membran değişikliklerini veya hücresel stres yanıtını yansıtıyor olabileceği düşünüldü (283).

Bu çalışmada, β-tubulin proteininin 5-FU, sindirilmiş kefir ve bu ajanların kombinasyonları uygulanan HT29 hücrelerinde ifade edildiği saptandı. β-tubulin, mikrotübül yapısının temel bileşenlerinden biri olup hücre iskeleti organizasyonu, iğ iplikçiklerinin oluşumu ve hücre şeklinin korunması gibi temel biyolojik işlevlerde rol almaktadır. 5-FU'nun DNA replikasyonunu inhibe ederek hücre döngüsünü S fazında durdurmaktadır (284). Bu durum, hücrelerin mitotik bölünmeye geçememesiyle birlikte, bölünmeye hazırlık amacıyla mikrotübül bileşenlerinin sentezini tetikleyebilmektedir. Ayrıca kemoterapi kaynaklı hücresel stresin mikrotübül dinamiklerini etkileyerek tubulin ekspresyonunu artırabileceği daha önce raporlanmıştır (285). Bu bilgiler, β-tubulin'in 5-FU uygulamasında tespit edilmesini desteklemektedir. Benzer şekilde, sindirilmiş kefir uygulamalarında da β-tubulin ekspresyonunun artmış olması, sindirilmiş kefirin 10 kda altı fraksiyonunun içerdiği biyoaktif bileşiklerin hücre içi sinyal yolları üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Kefirin hücrede adaptif savunma mekanizmalarını harekete geçirmiş olabilir. Buna yanıt olarak iskelet sisteminde yeniden düzenlenme ihtiyacını artırarak tubulin ekspresyonunu yükseltmiş olabilir. Sonuç olarak hem kemoterapötik hem de fonksiyonel gıda kaynaklı ajanların β-tubulin düzeyini etkilemesi, bu proteinin

yalnızca yapısal bir unsur değil, aynı zamanda hücresel stres ve yenilenme yanıtının da bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, HT29 hücrelerine uygulanan 1500 µg/mL SPP tedavisinin proteomik profilde belirgin değişikliklere neden olduğu saptandı. SPP uygulamasına özgü olarak tespit edilen proteinler arasında Aktive Protein C Kinaz 1 Reseptörü, Sitokrom b-c1 Kompleksi Alt Birimi 1, Moesin ve Pirüvat Kinaz yer aldı. Özellikle Aktive Protein C Kinaz 1 Reseptörü yalnızca SPP uygulamasında tespit edilmiş olması, bu maddenin hücre içi sinyal yollarını etkileyen güçlü bir stres faktörü olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir. Aktive Protein C Kinaz 1 Reseptörü, tümör hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı ve apoptozu desteklediği bilinmektedir (286). Buna ek olarak, sadece SPP grubunda tespit edilen Sitokrom b-c1 alt birimi ve Pirüvat Kinaz gibi metabolik proteinler, mitokondriyal fonksiyonların ve enerji üretiminin yeniden düzenlendiğini göstermektedir. HT29 hücrelerinde SPP uygulaması sonrasında mitokondriyal elektron taşıma zincirine (ETZ) ait sitokrom b-c1 kompleks alt biriminin artış göstermesi, bu ajanın mitokondriyal fonksiyonlar üzerinde belirgin etkiler oluşturabileceğini düşündürmektedir. Sitokrom b-c1 kompleksi, elektronların koenzim Q'dan sitokrom c'ye taşınmasını sağlayan ve bu süreçte proton gradyanı oluşturarak ATP üretimini destekleyen kritik bir ETZ bileşenidir. Ancak aynı zamanda, bu kompleks ROS üretiminin başlıca kaynaklarından biridir. Zhao ve ark. (287), Kompleks III'ün özellikle Q döngüsü sırasında süperoksit üretimiyle ROS üretiminde merkezi bir rol oynadığını vurgulamış, bu mekanizmanın hücresel oksidatif stres ve mitokondriyal hasar süreçlerini tetikleyebileceğini belirtmiştir. Bu bağlamda, SPP'nin Kompleks III düzeyinde protein ekspresyonunu artırması, mitokondriyal stres yanıtlarını aktive ederek intrinsik apoptoz yolaklarını uyarmış olabilir. Ayrıca, ROS düzeylerindeki artış, hücre içi redoks dengesi üzerinde baskı oluşturarak pro-apoptotik sinyallerin kuvvetlenmesine katkıda bulunabilir. Elde edilen bu bulgu, SPP'nin sadece klasik antiproliferatif etkileriyle değil, aynı zamanda mitokondriyal dinamikler ve oksidatif stres yoluyla da tümör hücrelerinde hücre ölümünü destekleyebileceğini göstermektedir.

HT29 hücrelerinde yalnızca 185 µg/mL 5-FU ile 1500 µg/mL SPP kombinasyonuyla tespit edilen TLL1, NPTXR ve SLC30A5 gibi proteinlerin ekspresyonundaki artış, bu tedavi kombinasyonunun hücrede özgün ve potansiyel olarak stres yanıtlarını tetikleyen çok yönlü bir moleküler yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

TLL1, ekstraselüler matriks bileşenlerinin işlenmesinde görevli bir metalloproteinaz olup, TGF-β gibi büyüme faktörlerinin aktivasyonu ve doku yeniden şekillenmesi gibi süreçlerde rol alır; bu yönüyle tümör mikroçevresinde yapısal değişimlerin göstergesi olabilir (288). NPTXR ise sinaptik plastisite ve hücre-hücre etkileşimiyle ilişkili bir reseptördür ve farklı kanser türlerinde aşırı ekspresyonu bildirilmiş, tümör hücrelerinin proliferasyonu ve metastatik yeteneği ile bağlantılı bulunmuştur (289). Öte yandan, SLC30A5 çinko taşıyıcı proteini, hücre içi çinko dengesini sağlayarak birçok çinko-bağımlı enzimin aktivasyonu ve protein katlanması gibi hayati süreçlerde yer alır (290). Bu taşıyıcının ekspresyonundaki artış, oksidatif stres koşullarında hücresel savunma sisteminin devreye girdiğini gösterebilir. Nitekim, çinko taşıyıcı proteinlerin kanser progresyonundaki rollerine dair son çalışmalar, bu tür moleküler yanıtların tümör hücreleri için kompansatuvar veya terminal adaptasyon anlamına gelebileceğini öne sürmektedir (291). Dolayısıyla, bu proteinlerin sadece kombinasyon grubunda tespit edilmiş olması, SPP ve 5-FU'nun sinerjik etkisinin hücreyi hayatta kalma ve ölüm sinyalleri arasında karar vermeye zorladığını ve bu moleküler değişikliklerin tedaviye bağlı olarak gelişen özgün bir stres yanıtının parçası olduğunu düşündürmektedir. Timosin β4 (Tβ4), hücresel proliferasyon, farklılaşma ve göçte rol oynayan ve çeşitli tümör varlıklarında aşırı ifade edilen bir polipeptittir. Tβ4'ün olası bir tümör baskılayıcı işlevi olduğunu göstermektedir (292). Timosin β4 %15 sindirilmiş kefirin uygulandığı HT29 hücrelerinde tespit edildi. Sonuç olarak, elde edilen proteomik veriler, uygulanan tedavilerin HT29 hücrelerinde yalnızca hücre ölümünü değil, aynı zamanda hücre iskeleti, metabolizma, stres yanıtı ve epigenetik düzenleme gibi temel biyolojik yolları da etkilediğini göstermektedir.

HT29 hücrelerinde uygulanan farklı tedavi gruplarına ait toplam protein düzeyleri incelendiğinde, özellikle 5-FU ve SPP uygulamalarının hücrede belirgin düzeyde protein sentezini baskıladığı görülmüştür. Kontrol grubunda 1,50 ± 0,11 mg/mL olan toplam protein düzeyi, 185 µg/mL 5-FU grubunda 1,11 ± 0,04 mg/mL'ye, 1500 µg/mL SPP grubunda 0,86 ± 0,05 mg/mL'ye düşmüştür. En düşük düzey ise 185 µg/mL 5-FU + 1500 µg/mL SPP kombinasyonunda 0,75 ± 0,03 mg/mL olarak ölçülmüştür. Bu düşüş, hücrelerde apoptoz, translasyonel duraklama ve mitokondriyal stres gibi süreçlerin aktive olduğunu ve dolayısıyla global protein sentezinin baskılandığını göstermektedir. Bu biyolojik baskılanma doğrultusunda, proteomik analizlerde yalnızca 25 proteinin tespit edilmiş olması önemli bir sınırlılık olarak değerlendirilmelidir. Bu durum hem biyolojik

etkilerin büyüklüğüne hem de analitik sürecin teknik sınırlılıklarına işaret edebilir. Protein sentezinin baskılanması, bazı yapısal ve fonksiyonel proteinlerin ifadesinin düşmesine yol açarken; düşük toplam protein konsantrasyonu, özellikle düşük bollukta ya da hidrofobik yapıdaki proteinlerin ekstraksiyonu ve tespitini de zorlaştırmış olabilir. Ayrıca kullanılan protein ekstraksiyon yöntemi, kütle spektrometrisi cihazının hassasiyeti, örnek konsantrasyonu, veri tabanı içeriği ve yazılım parametreleri de elde edilen protein sayısını etkilemiş olabilir.

Her ne kadar kapsamlı bir diferansiyel ekspresyon analizi yapılamamış olsa da bazı tedavilere özgü olarak tespit edilen proteinler hücresel yanıtların yönü ve mekanizması hakkında önemli ipuçları sunmakta ve hipotez geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yönüyle, proteomik veriler çalışmada hipotez oluşturucu ve destekleyici nitelikte değerlendirilmiş, ileri araştırmalara temel teşkil edecek şekilde raporlanmıştır. Elde edilen proteinlerin Western blot, qRT-PCR veya immünfloresan gibi yöntemlerle doğrulanması, bulguların biyolojik güvenilirliğini artıracaktır. Düşük bollukta ifade edilen ancak potansiyel öneme sahip proteinlerin saptanabilmesi için zenginleştirme stratejileri uygulanabilir. Buna ek olarak, tespit edilen proteinler üzerinden yolak analizi, protein-protein etkileşim ağları ve biyoinformatik modellemeler yapılması, tedaviye özgü biyolojik süreçlerin daha ayrıntılı şekilde anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 5-FU, HT29 hücrelerinde zamana ve doza bağımlı olarak belirgin sitotoksik etki gösterdi. FHC hücrelerinde ise bu etki daha geç ve daha yüksek dozlarda ortaya çıktı. 72 saatlik inkübasyon sonunda 5-FU'nun TI değeri 3,15 olarak belirlendi.
- Sodyum bütirat'ın TI değeri 1,16 olarak hesaplandı. TI değerinin 1'in üzerinde olması, bütiratın kanser hücrelerine karşı belirli bir seçiciliğe sahip olduğunu gösterdi; ancak bu seçiciliğin sınırlı düzeyde olduğunu ortaya koydu. Fizyolojik dozlarda bütirat HT29 hücrelerinde sitotoksisiteye neden oldu. Hücre kültürü çalışmalarında, endojen bütirat üretimini taklit edebilecek sürekli salım sistemleriyle bütirat uygulamaları gerçekleştirilmeli, bu yaklaşımlar farklı hücre tiplerinde test edilmeli; elde edilen bulguların doğrulanması için ileri düzey deneysel ve klinik çalışmalar yürütülmelidir.
- Karnosol'ün TI değeri 1,33 olarak hesaplandı. TI değerinin 1'in üzerinde olması, kanser hücrelerine karşı belirli bir seçiciliğe sahip olduğunu gösterdi; ancak bu seçiciliğin sınırlı düzeyde olduğunu ortaya koydu. Bu nedenle, karnosolün terapötik uygulamalarında güvenli pencerenin belirlenmesi kritik önem taşımaktadır. Karnosol'ün hem kanser hem de normal hücrelerdeki etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, karnosolün biyoyararlanımı, metabolik stabilitesi ve sistemik toksisite profili üzerine çalışmalar yapılmalıdır.
- SPP, HT29 hücrelerinde 5-FU'ya benzer şekilde doz bağımlı sitotoksisiteye neden oldu; TI değeri 5-FU'dan daha yüksek bulunarak seçici toksisite potansiyeli gösterdi. SPP ve 5-FU kombinasyonları hem HT29 hem de FHC hücrelerinde tekli uygulamalara göre daha güçlü sitotoksik etki yaratmış, bu etki HT29 hücrelerinde daha belirgin oldu. SPP ve 5-FU arasında *KASPAZ-3, -8, -9*, *BAX, BCL-2* ve *MMP-9* açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Her iki madde de *KASPAZ-3, -8, -9, BAX* ve *MMP-9* ekspresyonlarını arttırırken *BCL-2* ekspresyonlarını azalttı. Kombinasyon tedavisi yalnızca apoptozu değil nekrozu da tetikledi. Her iki ajanın da IC_{50} dozlarının birlikte uygulanmasının buna neden olabileceği vurgulandı. Bu nedenle, hücre ölüm paternlerinin daha selektif ve apoptoza yönelimli olması için ilerleyen çalışmalarda daha düşük alt-IC_{50} dozlarda kombinasyonlar denenerek, optimum etkinlik ve minimal toksisite dengesinin sağlanması hedeflenmelidir.

- SPP, özellikle 5-FU'ya karşı direnç geliştirmiş vakalarda bir tedavi seçeneği olarak önemli bir aday olabilir. SPP'nin MDR gelişimini azaltabileceği düşünülmekte dolayısıyla kemoterapiye dirençli hücre modellerinde de SPP deneylerinin yapılması önerilmektedir.
- Ülkemiz için stratejik öneme sahip olan bor'un bir bileşiği olan SPP'nin yerli kaynaklardan elde edilebilmesi, yüksek TI ve 5-FU ile sinerjik etkisi sayesinde, KRK tedavisinde potansiyel bir destekleyici veya alternatif ajan olarak değerlendirilmeye değerdir.
- SPP ve 5-FU kombinasyonlarının sinerjik etkisi göz önünde bulundurularak, bu kombinasyonun özellikle daha düşük SPP ve orta düzey 5-FU dozlarında deneysel çalışmalarda test edilmesi önerilmektedir.
- Bu çalışmada sindirilmiş kefir, süt ve sindirilmemiş kefir örneklerinin HT29 ve FHC hücreleri üzerindeki etkileri, 10 kDa altı fraksiyonları kullanılarak değerlendirildi. Sindirilmiş kefir; sindirilmiş süt ve sindirilmemiş kefire kıyasla HT29 hücrelerinde belirgin sitotoksik etki gösterirken FHC hücrelerinde bu etki daha sınırlı olup TI değeri çalışmada etkileri araştırılan maddeler arasında en yüksekti. Sindirilmiş kefirin FHC hücre canlılığını sindirilmemiş kefir ve sindirilmiş süte göre daha yüksek düzeyde koruduğu bulundu. Sindirilmiş kefirin HT29 hücrelerindeki sitotoksik etkisi, sindirim süreci sırasında ortaya çıkan yeni biyoaktif bileşiklerin kanser hücre proliferasyonunu baskılamadaki rolüne işaret ediyor olabileceğini düşündürdü.
- Kefir, KRK hücreleri üzerinde terapötik potansiyele sahip bir fonksiyonel gıda adayı olabilir. Ayrıca bu çalışma, gıdaların *in vitro* modellerde doğrudan değil, sindirim simülasyonu sonrasında uygulanmasının sonuçlar üzerinde önemli bir fark yaratabileceğini ortaya koydu. Dolayısıyla, gıdaların kanser hücre kültürü çalışmalarında etkilerini daha doğru değerlendirebilmek için, sindirim simülasyonu sonrası elde edilen ürünlerin kullanılması gerektiği sonucuna varıldı. Bununla birlikte, sindirilmiş kefirin içerdiği spesifik aktif bileşiklerin tanımlanması ve etkili olduğu moleküler mekanizmaların aydınlatılması için ileri düzeyde çalışmalar yapılması gerekmektedir.
- Sindirilmiş kefirin 10 kDa altı fraksiyonlarındaki DPPH kapasitesi ve TFC'nin yüksek olması ve HT29 hücre canlılığı üzerinde de en güçlü azalma etkisini oluşturması, elde edilen kimyasal parametrelerle hücresel yanıtlar arasında doğrudan bir ilişki olduğunu destekledi. Genel olarak, sindirim işleminin ve uygulanan

ultrafiltrasyonun sindirilmiş kefirde biyoaktif moleküllerin serbest kalmasını ve fenolik içerik ile antioksidan kapasitenin artmasını sağladığı, bunun da hücre kültürü deneylerinde gözlenen biyolojik etkiler üzerinde belirleyici rol oynamış olabileceği değerlendirildi.

- %2,5 ve %5 kefir dozları sırasıyla yaklaşık 156 mL ve 313 mL günlük tüketime karşılık gelmekte olup, fizyolojik olarak uygun sınırlar içinde kaldı.
- Sindirilmiş kefir *KASPAZ-3, -8, -9* ve *BAX* gen ekspresyon düzeyleri açısından 5-FU'ya benzer etki gösterdi. Ancak sindirilmiş kefir bundan farklı olarak 5-FU'ya kıyasla *MMP-2* ve *-9* ekspresyonlarını azalttı.
- 5-FU ve sindirilmiş kefir kombinasyonları, doza bağlı olarak farklı etki profilleri sergilemiş ve bu etki değişkenliği CI değerlerine yansıdı. 5-FU + kefir kombinasyonlarının Fa, yalnızca kefire göre daha düşük, ancak tek başına 5-FU'ya kıyasla genellikle daha yüksek bulundu.
- Sindirilmiş kefir ve 5-FU kombinasyonlarının hayvan modelleri ve insan klinik çalışmalarında test edilerek translasyonel değeri belirlenmelidir.
- *İn vitro* elde edilen bulgular, doğrudan *in vivo* veya klinik ortama genellenemez; zira bağırsak mikrobiyotasının dinamik yapısı ve sistemik emilim gibi faktörler göz ardı edilemez.
- Sinerji indekslerine dayalı doz belirleme algoritmaları, ilerideki *in vivo* ve klinik çalışmalarda bireyselleştirilmiş tedavi stratejileri geliştirmek için kullanılmalıdır.
- Gıda-ilaç etkileşimlerini içeren bu tür çalışmaların halk sağlığı açısından önemi göz önünde bulundurularak, kefir gibi fermente ürünlerin kemoterapi sürecindeki rolü daha kapsamlı şekilde incelenmelidir.

KAYNAKLAR

1. International Agency for Research on Cancer. *Cancer Today Chart*. (İnternette) 2021, Feb 4. Erişim 15.05.2025, https://gco.iarc.fr/.
2. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodriguez Yoldi, M.J. (2017). Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 197.
3. Thanikachalam, K., Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, 11,164.
4. Granados-Romero, J., Valderrama-Treviño, A., Contreras-Flores, E., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruíz, K., Ceballos-Villalba, J., Estrada-Mata, A., Alvarado Rodríguez, C., Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review, *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5, 4667-4676.
5. Sethy, C., Kundu, C.N. (2021). 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* **137**:111285. Erişim 05.01.2025, https://www.sciencedirect.com/science /article /pii/S0753332221000706?via%3Dihub.
6. Hossain, M.S., Kader, M.A., Goh, K.W., Islam, M., Khan, M.S., Harun-Ar Rashid, M., Ooi, J., Melo Coutinho, H.D., Al-Worafi, Y.M., Moshawih, S., Lim, Y.C., Kibria, K.M.K., Ming, L.C. (2022). Herb and spices in colorectal cancer prevention and treatment: a narrative review. *Frontiers in Pharmacology*, **13**:865801. Erişim 05.03.2025, https://doi.org/ 10.3389/fphar.2022.865801.
7. Liang, H., Guan, M., Li, T., Li S., Ma, C. (2025) Critical review on biological effect and mechanisms of diterpenoids in *Rosmarinus officinalis*. *Food & Medicine Homology*, Erişim 15.05.2025, https://doi.org/10.26599/FMH.2025.9420021.
8. Yünlü K. (2016). Bor bileşikleri, sentez yöntemleri, özellikleri, uygulamaları. Ankara: Değişim Yayınları.
9. Kuru, R., Yarat, A. (2017). Bor ve sağlığımıza olan etkilerine güncel bir bakış. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 7, 107-114.
10. Das, B.C., Nandwana, N.K., Das, S., Nandwana, V., Shareef, M.A., Das, Y., Saito, M., Weiss, L. M., Almaguel, F., Hosmane, N.S., Evans, T. (2022). Boron chemicals in drug discovery and development: synthesis and medicinal perspective. *Molecules*, **27**:2615. Erişim 07.01.2025, https://www.mdpi.com/1420-3049/27/9/2615.
11. Ömeroğlu, Ulu, Z., Değirmenci, N.S., Bolat, Z.B., Şahin, F. (2023). Synergistic anti-cancer effect of sodium pentaborate pentahydrate, curcumin and piperine on hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports*, **13**:14404. Erişim 01.01.2025, https://www.nature.com/articles/s41598-023-40809-y.
12. Degirmenci, N.S., Padar, G., Sahin, F., Omeroglu Ulu, Z. (2024). Investigating the mechanisms of anti-tumoral effect of combination therapy of calcitriol and sodium pentaborate pentahydrate on HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Biological Trace Element Research*. Erişim 07.01.2025, https://doi.org/10.1007/s12011-024-04416-w
13. *Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı. Türk Gıda Kodeksi Fermente Ürünler Süt Tebliği 32029*. Ankara (İnternette) 2022, 30 Kasım. Erişim 01.02.2025, https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2022/11/20221130-5.htm.
14. Üstün-Aytekin, Ö., Şeker, A., Arısoy, S. (2020). The effect of in vitro gastrointestinal simulation on bioactivities of kefir. *International Journal of Food Science & Technology*, 55, 283-292.
15. Kim, D.H., Jeong, C.H., Cheng, W.N., Kwon, H.C., Kim, D.H., Seo, K.H., Choi, Y., Han, S. G. (2021). Effects of kefir on doxorubicin-induced multidrug resistance in human colorectal cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 78, 104371.
16. Dibekçi, M., Çağdaş, E., Seydim, A.C., Seydim, Z.B. (2016). Effect of kefir on Fusobacterium nucleatum in potentially preventing intestinal cancer. Functional Foods in Health and Disease, 6, 469-477.
17. Sun, J., Chen, S., Zang, D., Sun, H., Sun, Y., Chen, J. (2024). Butyrate as a promising therapeutic target in cancer: From pathogenesis to clinic (Review). *International Journal of Oncology*, **64**:44. Erişim 07.01.2025, https://doi.org/10.3892/ijo.2024.5632.
18. Bazira, P.J. (2023). Anatomy of the caecum, appendix, and colon. *Surgery (Oxford)*, 41, 1-6.
19. National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. *Colon and Cecum* (İnternette), Erişim 06.02.2025, https://www.niddk.nih.gov/news/media-library/17460.

20. Siri, S., Zhao, Y., Maier, F., Pierce, D.M., Feng, B. (2020). The macro- and micro-mechanics of the colon and rectum I: Experimental evidence. *Bioengineering (Basel)*, **7**:130. Erişim 05.02.2025, https://www.mdpi.com/2306-5354/7/4/130.
21. National University of Singapore. *Colon-Normal Histology* (İnternette), Erişim: 06.02.2025, https://medicine.nus.edu.sg/pathweb/normal-histology/colon/.
22. Mahadevan, V. (2020). Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery (Oxford)*. 38, 1-6.
23. Lee, R., Mezoff, E.A. (2020). Anatomy and physiology of the small and large intestines. İçinde W. Robert, S.H. Jeffrey, Kay M (Eds.), *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease.* Elsevier; 308-320.
24. Nigam, Y., Knight, J., Williams, N. (2019). Gastrointestinal tract 5: The anatomy and functions of the large intestine. *Nursing Times*, 115, 50-53.
25. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. *Türkiye Kanser İstatistikleri 2019*. Ankara: Sağlık Bakanlığı (İnternette) 2025. Erişim 08.02.2025, https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/Dokumanlar/Istatistikler/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2019.pdf.
26. Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C.J., Laversanne, M., Vignat, J., Ferlay, J., Murphy, N., Bray, F. (2023). Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*, 72, 338-344.
27. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 74, 229-263.
28. Scholefield J.H., Eng C. (2016). Kolorektal Kanser Tanı ve Klinik Yönetimi (Ö. Alabaz, Trans). Akademisyen Tıp Kitabevi. (Original work published in WILEY Blackwell).
29. Thélin, C., Sikka, S. (2015). Epidemiology of colorectal cancer-incidence, lifetime risk factors statistics and temporal trends. İçinde R. Ettarh (Ed.), *Screening for Colorectal Cancer with Colonoscopy,* IntechOpen. Erişim 08.02.2025, https://www.intechopen.com/chapters/49625.
30. Akagündüz, B., Karabulut B. (2023). *Kolorektal Kanserler*. İstanbul: İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık.
31. Vuik, F.E., Nieuwenburg, S.A., Bardou, M., Lansdorp-Vogelaar, I., Dinis-Ribeiro, M., Bento, M.J., Zadnik, V., Pellisé, M., Esteban, L., Kaminski, M.F., Suchanek, S., Ngo, O., Májek, O., Leja, M., Kuipers, E. J., Spaander, M.C. (2019). Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*, 68, 1820-1826.
32. Rawla, P., Sunkara, T., Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przeglad Ggastroenterologiczny*, 14, 89-103.
33. Fanizza, J., Bencardino, S., Allocca, M., Furfaro, F., Zilli, A., Parigi, T.L., Fiorino, G., Peyrin-Biroulet, L., Danese, S., D'Amico, F. (2024). Inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Cancers*, **16**:2943. Erişim 04.02.2025, https://www.mdpi.com/2072-6694/16/17/2943.
34. Stidham, R.W., Higgins, P.D.R. (2018). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Clinics In Colon and Rectal Surgery*, 31, 168-178.
35. Sato, Y., Tsujinaka, S., Miura, T., Kitamura, Y., Suzuki, H., Shibata, C. (2023). Inflammatory bowel disease and colorectal cancer: epidemiology, etiology, surveillance, and management. *Cancers*, **15**:4154. Erişim 05.02.2025, https://www.mdpi.com/2072-6694/15/16/4154.
36. World Cancer Research Fund. (2024). *Colorectal Cancer Report.* (İnternette) Erişim 07.01.2025, https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2024/10/Colorectal-cancer-report.pdf.
37. Lewandowska, A., Rudzki, G., Lewandowski, T., Stryjkowska-Góra, A., Rudzki, S. (2022). Risk factors for the diagnosis of colorectal cancer. *Cancer Control*, **29**. Erişim 05.02.2025, https://doi.org/10.1177/10732748211056692.
38. Bradbury, K.E., Murphy, N., Key, T.J. (2020). Diet and colorectal cancer in UK Biobank: A prospective study. *International Journal of Epidemiology,* 49*,* 246-258.
39. Wang, L., Du, M., Wang, K., Khandpur, N., Rossato, S.L., Drouin-Chartier, J.P., Steele, E.M., Giovannucci, E., Song, M., Zhang, F.F. (2022). Association of ultra-processed food consumption with colorectal cancer risk among men and women: results from three prospective US cohort studies. *British Medical Journal*, **378**:e068921. Erişim 05.01.2025, https://www.bmj.com/content/378/bmj-2021-068921.
40. Diakité, M.T., Diakité, B., Koné, A., Balam, S., Fofana, D., Diallo, D., Kassogué, Y., Traoré, C.B., Kamaté, B., Ba, D., Ly, M., Ba, M., Koné, B., Maiga, A.I., Achenbach, C., Holl, J., Murphy, R., Hou, L., Maiga, M. (2022). Relationships between gut microbiota, red meat consumption, and

colorectal cancer. *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis,* **13**:1000385. Erişim 07.01.2025, https://europepmc.org/article/pmc/pmc10194058.
41. Zhu, Y., Wu, H., Wang, P.P., Savas, S., Woodrow, J., Wish, T., Jin, R., Green, R., Woods, M., Roebothan, B., Buehler, S., Dicks, E., McLaughlin, J.R., Campbell, P.T., Parfrey, P.S. (2013). Dietary patterns and colorectal cancer recurrence and survival: a cohort study. *British Medical Journal Open*, **3**:e002270. Erişim 30.01.2025, https://bmjopen.bmj.com/content/3/2/e002270.long.
42. Bultman S.J. (2017). Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*, **61**:10.1002/mnfr.201500902. Erişim 28.01.2025, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201500902.
43. Song, M., Wu, K., Meyerhardt, J.A., Ogino, S., Wang, M., Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Chan, A.T. (2018). Fiber intake and survival after colorectal cancer diagnosis. *JAMA Oncology*, 4, 71-79.
44. Wang, F., Ugai, T., Haruki, K., Wan, Y., Akimoto, N., Arima, K., Zhong, R., Twombly, T.S., Wu, K., Yin, K., Chan, A.T., Giannakis, M., Nowak, J.A., Meyerhardt, J.A., Liang, L., Song, M., Smith-Warner, S.A., Zhang, X., Giovannucci, E.L., Willett, W.C., Ogino, S. (2022). Healthy and unhealthy plant-based diets in relation to the incidence of colorectal cancer overall and by molecular subtypes. *Clinical and Translational Medicine*, **12**:e893. Erişim 28.01.2025, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ctm2.893.
45. Yu, X.F., Zou, J., Dong, J. (2014). Fish consumption and risk of gastrointestinal cancers: A meta-analysis of cohort studies. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 15398-15412.
46. Liang, P.S., Chen, T.Y., Giovannucci, E. (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 124, 2406-2415.
47. Zhu, Y., Yang, S.R., Wang, P.P., Savas, S., Wish, T., Zhao, J., Green, R., Woods, M., Sun, Z., Roebothan, B., Squires, J., Buehler, S., Dicks, E., Zhao, J., Mclaughlin, J.R., Parfrey, P.S., Campbell, P.T. (2014). Influence of pre-diagnostic cigarette smoking on colorectal cancer survival: overall and by tumour molecular phenotype. *British Journal of Cancer*, 110, 1359-1366.
48. Huang, Y.M., Wei, P.L., Ho, C.H., Yeh, C.C. (2022). Cigarette smoking associated with colorectal cancer survival: a nationwide, population-based cohort study. *Journal of Clinical Medicine,* **11**:913. Erişim 20.01.2025, https://www.mdpi.com/2077-0383/11/4/913.
49. Rezende, L F.M., Sá, T.H., Markozannes, G., Rey-López, J.P., Lee, I.M., Tsilidis, K.K., Ioannidis, J.P.A., Eluf-Neto, J. (2018). Physical activity and cancer: an umbrella review of the literature including 22 major anatomical sites and 770 000 cancer cases. *British Journal of Sports Medicine*, 52, 826-833.
50. Kruk, J., Czerniak, U. (2013). Physical activity and its relation to cancer risk: updating the evidence. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 14, 3993-4003.
51. Sanchez, N.F., Stierman, B., Saab, S. Mahajan, D., Yeung, H., Francois F. (2012). Physical activity reduces risk for colon polyps in a multiethnic colorectal cancer screening population. *BioMed Central Research Notes,* **5**:312. Erişim 01.01.2025, https://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-312.
52. Oruç, Z., Kaplan, M.A. (2019). Effect of exercise on colorectal cancer prevention and treatment. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 11, 348-366.
53. Edwards, B.K., Noone, A.M., Mariotto, A.B., Simard, E.P., Boscoe, F.P., Henley, S.J., Jemal, A., Cho, H., Anderson, R.N., Kohler, B.A., Eheman, C.R., Ward, E.M. (2014). Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. *Cancer*, 120, 1290-1314.
54. Gonzalez-Gutierrez, L., Motiño, O., Barriuso, D., de la Puente-Aldea, J., Alvarez-Frutos, L., Kroemer, G., Palacios-Ramirez, R., Senovilla, L. (2024). Obesity-associated colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**:8836. Erişim 01.01.2025, https://www.mdpi.com/1422-0067/25/16/8836.
55. Bardou, M., Rouland, A., Martel, M., Loffroy, R., Barkun, A.N., Chapelle, N. (2022). Review article: obesity and colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 56, 407-418.
56. Chaplin, A., Rodriguez, R.M., Segura-Sampedro, JJ., Ochogavía-Seguí, A., Romaguera, D., Barceló-Coblijn, G. (2022). Insights behind the relationship between colorectal cancer and obesity: is visceral adipose tissue the missing link? *International Journal of Molecular Sciences*, **23**:13128. Erişim 01.01.2025, https://www.mdpi.com/1422-0067/23/21/13128.

57. Miranda, B.C.J., Tustumi, F., Nakamura, E.T., Shimanoe, V.H., Kikawa, D., Waisberg, J. (2024). Obesity and colorectal cancer: A narrative review. *Medicina,* **60**:1218. Erişim 01.02.2025, https://www.mdpi.com/1648-9144/60/8/1218.
58. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodriguez Yoldi, M.J. (2017). Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**:197. Erişim 01.02.2025, https://www.mdpi.com/1422-0067/18/1/197.
59. Hong S.N. (2018). Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intestinal Research*, 1, 327-337.
60. Lewandowska A, Rudzki G, Lewandowski T, Stryjkowska-Góra A, Rudzki S. (2022). Risk factors for the diagnosis of colorectal cancer. *Cancer Control*, **29**. Erişim 05.02.2025 https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/10732748211056692.
61. Biorender. Erişim 01.01.2025 https://www.biorender.com/ (Yaşar R. tarafından oluşturuldu)
62. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. *Türkiye Birleşik Veri Tabanı* 2018. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Yayını (İnternette) 2022. Erişim 01.02.2025, https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri.html.
63. Wells, K., Wise, P.E. (2017). Hereditary colorectal cancer syndromes. *The Surgical Clinics of North America*, 97, 605-625.
64. Peltomäki, P., Nyström, M., Mecklin, J.P., Seppälä, T.T. (2023). Lynch syndrome genetics and clinical implications. *Gastroenterology*, 164, 783-799.
65. Dinarvand, P., Davaro, E.P., Doan, J.V., Ising, M.E., Evans, N.R., Phillips, N.J., Lai, J., Guzman, M.A. (2019). Familial adenomatous polyposis syndrome: an update and review of extraintestinal manifestations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 143,1382-1398.
66. Parmar, S., Easwaran, H., (2022). Genetic and epigenetic dependencies in colorectal cancer development, *Gastroenterology Report*, **10**:goac035, Erişim 15.02.2025, https://academic.oup.com/gastro/article/doi/10.1093/gastro/goac035/6663806.
67. Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G. (2018). Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Medical Sciences*, **6**:31. Erişim 15.02.2025, https://www.mdpi.com/2076-3271/6/2/31.
68. Ionescu, V.A., Gheorghe, G., Bacalbasa, N., Chiotoroiu, A.L., Diaconu, C. (2023). Colorectal cancer: from risk factors to oncogenesis. *Medicina*, **59**:1646. Erişim 15.02.2025, https://www.mdpi.com/1648-9144/59/9/1646.
69. Baran, Y. (Ed.). (2021). *Kanser Moleküler Biyolojisi.* Ankara: Hipokrat Kitabevi.
70. Patelli, G., Tosi, F., Amatu, A., Mauri, G., Curaba, A., Patanè, D.A., Pani, A., Scaglione, F., Siena, S., Sartore-Bianchi, A. (2021). Strategies to tackle RAS-mutated metastatic colorectal cancer. *European Society for Medical Oncology Open*. **6**:100156. Erişim 15.02.2025, https://www.esmoopen.com/article/S2059-7029(21)00116-2/fulltext.
71. Bahar, M.E., Kim, H.J. Kim, D.R. (2023). Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy,* **8**:455. Erişim 15.02.2025, https://www.nature.com/articles/s41392-023-01705-z.
72. Caputo, F., Santini, C., Bardasi, C., Cerma, K., Casadei-Gardini, A., Spallanzani, A., Andrikou, K., Cascinu, S., Gelsomino, F. (2019). BRAF-mutated colorectal cancer: clinical and molecular insights. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**:5369. Erişim 16.02.2025, https://www.mdpi.com/1422-0067/20/21/5369.
73. Oh B.Y., Lee R.A., Chung S.S., Kim K.H. (2011). Epidermal growth factor receptor mutations in colorectal cancer patients. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*. 27, 127-132.
74. Canbay, E., Buğra, D. (2011). Kolorektal kanser: Genetik ve moleküler biyoloji araştırmaları hasta tedavisine yeterince yansıyor mu? *Turkish Journal of Surgery*, 27, 198-205.
75. Zhang, L., Shay, J.W. (2017). Multiple roles of APC and its therapeutic implications in colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. **109**:djw332. Erişim 01.01.2025, https://academic.oup.com/jnci/article/109/8/djw332/3113843.
76. Farooqi, A.A., de la Roche, M., Djamgoz, M.B.A., Siddik, Z.H. (2019). Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. *Seminars in Cancer Biology*, *58*, 65-79.
77. Liebl, M.C., Hofmann, T.G. (2021). The role of p53 signaling in colorectal cancer. *Cancers*, **13**:2125. Erişim 01.02.2025, https://www.mdpi.com/2072-6694/13/9/2125.
78. Wang, H., Guo, M., Wei, H. Chen, Y. (2023). Targeting p53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy,* **8**:92. Erişim 05.01.2025, https://www.nature.com/articles/s41392-023-01347-1.

79. Altınbaş, R. (2020). Onkogenler. İçinde E. Bozgeyik (Ed.), *Kanserin Moleküler Biyolojisi ve İmmünolojisi.* Ankara: Akademisyen Kitabevi; 29-44.
80. Márquez-González, R.M., Saucedo-Sariñana, A.M., de Jesús Tovar-Jacome, C., Barros-Núñez, P., Gallegos-Arreola, M.P., Orozco-Gutiérrez, M.H., Mariscal-Ramírez, I., Pineda-Razo, T.D., Alcaraz-Wong, A.A., Marín-Contreras, M.E., Rosales-Reynoso, M.A. (2024). NME1 and DCC variants are associated with susceptibility and tumor characteristics in Mexican patients with colorectal cancer. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, **36**:10. Erişim 05.02.2025, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38556604/.
81. Zhao, M., Mishra, L., Deng, C.X. (2018). The role of TGF-β/SMAD4 signaling in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 14, 111-123.
82. Jia, X., Shanmugam, C., Paluri, R.K., Jhala, N.C., Behring, M.P., Katkoori, V.R., Sugandha, S.P., Bae, S., Samuel, T., Manne, U. (2017). Prognostic value of loss of heterozygosity and sub-cellular localization of SMAD4 varies with tumor stage in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8, 20198-20212.
83. Itatani, Y., Kawada, K., Sakai, Y. (2019). Transforming growth factor-β signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**:5822. Erişim 10.01.2025, https://www.mdpi.com/1422-0067/20/23/5822
84. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A.V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death and Differentiation*, 25, 486-541.
85. Celepli, S., Bigat, İ., Celepli ,P., Karagin, P.H. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji*, 24, 103-120.
86. Chinnasamy, S. Zameer, F., Muthuchelian, K. (2020). Molecular and biological mechanisms of apoptosis and its detection techniques. *Journal of Oncological Sciences*, 6, 49-64
87. Okuyan, D. (2023). Apoptosis. *Selçuk University Faculty of Science Journal of Science*, 49, 1-10.
88. Obeng, E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology,* 81, 1133-1143.
89. Dandoti, S. (2021). Mechanisms adopted by cancer cells to escape apoptosis-a review. *Biocell*. 45, 863-884.
90. Gökhan, A., Kılıç, K.D., Gülle, K., Uyanıkgil, Y., Çavuşoğlu, T. (2020). Apoptotic pathways and targeted therapies. *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, 27, 565-573.
91. Bostan, M., Mihaila, M., Hotnog, C., Bleotu, C., Anton, G., Roman, V., Brasoveanu, L.I. (2016). Modulation of apoptosis in colon cancer cells by bioactive compounds. İçinde L. Rodrigo (Ed.), *Colorectal Cancer - From Pathogenesis to Treatment,* IntechOpen. Erişim 15.02.2025, https://www.intechopen.com/chapters/50724.
92. Abraha, A.M., Ketema, E.B. (2016). Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8, 583-591.
93. Wang, S., Guo, S., Guo, J., Du, Q., Wu, C., Wu, Y., Zhang, Y. (2024). Cell death pathways: molecular mechanisms and therapeutic targets for cancer. *MedComm*, **5**:e693. Erişim 07.01.2025, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mco2.693.
94. Zhang, L., Liu, J., Dai, Z., Wang, J., Wu, M., Su, R., Zhang, D. (2022). Crosstalk between regulated necrosis and micronutrition, bridged by reactive oxygen species. *Frontiers in Nutrition*, **9**:1003340. Erişim 07.01.2025, https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2022.1003340/full.
95. D'Arcy, M.S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biology International, 43, 582-592.
96. Bertheloot, D., Latz, E. Franklin, B.S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology,* 18, 1106-1121.
97. Yılmaz, Z. (2023). Nekroptozis: serebral ve miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı için terapötik bir hedef midir? *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20, 451-462.
98. Yu, Y. Q., Gamez-Belmonte, R., Patankar, J.V., Liebing, E., Becker, C. (2022). The role of programmed necrosis in colorectal cancer. *Cancers*, **14**:4295. Erişim 05.02.2025, https://www.mdpi.com/2072-6694/14/17/4295.
99. Liu, Z.G., Jiao, D. (2019). Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis. *Cell Stress*, 4, 1-8.
100. Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H. Salhab, H.A., Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* **5**:28. Erişim 28.01.2025, https://www.nature.com/articles/s41392-020-0134-x.

101. Özkara, G., Öztürk, O., Yılmaz Aydoğan, H. (2020). Kanser ve metastaz: Hücre adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantıların önemi. *Experimed*, 10, 38-44.
102. Pacmayr, E., Treese, C., Stein, U. (2017). Underlying mechanisms for distant metastasis-molecular biology. *Visceral Medicine*, 33, 11-20.
103. Lu, J., Kornmann, M., Traub, B. (2023). Role of epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**:14815. Erişim 07.01.2025, https://www.mdpi.com/1422-0067/24/19/14815
104. Aladağ, T. (2024). *MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin metastatik karakterine silymarin'in etkisinin 2 boyutlu ve 3 boyutlu kültür yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi* (Doktora tezi, Prof. Dr. Hülya Çetin ve Doç. Dr. Fatma Fırat, Danışmanlar). Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye.
105. Şahin, Z.A. (2022). *Kolon kanseri hücrelerinin mezenkimal-epitel dönüşümü sürecinde epigenetik değişimlerin araştırılması* (Yüksek lisans tezi, Prof. Dr. Çetin Ilgaz ve Dr. Öğr. Üyesi Aslı Sade Memişoğlu, Danışmanlar). Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.
106. Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J.M., Perez-Romero, B.A., Guerrero-Rodriguez, J.F., Martinez-Avila, N., Martinez-Fierro, M.L. (2020). The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**:9739. Erişim 03.12.2024, https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9739.
107. Babaei, G., Aziz, S.G., Jaghi, N.Z.Z. (2021). EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **133**:110909. Erişim 12.12.2024, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333222031101X?via%3Dihub.
108. Özkara, G. (2019). *Polifenolik bileşenlerin hormon pozitif ve negatif meme kanseri hücre hatlarında migrasyon ilişkili JAM-A, LFA-1 ve VLA-4 gen ekspresyonlarına etkilerinin araştırılması*. (Doktora tezi, Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan, Danışman) İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye
109. Sznurkowska, M.K., Aceto, N. (2022). The gate to metastasis: key players in cancer cell intravasation. *The FEBS Journal*, 289, 4336-4354.
110. Hamutoğlu, R., Önder, O. (2017). Fizyolojik ve patolojik koşullarda anjiyogenezin rolü. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi,* 2, 56-62.
111. de Visser, K.E., Joyce, J.A. (2023) The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, 41, 374-403.
112. Strilic, B, Offermanns, S. (2017). Intravascular survival and extravasation of tumor cells. *Cancer Cell.* 32, 282-293.
113. Pandurangan, A.K., Divya, T., Kumar, K., Dineshbabu, V., Velavan, B., Sudhandiran, G. (2018). Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 10, 244-259.
114. Huang, Y., Hong, W. Wei, X. (2022). The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis. *Journal of Hematology & Oncology,* **15**:129. Erişim 20.12.2024, https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01347-8.
115. Shin, A.E., Giancotti, F.G., Rustgi, A.K. (2023). Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 44, 222-236.
116. Ni, Y., Liang, Y., Li, M., Lin, Y., Zou, X., Han, F., Cao, J., Li, L. (2023). The updates on metastatic mechanism and treatment of colorectal cancer. *Pathology, Research and Practice*, **251**:154837. Erişim 12.12.2024, https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0344-0338(23)00538-1.
117. Sağnak-Yılmaz, Z., (2022). Kolorektal kanser metastazının moleküler mekanizması ve organotropism. *Kocaeli Tıp Dergisi*, 1, 15-25.
118. Okuyan, D., Türkoğlu, A. S. ve Köçkar, F. (2023). Kolon kanserinde IL-6 sitokinin karbonik anhidraz III gen ifadesi üzerindeki etkisinin incelenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13, 102-111.
119. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, *Kolorektal Kanser Klinik Protokolü.* Ankara: Sağlık Teknolojisi Değerlendirme Dairesi Başkanlığı. (İnternette) Ağustos 2019. Erişim 01.02.2025, chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://dosyamerkez.saglik.gov.tr/Eklenti/31682/0/kolorektal-kanser-klinik-protokolpdf.pdf.
120. National Cancer Institute. *Colorectal cancer.* (İnternette), Erişim 06.02.2025, https://training.seer.cancer.gov/colorectal/intro/types.html.
121. American Joint Committee on Cancer. *Colorectal Cancer Stages.* (İnternette), Erişim 03.02.2025, https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html.

122. Güler, E.M. (2019). *Kolon kanseri hücreleri üzerine timokinon ve 5-fluorouracilin terapötik etkisinin in vitro ve in vivo araştırılması*. (Doktora tezi, Prof. Dr. Abdurrahim Koçyiğit, Danışman). Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
123. Çelik, B. (2019). *Rezektabl kolon kanserinde anastomoz hattı nüksüne etki eden prediktif faktörler*. (Uzmanlık tezi, Doç. Dr. Metin Keskin, Danışman, Op. Dr. Ali Fuat Kaan Gök, Yardımcı Danışman). İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.
124. Hossain, M.S., Karuniawati, H., Jairoun, A.A., Urbi, Z., Ooi, J., John, A., Lim, YC., Kibria, K.M.K., Mohiuddin, A.K.M., Ming, L.C., Goh, K.W., Hadi, M.A. (2022). Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers*, **14**:1732. Erişim 04.02.2025, https://www.mdpi.com/2072-6694/14/7/1732.
125. Xie, Y.H., Chen, Y.X. Fang, J.Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**:22. Erişim 04.02.2025, https://www.nature.com/articles/s41392-020-0116-z.
126. Özmen, A. (2020). Kolorektal kanserlerde moleküler hedefli tedaviler. İçinde Sedef, A.M. (Ed.), *Onkolojide Moleküler Hedefler*. Ankara: Akadamisyen Kitabevi; 213-220.
127. Kumar, A., Gautam, V., Sandhu, A., Rawat, K., Sharma, A., Saha, L. (2023). Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: a comprehensive review. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 15, 495-519.
128. Fadlallah, H., El Masri, J., Fakhereddine, H., Youssef, J., Chemaly, C., Doughan, S., Abou-Kheir, W. (2024). Colorectal cancer: Recent advances in management and treatment. *World Journal of Clinical Oncology*, 15, 1136-1156.
129. Šuleková, M., Váhovská, L., Hudák, A., Žid, L., Zeleňák, V. (2019). A study of 5-fluorouracil desorption from mesoporous silica by RP-UHPLC. *Molecules*, **24**:1317. Erişim 07.01.2025, https://www.mdpi.com/1420-3049/24/7/1317.
130. Merloni, F., Ranallo, N., Scortichini, L., Giampieri, R., Berardi, R. (2019). Tailored therapy in patients treated with fluoropyrimidines: focus on the role of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Cancer Drug Resistance*, 2, 787-802.
131. Azwar, S., Seow, H.F., Abdullah, M., Faisal Jabar, M., Mohtarrudin, N. (2021). Recent updates on mechanisms of resistance to 5-fluorouracil and reversal strategies in colon cancer treatment. *Biology*, **10**:854. Erişim 03.01.2025, https://www.mdpi.com/2079-7737/10/9/854.
132. Sabeti-Aghabozorgi, A., Moradi-Sarabi, M., Jafarzadeh-Esfehani, R., Koochakkhani, S., Hassanzadeh, M., Kavousipour, S., Eftekhar, E. (2020). Molecular determinants of response to 5-fluorouracil-based chemotherapy in colorectal cancer: the undisputable role of micro-ribonucleic acids. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12, 942-956.
133. Yüksel, T. (2019). *Dihidropirimidin dehidrogenaz gen polimorfizminin 5-fluorourasil kemoterapi ajanı alan kanser tanılı hastalarda gelişebilecek toksisiteler ile ilişkisi*. (Tıpta uzmanlık tezi, Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem Cindoğlu, Danışman). Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.
134. Batista, C.S., Martins, T. L., Batista, F. C. A. (2012). 5-Fluorouracil (5-FU)-using and side effects. İçinde A.C.D. Longinho, S.E.B. Dobreiro (Eds.), *Fluorouracil: Synthesis, Health Effects and Role in Chemotherapy,* Nova Science Publishers.
135. Özgen-Gülyenli, D., Bakar, E. (2019). Dışa atım pompa sistemleri ve bu sistemlerin kanser tedavisindeki etkinlikleri. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 3, 54-69.
136. Wang, X., Zhang, H., Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2, 141-160.
137. Hu, T., Li, Z., Gao, C.Y., Cho, C.H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*, 22, 6876-6889.
138. Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A., Christou, N. (2020). 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: from classical pathways to promising processes. *Cancer Science*, 111, 3142-3154.
139. Nelson, V.K., Nuli, M.V., Mastanaiah, J., Saleem, T.S.M., Birudala, G., Jamous, Y.F., Alshargi, O., Kotha, K.K., Sudhan, H.H., Mani, R.R., Muthumanickam, A., Niranjan, D., Jain, N.K., Agrawal, A., Jadon, A.S., Mayasa, V., Jha, N.K., Kolesarova, A., Slama, P., Roychoudhury, S. (2023). Reactive oxygen species mediated apoptotic death of colon cancer cells: therapeutic potential of plant derived alkaloids. *Frontiers in Endocrinology*, **14**:1201198. Erişim 03.01.2025, https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1201198/full

140. Sorolla, M.A., Hidalgo, I., Sorolla, A., Montal, R., Pallisé, O., Salud, A., Parisi, E. (2021). Microenvironmental reactive oxygen species in colorectal cancer: involved processes and therapeutic opportunities. *Cancers*, **13**:5037. Erişim 07.01.2025, https://www.mdpi.com/2072-6694/13/20/5037
141. Huang, R., Chen, H., Liang, J., Li, Y., Yang, J., Luo, C., Tang, Y., Ding, Y., Liu, X., Yuan, Q., Yu, H., Ye, Y., Xu, W., Xie, X. (2021). Dual role of reactive oxygen species and their application in cancer therapy. *Journal of Cancer*, 12, 5543-5561.
142. Bozkoyun-Dusak, Z., Yaşar, Y.Z., Şaprak, A. (2024). Oksidatif stres ve kolorektal kanser ilişkisinde antioksidanların önemli rolü. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, 17, 119-124.
143. Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A.O., Yeskaliyeva, B., Abdull Razis, A.F., Modu, B., Calina, D., Sharifi-Rad, J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in Chemistry*, **11**:1158198. Erişim 03.01.2025, https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2023.1158198/full.
144. Karabulut, H., Gülay, M.Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1, 65-76.
145. Carini, F., Mazzola, M., Rappa, F., Jurjus, A., Geagea, A.G., Al Kattar, S., Bou-Assi, T., Jurjus, R., Damiani, P., Leone, A., Tomasello, G. (2017). Colorectal carcinogenesis: role of oxidative stress and antioxidants. *Anticancer Research*, 37, 4759-4766.
146. Shah, M.A., Rogoff, H.A. (2021). Implications of reactive oxygen species on cancer formation and its treatment. *Seminars in Oncology*, 48, 238-245.
147. Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., Nepovimova, E., Kuca, K., Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97, 2499-2574.
148. Kotsafti, A., Scarpa, M., Castagliuolo, I., Scarpa, M. (2020). Reactive oxygen species and antitumor immunity-from surveillance to evasion. *Cancers*, **12**:1748. Erişim 03.01.2025, https://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1748.
149. Büyüktuncel, E. (2014). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17, 93-103.
150. Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
151. Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 412-422.
152. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
153. Kuru, R. (2018). İnsanlarda diyet ile alınan bor miktarının bazı biyokimyasal parametreler üzerine olan etkisinin incelenmesi. (Yüksek lisans tezi, Prof. Dr. Ayşen Yarat, Danışman). Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.
154. Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü. *Bor Mineralleri ve Kullanım Alanları* (İnternette), Erişim 09.02.2024, https://www.etimaden.gov.tr.
155. Nielsen, F.H., Eckhert, C.D. (2020). Boron. *Advances in Nutrition*, 11, 461-462.
156. Demirci, S., Doğan, A., Aydın, S., Dülger, E.Ç., Şahin, F. (2016). Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression, and inflammation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 417, 119-133.
157. Topçu, A., Halıcı, Z., Çadırcı, E., Karakuş, E., Doğan, A., Bakan, F., Göncü, Y., Şahin, F. (2024). The effects of boron nitride/hydroxyapatite compounds on bone defects in osteoporotic rats. Journal of Molecular Structure, **1295**:136683. Erişim 03.01.2025, https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022286023017738?via%3Dihub.
158. Doğan, A., Demirci, S., Apdik, H., Bayrak, O.F., Gulluoglu, S., Tuysuz, E.C., Gusev, O., Rizvanov, A.A., Nikerel, E., Şahin, F. (2017). A new hope for obesity management: boron inhibits adipogenesis in progenitor cells through the Wnt/β-catenin pathway. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 69, 130-142.
159. Kuru, R., Yılmaz, S., Balan, G., Tuzuner, B.A., Taşlı, P.N., Akyüz, S., Yener Öztürk, F., Altuntaş, Y., Yarat, A., Şahin, F. (2019). Boron-rich diet may regulate blood lipid profile and prevent obesity: a non-drug and self-controlled clinical trial. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 191-198.
160. Şahin, E., Orhan, C., Erten, F., Şahin, F., Şahin, N., Şahin, K. (2023). The effect of different boron compounds on nutrient digestibility, intestinal nutrient transporters, and liver lipid metabolism. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 53, 619-62

161. Kucukkurt, I., Ince, S., Demirel, H.H., Turkmen, R., Akbel, E., Celik, Y. (2015). The effects of boron on arsenic-induced lipid peroxidation and antioxidant status in male and female rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 29, 564-571.
162. Mohammed, E.E., Türkel, N., Yigit, U.M., Dalan, A.B., Şahin, F. (2023). Boron derivatives inhibit the proliferation of breast cancer cells and affect tumor-specific T cell activity in vitro by distinct mechanisms. *Biological Trace Element Research*, 201, 5692-5707.
163. Baldivia, S.A., Ibarra, R.G., Torre, R.R., Sobrino, G.G., Tasistro, A., Etchevers, B.J., Reyna, S.L. (2016). Five causes why boron essentiality on humans has not been confirmed: a hypothesis. *Integrative Food, Nutrition and Metabolism*, 4, 1-5.
164. Kuru, R., Yılmaz, S., Saçan, Ö., Yanardağ, R., Yarat, A., Şahin, F. (2020). Boron levels in bottled waters in Turkey. *3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences* içinde (763-767 ss.). Ankara, Türkiye.
165. Kuru, R., Kurt Mutlu, E., Cempel, E., Belentepe Çelik, S., Yarat, A. (2018). Evaluation of dietary boron in terms of health: a retrospective study. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 8, 296-300.
166. Kuru, R., Yılmaz, S., Taşlı, P.N., Yarat, A., Şahin, F. (2019). Boron content of some foods consumed in Istanbul, Turkey. *Biological Trace Element Research*, 187, 1-8.
167. Duydu, Y., Başaran, N., Bolt, H.M. (2023). What can we learn from epidemiological studies on chronic boron exposure? *Critical Reviews in Toxicology*, 53, 168-180.
168. Amerika Birleşik Devletleri İlaç, Besin ve Beslenme Komitesi. (2001). *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and* zinc. Washington (DC): National Academies Press.
169. European Food Safety Authority. *Overview on tolerable upper intake levels as derived by the scientific committee on food (SCF) and* the EFSA panel on dietetic products, nutrition and allergies (NDA) (İnternette) Haziran 2024. Erişim: 05.02.2025, chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2024-05/ul-summary-report.pdf)
170. Malouff, T.D., Seneviratne, D.S., Ebner, D.K., Stross, W.C., Waddle, M.R., Trifiletti, D.M., Krishnan, S. (2021). Boron neutron capture therapy: a review of clinical applications. *Frontiers in Oncology*, **11**:601820. Erişim 03.01.2025, https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.601820/full.
171. Grams, R.J., Santos, W.L., Scorei, I.R., Abad-García, A., Rosenblum, C.A., Bita, A., Cerecetto, H., Viñas, C., Soriano-Ursúa, M.A. (2024). The rise of boron-containing compounds: advancements in synthesis, medicinal chemistry, and emerging pharmacology. *Chemical Reviews*, 124, 2441-2511.
172. Messner, K., Vuong, B., Tranmer, G.K. (2022). The boron advantage: the evolution and diversification of boron's applications in medicinal chemistry. *Pharmaceuticals*, **15**:264. Erişim 03.01.2025, https://www.mdpi.com/1424-8247/15/3/264.
173. Mahabir, S., Spitz, M.R., Barrera, S.L., Dong, Y.Q., Eastham, C., Forman, M.R. (2008). Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. *American Journal of Epidemiology*, 167, 1070-1080.
174. Cui, Y., Winton, M.I., Zhang, Z.F., Rainey, C., Marshall, J., De Kernion, J.B., et al. (2004). Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncology Reports*, 11, 887-892.
175. Williams, M.T., Chapin, R.E., King, P.E., Moser, G.J., Goldsworthy, T.L., Morrison, J.P., Maronpot, R.R. (2004). Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Journal of Toxicologic Pathology*, 32, 73-78.
176. Korkmaz, M., Avcı, C.B., Gündüz, C., Aygüneş, D., Erbaykent, T.B. (2014). Disodium pentaborate decahydrate (DPD) induced apoptosis by decreasing hTERT enzyme activity and disrupting F-actin organization of prostate cancer cells. *Tumour Biology*, 35, 1531-1538.
177. Avcı, Ç.B., Burcu, E.T., Özalp, Ö., Bağca, B.G., Dodurga, Y., Aygüneş, D., Günel, N.S., Korkmaz, M., Gündüz, C. (2016). Disodium pentaborate decahydrate up-regulates expressions of MAP kinase genes in human prostate cancer cells. *Demiroğlu Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi*, 2, 100-104.
178. Fırat, F., Aladağ, T. (2022). *In vitro* effects of boric acid and bevacizumab in non-small cell lung cancer. *New Trends in Medicine Sciences* 3, 61-69.
179. Cebeci, E., Yüksel, B., Şahin, F. (2022). Anti-cancer effect of boron derivatives on small-cell lung cancer. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **70**:126923. Erişim 15.01.2025, https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0946672X22000037?via%3Dihub.

180. Semerci-Sevimli, T., Ghorbani, A., Sevimli, M. (2023). Borik asitin anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkilerinin insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde TGF-β sinyal yolağı üzerinden incelenmesi. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 7, 553-564.
181. Koldemir-Gündüz, M., Aydin, H.E., Berikten, D., Kaymak, G., Köse, D.A., Arslantaş, A. (2021). Synthesis of new boron derived compounds; anticancer, antioxidant and antimicrobial effect in vitro glioblastoma tumor model. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, *64*, 864-872.
182. Özyarım, Ş.C., Karabağ Çoban, F. (2021). Investigation of the apoptotic and antiproliferative effects of boron on CCL-233 human colon cancer cells. *Cell Journal*, 23, 429-434.
183. Çiğel, A., Ek, R.O., Bilgin, M.D. (2020). Borik asidin kolon kanseri hücre hattı üzerindeki kanser önleyici ve biyolojik etkilerinin değerlendirilmesi. *Meandros Medical and Dental Journal*, 21, 238-243.
184. Türeyen, A., Günay, S., Erden, Y., İnce, S. (2021). Effect of boric acid in colorectal adenocarcinoma cell line and role on chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil. *International Journal of Pharmacology*, 17, 57-64.
185. Hacıoğlu, C., Davran, F. (2023). Kolorektal kanser hücrelerinde boraksın Gpx4/ACSL4 sinyal yolu aracılığıyla sitotoksik etkileri. *Sağlık Bilimlerinde Değer*, 13, 54-60.
186. Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C.M., Mitran, V., Cimpean, A., Iordachescu, D. (2008). Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biological Trace Element Research*, 122, 197-205.
187. Eroğlu-Güneş, C. (2023). Boric acid shows ER stress and apoptosis mediated anticancer activity in human pancreatic cancer MIA PaCa-2 and PANC-1 cells. *Selcuk Medical Journal*, 39, 1-6.
188. Dikkatli, Ö.I., Darcansoy İseri, Ö. (2023). Boron and beyond: where do we stand in cancer treatment? *Journal of Boron*, 8, 158-188.
189. National Center for Biotechnology Information. *Sodium pentaborate pentahydrate* (İnternette), Erişim: 04.02.2025, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-pentaborate-pentahydrate.
190. Aktas-Senocak, E., Utlu, N., Kurt, S., Kucukler, S., Kandemir, F.M. (2024). Sodium pentaborate prevents acetaminophen-induced hepatorenal injury by suppressing oxidative stress, lipid peroxidation, apoptosis, and inflammatory cytokines in rats. *Biological Trace Element Research*, 202, 1164-1173.
191. Öztaş, N., Kara, E., Demir, D., Yetkin, D., Ceylan, S., İyigündoğdu, Z. (2024). Biologically active sodium pentaborate pentahydrate and *Hypericum perforatum* oil loaded polyvinyl alcohol: chitosan membranes. *International Journal of Biological Macromolecules*, **269**:132133. Erişim 01.01.2025, https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813024029386?via%3Dihub.
192. Yilmaz, A.B., Tapsin, S., Elbasan, E.B., Kayhan, H.D., Sahin, F., Turkel, N. (2020). Suppressor effects of sodium pentaborate pentahydrate and pluronic F68 on adipogenic differentiation and fat accumulation. *Biological Trace Element Research*, 193, 390-399.
193. International Probiotics Association, *Microbiota (İnternette),* Erişim: 04.12.2024, https://internationalprobiotics.org/home/.
194. Hou, K., Wu, Z.X., Chen, X.Y., Wang, J.Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J.B., Wei, L., Li, J., Chen, Z.S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **7**:135. Erişim 01.01.2025, https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4.
195. Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G.A.D., Gasbarrini, A., Mele, M.C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, **7**:14. Erişim 03.01.2025, https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014.
196. Bhatt, A.P., Redinbo, M.R., Bultman, S.J. (2017). The role of the microbiome in cancer development and therapy. CA: A *Cancer Journal for Clinicians*. 67, 326-344.
197. Oliphan, K., Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, **7**:91. Erişim 03.01.2025, https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8.
198. Zhang, Y., Chen, R., Zhang, D., Qi, S., Liu, Y. (2023). Metabolite interactions between host and microbiota during health and disease: which feeds the other? *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **160**:114295. Erişim 07.01.2025, https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114295
199. Liu, L., Wang, H., Chen, X., Zhang, Y., Zhang, H., Xie, P. (2023). Gut microbiota and its metabolites in depression: from pathogenesis to treatment. *EBioMedicine*. **90**:104527. Erişim 03.01.2025, https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104527

200. Chen, M., Lin, W., Li, N., Wang, Q., Zhu, S., Zeng, A., Song, L. (2022). Therapeutic approaches to colorectal cancer via strategies based on modulation of gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*. **13**:2022. Erişim 07.01.2025, https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.945533
201. Kapitan, M., Niemiec, M.J., Steimle, A., Frick, J.S., Jacobsen, I.D. (2019). Fungi as part of the microbiota and interactions with intestinal bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 422, 265-301.
202. Chibani, C.M., Mahnert, A., Borrel, G., Almeida, A., Werner, A., Brugère, J.F., Gribaldo, S., Finn, R.D., Schmitz, R.A., Moissl-Eichinger, C. (2022). A catalogue of 1,167 genomes from the human gut archaeome. *Nature Microbiology*. 7, 48-61.
203. Mafra, D., Ribeiro, M., Fonseca, L., Regis, B., Fragoso Dos Santos, H., Emiliano de Jesus, H., Schultz, J., Shiels, P.G., Stenvinkel, P., Rosado, A. (2022). Archaea from the gut microbiota of humans: could be linked to chronic diseases? *Anaerobe*. **77**:102629 Erişim 03.01.2025, https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102629.
204. Nash, A.K., Auchtung, T.A., Wong, M.C., Smith, D.P., Gesell, J.R., Ross, M.C., Stewart, C.J., Metcalf, G.A., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., Ajami, N.J., Petrosino, J.F. (2017). The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. *Microbiome*. **5**:153. Erişim 25.01.2025, https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-017-0373-4.
205. Kuru-Yaşar, R., Üstün-Aytekin, Ö. (2024). The crucial roles of diet, microbiota, and postbiotics in colorectal cancer. *Current Nutrition Reports*, 13, 126-151.
206. Dahiya, D., Nigam, P. S. (2022). The gut microbiota influenced by the intake of probiotics and functional foods with prebiotics can sustain wellness and alleviate certain ailments like gut-inflammation and colon-cancer. *Microorganisms*, **10**:665. Erişim 20.01.2025, https://doi.org/10.3390/microorganisms10030665
207. Yang, J., Yu, J. (2018). The association of diet, gut microbiota and colorectal cancer: what we eat may imply what we get. *Protein & Cell*, 9, 474-487.
208. Yang, Y., Misra, B.B., Liang, L., Bi, D., Weng, W., Wu, W., Cai, S., Qin, H., Goel, A., Li, X., Ma, Y. (2019). Integrated microbiome and metabolome analysis reveals a novel interplay between commensal bacteria and metabolites in colorectal cancer. *Theranostics*, 9, 4101-4114.
209. Kvakova, M., Kamlarova, A., Stofilova, J., Benetinova, V., Bertkova, I. (2022). Probiotics and postbiotics in colorectal cancer: Prevention and complementary therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 28, 3370-3382.
210. Xing, C., Du, Y., Duan, T., Nim, K., Chu, J., Wang, H.Y., Wang, R.F. (2022). Interaction between microbiota and immunity and its implication in colorectal cancer. *Frontiers in Immunology*, **13**:963819. Erişim 15.12.2024, https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.963819.
211. Loke, Y.L., Chew, M.T., Ngeow, Y.F., Lim, W.W.D., Peh, S.C. (2020). Colon carcinogenesis: the interplay between diet and gut microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**:603086. Erişim 03.01.2025, https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.603086
212. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506-514.
213. Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491-502.
214. Liang, B., Xing, D. (2023). The current and future perspectives of postbiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15, 1626-1643.
215. Thorakkattu, P., Khanashyam, A.C., Shah, K., Babu, K.S., Mundanat, A.S., Deliephan, A., Deokar, G.S., Santivarangkna, C., Nirmal, N.P. (2022). Postbiotics: current trends in food and pharmaceutical industry. *Foods*, **11**:3094. Erişim 03.01.2025, https://doi.org/10.3390/foods11193094.
216. Nataraj, B.H., Ali, S.A., Behare, P.V., Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, **19**:168. Erişim 07.01.2025, https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w.
217. Salminen, S., Collado, M.C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E.M.M., Sanders, M.E., Shamir, R., Swann, J.R., Szajewska, H., Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18, 649-667.

218. Bultman, S.J. (2016). The microbiome and its potential as a cancer preventive intervention. *Seminars in Oncology*, 43, 97-106.
219. Kaźmierczak-Siedlecka, K., Marano, L., Merola, E., Roviello, F., Połom, K. (2022). Sodium butyrate in both prevention and supportive treatment of colorectal cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **12**:1023806. Erişim 03.01.2025, https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1023806
220. Hodgkinson, K., El Abbar, F., Dobranowski, P., Manoogian, J., Butcher, J., Figeys, D., Mack, D., Stintzi, A. (2023). Butyrate's role in human health and the current progress towards its clinical application to treat gastrointestinal disease. *Clinical Nutrition*, 42, 61-75.
221. Liu, H., Wang, J., He, T., Becker, S., Zhang, G., Li, D., Ma, X. (2018). Butyrate: A double-edged sword for health? *Advances in Nutrition*, 9, 21-29.
222. Tomar, O., Çağlar, A., Akarca, G. (2017). Kefir ve sağlık açısından önemi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17, 834-853.
223. Şeker, A. (2017). *Kefir içeceğinin biyoaktif bileşenlerinin in vitro gastrointestinal simülasyon ile belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Doç. Dr. Özlem Aytekin, Danışman). Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.
224. Karabıyıklı, Ş., Daştan, S. (2016). Geleneksel ve fonksiyonel bir gıda olan kefirin mikrobiyolojik profili. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University*, 33, 75-83.
225. Rosa, D.D., Dias, M.M.S., Grześkowiak, Ł.M., Reis, S.A., Conceição, L.L., Peluzio, M. do C.G. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30, 82-96.
226. Vieira, C.P., Rosario, A.I.L.S., Lelis, C.A., Oliveira, M.G., Peluzio, M. do C.G., Dias, M. M. S. (2021). Bioactive compounds from kefir and their potential benefits on health: A systematic review and meta-analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2021**:9081738. Erişim 02.02.2025, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2021/9081738.
227. Farag, M. A., Jomaa, S. A., Abd El-Wahed, A., El-Seedi, H. R. (2020). The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients*, **12**:346. Erişim 15.12.2024, https://doi.org/10.3390/nu12020346.
228. Bellikci Koyu, E., Büyüktuncer Demirel, Z. (2018). Fonksiyonel bir besin: Kefir. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 46(2), 166-175.
229. Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı. *Kefir* (İnternette), Erişim: 04.02.2025, https://turkomp.tarimorman.gov.tr/main.
230. Kim, D.H., Jeong, D., Kim, H., Kang, I.B., Chon, J.W., Song, K.Y., Seo, K.H. (2016). Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36, 787-790.
231. Ozyazgan-Tokay, A., Pehlivan, E. (2022). The effect of kefir consumption on blood pressure and some blood parameters in hypertensive individuals. *European Journal of Public Health*, **32**:ckac131.228. Erişim 15.12.2024, https://academic.oup.com/eurpub/article/32/Supplement_3/ckac131.228/6766835.
232. Ostadrahimi, A., Taghizadeh, A., Mobasseri, M., Farrin, N., Payahoo, L., Beyramalipoor Gheshlaghi, Z., Vahedjabbari, M. (2015). Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Iranian Journal of Public Health*, 44, 228-237.
233. Chen, Y.H., Chen, H.L., Fan, H.C., Tung, Y.T., Kuo, C.W., Tu, M.Y., Chen, C.M. (2020). Anti-inflammatory, antioxidant, and antifibrotic effects of kefir peptides on salt-induced renal vascular damage and dysfunction in aged stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Antioxidants*, **9**: 90. Erişim 15.12.2024, https://www.mdpi.com/2076-3921/9/9/790.
234. Kim, D.H., Kim, H., Jeong, D., Kang, I.B., Chon, J.W., Kim, H.S., Seo, K.H. (2017). Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: Targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 44, 35-43.
235. Yegin, Z., Sudagidan, M. (2024). A medical and molecular approach to kefir as a therapeutic agent of human microbiota. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 94, 71-80.
236. Khoury, N., El-Hayek, S., Tarras, O., El-Sabban, M., El-Sibai, M., Rizk, S. (2014). Kefir exhibits antiproliferative and proapoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. *International Journal of Oncology*, 45, 2117-2127.
237. de Almeida Brasiel, P.G., Dutra Luquetti, S.C.P., Medeiros, J D., Corrêa, J.O.A., Machado, A. B.F., Moreira, A.P.B., Rocha, V.N., de Souza, C.T., Peluzio, M. do C.G. (2022). Kefir modulates gut microbiota and reduces DMH-associated colorectal cancer via regulation of intestinal

inflammation in adulthood offsprings programmed by neonatal overfeeding. *Food Research International*, **152**:110708. Erişim 05.01.2025, https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110708
238. Comak-Gocer, E. M., Ergin-Zeren, F., Ozen-Küçükcetin, İ., Kucukcetin, A. (2024). Rheological, microbiological, and in vitro digestive properties of kefir produced with different kefir grains and commercial starter cultures. *Food Science and Technology International*. Erişim 01.02.2025, https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/10820132241304130.
239. O'Neill, E.J., Den-Hartogh, D.J., Azizi, K., Tsiani, E. (2020). Anticancer properties of carnosol: a summary of *in vitro* and *in v*ivo evidence. *Antioxidans,* **9**:961. Erişim 01.01.2025, https://www.mdpi.com/2076-3921/9/10/961.
240. Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., Yu, X. (2020). Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Natural Product Communications*. **15**. Erişim 01.01.2025, https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X20903555.
241. National Center for Biotechnology Information. *Carnosol* (İnternette), Erişim 04.02.2025, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carnosol.
242. Anwar, F., Qadir, R. (2021) Carnosic acid and carnosol. İçinde M. Mushtaq, F. Anwar (Eds.), *A Centum of Valuable Plant Bioactives*, Academic Press; 261-274,
243. Lin, C., Zhang, X., Su, Z., Xiao, J., Lv, M., Cao, Y., Chen, Y. (2019). Carnosol Improved Lifespan and Healthspan by Promoting Antioxidant Capacity in *Caenorhabditis elegans*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2019**:5958043. Erişim 12.12.2024, https://doi.org/10.1155/2019/5958043.
244. Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function,* 5, 1113-1124.
245. American Type Culture Collection. *HT29 Cell* (İnternette), Erişim 05.03.2025, https://www.atcc.org/products/htb-38.
246. American Type Culture Collection. FHC Cell (İnternette), Erişim 05.03.2025, https://www.atcc.org/products/crl-1831.
247. Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. Current Protocols in Immunology, 111:A3.B.1-A3.B.3. Erişim 05.04.2025, https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111.
248. Terana, G.T., Abd-Alhaseeb, M.M., Omran, G.A., Okda, T.M. (2022). Quercetin potentiates 5-fluorouracil effects in human colon cancer cells through targeting the Wnt/β-catenin signalling pathway: the role of miR-27a. *Contemporary Oncology*, *26*, 229238.
249. Klepinina, L., Klepinin, A., Truu, L., Chekulayev, V., Vija, H., Kuus, K., Teino, I., Pook, M., Maimets, T., Kaambre, T. (2021). Colon cancer cell differentiation by sodium butyrate modulates metabolic plasticity of Caco-2 cells via alteration of phosphotransfer network. *PLoS ONE*, **16**: e0245348. Erişim: 23.06.2025, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245348.
250. Yan, M., Vemu, B., Veenstra, J., Petiwala, S.M., Johnson, J.J. (2018). Carnosol, a dietary diterpene from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) activates Nrf2 leading to sestrin 2 induction in colon cells. *Integrative Molecular Medicine*, **5**:10.15761/IMM.1000335. Erişim 01.01.2025, https://doi.org/10.15761/IMM.1000335.
251. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48, 4827-4833.
252. Compusyn Software. (İnternette), Erişim 01.02.2025, https://www.combosyn.com/.
253. Snergyfinder Software. (İnternette), Erişim 05.02.2025, https://synergyfinder.org/.
254. Baskić, D., Popović, S., Ristić, P., Arsenijević, N.N. (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International* 30, 924-932.
255. Crowley, L.C., Marfell, B.J., Scott, A.P., Waterhouse, N.J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin v binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2016**. Erişim 05.04.2025, https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288.
256. Tang, S., Li, S., Tang, B. Wang, X., Xiao, Y., Cheke, R.A. (2023). Hormetic and synergistic effects of cancer treatments revealed by modelling combinations of radio - or chemotherapy with immunotherapy. *BMC Cancer,* **23**:1040. Erişim 20.04.2025 https://doi.org/10.1186/s12885-023-11542-6.

257. Chang, X., Tamauchi, S., Nakagawa, A., Xinyuan, W., Yoshida, K., Yokoi, A., Yoshikawa, N., Kajiyama, H. (2025). Chemotherapeutic hormesis induced by the tumor microenvironment in refractory ovarian cancer. *Scientific Reports*, **15**:596. Erişim 10.04.2025, https://doi.org/10.1038/s41598-024-84290-7.
258. Hacıoğlu, C., Davran, F. (2023). Kolorektal kanser hücrelerinde boraksın Gpx4/ACSL4 sinyal yolu aracılığıyla sitotoksik etkileri. *Sağlık Bilimlerinde Değer*, *13*, 54-60.
259. Kırlangıç, Ö. F., Kaya-Sezginer, E., Ören, S., Gür, S., Yavuz, Ö., Özgürtaş, T. (2022). Cytotoxic and apoptotic effects of the combination of borax (sodium tetraborate) and 5-fluorouracil on DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cell line. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, *19*, 371-376.
260. Cebeci, E., Yüksel, B., Şahin, F. (2025). Anti-cancer effects of boron derivatives on non-small cell lung cancer. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **88**:127627. Erişim 10.05.2025 https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2025.127627.
261. Gasaly, N., Hermoso, M. A., Gotteland, M. (2021). Butyrate and the fine-tuning of colonic homeostasis: Implication for ınflammatory bowel diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, ***22***:3061. Erişim: 05.02.2025 https://doi.org/10.3390/ijms22063061**.**
262. Jaye, K., Li, C.G., Chang, D., Bhuyan, D.J. (2022). The role of key gut microbial metabolites in the development and treatment of cancer. *Gut Microbes*, **14**:2038865. Erişim 05.03.2025 https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2038865.
263. Banasiewicz, T., Domagalska, D., Borycka-Kiciak, K., Rydzewska, G. (2020). Determination of butyric acid dosage based on clinical and experimental studies-a literature review. *Przeglad Gastroenterologiczny*, 15, 119-125. https://doi.org/10.5114/pg.2020.95556.
264. Helander, H.F, Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract-revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 49, 681-689.
265. Oncel, S., Safratowich, B.D., Lindlauf, J.E., Liu, Z., Palmer, D.G., Briske-Anderson, M., Zeng, H. (2024). Efficacy of butyrate to inhibit colonic cancer cell growth is cell type-specific and apoptosis-dependent. *Nutrients*, **16**:529. Erişim 05.04.2025 https://doi.org/10.3390/nu16040529.
266. Mederle, A.L., Semenescu, A., Drăghici, G.A., Dehelean, C.A., Vlăduț, N.V., Nica, D.V. (2025). Sodium butyrate: a multifaceted modulator in colorectal cancer therapy. *Medicina*, **61**:136. Erişim 10.05.2025 https://doi.org/10.3390/medicina61010136.
267. Müsri, Ö. C., Oğuz, S., Gürcan, Ş., Özgürtaş, T., Yalta, T., Tazegül, G., Yalçın-Müsri, F. (2019). Carnosol alleviates inflammation and bacterial translocation in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury. International Anatolia Academic Online Journal Health Sciences, 5, 105-118.
268. Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Borji, A., Samini, M., Farkhondeh, T. (2017). Protective effects of carnosol against oxidative stress induced brain damage by chronic stress in rats. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, **17**:249. Erişim 17.02.2025, https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-017-1753-9
269. Gassib, N., Issa, H., Loubaki, L., Behaz, S., Almutairi, M.H., Rouabhia, M., Semlali, A. (2024). Cellular mechanisms mediating the anti-cancer effects of carnosol on gingiva carcinoma. *Scientific Reports,* **14**:12266. Erişim 15.02.2025, https://www.nature.com/articles/s41598-024-60797-x.
270. Alsamri, H., El Hasasna, H., Al Dhaheri, Y., Eid, A. H., Attoub, S., Iratni, R. (2019). Carnosol, a natural polyphenol, inhibits migration, metastasis, and tumor growth of breast cancer via a ROS-dependent proteasome degradation of STAT3. *Frontiers in Oncology*, **9**:743. Erişim 05.02.2025, https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2019.00743/full.
271. Gao, H., Song, Q., Yang, J., Yu, S., Zhao, J., Yu, G. (2017). Carnosol inhibits Hedgehog signaling pathway in both LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines. *Cellular and Molecular Biology*, 63, 104-108.
272. Park, K., Kundu, J., Chae, I., Kim, D., Yu, M., Kundu, J.K., Chun, K. (2014). Carnosol induces apoptosis through generation of ROS and inactivation of STAT3 signaling in human colon cancer HCT116 cells. *International Journal of Oncology*, 44, 1309-1315.
273. Visanji, J.M., Thompson, D.G., Padfield, P.J. (2006). Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer letters*, 237, 130-136.
274. Apalowo, O.E., Adegoye, G.A., Mbogori, T., Kandiah, J., Obuotor, T.M. (2024). Nutritional characteristics, health impact, and applications of kefir. *Foods*, **13**:1026. Erişim 05.02.2025, https://doi.org/10.3390/foods13071026.

275. Vieira, C.P., Rosario, A.I.L.S., Lelis, C.A., Rekowsky, B.S.S., Carvalho, A.P.A., Rosário, D.K.A., Elias, T.A., Costa, M.P., Foguel, D., Conte-Junior, C.A. (2021). Bioactive compounds from kefir and their potential benefits on health: A systematic review and meta-analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2021**:9081738. Erişim 05.04.2025 https://doi.org/10.1155/2021/9081738.
276. Tingirikari, J.M.R., Sharma, A., Lee, H.J. (2024). Kefir: a fermented plethora of symbiotic microbiome and health. *Journal of Ethnic Foods,* **11**:35, https://doi.org/10.1186/s42779-024-00252-4.
277. Melo, A.F.P., Mendonça, M.C.P., Rosa-Castro, R.M. (2018). The protective effects of fermented kefir milk on azoxymethane-induced aberrant crypt formation in mice colon. *Tissue and Cell*, 52, 51-56.
278. Brasiel, G.A., Luquetti, C.P.D., Medeiros, J.D., Corrêa, J.O.D.A., Machado, A.B.F., Moreira, A.P.B., Rocha, V.N., de Souza, C.T., Peluzio, M.D.C.G. (2022). Kefir modulates gut microbiota and reduces DMH-associated colorectal cancer via regulation of intestinal inflammation in adulthood offsprings programmed by neonatal overfeeding. *Food Research International*, **152**:110708. Erişim: 11.05.2025 https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110708.
279. Zanardi, K.R., Grancieri, M., Silva, C.W., Trivillin, L.O., Viana, M.L., Costa, A.G.V., Costa, N.M.B. (2023). Functional effects of yacon (Smallanthus sonchifolius) and kefir on systemic inflammation, antioxidant activity, and intestinal microbiome in rats with induced colorectal cancer. *Food & Function*, 14, 9000-9017.
280. Rajoka, M.S.R., Mehwish, H.M., Fang, H., Padhiar, A.A., Zeng, X., Khurshid, M., Hassoun, A., Usman, I., Zhao, H., & Zhao, L. (2019). Characterization and anti-tumor activity of exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefiri isolated from Chinese kefir grains. *Journal of Functional Foods*, **63**:103588. Erişim: 08.04.2025 https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103588.
281. Can, G., Topuz, E., Derin, D., Durna, Z., & Aydiner, A. (2009). Effect of kefir on the quality of life of patients being treated for colorectal cancer. *Oncology Nursing Forum*, 36, E335-E342.
282. Topuz, E., Derin, D., Can, G., Kürklü, E., Cinar, S., Aykan, F., Cevikbaş, A., Dişçi, R., Durna, Z., Sakar, B., Saglam, S., Tanyeri, H., Deniz, G., Gürer, U., Taş, F., Guney, N., Aydiner, A. (2008). Effect of oral administration of kefir on serum proinflammatory cytokines on 5-FU induced oral mucositis in patients with colorectal cancer. *Investigational New Drugs*, 26, 567-572.
283. Stukan, I., Żuk, A., Pukacka, K., Mierzejewska, J., Pawłowski, J., Kowalski, B., & Dąbkowska, M. (2025). Wolf in sheep's clothing: taming cancer's resistance with human serum albumin? *International Journal of Nanomedicine*, *20*, 3493-3525.
284. Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., Bucci, E. O., Finzi, G., Sessa, F., Noonan, D. M., Albini, A. (2015). Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PloS one*, **10**:e0115686. Erişim 04.04.2025 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115686.
285. Parker, A. L., Kavallaris, M., McCarroll, J. A. (2014). Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Frontiers in Oncology*, **4**:153. Erişim 10.03.2025 https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00153.
286. Kim, J.Y., Valencia, T., Abu-Baker, S., Linares, J., Lee, S.J., Yajima, T., Chen, J., Eroshkin, A., Castilla, E.A., Brill, L.M., Medvedovic, M., Leitges, M., Moscat, J., & Diaz-Meco, M.T. (2013). c-Myc phosphorylation by PKCζ represses prostate tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 110, 6418-6423.
287. Zhao, R.Z., Jiang, S., Zhang, L., Yu, Z.B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine,* 44, 3-15.
288. Hopkins, D.R., Keles, S., Greenspan, D.S. (2007). The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biology,* 26, 508-523.
289. Bogdan, M., Meca, A.D., Turcu-Stiolica, A., Oancea, C.N., Kostici, R., Surlin, M.V., Florescu, C. (2022). Insights into the relationship between Pentraxin-3 and cancer. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(23), 15302. Erişim 15.04.2025 https://doi.org/10.3390/ijms232315302.
290. Murakami, M., Hirano, T. (2008). Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Science,* 99, 1515-1522.
291. Liu, Y., Lu, T., Li, R., Cui, L., Xu, R., Teng, S., Baranenko, D., Zhang, T., Yang, L., Qie, R., Xiao, D. (2024). Integrated pan-cancer genomic analysis reveals the role of SLC30A5 in the proliferation, metastasis, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer,* 15, 4686-4699.

292. Caers, J., Hose, D., Kuipers, I., Bos, T.J., Van Valckenborgh, E., Menu, E., De Bruyne, E., Goldschmidt, H., Van Camp, B., Klein, B., Vanderkerken, K. (2010). Thymosin β4 has tumor suppressive effects and its decreased expression results in poor prognosis and decreased survival in multiple myeloma. *Haematologica, 95*, 163-167.