

SENANUR MALCANLI

Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi

İSTANBUL-2023

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

GLUTATYONA BAĞLI ANTİOKSİDATİF KAPASİTE
İNİBİSYONUNUN KOLOREKTAL KANSER METABOLİZMASI ÜZERİNE
ETKİLERİ

SENANUR MALCANLI

DANIŞMAN
DR.ÖĞR.ÜYESİ ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ

İSTANBUL - 2023

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

GLUTATYONA BAĞLI ANTIOKSİDATİF KAPASİTE
İNİBİSYONUNUN KOLOREKTAL KANSER METABOLİZMASI ÜZERİNE
ETKİLERİ

SENANUR MALCANLI

DANIŞMAN
DR.ÖĞR.ÜYESİ ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK

Bu çalışma, İstinye Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2021/BAP13

İSTANBUL - 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İ
ETİK BEYANI.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	XIIİ
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kolonrektal Kanser.....	4
2.2. Kolonrektal Kanser Tedavileri.....	9
2.3. Antioksidan Savunma Sistemi	18
2.4. Glutatyona Bağlı Antioksidatif Kapasite İnhibisyonu.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Hücre Kültürü.....	26
3.2. Hücre Pasajlanması.....	26
3.3. Hücrelerin Stoklanması.....	27
3.4. Hücrelerin Stoktan Çıkarılması	27
3.5. Sülforodamin B Testi ile Canlılık Tayini.....	27
3.6. GSH/GSSG Miktarı Tayini	29
3.7. NADP ⁺ /NADPH Oranı Tayini	29
3.8. DCFHDA Boyası ve Akış Sitometrisi İle ROS Düzey Analizi	30
3.9. Akış Sitometrisi İle Süperoksit Anyonu Düzey Analizi	31
3.10. Hoechst 33342 ve Propidyum İyodür Boyaları İle Apoptoz Analizi ...	31
3.11. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. CB-839 HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinin Canlılığını Azaltmıştır	33

4.2. CB-839 HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde GSH ve GSSG Miktarını Azaltmıştır	33
4.3. Polidatin HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinin Canlılığını Değiştirmemiştir	35
4.4. Polidatin HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde NADP ⁺ /NADPH Oranını Artırmıştır	35
4.5. 5-fluorourasil HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinin Canlılığını Azaltmıştır	36
4.6. CB-839 İle 5-FU ve Polidatin İle 5-FU Kombinasyonları İlaçların Tek Başına Uygulanmasına Kıyasla HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinin Canlılığını Düşürmemiştir	37
4.7. HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde CB-839 İle 5-FU ve Polidatin İle 5-FU Kombinasyonları ROS Seviyesini Değiştirmemiştir	38
4.8. HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde CB-839 İle 5-FU ve Polidatin İle 5-FU Kombinasyonları Süperoksit Anyonunun Seviyesini Etkilememiştir	39
4.9. HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde CB-839 İle 5-FU ve Polidatin İle 5-FU Kombinasyonlarının Hücre Ölümünü Tetiklememiştir	40
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ, ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI	50
KAYNAKÇA	51
EKLER	74
EK-1: İNTİHAL RAPORU	75
EK-2: ÖZGEÇMİŞ	78

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: Ölüm Reseptörleri ve Ligandları (Gökhan vd., 2022).....	16
--	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Kanserin Oluşum Mekanizması (V. Mishra vd., 2018).....	4
Şekil 2.2: Dünya Kanseri İstatistikleri 2020 Yılı Kanseri İnsidans ve Mortalite Oranları. (A) Toplam Kanseri İnsidans ve Mortalite Oranları. (B) Erkeklerde Kanseri İnsidans ve Mortalite Oranları. (C) Kadınlarda Kanseri İnsidans ve Mortalite Oranları. (Sung vd., 2021).....	6
Şekil 2.3: Kanseri Ayırt Edici Özellikleri (Hanahan, 2022).....	8
Şekil 2.4: Kanseri Tedavi Yaklaşımları (V. Mishra vd., 2018) (Mishra ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadan değiştirilerek alınmıştır).....	10
Şekil 2.5: 5-fluorourasil ve Urasil'in Kimyasal Yapısı (Długosz-Pokorska vd., 2019; Šuleková vd., 2019).....	11
Şekil 2.6: Bcl-2 Ailesi Üyeleri (Pistritto vd., 2016).....	14
Şekil 2.7: Apoptozun İntrensik ve Ekstrensik Yolları (Pistritto vd., 2016).....	17
Şekil 2.8: Kanseri Hücrelerinin Zayıf Noktası (Glasauer & Chandel, 2014).....	19
Şekil 2.9: Hücresel GSH'nin Antioksidan Rolü (Lv vd., 2019).....	21
Şekil 3.10: HCT-116 (a) ve HT-29 (b) Hücrelerinin Işık Mikroskobu Görüntüsü.....	26
Şekil 4.11: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839'un hücre canlılığı üzerindeki etkisi SRB testi ile gösterilmiştir.	33
Şekil 4.12: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839'un GSH ve GSSG miktarlarına etkisi "GSH/GSSG Glo Assay" ile gösterilmiştir.....	34
Şekil 4.13: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde Polidatin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi SRB testi ile gösterilmiştir.	35
Şekil 4.14: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde Polidatin'in NADP ⁺ /NADPH oranına etkisi "NADP ⁺ /NADPH Glo TM Assay" ile gösterilmiştir.	36

Şekil 4.15: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde 5-FU'nun hücre canlılığı üzerindeki etkisi SRB testi ile gösterilmiştir.	36
Şekil 4.16: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi SRB testi ile gösterilmiştir.	37
Şekil 4.17: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının ROS seviyesine etkisi akış sitometrisi ile ROS analizi yapılarak gösterilmiştir.	39
Şekil 4.18: HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının süperoksit radikali seviyesindeki etkisi akış sitometrisi ile ROS analizi yapılarak gösterilmiştir.	40
Şekil 4.19: HCT-116 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının süperoksit radikali seviyesindeki etkisi akış sitometrisi ile ROS analizi yapılarak gösterilmiştir.	40
Şekil 4.20: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının hücre ölümü üzerine etkisi Hoechst/PI boyaması yapılarak gösterilmiştir.	42
Şekil 5.21: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde glutamin bağımlılığını göstermek amacıyla SRB testi yapılmıştır.	46
Şekil 5.22: Kanserde NADPH Homeostazının Moleküler Mekanizmaları (Ju vd., 2020).	47

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

5-FU	: 5-fluorourasil
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
APAF1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
Bcl-2	: B-hücresi lenfoma 2
BPTES	: Bis-2-(5-fenilasetamido-1,3,4-tiya-diazol-2-il) etil sülfür
CAD	: Kaspazla Aktive Olan Dnaz
CAT	: Katalaz
CoQ 10	: Koenzim Q 10
DCFHDA	: 2',7'-diklorodihidrofluorescein diasetat
DD	: Ölüm Bölgesi
DED	: Ölüm Efektör Bölgesi
DHE	: Dihidroetidyum
DISC	: Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi
DR	: Ölüm Reseptörleri
FAO	: Yağ Asidi Oksidasyonu
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FdUMP	: Fluorodeoksiüridin Monofosfat
G6PDH	: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GCL	: Glutamat Sistein Ligaz
GLN	: Glutamin
GLS	: Glutaminaz
GLU	: Glutamat
GLUD	: Glutamat Dehidrogenaz
GPX	: Glutatyon Peroksidaz
GR	: Glutatyon Redüktaz
GS	: Glutatyon Sentetaz
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Okside Glutatyon

H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HNPCC	: Kalıtsal Polip Dışı Kolorektal Kanser
IAP	: Apoptoz Proteinlerinin İnhibitörü
ICAD	: CAD İnhibitörü
IDH	: İzositrat Dehidrogenaz
KRK	: Kolorektal Kanser
ME	: Malik Enzim
NADK	: NAD Kinaz
NNT	: Nikotinamid Nükleotit Transhidrojenaz
PARP	: Poli-ADP-Riboz Polimeraz
PI	: Propidyum İyodür
PPP	: Pentoz Fosfat Yolu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SRB	: Sülfrodamin B
TCA	: Trikarboksilik Asit Döngüsü
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör
TRADD	: TNFR1 ile ilişkili Ölüm Bölgesi
TS	: Timidilat Sentaz
UPP1	: Üridin Fosforilaz 1
xCT Taşıyıcısı	: Sistin/Glutamat Taşıyıcısı

ÖZET

Malcanlı, S. (2023). Glutatyona Bağlı Antioksidatif Kapasite İnhibisyonunun Kolorektal Kanser Metabolizması Üzerine Etkileri. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kolorektal kanser, dünya çapında insidans açısından üçüncü, mortalite açısından ise ikinci sırada yer alan önemli bir malignitedir. Potansiyel yan etkiler ve ilaç direnci nedeniyle geleneksel kemoterapi yaklaşımlarının etkisizliği, konvansiyonel kemoterapötik ilaçların antioksidan mekanizma inhibitörleri ile kombine uygulanması gibi yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açmaktadır. Çalışmamızda, antioksidatif mekanizmada önemli rol oynayan glutatyonun inhibisyonuna, glutaminaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin inhibe edilmesiyle NADPH seviyesinin düşürülmesi olarak iki temel mekanizmayla odaklandık. Glutatyon inhibisyonunun, kanser hücrelerinde geleneksel kemoterapötik ilaç olan 5-fluorourasil'in etkilerini artırıp artırmadığını araştırdık. HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde glutaminaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz inhibisyonuyla, glutatyon aktivitesini azaltmak için sırasıyla küçük molekül inhibitörler CB-839 ve Polidatin kullanıldı. HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde 5-fluorourasil'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi Sülforodamin-B testi ile araştırılmış ve kombinasyon için IC₅₀ dozu belirlenmiştir. CB-839 inhibitörünün hücre canlılığındaki etkisi araştırılmış ve HT-29 hücrelerinde 100 nM, 10 nM, 1 nM; HCT-116 hücrelerinde 10 nM, 1 nM, 0,1 nM dozları sırasıyla canlılığı düşüren ilk doz, canlılığı düşürmeyen en yüksek doz ve canlılığı düşürmeyen en yüksek dozdan bir önceki doz olarak seçilmiştir. HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde Polidatin inhibitörünün hücre canlılığındaki etkisi araştırılmış, hücre canlılığını etkilemediği belirlenmiş ve kombinasyon için denenen en yüksek doz olan 100 µM dozu seçilmiştir. GSH ve GSSG miktarı tespit edilerek CB-839'un glutaminaz inhibisyonunu; NADP⁺/NADPH oranı tespit edilerek de, Polidatin'in glukoz-6-fosfat dehidrogenaz inhibisyonunu gerçekleştirdiği gösterilmiştir. İnhibitörlerin ve inhibitör-5-FU kombinasyonunun ROS seviyesindeki etkileri akış sitometrisi; hücre ölümü üzerindeki etkileri Hoechst-33342&PI boyamasıyla belirlenmiş ve kolorektal kanser hücrelerinde ROS seviyesini artırmadığı ve hücre ölümünü tetiklemediği görülmüştür.

Sonuç olarak, antioksidan sistem inhibisyonu, 5-fluorourasil'in etkinliğine katkıda bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Kombine antikanser terapi, 5-fluorourasil, CB-839, Polidatin, Oksidatif stres

Bu çalışma, İstanbul İstinye Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2021/BAP13



ABSTRACT

Malcanlı, S. (2023). Effects of Glutathione-Induced Antioxidative Capacity Inhibition on Colorectal Cancer Metabolism. Istinye University, Institute of Health Science, Department of Cancer Biology and Pharmacology. Master Thesis. Istanbul.

Colorectal cancer is concerning malignancy death ranking third in incidence and second in mortality worldwide. Ineffectiveness of classical chemotherapeutical approaches due to potential side effects and drug resistance leads to development of novel treatment strategies such as combining oxidant chemotherapy with inhibitors of antioxidant mechanism. In our study, we focused on the inhibition of glutathione, which plays an important role in the antioxidant mechanism, by two main mechanisms as inhibition of glutaminase activity and inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and reduction of NADPH level. We investigated whether glutathione inhibition enhances effects of 5-fluorouracil, conventional chemotherapeutic, on cancer cells. Small molecule inhibitors CB-839 and polydatin were used to reduce glutathione activity respectively via glutaminase and glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition in HCT-116 and HT-29 colorectal cancer cell lines. The effect of 5-fluorouracil on cell viability in HT-29 and HCT-116 cells was investigated by Sulforodamine-B test and IC_{50} dose was determined for the combination. The effect of CB-839 inhibitor on cell viability was investigated and doses of 100 nM, 10 nM, 1 nM in HT-29 cells; 10 nM, 1 nM, 0.1 nM in HCT-116 cells were selected as the first dose that reduced viability, the highest dose that did not reduce viability, and the previous dose from the highest dose that did not reduce viability, respectively. The effect of polydatin inhibitor on cell viability was investigated in HT-29 and HCT-116 cells, it was determined that it did not affect cell viability, and the highest dose of 100 μ M was selected for the combination. By determining the amount of GSH and GSSG, it was shown that CB-839 inhibits glutaminase; and by determining the $NADP^+/NADPH$ ratio, it was shown that Polydatin inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase. The effects of inhibitors and inhibitor-5-FU combination on ROS level were determined by flow cytometry; the effects on cell death were determined by Hoechst-33342&PI staining and it was found that it did not increase ROS level in colorectal cancer cells and did not trigger cell

death. As a result, inhibition of the antioxidant system did not contribute to the effectiveness of 5-fluorouracil.

Key Words: Combined anticancer therapy, 5-fluorouracil, CB-839, Polydatin, Oxidative stress

The present work was supported by Istanbul Istinye University Scientific Research Projects Unit. Project No. 2021/BAP13



1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ile ortaya çıkan genetik bir hastalıktır (National Cancer Institute, 2021). Kanser dünya çapında ikinci sırada yer alan ve giderek artan ölüm nedenidir. Kolorektal kanser (KRK) küresel olarak insidans açısından üçüncü sırada ancak mortalite açısından ikinci sırada yer alan kanser türüdür (Sung vd., 2021). KRK, kolon veya rektum dokularında benign hücrelerin büyümelerinden invaziv hücrelere kadar değişen geniş bir neoplazma spektrumu ile kendini gösteren malign hücrelerin oluştuğu bir hastalıktır (PDQ Cancer Genetics Editorial Board, 2002). KRK etiyojisinde hem genetik hem de çevresel faktörler önemli rol oynamaktadır. Bu faktörler, kolon epitel hücrelerinde kansere özgü davranışların kazanılmasını teşvik etmektedir (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; Kuipers vd., 2015).

Hanahan ve Weinberg 2000 ve 2011 yıllarında, kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayıran 10 ayırt edici özellik ortaya koymuşlardır (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Kanserinin temel ve ayırt edici özelliklerinden biri olan enerji metabolizmasının yeniden programlanması, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayan bir araç kazandırmaktadır (Yao vd., 2020; Zou vd., 2020). Bu sebeple, tümör hücrelerinin metabolik düğümlerini saptamak ve hedeflemek, kanser hastalarında gelecek vaadedilen terapötik yaklaşımlar teşkil etmektedir (Tang vd., 2021). Bu çalışmamızda kanserinin ayırt edici özelliklerinden biri olan metabolik değişimlere odaklanılmıştır.

Yüksek morbidite ve mortalitenin önemli bir küresel kaynağı olan bu hastalık için çeşitli terapi yaklaşımları benimsenmiştir (Stefani vd., 2017). Kanser, uygulanan tedaviye çeşitli mekanizmalarla direnç göstererek klinik tedavilerin etkinliğini sınırlandırmakta ve bu nedenle antikanser ilaç direncini ortadan kaldıracak etkili hedef tedavi arayışları devam etmektedir (Palumbo vd., 2013). Bugüne kadar klinik çalışmaların çoğu, tek ajan kullanımına odaklanmıştır (Prete vd., 2018; Zhong vd., 2021). En yaygın kullanılan tedavi çeşidi olan kemoterapinin toksisite ve yan etkiler olarak dezavantajı bulunmaktadır. KRK tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapötik ilaç, fluor atomlu bir urasil analogu olan 5-fluorourasil'dir (5-FU) (Heidelberger vd., 1957; Longley vd., 2003; G. J. Peter & Van Groeningen, 1991). İleri seviye KRK için

birinci basamak tedavide 5-FU bazlı kemoterapiye yanıt oranları yalnızca %10-15 aralığındadır (Douillard vd., 2000). Bundan dolayı günümüzde, hedefe yönelik moleküller ile kemoterapötik ilaçların kombine uygulanması kanser tedavisinde umut vadetmektedir (Hingorani vd., 2016; Prete vd., 2018; Zhong vd., 2021).

KRK tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaç olan 5-FU, önemli hücresel mekanizmalara müdahale ederek, indüklediği hasara yanıt olarak hücre ölümlerinden biri olan apoptoza yol açmaktadır (H. Wang, 2020). Çeşitli dokularda kemoterapötik ilaca bağlı hasarın patofizyolojik mekanizmaların temelini oksidatif stres olduğu düşünülmektedir (Kannarkat vd., 2007; Martins vd., 2008; Pereira vd., 2012; Tafazoli vd., 2005). Kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerini seçici olarak öldürmede sitotoksik seviyede reaktif oksijen türlerin (ROS) artmasıyla oluşan oksidatif stresi indüklemek için kullanılmaktadır (Y. Wang vd., 2021). Kanser hücreleri, ROS birikimine yanıt olarak, oksidatif hasarı engellemek amacıyla antioksidan sistemleri (örn. NADPH, GSH) artırmaktadır (K. Wang vd., 2019).

Kanserde antioksidan savunma mekanizmalarının çoğu, glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan tripeptid molekül olan glutatyona (GSH) bağlıdır (Kennedy vd., 2020; Schumacker, 2015). Kanser hücrelerinde GSH seviyelerinin tümör gelişimi ve ilaç direnci ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Altman vd., 2016). Kanser hücrelerinde redoks dengesinin ve antioksidan sistemlerin hedeflenmesi, antikanser tedavi için gelecek vadetmektedir (De Berardinis & Chandel, 2016; Hay, 2016; Martinez-Outschoorn vd., 2017).

Antioksidan molekül olan GSH'nin rejenerasyonu, NADPH tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Gorrini vd., 2013). Hücrelerde NADPH'nin ana kaynağı olan pentoz fosfat yolunda (Pentose Phosphate Pathway; PPP) yer alan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) NADPH sentezinde önemli rol oynamaktadır (Compagno vd., 2009; Jiang vd., 2013; Quade vd., 2004; Rosenwald vd., 2002; Stearman vd., 2005). G6PDH'nin inhibisyonu kanser hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığını yeniden sağlayabildiğinden PPP inhibisyonu kansere karşı iyi bir terapötik strateji olarak görülmektedir (Catanzaro vd., 2015; Jones & Schulze, 2012). G6PDH'nin bir inhibitörü olan Polidatin'in (3,4',5-trihidroksistilben-3-β-d-glukozit; trans-resveratrol 3-β-mono-D-glukozit; piceid) kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonu dahil olmak üzere birçok

biyolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Dandawate vd., 2016; Kong vd., 2016; H. Liu vd., 2011).

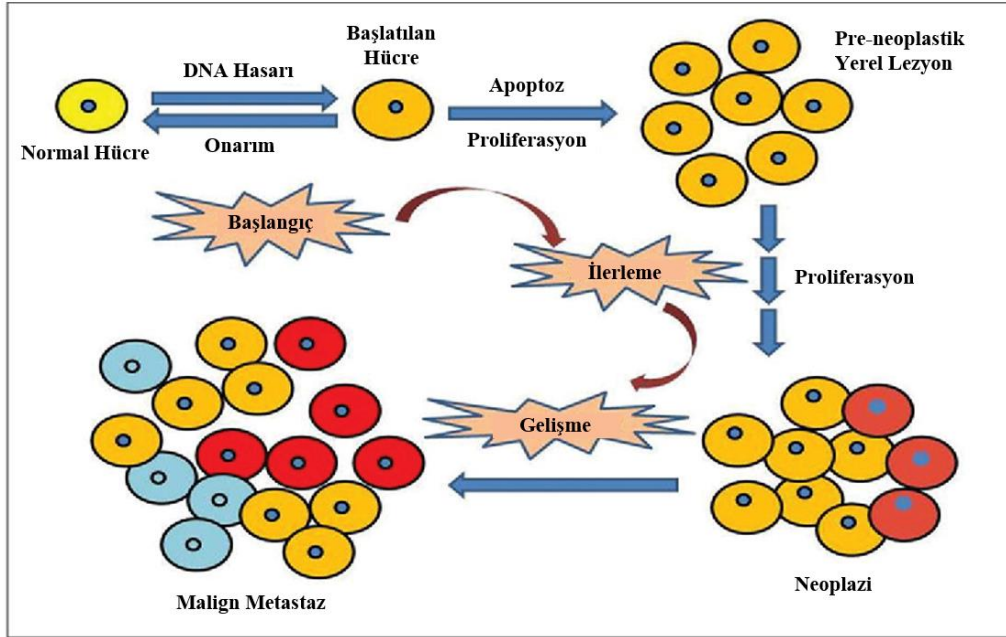
Glutasyon sentezinde rol oynayarak ROS nötralizasyonuna katkıda bulunan glutamin (Gln), GSH'nin tüm bileşenleri için ncldr (Welbourne, 1979). Kanser tedavilerinde glutamin'in (Gln) glutamat'a (Glu) dönüşümünü katalizleyen glutaminaz enzimi (GLS) potansiyel bir hedef olarak kabul edilmekte ve bu nedenle GLS'ye özgü inhibitörler geliştirilmiştir (K. Wang vd., 2019). CB-839 bileşiği (*N*- [5-[4-[6-[[2-[3-(triflorometoksi)fenil]-asetil]amino]-3-piridazinil]btil]-1,3,4-tiyadiazol-2-il]), en çok kullanılan GLS inhibitörüdür (Zimmermann vd., 2016). CB-839 bileşiği, bir GLS inhibitörü olarak GSH'nin hedeflenmesi üzerinden kanser tedavisi stratejilerinin planlanmasında umut vadetmektedir.

Günümüzde, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi yaklaşımlarında yan etkilerin azaltılması ve tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla, konvansiyonel kemoterapötik ilaçlar ile birlikte farklı moleküler yolların hedeflenmesiyle kombine uygulanmasına ağrılık verilerek antikanser tedavide yeni stratejilerin oluşturulmasına odaklanılmıştır (de la Cueva vd., 2013; Prete vd., 2018). Antioksidatif mekanizmada önemli rol oynayan glutasyon, tümör gelişimi ve tedavi etkinliğini olumsuz yönde etkileyen ilaç direnci ile doğrudan ilişki içindedir. Bu nedenle, glutasyon'u hedefleyerek ve kemoterapötik ilaçlarla kombine ederek yeni kanser tedavi stratejileri oluşturmak antikanser tedavilerde gelecek vadetmektedir (Altman vd., 2016; Godwin vd., 1992). Bu bağlamda çalışma kapsamındaki amacımız; glutasyon'a bağlı antioksidatif kapasiteyi küçük molekül inhibitörler ile baskılayarak kolorektal kanser hücrelerinde 5-fluorourasil etkinliğini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

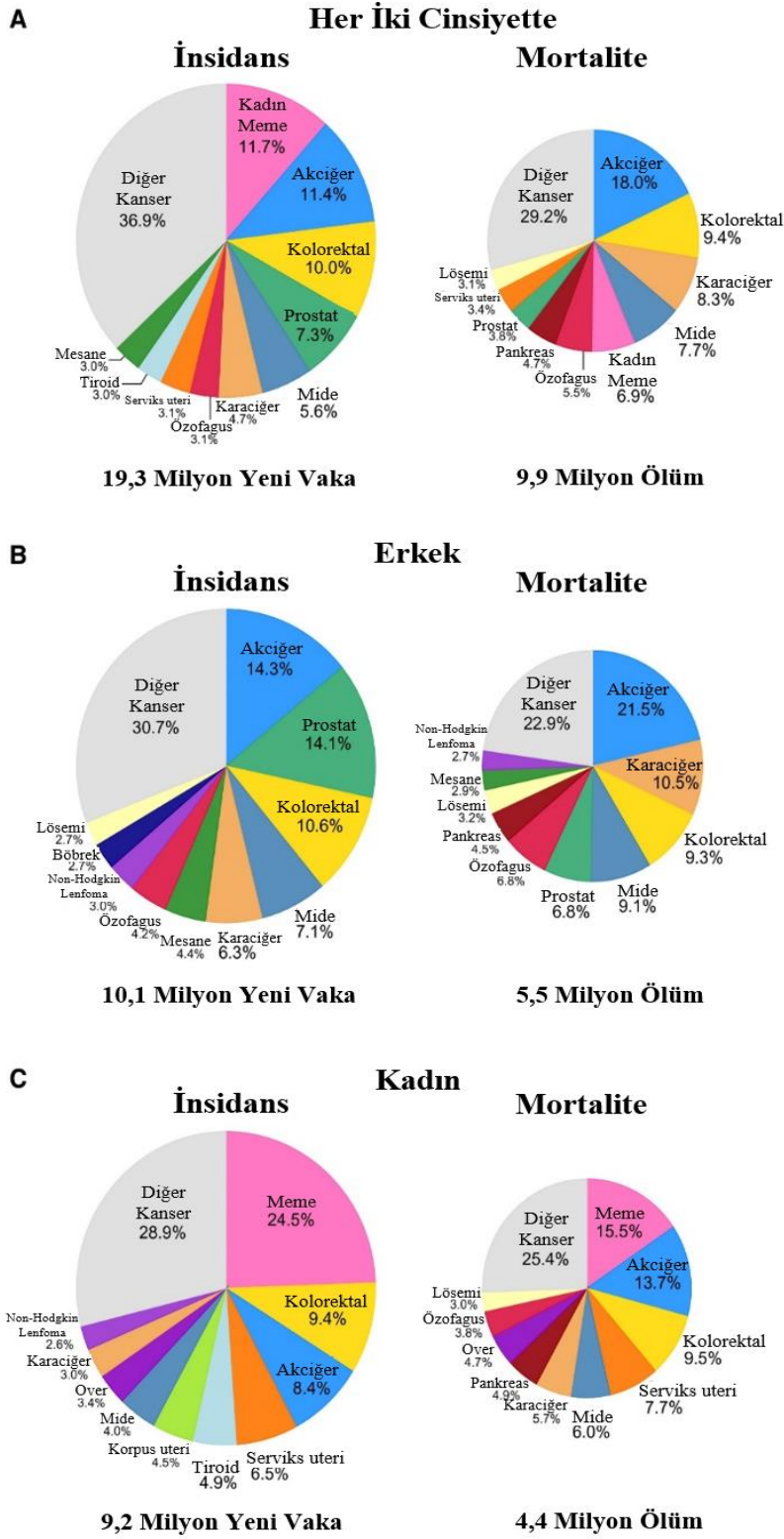
2.1. Kolorektal Kanser

Kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında gerçekleşen ve hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ile ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır (National Cancer Institute, 2021). Tümör oluşum süreci olarak bilinen karsinogenez, hem fenotipik hem de genetik düzeyde çok basamaklı bir olaydır. Onkogenlerin aktivasyonuna ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olan genetik hasar veya mutasyonlar karsinogenezin temelini oluşturmaktadır. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu kontrolsüz hücre döngüsü ilerlemesine ve apoptotik mekanizmaların inaktivasyonuna yol açmaktadır. Bu genetik değişimler sonucu neoplastik hücreler oluşmaktadır. Malign hücreler kontrolsüz hücre büyümesi, invazyon ve metastatik özelliklerin kazanılması ile karakterize edilmektedir (Şekil 2.1) (V. Mishra vd., 2018; Sarkar vd., 2013).



Şekil 2.1: Kanser Oluşum Mekanizması (V. Mishra vd., 2018).

Kanser, dünya çapında en önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Küresel olarak kanser, mortalite nedenleri arasında ikinci sırada yer almakta ve hızla artış göstermektedir (Gersten & Wilmoth, 2002; Omran, 1971; Russo & Sundaramurthi, 2019; Sung vd., 2021). Dünya çapında kanser oranının 2020 yılına kıyasla 2040 yılında 28,4 milyon vaka olmasıyla %47'lik bir artış göstermesi beklenmektedir (*Kanser İstatistikleri - Ulusal Kanser Enstitüsü*, 2020; Sung vd., 2021). Dünya kanser istatistikleri 2020 yılı verilerine göre insidans açısından en fazla %11,7 oranıyla meme, %11,4 oranıyla akciğer ve ardından %10 oranıyla kolorektal kanser; mortalite açısından en fazla %18 oranıyla akciğer, %9,4 oranıyla kolorektal ve %8,3 oranıyla karaciğer kanseri görülmektedir. Kanser insidans ve ölüm oranları cinsiyete göre değişiklik göstermektedir. Erkeklerde dünya kanser istatistikleri 2020 yılı verilerine göre insidans açısından ilk üç sırada sırasıyla akciğer, prostat ve kolorektal yer alırken kadınlarda meme, kolorektal ve akciğer kanseri; mortalite açısından ise erkeklerde akciğer, karaciğer ve kolorektal yer alırken kadınlarda meme, akciğer ve kolorektal kanseri yer almaktadır (Şekil 2.2) (Sung vd., 2021).



Şekil 2.2: Dünya Kanser İstatistikleri 2020 Yılı Kanser İnsidans ve Mortalite Oranları. (A) Toplam Kanser İnsidans ve Mortalite Oranları. (B) Erkeklerde Kanser İnsidans ve Mortalite Oranları. (C) Kadınlarda Kanser İnsidans ve Mortalite Oranları. (Sung vd., 2021).

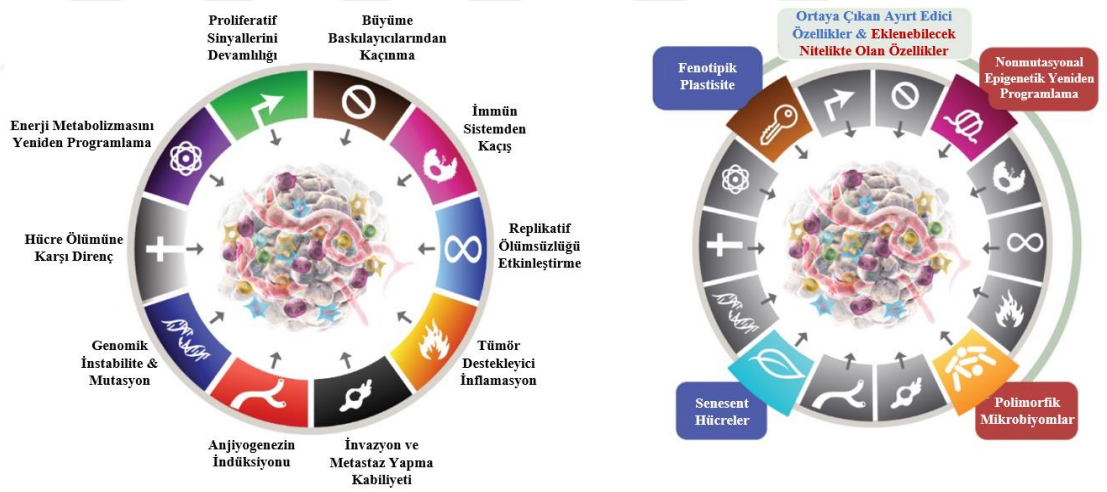
KRK dünya çapında insidans açısından üçüncü sırada ancak mortalite açısından ikinci sırada yer alan kanser türüdür. KRK, yaygınlık açısından kadınlarda ve erkeklerde sırasıyla ikinci ve üçüncü sırada yer almaktadır (Sung vd., 2021). KRK tipik olarak ileri yaşlarda daha sık görülüyor olsa da tüm yaş gruplarında görülebilmektedir. KRK genellikle kolonun lümeninde oluşan polip adı verilen küçük ve benign hücre kümelerinin zamanla malign transformasyon geçirmesiyle başlamaktadır (*Colon cancer - Symptoms and causes - Mayo Clinic, 2021*).

KRK etiyojisinde hem genetik hem de çevresel faktörler önemli rol oynamaktadır. KRK vakalarının yaklaşık %95'i sporadik iken yaklaşık %5'inin kalıtsal olduğu tespit edilmiştir (Testa vd., 2018). KRK riskini artıran en yaygın kalıtsal sendrom, kalıtsal polip dışı kolorektal kanser (HNPCC; Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer) olarak da bilinen Lynch sendromudur (*Colon cancer - Symptoms and causes - Mayo Clinic, 2021*). Bu sendroma *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* ve *EPCAM* DNA yanlış eşleşme (mismatch) onarım genlerinden birinde meydana gelen bir mutasyon neden olmaktadır (Kuipers vd., 2015). İkinci en yaygın kalıtsal sendrom ise ailesel adenomatöz polipozistir. Bu sendroma, WNT sinyal yolunun aktivitesini kontrol eden adenomatöz polipozis koli (APC) genindeki mutasyonlar neden olmaktadır. Ailesel adenomatöz polipozisli hastaların çoğunda genç yaşta çok sayıda kolorektal adenom ve ardından kolorektal kanser gelişmektedir (Vasen vd., 2015). Ayrıca kolonda oluşan kronik inflamatuvar hastalıklar KRK riski ile ilişkilendirilmiştir (Jess vd., 2012). Alkol ve/veya sigara kullanımı, obezite, şeker hastalığı, hareketsiz yaşam tarzı, düşük lifli/yüksek yağlı beslenme gibi çevresel faktörler de KRK riski faktörleri arasında yer almaktadır (Kuipers vd., 2015).

Kolorektal kansere neden olan çevresel ve genetik faktörler, kolon epitel hücrelerinde kansere özgü davranışların kazanılmasını teşvik etmektedir (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; Kuipers vd., 2015). Bu ayırt edici kanser özelliklerinin kazanılmasının bir yolu, onkogenleri aktive eden ve tümör baskılayıcı genleri etkisiz hale getiren genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimidir. Kolondaki neoplastik hücrelerin çoğunda genomik instabilite gözlemlenmiş ve KRK oluşumu için merkezi moleküler olay olduğu görülmüştür (Colussi vd., 2013; Grady & Carethers, 2008). Genomik ve epigenomik instabilite, tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki

mutasyonların ve epigenetik değişimlerin birikimini artırmakta, bu da kolon hücrelerinin malign dönüşümünü hızlandırmaktadır (Fearon & Vogelstein, 1990; Kinzler & Vogelstein, 1996; Lengauer vd., 1998).

Hanahan ve Weinberg'in 2000 ve 2011 yıllarında ortaya koydukları, kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayıran 10 temel ve ayırt edici özellik bulunmaktadır. Bu 10 ayırt edici özellik şunlardır: hücre ölümüne karşı direnç, proliferatif sinyallerini devamlılığı, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, invazyon ve metastaz yapma kabiliyeti, anjiyogenezin indüksiyonu, replikatif ölümsüzlüğü etkinleştirme, enerji metabolizmasını yeniden programlama, immün sistemden kaçış, tümör destekleyici inflamasyon ve genomik instabilite (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Hanahan 2022 yılında ileride mekanizmalarının araştırılıp tam anlaşılmasıyla birlikte bu 10 temel ve ayırt edici özelliklere eklenebilecek nitelikte olan özellikler ortaya koymuştur. Bu 4 özellik şunlardır: nonmutasyonel epigenetik yeniden programlama, polimorfik mikrobiyomlar, senesent hücreler ve fenotipik Plastisite (Şekil 2.3) (Hanahan, 2022).



Şekil 2.3: Kanserın Ayırt Edici Özellikleri (Hanahan, 2022).

Kanserın temel ve ayırt edici özelliklerinden biri olan enerji metabolizmasının yeniden programlanması, tümör hücrelerine hayatta kalma ve proliferasyon avantajı sağlayan bir araç kazandırmaktadır (Yao vd., 2020; Zou vd., 2020). Bu nedenle, tümör hücrelerinin metabolik düğümlerini belirlemek ve hedeflemek, kanser hastalarında ümit

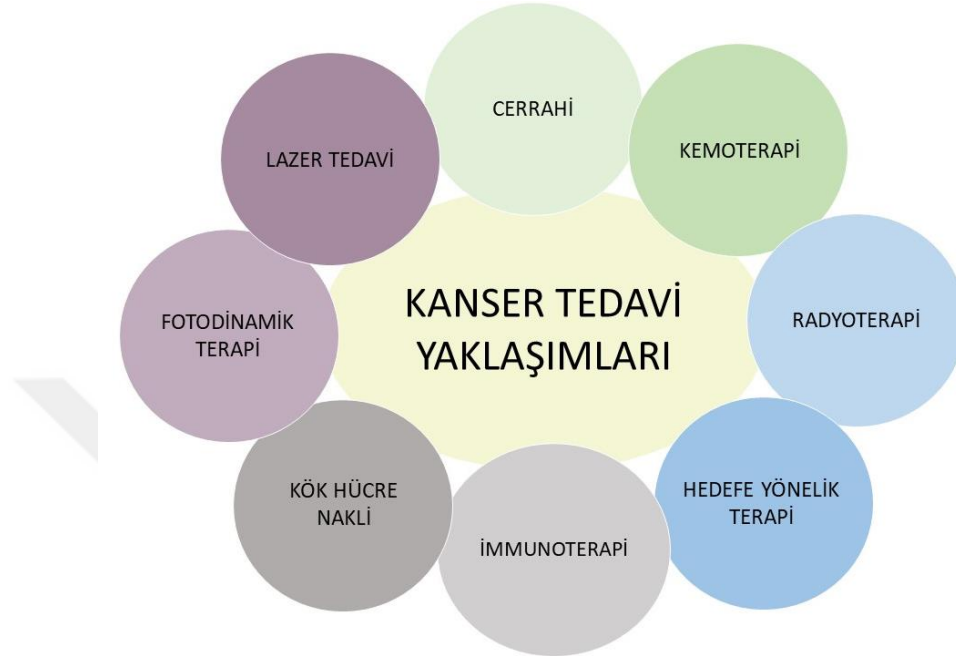
verici terapötik yaklaşımlar teşkil etmektedir (Tang vd., 2021). Bu çalışmamızda kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olan metabolik değişimlere odaklanılmıştır.

2.2. Kolorektal Kanser Tedavileri

Dünya çapında önem arz eden yüksek morbidite ve mortalite nedeni olan bu hastalığa yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi çok büyük öneme sahiptir (National Cancer Institute, 2021). Kanser tedavisi için çeşitli yaklaşımlar benimsenmiştir. Antikanser tedavilerde amaç, tümörü yok etmek ve aynı zamanda bu tedavilerin sağlıklı hücreler üzerindeki toksik yan etkilerini de en aza indirmektir (Stefani vd., 2017). Tedavide nihai hedef yerine getirilirken hastanın yaşam süresinin artırılması kadar yaşam kalitesinin korunmasına da dikkat edilmektedir (Tanaka & Gotay, 1998). Kanser için mevcut tedaviler arasında cerrahi rezeksiyon, radyoterapi, sitotoksik kemoterapi, hormonal terapi, immünoterapi, neoadjuvan kemoterapi ve hedefe yönelik terapileri içeren sistemik tedaviler bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Indra vd., 2021; Palumbo vd., 2013). Bu yöntemlerin avantajları kadar yan etkileri de bulunmaktadır. Bu tedavi yaklaşımları ile ilişkili anemi, kanama, morarma, iştah kaybı, ishal, kabızlık, ödem, yorgunluk, enfeksiyon, mide bulantısı, alopesi, kusma, hafıza kaybı, sinir sorunu ve mesane sorunu gibi çeşitli yan etkiler vardır (Fillion vd., 2003; V. Mishra vd., 2018; Stein vd., 2003; Usta Yeşilbalkan vd., 2005). Bu yan etkilerin kanser hastalarının yaşam kalitesi üzerinde olumsuz bir etki yarattığı ve tedavilere uyumu azaltabildiği saptanmıştır (Stein vd., 2003). Ancak kanser, uygulanan tedaviye çeşitli mekanizmalarla direnç göstererek klinik tedavilerin etkinliğini azaltabilmekte ve bu nedenle antikanser ilaç direncini ortadan kaldıracak etkili hedef tedavi arayışları devam etmektedir (Palumbo vd., 2013).

Bugüne kadar çoğu klinik çalışma, tek ajan kullanımına odaklanmıştır (Prete vd., 2018; Zhong vd., 2021). En yaygın olarak kullanılan tedavi çeşidi olan kemoterapinin en önemli dezavantajı olan toksisite ve yan etkilerden dolayı günümüzde, hedefe yönelik moleküller ile kemoterapötik ilaçların kombine uygulanması kanser tedavisinde umut vadetmektedir (Hingorani vd., 2016; Prete vd., 2018; Zhong vd., 2021). Hedefe yönelik küçük moleküller ile kanser hücreleri spesifik olarak hedeflenebilmekte ve toksisite düşürülebilmektedir. Hedefe yönelik moleküller ile kemoterapötik ilaçların

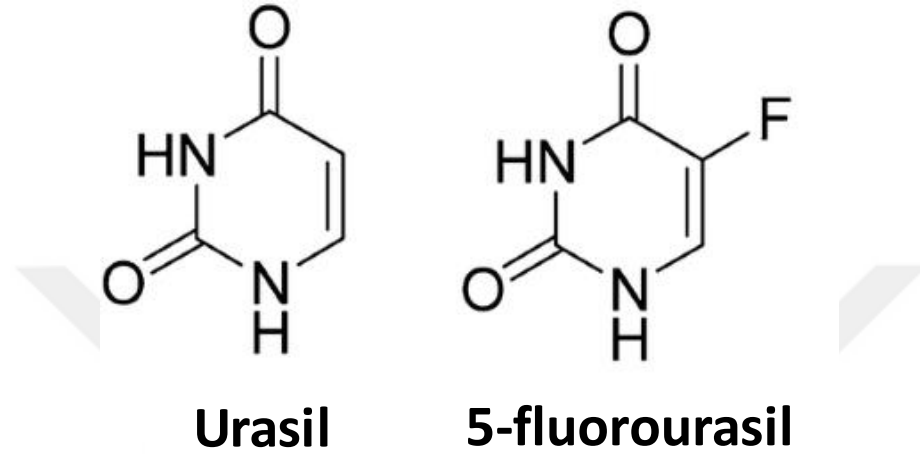
düşük dozlarının kombine uygulanması ile kemoterapinin sebep olduğu yan etkiler azaltılabilmekte ve tedavinin etkinliği artırılabilir (Zhong vd., 2021).



Şekil 2.4: Kanser Tedavi Yaklaşımları (V. Mishra vd., 2018) (Mishra ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadan değiştirilerek alınmıştır).

KRK tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapötik ilaç, yaklaşık 60 yıl önce geliştirilen antimetabolit karaktere sahip olan 5-fluorourasil'dir (Heidelberg vd., 1957). 5-FU, fluor atomlu bir urasil analogudur (Şekil 2.5). Sitotoksikite mekanizması, fluoronükleotidlerin RNA ve DNA'ya yanlış yerleştirilmesinden kaynaklanmakta, ancak ana toksik etkilere timidilat sentaz (TS) enziminin inhibisyonu aracılık etmektedir (Longley vd., 2003; G. J. Peter & Van Groeningen, 1991). TS enziminin inhibisyonu ile timidin tükenmesine neden olmakta, böylece metabolitlerinin RNA ve DNA'ya eklenmesini engellemektedir (Longley vd., 2003). Bu şekilde tümör hücrelerini, büyümesini inhibe ederek ve S fazında durdurarak apoptoza sürükleyebilmektedir (Noordhuis vd., 2004). 5-FU'nun yüksek dozlarına maruz kalındığında lökoensefalopati, inme, diyare ve gastrointestinal mukozit gibi ciddi yan etkilere neden olabilmektedir (Di Donato vd., 2016; Kinno vd., 2014; Van Kuilenburg, 2004). İlerlemiş KRK için birinci basamak tedavide 5-FU bazlı kemoterapiye yanıt

oranları yalnızca %10-15 aralığındadır (Douillard vd., 2000). Bundan dolayı, günümüzde kullanımı artan hedefe yönelik moleküller ile kemoterapötik ilaçların kombine uygulanmasına dayalı yeni terapötik stratejiler yaygınlaşmaktadır (de la Cueva vd., 2013).



Şekil 2.5: 5-fluorourasil ve Urasil'in Kimyasal Yapısı (Długosz-Pokorska vd., 2019; Šuleková vd., 2019)

Reaktif oksijen türleri üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlikten kaynaklanan oksidatif stresin, çeşitli organ ve dokularda kemoterapötik ilaca bağlı hasarın patofizyolojik mekanizmalarının temel taşı olduğu düşünülmektedir (Kannarkat vd., 2007; Martins vd., 2008; Pereira vd., 2012; Tafazoli vd., 2005). Günümüzde kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere geleneksel antineoplastik tedaviler, kanser hücrelerini seçici olarak öldürmede oksidatif stresin sitotoksik seviyelerini indüklemek için kullanılmaktadır. Bu tedavileri alan hastalar, ROS kaynaklı hücre ölümü, DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu belirtileri göstermektedir (Y. Wang vd., 2021). Kemoterapötik ilaçlar, önemli hücresel mekanizmalara müdahale ederek sıklıkla hücre döngüsü tutuklanmasına ve programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoza yol açmaktadır (Rang H., 2016). Kemoterapötik ilaçların doğrudan veya dolaylı olarak indüklediği DNA hasarına yanıt, ya onarım ya da hücre ölümüdür. DNA hasarı onarımı yapılamadığında, hücreler apoptoza uğrayacaktır (Hassan vd., 2014). KRK tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötik ilaç olan 5-FU, hücrelerin ilaca bağlı

apoptoza karşı duyarlılığını artırmaktadır. Buna verilebilecek örneklerden biri; 5-FU'nun apoptozu tetiklemek için kaspaz-6'yı aktive edebildiğini gösteren çalışmadır (H. Wang, 2020).

Apoptoz, normal dokularda gelişim ve homeostazda kritik bir rol oynayan farklı biyokimyasal ve genetik yollara sahip programlanmış bir hücre ölümüdür (Lockshin & Williams, 1965). Normal dokularda yeni hücre oluşumu ile hücre kaybı arasında bir denge vardır. Bu süreçte apoptoz önemli bir rol oynamaktadır (H. Wang, 2020). Apoptozun, kaspaz-3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazların enzimatik aktivitesi yoluyla birçok proteinin proteolitik bölünmesiyle katalize edilen hücresel bir ölüm yolu olduğu da bilinmektedir (McIlwain vd., 2013). Apoptoz için kaspazların aktivasyonu, Poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) proteininin bölünmesi, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarındaki değişim birer hücresel protein belirteçidir ve western blot yöntemiyle tayin edilebilmektedir (Carneiro & El-Deiry, 2020; Lazebnik vd., 1994; M. Mishra vd., 2017). Aktifleşen kaspaz-3'ün böldüğü sitokeratin-18 diğer bir adıyla M30 antijenin seviyesine bakılmasıyla da apoptoz tespit edilebilmektedir (Olofsson vd., 2007; Ulukaya vd., 2011). TUNEL yöntemi, ELİSA, fluoresan boyama (Örneğin Hoechst 33342 ve Propidyum İyodür) ve agaroz jel elektroforezinde DNA fragmentasyonu incelenerek, akış sitometrisi ile çeşitli apoptoz belirteçleri ölçülerek ve anneksin V yöntemi ile de apoptotik hücreler belirlenebilmektedir (Elmore, 2007; Güleş & Eren, 2008; Newbold vd., 2014; Saraste & Pulkki, 2000).

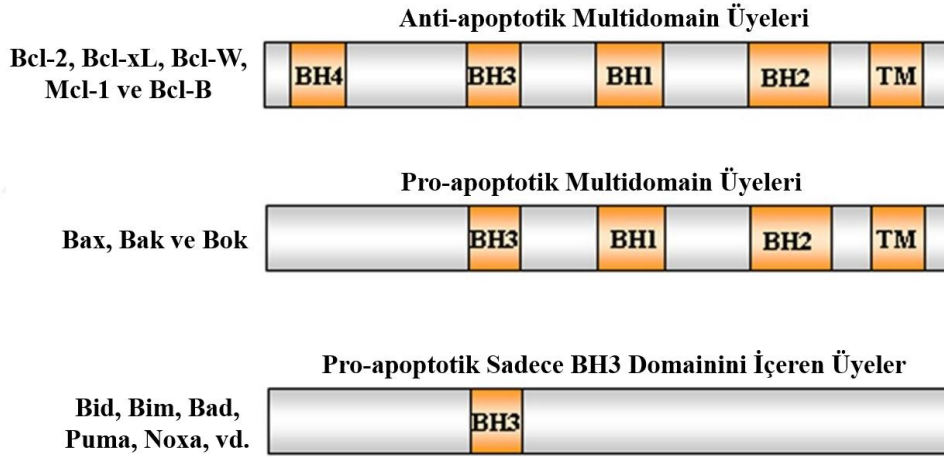
Apoptotik süreç sırasında birtakım biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Apoptoz uyarısı alan hücre, bulunduğu ortamdan uzaklaşmakta ve hücre iskeletindeki lamin'lerin ve aktin filamentlerinin bölünmesini takiben küçülmeye başlamaktadır. Kromatin yoğunlaşarak piknotik bir görünüm almakta ve DNA nükleozomlardan kesilmektedir. Bu aşamada jel elektroforezindeki gibi tipik merdiven bant görüntüsü görülmektedir. Hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfotidilserin hücre membranının dış yüzeyine transloke olmaktadır. Nükleus küçülmekte ve parçalara ayrılmaktadır. Parçalanmış nükleus ile hücre sitoplazması birleşip tomurcuklanarak apoptotik cisimcikler oluşmaktadır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınmakta ve fagosite edilmektedir (Canpolat, 2016; Celepli vd., 2020; Coşkun & Özgür, 2011; Hassan vd., 2014; Öni vd., 2004). Ancak apoptozda

membran intakt olduğu için enflamasyon görülmemektedir (Bellamy vd., 1995; Ellis vd., 2003).

Apoptoz intrinsik (İçsel; Mitokondriyal) ve ekstrinsik (Dışsal; Ölüm Reseptörü İlişkili) yol olmak üzere başlıca iki yolla gerçekleşmektedir (Hassan vd., 2014). Apoptozun intrinsik yolunda mitokondrinin temel bir rolü bulunmaktadır (Green & Kroemer, 2004). Kemoterapötik ilaçlar gibi ajanların neden olduğu onarılamayan genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar, intrinsik yolun başlatılmasının bazı tetikleyicileridir (Kroemer vd., 2007). Ekstrinsik yolda ise hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri aracılık etmektedir (Khan vd., 2014). Her iki yoldaki merkezi düzenleyici, proteinler kaspazlardır (Cryns & Yuan, 1998). Kaspazlar, proteinlerde aspartik asitten sonraki peptit bağı kırma sisteminin aspartil proteazlarıdır. Zimojen olarak sentezlenmekte ve proteolitik parçalanma ile aktifleştirilmektedir (Wong, 2011). Aktive edilmiş kaspazlar, DNA hasar onarımı ve replikasyonunda rol alan enzimleri inaktive etmektedir. Hücre iskeleti proteinlerini parçalayarak hücre membranının tomurcuklanmasına neden olmaktadır (Adams & Cory, 2001; Adrain & Martin, 2001; Spierings vd., 2004; Wong, 2011). Başlatıcı (kaspaz-2, 8, 9, 10), efektör (kaspaz-3, 6, 7) ve inflamatuvar (kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) kaspazlar olarak üç tip şeklinde sınıflandırılmıştır (Boice & Bouchier-Hayes, 2020). Apoptozun iki ana yolu da kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Castillo Ferrer vd., 2021).

İntrinsik yolun merkezi düzenleyicilerinden birisi de Bcl-2 (B-cell lymphoma-2; B-hücre lenfoma 2) ailesidir. Bu aile, mitokondriyal membranın permeabilizasyonuna aracılık ederek, pro-apoptotik ve anti-apoptotik etkiler gösterip intrinsik yolu düzenlemektedir (Adams & Cory, 2007; Giam vd., 2008). Bcl-2 proteinleri, içerdikleri homolog domain'lere (bölgelere) göre, ikisi pro-apoptotik biri anti-apoptotik işlevli olmak üzere üç alt grupta sınıflandırılmaktadır. Anti-apoptotik işlevli Bcl-2, Bcl-xL ve Bcl-W gibi proteinler BH1-4 domain'lerini içermektedir. Pro-apoptotik işlevli Bax ve Bak gibi proteinler BH1-3 domain'lerini içerirken Bid ve Bim gibi proteinler sadece BH3 domain'ini içermektedir (Şekil 2.6) (Danial, 2007; L.Omonosova & C.Hinnadurai, 2008). BH domain'leri pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim için çok önemlidir. Pro-apoptotik ile anti-apoptotik proteinlerin dimerizasyonu

apoptozun başlatılması için gereklidir (Pistritto vd., 2016). Sadece BH3 domainini içeren proteinler ile anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşimler, apoptozun kontrolünde önemli olayları başlatabilmektedir (Brunelle & Letai, 2009; Gavathiotis vd., 2008). Ayrıca anti-apoptotik proteinler, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun artmasını, sitokrom-c, SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding Protein With Low pI; İkinci Mitokondriden Türetilmiş Kaspaz Aktivatörü/Düşük pI ile Apoptoz Bağlayıcı Proteinin Doğrudan İnhibitörü), endonükleaz-G, AIF (Apoptosis Inducing Factor; Apoptoz İndükleyici Faktör) ve HtrA2/Omi (High Temperature Requirement protein A2; Yüksek Sıcaklık Gereksinimi protein A2) gibi pro-apoptotik proteinlerin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını engellemektedir (Distelhorst & Bootman, 2011; Hegde vd., 2002; Oakes vd., 2005).



Şekil 2.6: Bcl-2 Ailesi Üyeleri (Pistritto vd., 2016)

İntrinsik yol, DNA hasarı, metabolik stres ve endoplazmik retikulum stresi dahil olmak üzere hücrel stresler tarafından aktive edilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan birçok kemoterapötik ilaç bu yolu tetiklemektedir. Bu uyarılar mitokondriyal dış membran geçirgenleşmesine ve sitokrom-c'nin mitokondriyal membranlar arası boşluktan sitozole salınmasına yol açmaktadır (Boice & Bouchier-Hayes, 2020). Pro-apoptotik protein olan Bid, anti-apoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive etmekte, pro-apoptotik olan Bax ve Bak'ı aktive etmektedir (G. Liu vd., 2017).

Aktive olan Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu indükleyerek membran potansiyelini değiştirmektedir. Böylelikle mitokondri membranındaki porlardan sitozole sitokrom-c, SMAC, endonükleaz-G, Ca^{+2} ve AIF salınımı tetiklenmektedir (Wong, 2011). SMAC, pro-kaspazlar üzerine olan apoptoz proteinlerinin inhibitörünü (IAP; Inhibitor of Apoptosis Proteins; Apoptoz Proteinlerinin İnhibitörü) inhibe ederek apoptozu hızlandırmaktadır (Yuan & Akey, 2013). AIF, nükleusa transloke olmakta ve onu parçalara ayırmaktadır. Endonükleaz-G de DNA'yı parçalamaktadır. Sitokrom-c'nin APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1; Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1) monomerlerinden oluşan sitoplazmik protein yapısıyla birleşmesinden başlayarak apoptozom denilen bir kompleks oluşmaktadır. Bir ATP molekülünün salınması ile heptamerik apoptozomun oluşumu gerçekleşmektedir. Pro-kaspaz-9'un bağlanması ve aktivasyonundan sonra tam apoptozom oluşmaktadır (Gortat vd., 2015). Kaspaz-9, pro-kaspaz-3'ü aktif hale getirmektedir. Kaspaz-3 ICAD'ı (inhibitor of CAD; CAD İnhibitörü) inaktive edip CAD'ı (Caspase-Activated DNase; Kaspazla Aktive Olan DNaz) serbestleştirmektedir. CAD ise DNA'nın fragmente olmasına neden olmaktadır (Şekil 2.2.7) (Larsen & Sørensen, 2017).

Ekstrinsik yol, hücrenin dışından gelen uyarılarla veya spesifik faktörlerin hücre dışı konsantrasyonları belirli bir eşiğe ulaştığında tetiklenmektedir (Galluzzi vd., 2012). Bu yol, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) süper ailesine ait hücre yüzey ölüm reseptörlerinin (DR; Death Receptors; Ölüm Reseptörleri) tümör nekroz faktör (TNF) ailesine ait olan ligandlarıyla etkileşimi ile başlatılmaktadır (Guicciardi & Gores, 2009). DR'de, hücre içi protein-protein bağlantıları oluşturarak apoptozu indükleyen sinyalleşmede kritik bir rol oynayan sisteinden zengin ölüm domaini (DD; Death Domain; Ölüm Bölgesi) olarak adlandırılan sitoplazmik bir alan bulunmaktadır (Fulda & Debatin, 2003). Bu alan, hücre dışından gelen apoptotik sinyalin hücre içine iletilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (M. E. Peter & Krammer, 2003). Ölüm reseptörleri ve ligandlarından bazıları Tablo-1'de listelenmiştir.

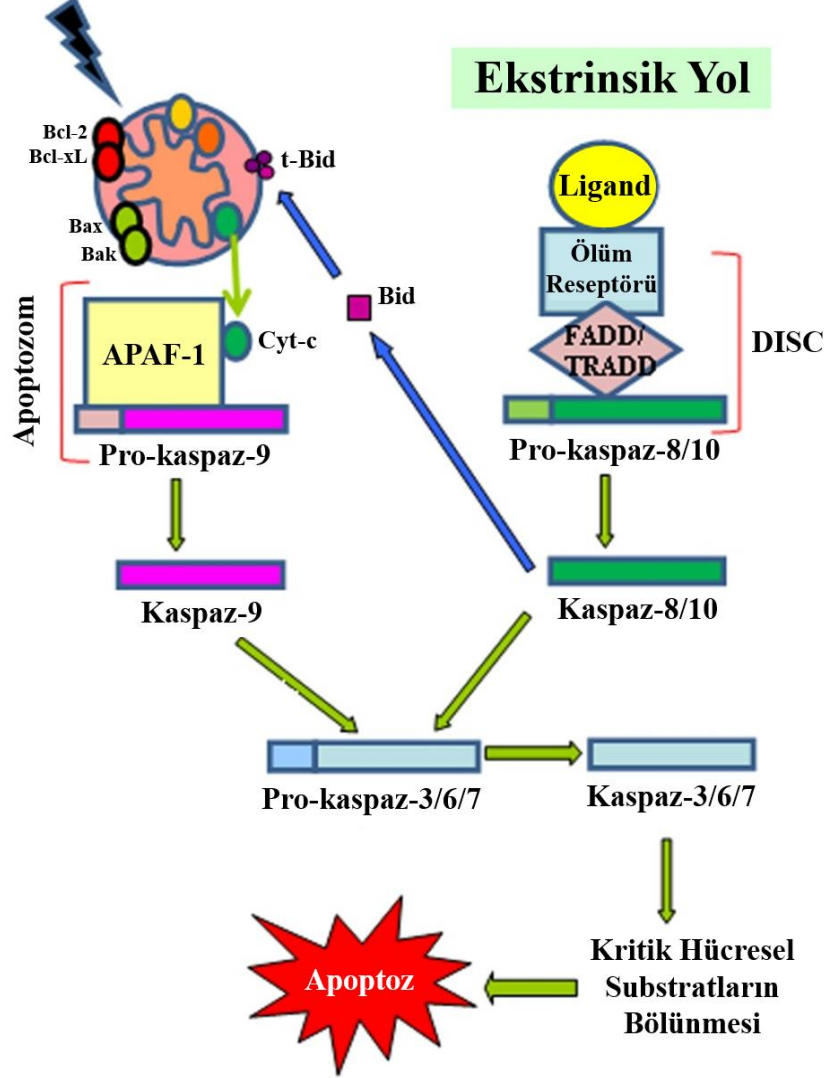
Tablo 1: Ölüm Reseptörleri ve Ligandları (Gökhan vd., 2022)

Ölüm Reseptörü	Ligand
TNFR1 (DR1/p55/p60/CD120a)	FADD
FAS (CD95/DR2/APO-1)	TRADD
TRAILR1 (DR4)	RIP
TRAILR2 (DR5/KILLER/TRICK2/APO-2)	TRAF

Ölüm sinyalleri DR'lere bağlandığında, DR'lerin sitoplazmik alanları, pro-kaspaz-8 ile etkileşime giren FADD (FAS-Associated Protein With Death Domain; Ölüm Bölgesi ile FAS ile İlişkili Protein) ve TRADD (TNFR1-Associated Death Domain; TNFR1 ile ilişkili Ölüm Bölgesi) gibi DD içeren adaptör proteinleri ile etkileşmekte ve apoptotik sinyalin ilerlemesini sağlamak için DISC (Death Inducing Signaling Complex; Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi) oluşturmak üzere DED (Death Effector Domain; Ölüm Efektör Bölgesi) aracılığıyla pro-kaspaz-8 ile etkileşime girmektedir. DISC oluştuktan sonra pro-kaspaz-8 kesilerek aktifleştirilmektedir. Aktifleşen kaspaz-8 iki yolla kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlamaktadır. Kaspaz-8, kaspaz-3'ü direkt aktive edebilmekte veya Bid proteinini keserek intrinsik yolda kaspaz-9'u aktifleştirdikten sonra kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Kaspaz-3 CAD aktivasyonu ile DNA fragmantasyonuna sebep olmaktadır (Şekil 2.7) (Li vd., 1998; G. Liu vd., 2017).

İntrinsik Yol

Stres Sinyali



Şekil 2.7: Apoptozun İntrinsik ve Ekstrinsik Yolları (Pistritto vd., 2016)

KRK tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötik ilaç olan 5-FU, önemli hücresel mekanizmalara müdahale ederek, neden olduğu hasara yanıt olarak hücre ölümlerinden biri olan apoptoza yol açmaktadır (H. Wang, 2020). Birçok doku türlerinde kemoterapötik ilaca bağlı hasarın patofizyolojik mekanizmalarının temel taşının oksidatif stres olduğu düşünülmektedir (Kannarkat vd., 2007; Martins vd., 2008; Pereira vd., 2012; Tafazoli vd., 2005). Kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerini seçici

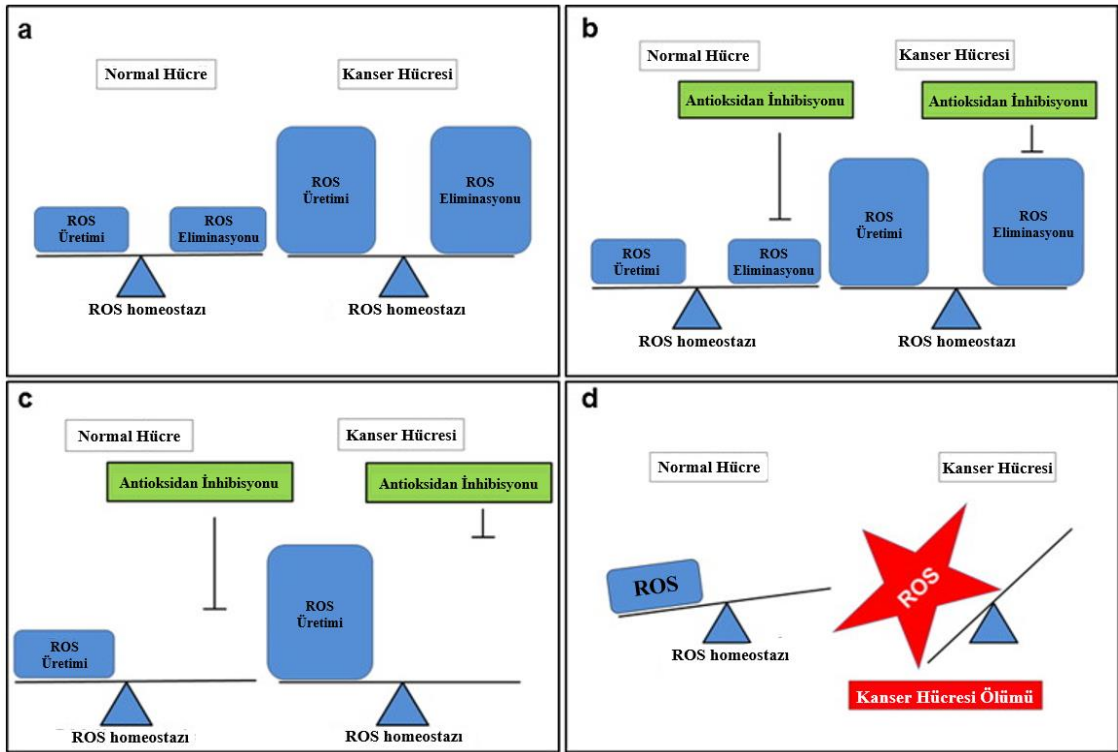
olarak öldürmede sitotoksik seviyede oksidatif stresi indüklemek için kullanılmaktadır (Y. Wang vd., 2021). Oksidatif stres, ROS üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır (Kannarkat vd., 2007; Martins vd., 2008; Pereira vd., 2012; Tafazoli vd., 2005). Aşırı ROS birikiminin artması, yüksek seviyede biyomoleküler hasara ve hücre ölümüne yol açmaktadır (Bhardwaj & He, 2020; Gorrini vd., 2013; Trachootham vd., 2009). Kanseri hücreleri, ROS birikimine yanıt olarak, oksidatif hasarı engellemek amacıyla antioksidan sistemleri (örn. NADPH, GSH) artırmaktadır (K. Wang vd., 2019). Kanseri hücrelerinde redoks dengesinin ve antioksidan sistemlerin hedeflenmesi, kanseri tedavisi için büyük umut vadetmektedir (De Berardinis & Chandel, 2016; Hay, 2016; Martinez-Outschoorn vd., 2017).

2.3. Antioksidan Savunma Sistemi

Kanseri hücreleri, artan büyüme ve çoğalma hızı nedeniyle daha çok enerjiye ihtiyaç duydukları için değiştirilmiş bir metabolizma sergilemektedir (Sosa vd., 2013). Hücresel metabolizma, hücre dışı ortam ve hücre içi süreçler arasındaki önemli bir bağlantıdır (Tang vd., 2021). Kanseri hücreleri değişen tümör mikroçevre koşullarına metabolik değişimler yaparak uyum sağlamak, hayatta kalmakta ve proliferasyon olmaktadır (Anastasiou, 2017). Otto Warburg, kanseri hücrelerinin oksijen varlığında bile laktat fermentasyonu yaptığını öne sürmüştü ve buna “Warburg Etkisi” adını vermiştir (Warburg, 1956). Metabolik fenotip, besin mevcudiyetine bağlı olarak tümör içinde heterojenlik göstermektedir (Hay, 2016; Martinez-Outschoorn vd., 2017). Kanseri hücrelerindeki metabolik anormallikler, büyük ölçüde hücresel biyoenerjetiklerin değişmesi nedeniyle yüksek seviyelerde biyomoleküler hasara ve hücre ölümüne yol açan ROS birikimi artışına neden olmaktadır (Bhardwaj & He, 2020; Gorrini vd., 2013; Trachootham vd., 2009).

ROS; süperoksit anyon, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, lipid peroksitler, protein peroksitler ve nükleik asitlerde oluşan peroksitler dahil olmak üzere oksijenin iki elektron indirgeme ürünüdür (Lushchak, 2014). ROS, hücrelerde aerobik metabolizma yoluyla doğal olarak üretilmektedir. Mitokondri solunum zinciri, NADPH oksidaz ve peroksizomlar, ROS’un başlıca endojen kaynaklarıdır. Fizyolojik koşullar altında, normal hücreler, ROS üretimi (pro-oksidanlar) ve eliminasyon (antioksidan kapasite)

arasındaki dengeyi kontrol ederek düşük seviyede bazal ROS ile redoks homeostazını korumaktadır. ROS seviyesinde ılımlı bir artış, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını desteklemektedir. Artan kanıtlar, kanser hücrelerinin, sinyal iletimi ve gen ekspresyonu gibi hücre içi aktiviteleri sürdürmek için normal sağlıklı hücrelerden daha fazla ROS ürettiğini göstermektedir (Sosa vd., 2013). Ancak ROS miktarı belirli bir düzeye ulaştığında hücrenin antioksidan kapasitesini aşabilmekte ve proteinler, nükleik asitler ve lipidler gibi hücresel makromolekülleri oksitleyerek hücre ölümünü tetikleyebilmektedir (Bhardwaj & He, 2020). Aynı zamanda oksidatif stresi indüklemek için olası iki ana strateji vardır: biri doğrudan ROS seviyesini artırmak, diğeri ise antioksidan savunma sistemini bozmak. Bu şekilde kanser hücrelerinde ROS miktarı toksik seviyeye getirilip hücre ölümü indüklenebilmektedir (Şekil 2.8) (Lv vd., 2019).



Şekil 2.8: Kanser Hücrelerinin Zayıf Noktası (Glasauer & Chandel, 2014)

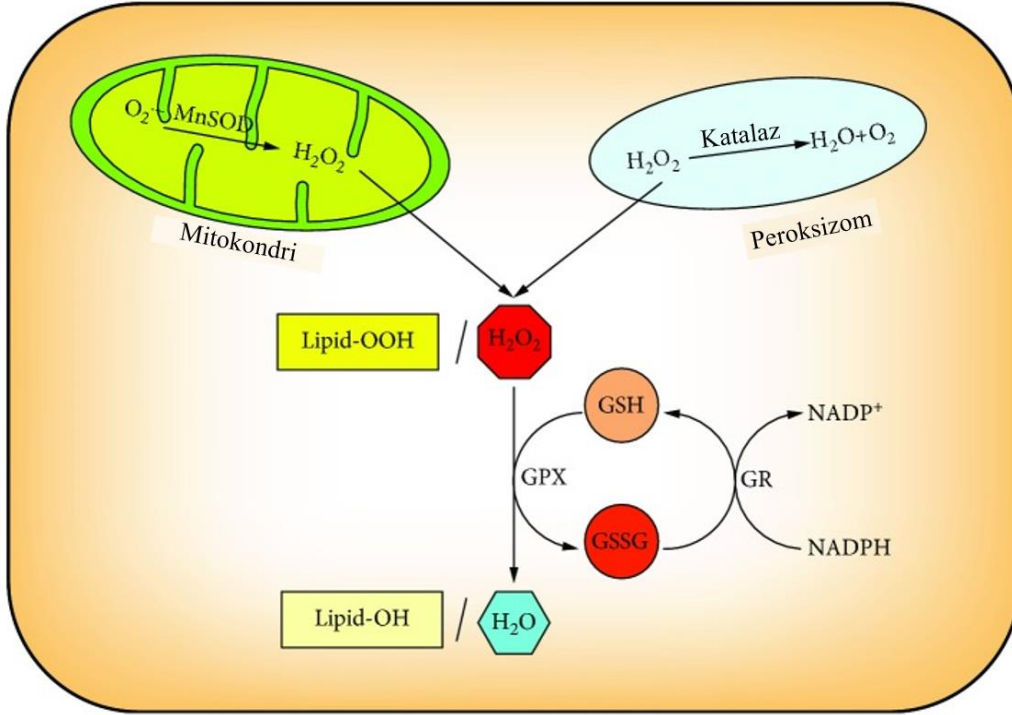
Genel olarak, hücrel metabolizma ve redoks sinyali arasındaki ara bağlantılar, kanser hücresinin hayatta kalmasına ve terapötik direnç kazanmasına olanak sağlayan dinamik metabolik-redoks devrelerini oluşturmaktadır (K. Wang vd., 2019). Kanser hücreleri, ROS birikimine yanıt olarak, oksidatif hasarı önlemek amacıyla içsel antioksidan sistemleri (örn. NADPH, GSH) artırmak ve aktive etmek için metabolik yolları yeniden düzenlemektedir (K. Wang vd., 2019). Kanser hücrelerinde metabolik açıklıklarının ve redoks dengesinin hedeflenmesi, kanser tedavisi için büyük umut vadetmektedir. Preklinik ve klinik çalışmalarda önemli çabalar sarf edilmiş ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (De Berardinis & Chandel, 2016; Hay, 2016; Martinez-Outschoorn vd., 2017).

Kanser hücreleri, kemoterapinin neden olduğu artan oksidatif stresle oluşan oksidatif hasarı önlemek ve ROS seviyesini toksik eşğin altında tutmak için metabolizmanın da aracılık ettiği indirgeyici moleküllerin üretilmesi ile güçlü ROS süpürücü, süperoksit dismutazlar (SOD'ler), katalaz (CAT), glutatyon peroksidazlar (GPX'ler) olmak üzere enzimatik olan; glutatyon (GSH), bilirubin, koenzim Q 10 (CoQ 10), melatonin olmak üzere enzimatik olmayan; ve selenyum gibi eksojen antioksidanlar olarak antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir (Trachootham vd., 2009; Zahra vd., 2021). Antioksidan savunma sistemleri, redoks dengesini sürdürmek ve makromolekülleri oksidatif stresin neden olduğu hasarlardan korumak için ROS üretimi ve nötralizasyonu arasındaki dengeyi sürdürmektedir (Y. Wang vd., 2021).

Antioksidan savunma mekanizmalarının çoğu, tripeptid molekül olan GSH'ye bağlıdır (Kennedy vd., 2020). GSH; glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşmaktadır (Schumacker, 2015). Glutamat sistein ligaz (GCL) glutamat ve sistein'i birleştirerek gama-glutamilsistein'i oluşturmaktadır. Daha sonra glutatyon sentetaz (GS) gama-glutamilsistein'e glisin ekleyerek glutatyon'u sentezlemektedir (Y. Liu vd., 2014).

Hücrelerde en çok bulunan antioksidan glutatyon, ROS moleküllerinden biri olan hidrojen peroksit (H_2O_2) serbest radikallerini nötralize eden bir tripeptittir. GSH, ROS detoksifikasyonuna katkıda bulunurken GPX tarafından GSSG'ye oksitlenmektedir (Schumacker, 2015). GSSG, NADPH molekülünün $NADP^+$ molekülüne dönüşümü ile birlikte glutatyon redüktaz (GR) tarafından tekrar GSH'ye indirgenmekte ve böylece

oksidatif hasarı önlemek için bir redoks döngüsü oluşmaktadır (Lv vd., 2019). Aynı zamanda GPX, substrat olarak GSH ile lipid peroksitleri (Lipid-OOH) toksik olmayan lipid alkollere (Lipid-OH) indirgemektedir. Bu karşılıklı dönüşüm döngüsü, hücrelerdeki serbest radikallerin sürekli olarak ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır (Şekil 2.9) (Traverso vd., 2013).



Şekil 2.9: Hücresel GSH'nin Antioksidan Rolü (Lv vd., 2019)

Glutasyon redüktaz tarafından katalize edilen glutasyon rejenerasyonu, NADPH tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Gorrini vd., 2013). Hücrelerde NADPH'ın ana kaynağı pentoz fosfat yoludur (Pentose Phosphate Pathway; PPP). PPP kanser hücrelerinin çoğalması, büyümesi, hayatta kalması ve metastazını teşvik etmektedir. PPP, oksidatif ve non-oksidatif kısımlardan oluşmaktadır. Oksidatif kısım NADPH üretimi ile lipit ve glutasyon sentezinde, non-oksidatif kısım ise nükleotit sentezinde önemlidir (Patra & Hay, 2014).

2.4. Glutatyona Bağlı Antioksidatif Kapasite İnhibisyonu

GSH, ROS nötralizasyonu, hücre proliferasyonu, enflamasyon, apoptoz gibi çeşitli süreçlerin düzenlenmesinde ve ayrıca ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda gereklidir (Bansal & Celeste Simon, 2018). Buna göre, kanserde hem biyobelirteç hem de terapötik hedef olarak GSH'nin rolü derinlemesine araştırılmıştır. Tümör hücrelerinde yüksek GSH seviyeleri, aşırı ROS birikimini azaltarak kanser hücresi proliferasyonunu, tümör progresyonunu ve metastazı teşvik edebilmektedir. Kanser hücrelerinde GSH metabolizmasını seçici olarak hedefleyen antineoplastik terapötik stratejiler, ROS modülasyonunun gücünü artırmak için etkili önlemlerdir (Y. Wang vd., 2021). Çeşitli çalışmalar, ROS üreticileri veya antioksidan inhibitörler yoluyla daha fazla ROS yükselmesinin kanser hücrelerini seçici olarak öldürebileceğini ve çeşitli kanser hücrelerinde tümör büyümesini ve ilerlemesini baskılayabildiğini göstermiştir (Adhikary vd., 2010; Glasauer vd., 2014; Ren vd., 2011; Shaw vd., 2011; Trachootham vd., 2006; Wu vd., 2010). GSH inhibitörlerinin antikanser tedavileri ile kombinasyonlarının kanser hücrelerini öldürmek için faydalı olduğu kanıtlanabilmektedir (Gorrini vd., 2013). Hücre metabolizmasının ROS üretimi ve antioksidan yanıtı üzerindeki etkisine paralel olarak, GSH üretimi için gerekli olan PPP ve glutamin metabolizmasında yer alan enzimler de düzenlenmektedir (Avolio vd., 2020).

PPP'nin oksidatif kısmının ikinci adımını katalizleyen enzim olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz GSH'nin rejenerasyonu için gerekli olan NADPH sentezinde önemli rol oynamaktadır. G6PDH'nin aşırı ekspresyonu çeşitli kanser türlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Compagno vd., 2009; Jiang vd., 2013; Quade vd., 2004; Rosenwald vd., 2002; Stearman vd., 2005). G6PDH, hücre içi redoks homeostazını koruyarak tümör büyümesini artırmaktadır (Cai vd., 2015). Bu nedenle G6PDH, kansere karşı potansiyel bir ilaç hedefi olarak görülmektedir (H. C. Yang vd., 2019). G6PDH'nin inhibisyonu kanser hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığını yeniden sağlayabildiğinden PPP inhibisyonu kansere karşı iyi bir terapötik strateji olarak görülmektedir (Catanzaro vd., 2015; Jones & Schulze, 2012). Bu amaçla PPP enzimi olan G6PDH inhibisyonu için inhibitörler geliştirilmiştir (H. C. Yang vd., 2019). Polidatin (3,4',5-trihidroksistilben-3-β-d-glukozit; trans-resveratrol 3-β-mono-D-glukozit; piceid), PPP'nin hız sınırlayıcı enzimi olan G6PDH'nin bir inhibitörüdür.

Polidatin'in kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonu dahil olmak üzere birçok biyolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Dandawate vd., 2016; Kong vd., 2016; H. Liu vd., 2011). Polidatin ile G6PDH inhibisyonu, kanser hücrelerinde NADPH üretiminin bozulmasına, dolayısıyla redoks dengesizliğine, ER stres oluşumuna, hücre döngüsünün tutuklanmasına ve apoptoz indüksiyonuna neden olmaktadır (Mele vd., 2018). Daha önce gerçekleştirilmiş olan bir çalışmada, Polidatin oksaliplatin ile kombine uygulanarak HT-29 KKK hücrelerinin G₀/G₁ fazında birikimine neden olarak hücre proliferasyonunu inhibe etmiş ve apoptozu indüklemiştir (Zhang Dongmei; Zhang Yaming, 2016). Bu etkilerden dolayı G6PDH'nin hedeflenmesi ile kanser tedavilerinde yeni stratejiler geliştirilebilmekte ve umut vadeditmektedir.

Kanserde antioksidan yanıtla ilgili olan diğer bir sıklıkla gerçekleşen metabolik değişiklik, plazmada en bol bulunan esansiyel olmayan amino asit olan glutamin'in yüksek talebidir. Protein sentezindeki rolünün yanı sıra, Gln, trikarboksilik asit döngüsü (TCA) için bir anaplerotik substrat olarak kullanılabilirdiğinden alternatif bir enerji kaynağını temsil etmektedir (Avolio vd., 2020). Anabolik süreçlerinde ilerlemesi için kanser hücreleri Gln alımını artırmaktadır (Eagle, 1955; Mohamed, Deng, Khuri, & Owonikoko, 2014). Kanser hücreleri aktive olan onkogenler ve inaktive olan tümör süpresörlerden dolayı glutamine bağımlı hale gelmektedir (Choi & Park, 2018). Bu değişiklikler kanser hücresinde Gln taşıyıcılarının ve Gln metabolizmasında yer alan enzimlerin ekspresyonlarının artırılmasını sağlamaktadır (Nagarajan vd., 2016). Gln hücreye alındıktan sonra glutaminoliz (glutamin katabolizması) gerçekleşmektedir. Glutaminaz enzimi, glutamin'in glutamat'a dönüşmesini sağlamaktadır. Daha sonra glutamat dehidrogenaz (GLUD) enzimi glutamat'ı α -ketoglutarat'a dönüştürmektedir. Glutamin ve metabolik dönüşüm ürünleri olan glutamat ve α -ketoglutarat, amino asitler, yağ asitleri, GSH, pürinler, pirimidinler, heksoaminler gibi önemli hücre bileşenlerinin biosentezine azot veya karbon kaynağı olarak katkıda bulunmaktadır (Altman vd., 2016; Deberardinis & Cheng, 2010; L. Yang vd., 2017). Glutamin, glutatyon sentezinde rol oynayarak ROS nötralizasyonuna katkıda bulunmaktadır. Glutamin, glutatyon'un tüm bileşenleri için öncüdür. Glutamin'in hücreye girişi, glutatyon sentezi için hız sınırlayıcı adımdır (Welbourne, 1979). Glutatyon seviyelerinin kanser hücrelerinde tümör gelişimi ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerinde glutamin metabolizmasının hedeflenmesi kemoterapötik ilaçlara gösterilen direncin

tersine çevrilmesinde rol oynamaktadır (Altman vd., 2016). Bu sebeple antikanser tedavi stratejilerinde glutamin metabolizması üzerinden glutatyon'u hedeflemek umut vadetmektedir (Godwin vd., 1992).

Kanser tedavilerinde glutaminaz potansiyel bir hedef olarak kabul edilmektedir ve bu nedenle GLS'ye özgü birkaç inhibitör geliştirilmiştir. Bu inhibitörler bis-2-(5-fenilasetamido-1,3,4-tiya-diazol-2-il) etil sülfür (BPTES), 968 ve CB-839'dur (K. Wang vd., 2019). Bir 2-piridinasetamid olan CB-839 bileşiği (*N*-[5-[4-[6-[[2-[3-(triflorometoksi)fenil]-asetil]amino]-3-piridazinil]bütil]-1,3,4-tiyadiazol-2-il]), en çok kullanılan glutaminaz inhibitörü olan BPTES analogudur. CB-839, diğer GLS inhibitörlerinden farklı olarak yapılarında yüksek oranda reaktif fonksiyonel gruplar içermeyen yeni nesil bir inhibitördür (Zimmermann vd., 2016). CB-839, iyi bir oral biyoyararlanıma ve BPTES'e kıyasla 13 kat daha yüksek bir enzim inhibisyon etkinliğine sahiptir (Gross vd., 2014). Bununla birlikte daha çok akciğer kanserinde olmak üzere, farklı kanser tiplerinde de gerçekleştirilmiş klinik araştırmalar bulunmaktadır (Riess vd., 2021; *Study of CB-839 in Combination w/ Paclitaxel in Patients of African Ancestry and Non-African Ancestry With Advanced TNBC - Full Text View - ClinicalTrials.gov*, 2017). PIK3CA-mutant KRK hücre hattında ve KRK fare modellerinde 5-FU'nun glutaminaz inhibitörü CB-839'un antitümör etkisini artırdığı gösterilmiştir. 5-FU ile CB-839 kombine uygulanması, PIK3CA-mutant KRK hücrelerinin transfekte edilmiş farelerde büyüme inhibisyonunu sağlamıştır (Y. Zhao vd., 2020). Aynı zamanda glutaminoliz'in deaktivasyonunun PIK3CA-mutant KRK hücrelerini aspirin'e bağlı büyüme inhibisyonuna duyarlılaştırdığı gösterilmiştir (Boku vd., 2020). KRK hücrelerinde glukoz taşıyıcı inhibitörü glutor ile glutaminaz inhibitörü CB-839 sinerjik etki göstererek hücre büyümesini inhibe etmiştir (Reckzeh vd., 2019). Birçok çalışma, GLS işlevinin inhibe edilmesi yoluyla kanser hücrelerinin hücre canlılığının ve proliferasyonunun azaltılabildiğini göstermektedir (Katt vd., 2019). CB-839 bileşiği, bir glutaminaz inhibitörü olarak glutatyonun hedeflenmesi üzerinden antikanser tedavi stratejilerinin planlanmasında büyük umut vadetmektedir.

Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi yaklaşımlarında, hastanın yaşam kalitesini ve tedavi etkinliğini olumsuz yönde etkileyen birçok yan etki bulunmaktadır (Stein vd., 2003; Zhong vd., 2021). Günümüzde, kemoterapide yan

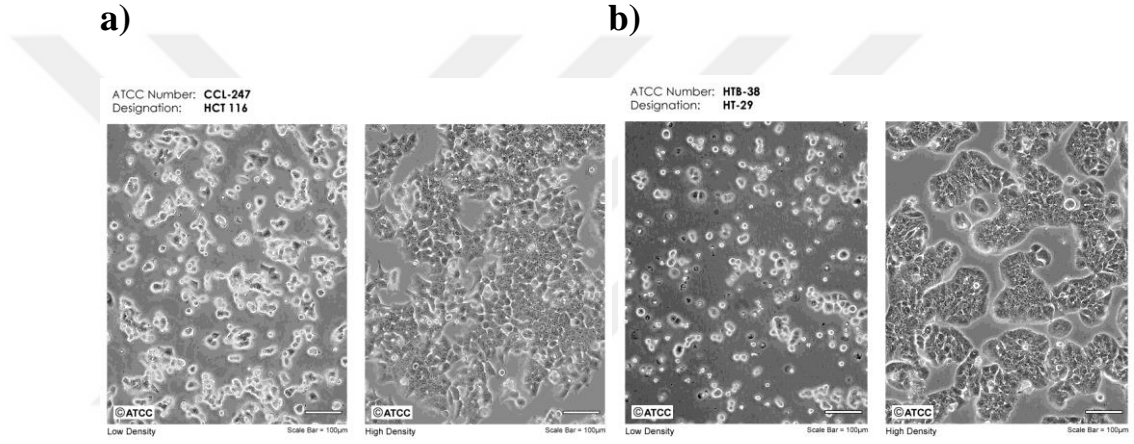
etkilerin azaltılması ve tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla, konvansiyonel kemoterapötik ilaçlar ile birlikte farklı moleküler yolların hedeflenmesiyle kombine uygulanmasına ağırlık verilerek kanser tedavisinde yeni stratejilerin üretilmesine odaklanılmıştır (de la Cueva vd., 2013; Prete vd., 2018).

Antioksidatif mekanizmada önemli rol oynayan glutatyon, tümör gelişimi ve tedavi etkinliğini olumsuz yönde etkileyen ilaç direnci ile doğrudan ilişki içindedir. Birçok çalışma, glutatyonun radyasyona ve DNA-reaktif ilaçlara (platin analogları ve klasik alkilleyici ajanlar) karşı dirençte yer aldığını göstermektedir. Bu nedenle, glutatyon'u hedefleyerek ve kemoterapötik ilaçlarla kombine ederek yeni kanser tedavi stratejileri oluşturmak antikanser tedavilerde gelecek vadetmektedir (Altman vd., 2016; Godwin vd., 1992). Bu bağlamda çalışma kapsamındaki amacımız; glutatyon'a bağlı antioksidatif kapasiteyi küçük molekül inhibitörler ile baskılayarak kolorektal kanser hücrelerinde 5-fluorourasil etkinliğini araştırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Araştırmada HCT-116 (CCL-247, ATCC) ve HT-29 (HTB-38, ATCC) KRK hücre hatları kullanılmıştır (Şekil 3.10). HCT-116 ve HT-29 KRK hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) (Cytiva CAT NO: SV30160.03), %1 (2 mM) L-Gln (Capricorn CAT NO: GLN-B) ve %1 (100 U/mL) Penisilin/streptomisin (PAN BIOTECH CAT NO: P06-07100) içeren RPMI-1640 (Biowest CAT NO: MS015H) besiyeri (tam ortam) içerisinde 37°C %5 CO₂ basıncına sahip nemli inkübatörde idame edilmiştir.



Şekil 3.10: HCT-116 (a) ve HT-29 (b) Hücrelerinin Işık Mikroskobu Görüntüsü

3.2. Hücre Pasajlanması

Hücreler buldukları flask içinde %60-70 konfluent olduklarında hücre pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak, flask içerisinde besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin serumdan arındırılması için 75 cm² flask içerisine 4 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisi (1X PBS) (Capricorn CAT NO: PBS-1A) eklenmiş (25 cm² flask için 2 mL), yıkama yapıp uzaklaştırılmıştır. Flask içerisine 1 mL %0,05 tripsin-etilen diamin tetra asetik asit (tripsin-EDTA) (WISSENT CAT NO: 325-043-EL) eklenmiş ve 75 cm² flask içerisindeki hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda 5 dk (25 cm² flask için 2-3 dk) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tripsin'in hücre membranlarına zarar vermeye başlamasını engellemek için, mikroskopla bakıldığında

flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için 5 mL tam ortam eklenmiştir. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu 15 mL santrifüj tüp içerisine alındıktan sonra 21 °C’de, 300 g’de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış ve elde edilen hücre pelleti tam ortamla süspansiyon edilmiştir. Hücre süspansiyonu flask içerisine eklenmiş ve 37 °C’de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir.

3.3. Hücrelerin Stoklanması

‘‘Hücre Pasajlanması’’ metotundaki gibi hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmıştır. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu 15 mL santrifüj tüp içerisine alındıktan sonra 21 °C’de, 300 g’de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmıştır. Elde edilen hücre pelleti üzerine her bir kriyovial tüp için 1 mL dondurucu medya (%10 DMSO + %90 FBS) eklenerek süspansiyon edilmiş ve kriyovial tüplerin içerisine dağıtılmıştır. Hızlı bir şekilde -80 °C’de bulunan, hücrelerin kademeli ve kontrollü bir şekilde donmasını sağlayan Mr. Frosty içerisine kaldırılmıştır.

3.4. Hücrelerin Stoktan Çıkarılması

Önceden 37 °C’ye ısıtılmış tam ortamdan 5 mL 15 mL santrifüj tüp içerisine eklenmiştir. Kriyovial tüp -80 °C’den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözülmüştür. Hücre süspansiyonu, içinde 5 mL tam ortam bulunan 15 mL santrifüj tüp içerisine ilave edilmiş ve 21 °C’de, 300 g’de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış ve elde edilen hücre pelleti tam ortamla süspansiyon edilmiştir. Hücre süspansiyonu flask içerisine eklenmiş ve 37 °C’de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir.

3.5. Sülförodamin B Testi ile Canlılık Tayini

HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde glutasyon inhibisyonunu hedefleyen 0,1-10000 nM doz aralığında CB-839 (Cayman CAT NO: 22038), glutasyonun antioksidatif mekanizmadaki aktivitesini hedefleyen 1-100 µM doz aralığında Polidatin (Sigma-

Aldrich CAT NO: 15721-25G), 0,5-200 μ M doz aralığında 5-FU (Koçak Farma 1000 mg/20 mL steril), CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla Sülförodamin B (SRB) testi yapılmıştır. Sülförodamin B hücre canlılığı testi, SRB boyasının hücrelerdeki proteinlere bağlanma kabiliyetine dayanmaktadır. SRB, hafif asidik koşullar altında bazik amino asit kalıntılara bağlanan ve bazik koşullar altında ayrılan iki sülfonik gruba sahip parlak pembe bir aminoksanten boyadır. SRB'nin bağlanması stokiyometrik olduğundan, boyalı hücrelerden ekstrakte edilen boya miktarı, hücre kütlesi ile doğru orantılı olmaktadır. SRB boyaması, hücre metabolik aktiviteden bağımsızdır (Vichai ve Kirtikara, 2006). Bu nedenle sonucu negatif yönde etkilemesini elimine etmek için canlılık tayininde SRB testinin kullanımı tercih edilmiştir.

HCT-116 ve HT-29 KRK hücreleri 96 kuyucuklu plakalara (Gibco Cell Star CAT NO: 655180) 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 100'er μ L ortam içinde ekilmiştir. Gece boyu inkübasyonun ardından, test kuyucuklarındaki hücrelere ilaç uygulaması yapılmıştır. Negatif kontrol kuyucuklarındaki hücrelere ise ilaç çözeltisi ile aynı hacimde tam ortam eklenmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklara distile su hazırlanan %50 (w/v) trikoloroasetik asit (TCA) (Biobasic CAT NO: TB0968) çözeltisinden 50 μ L/kuyucuk eklenmiş ve 4 °C'de 60-90 dk fikse edilmiştir. Ardından TCA distile su ile 5 kere ardışık yıkamalarla uzaklaştırılmış ve %1 asetik asit içinde hazırlanan %0,4 (w/v) SRB solüsyonundan (ChemCruz CAT NO: sc-253615A) her kuyucuğa kuyucuk başına 50 μ L eklenerek 30 dk oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilmiştir. Bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için kuyucuklar %1 asetik asit (TEKKİM CAT NO: TK.010030.02501) çözeltisi ile 5 kere ardışık yıkanmış ve kapağı açık bırakılarak kurutulmuştur. Proteinlere bağlanan boya, 150 μ L/kuyu 10 mM tris bazı (pH: 10,0) (Biotech CAT NO: TB0196) ile çözdürülmüş ve plaka yaklaşık 150 rpm'de en az 10 dk çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Ardından 564 nm'de spektrofotometrik okuma (BMG Labtech, LUMIStar Omega) gerçekleştirilmiştir. Arkaplandan gelen sinyalleri elemek için 690 nm'de de okuma gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sinyaller, hücre canlılığına eşdeğer şekilde kuyucuklar arasında karşılaştırılmıştır.

Kontrol grubu hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilmiş ve ilaç uygulanan gruplardaki hücrelerin canlılığı aşağıda yer alan formül ile hesaplanmıştır. İlk olarak

564 nm’de ölçülen absorbans değerleri 690 nm’de ölçülen absorbans değerlerinden çıkartılmıştır. Her kuyucuğun absorbans değerinden kör kuyucukların absorbans değerlerinin ortalaması çıkartılmıştır. Her bir grubun ortalaması alınmış ve aşağıda yer alan formül uygulanmıştır. Her bir grup 6 teknik ve 3 biyolojik tekrar yapılmıştır.

% Canlılık = [(100*İlaç uygulanan grubun absorbans ortalaması)/Kontrol grubunun absorbans ortalaması]

3.6. GSH/GSSG Miktarı Tayini

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde glutatyon inhibisyonunu hedefleyen CB-839 inhibitörünün redükte glutatyon ve okside glutatyon seviyelerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla GSH/GSSG miktarı tayini yapılmıştır. KRK hücrelerinde GSH/GSSG düzeylerini belirlemek amacıyla “GSH/GSSG Glo Assay (Promega CAT NO: V6611)” üretici talimatlarına uygun şekilde kullanılmıştır. Bu GSH/GSSG tayin kitinin prensibi, GSH ile reaksiyona girdiğinde güçlü fluoresan hale gelen non-fluoresan ve suda çözünür bir boyanın kullanımına dayanmaktadır.

HCT-116 ve HT-29 KRK hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Gece boyu inkübasyonun ardından, HCT-116 KRK hücreleri 0,1, 1, 10, 100 nM CB-839, HT-29 KRK hücreleri ise 1, 10, 100 nM CB-839 ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Kontrol kuyucuklarındaki hücrelere ise ilaç çözeltisi ile aynı hacimde tam ortam eklenmiştir. Sinyaller, lüminesans mikropilaka okuyucusu (BMG Labtech, LUMIStar Omega) ile tespit edilmiştir.

3.7. NADP⁺/NADPH Oranı Tayini

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde glutatyon’un antioksidatif mekanizmadaki aktivitesini hedefleyen Polidatin inhibitörünün NADPH ve NADP⁺ seviyelerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla NADP⁺/NADPH oranı tayini yapılmıştır. KRK hücrelerinde NADP⁺/NADPH düzeylerini belirlemek amacıyla “NADP⁺/NADPH GloTM Assay Kit (Promega CAT NO: G9081)” üretici talimatlarına uygun şekilde kullanılmıştır. Bu testte yer alan reaktifler NADP⁺ ve NADPH için spesifiktir ve NAD⁺ veya NADH’yi tespit etmez. Oksitlenmiş (NADP⁺) ve indirgenmiş

(NADPH) formların miktarını ayrı ayrı tayin etme protokolü, asidik ve bazik pH'daki formların diferansiyel stabilitelelerinden yararlanılarak tespit edilmektedir.

HCT-116 ve HT-29 KRK hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Gece boyu inkübasyonun ardından, hücelere 100 μM Polidatin 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Kontrol kuyucuklarındaki hücelere ise ilaç çözeltisi ile aynı hacimde tam ortam eklenmiştir. Standart olarak 0-400 nM arasında değişen NADP^+ (Santa Cruz CAT NO: sc-202724) konsantrasyonları kullanılmıştır. NADP^+ ve NADPH düzeyleri, lüminometrik olarak bir mikropilaka okuyucusu (BMG Labtech, LUMISar Omega) ile ölçülmüştür.

3.8. DCFHDA Boyası ve Akış Sitometrisi İle ROS Düzey Analizi

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde glutasyon inhibisyonunu hedefleyen CB-839, glutasyonun antioksidatif mekanizmadaki aktivitesini hedefleyen Polidatin, CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının ROS seviyesindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla DCFHDA boyası (Sigma CAT NO: D6883) ve akış sitometrisi ile ROS düzey analizi yapılmıştır. Hücre membranından geçebilen fluoresan olmayan DCFHDA, hücrel esteraz'ın asetil gruplarını ayırmasıyla DCFH oluşmaktadır. ROS varlığında DCFH'nin yeşil renkli fluoresan özelliğe sahip 2',7'-diklorofloresin'e (DCF) oksidasyonu gerçekleşmektedir (Kim & Xue, 2020).

HCT-116 ve HT-29 KRK hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 15×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. HCT-116 KRK hücrelerine 100 nM CB-839, HT-29 KRK hücrelerine 100 nM CB-839 ve iki KRK hücre hattına da 100 μM Polidatin küçük molekülleri uygulandıktan 2 saat sonra 50 μM 5-FU ilacı 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Kontrol kuyucuklarındaki hücelere ise ilaç çözeltisi ile aynı hacimde tam ortam eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak 12,5 mM H_2O_2 (Sigma CAT NO: 18304-1L) kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardan ortam uzaklaştırılmıştır. Kuyucuk başına 700 μL 10 μM DCFHDA boyası eklenmiş ve 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda DCFHDA boyası kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. "Hücre Pasajlanması" metotundaki gibi hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmıştır. Kuyucuklardaki hücre süspansiyonu 1,5 mL santrifüj tüp

içerisine alındıktan sonra 21 °C'de, 300 g'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış ve elde edilen hücre pelleti PBS ile süspansiyon edilmiştir. Akış sitometrisi cihazında (BD Biosciences AC6531180147) okuma gerçekleştirilmiştir.

3.9. Akış Sitometrisi İle Süperoksit Anyonu Düzey Analizi

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde glutatyon inhibisyonunu hedefleyen CB-839, glutatyonun antioksidatif mekanizmadaki aktivitesini hedefleyen Polidatin, CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının süperoksit anyonu seviyesindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla akış sitometrisi ile ROS düzey analizi yapılmıştır. KRK hücrelerinde ROS düzeyinin belirlenmesi amacıyla “Muse Oksidatif Stres Kiti (Luminex CAT NO: MCH100111)” kullanılmıştır. Muse Oksidatif Stres Kiti, süperoksit radikallerinin hücre içi tespitine dayanarak oksidatif strese maruz kalan hücrelerin sayısını ve yüzdesini aynı anda belirlemektedir. Muse Oksidatif Stres solüsyonu hücre membranından geçebilmekte ve dihidroetidyum (DHE) içermektedir. DHE süperoksit anyonları ile reaksiyona girdiğinde oksidasyona uğrayarak kırmızı floresan ışımaya vermektedir.

Bu testi gerçekleştirmek amacıyla HCT-116 ve HT-29 KRK hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 1,5'er mL ortam içinde ekilmiştir. Gece boyu inkübasyonun ardından, test kuyucuklarındaki hücrelere 100 nM CB-839, 100 µM Polidatin, 50 µM 5-FU, CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonları 48 saat boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyon sonunda “Muse Oksidatif Stres Kiti (Luminex CAT NO: MCH100111)” kullanılarak üretici talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Muse Cell Analyzer (Millipore) cihazında okuma gerçekleştirilmiştir.

3.10. Hoechst 33342 ve Propidyum İyodür Boyaları İle Apoptoz Analizi

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde glutatyon inhibisyonunu hedefleyen CB-839, glutatyonun antioksidatif mekanizmadaki aktivitesini hedefleyen

Polidatin, CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının apoptoz üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla Hoechst 33342 (ChemCruz CAT NO: sc-495790) ve propidyum iyodür (PI) (Biolegend CAT NO: 421301) boyaması yapılmıştır. Hoechst hücrede dsDNA'nın A-T bölgelerine bağlandığında mavi renk ışına veren nükleik asit boyasıdır. Hoechst boyaması ile apoptozun göstergelerinden olan DNA fragmantasyonu gözlemlenebilmektedir (Chazotte, 2011). PI hücre membranından geçemeyen ve DNA'ya bağlanan kırmızı renk fluoresan boyadır. PI hücre membran intaktlığı bozulduğu zaman hücre içine girebilmekte ve ölü hücreyi göstermektedir (Dengler vd., 1995).

Bu deneyi gerçekleştirmek amacıyla 96 kuyucuklu plakalara 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 100'er μL besiyeri içinde hücreler ekilmiştir. Gece boyu inkübasyonun ardından, test kuyucuklarındaki hücrelere ilaç uygulaması yapılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuk başına 50 μL PBS içinde hazırlanan 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst ve 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI boyası eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda fluoresan mikroskopunda kuyucukların görüntüleri alınmıştır.

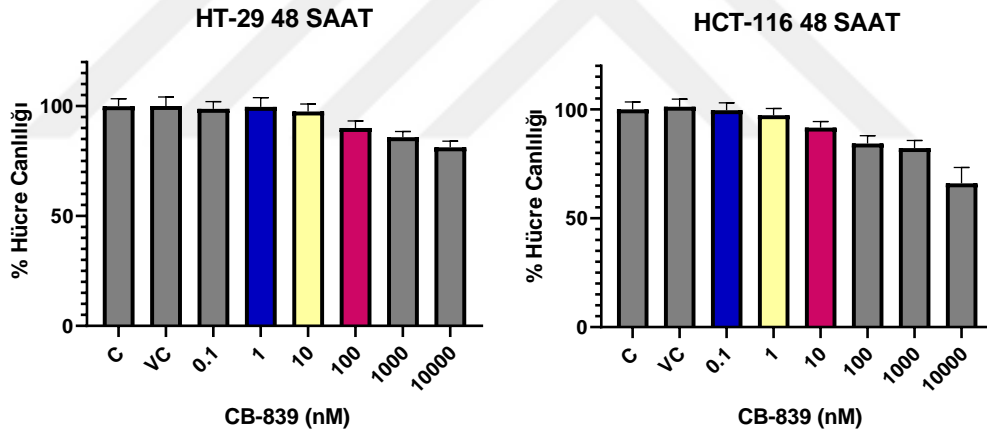
3.11. İstatistiksel Analiz

Yapılan deneylerin sonuçları GraphPad Prism 9 kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Gruplar arası anlamlılık düzeyleri Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis non-parametrik testleri ile belirlenmiştir. $P < 0,05$ %95 CI anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. CB-839 HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinin Canlılığını Azaltmıştır

HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde 48 saat boyunca uygulanan glutatyon inhibisyonunu hedefleyen 0,1-10000 nM doz aralığında glutaminaz inhibitörü CB-839'un hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla SRB testi yapılmıştır. CB-839 HT-29 hücrelerinin canlılığını 100 nM'da, HCT-116 hücrelerinin canlılığını 10 nM'da düşürmeye başlamıştır (Şekil 4.11). Sonraki deneyler için HT-29 hücrelerinde canlılığı düşüren ilk doz 100 nM, canlılığı etkilemeyen en yüksek doz 10 nM ve canlılığı etkilemeyen en yüksek dozdan bir önceki doz 1 nM CB-839; HCT-116 hücrelerinde canlılığı düşüren ilk doz 10 nM, canlılığı etkilemeyen en yüksek doz 1 nM ve canlılığı etkilemeyen en yüksek dozdan bir önceki doz 0,1 nM CB-839 olarak doz seçilmiştir.

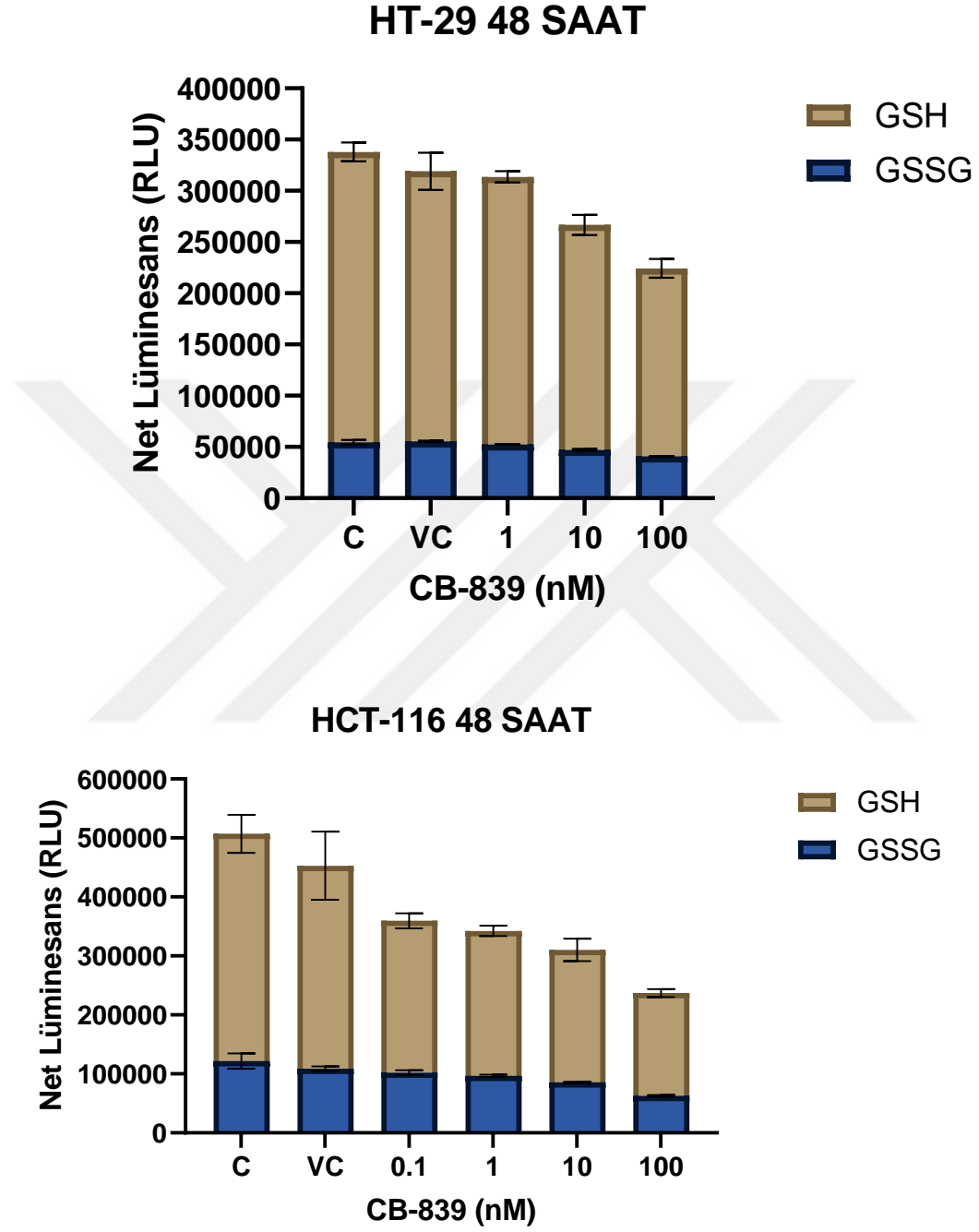


Şekil 4.11: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839'un hücre canlılığı üzerindeki etkisi SRB testi ile gösterilmiştir.

4.2. CB-839 HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde GSH ve GSSG Miktarını Azaltmıştır

HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde glutatyon inhibisyonunu hedefleyen glutaminaz inhibitörü CB-839'un seçilen dozlarda redükte glutatyon ve okside glutatyon seviyelerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla GSH/GSSG miktarı tayini

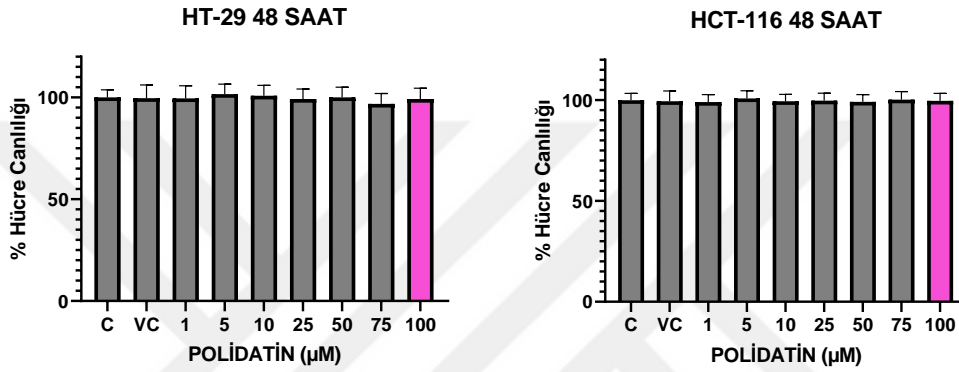
yapılmıştır. İki hücre hattında da CB-839'un dozu artıkça GSH ve GSSG miktarının azaldığı görülmüştür. CB-839'un glutaminazı inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839'un GSH ve GSSG miktarlarına etkisi "GSH/GSSG Glo Assay" ile gösterilmiştir.

4.3. Polidatin HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinin Canlılığını Değiştirmemiştir

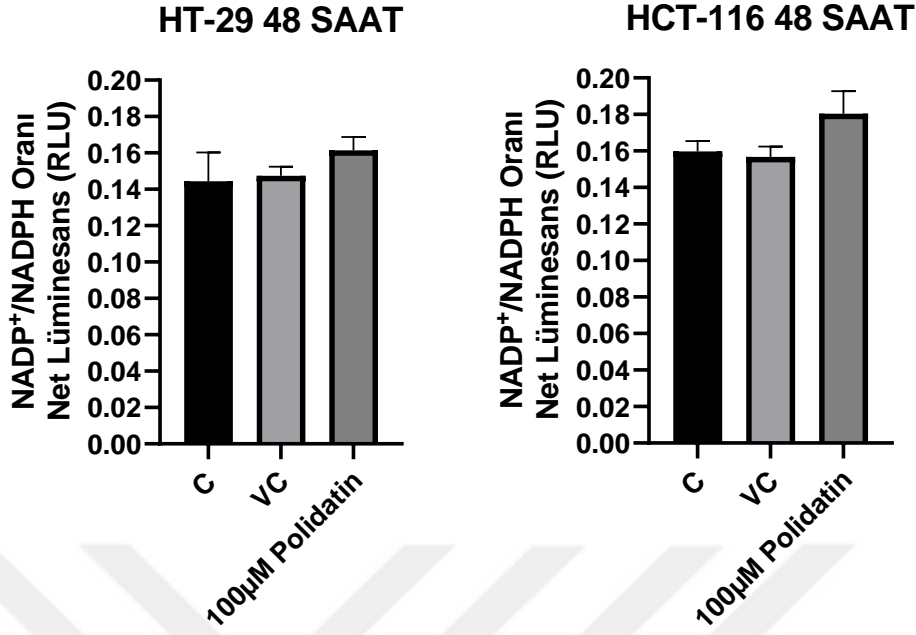
HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde 48 saat boyunca uygulanan glutatyonun antioksidatif mekanizmadaki aktivitesini hedefleyen 1-100 μM doz aralığında glukoz-6-fosfat dehidrogenaz inhibitörü Polidatin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla SRB testi yapılmıştır. Polidatin HT-29 ve HCT-116 hücrelerinin canlılığını etkilememiştir (Şekil 4.13). Sonraki deneyler için iki hücre hattında da 100 μM dozu seçilmiştir.



Şekil 4.13: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde Polidatin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi SRB testi ile gösterilmiştir.

4.4. Polidatin HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ Oranını Artırmıştır

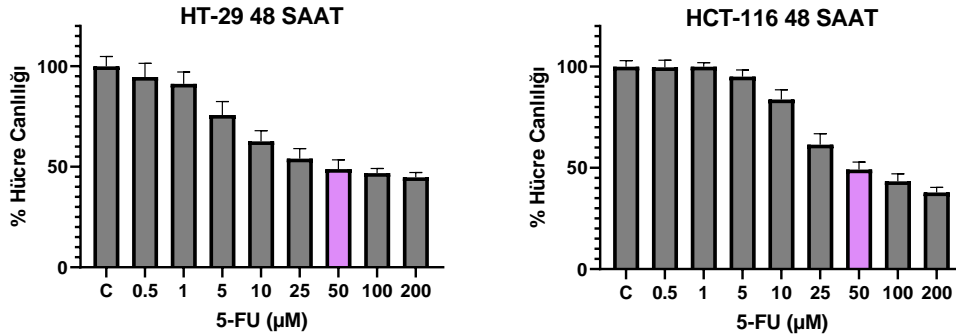
HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde glutatyonun antioksidatif mekanizmadaki aktivitesini hedefleyen glukoz-6-fosfat dehidrogenaz inhibitörü Polidatin'in NADPH ve NADP^+ seviyelerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ oranı tayini yapılmıştır. İki hücre hattında da Polidatin'in $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ oranını minimal düzeyde artırdığı görülmüştür. Polidatin'in glukoz-6-fosfat dehidrogenazı inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde Polidatin'in NADP⁺/NADPH oranına etkisi "NADP⁺/NADPH GloTM Assay" ile gösterilmiştir.

4.5. 5-fluorourasil HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinin Canlılığını Azaltmıştır

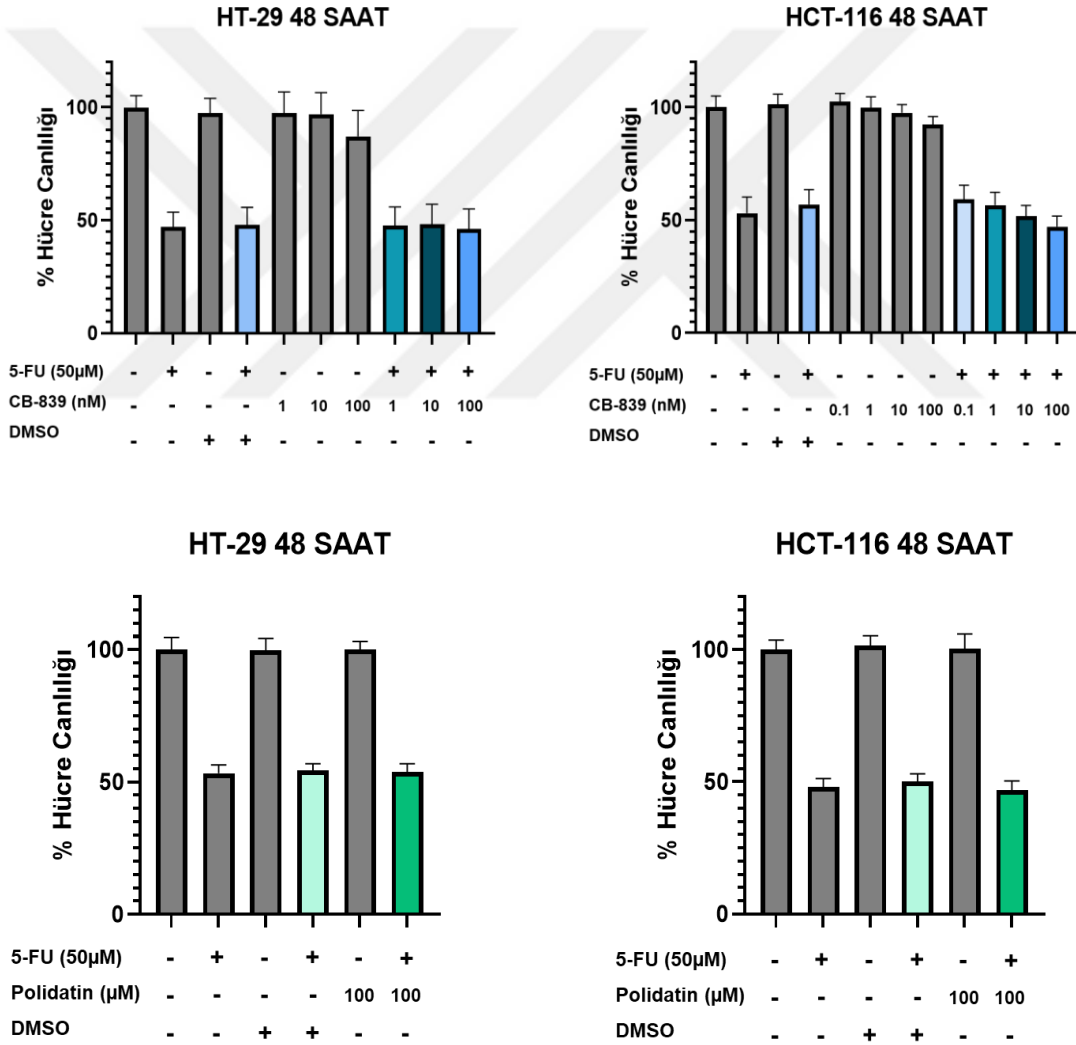
HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde 48 saat boyunca uygulanan 0,5-200 µM doz aralığında 5-FU'nun hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla SRB testi yapılmıştır. HT-29 ve HCT-116 hücrelerinde 5-FU'nun yaklaşık IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50; Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon) konsantrasyonu 50 µM bulunmuş ve sonraki deneyler için bu doz seçilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde 5-FU'nun hücre canlılığı üzerindeki etkisi SRB testi ile gösterilmiştir.

4.6. CB-839 İle 5-FU ve Polidatin İle 5-FU Kombinasyonları İlaçların Tek Başına Uygulanmasına Kıyasla HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinin Canlılığını Düşürmemiştir

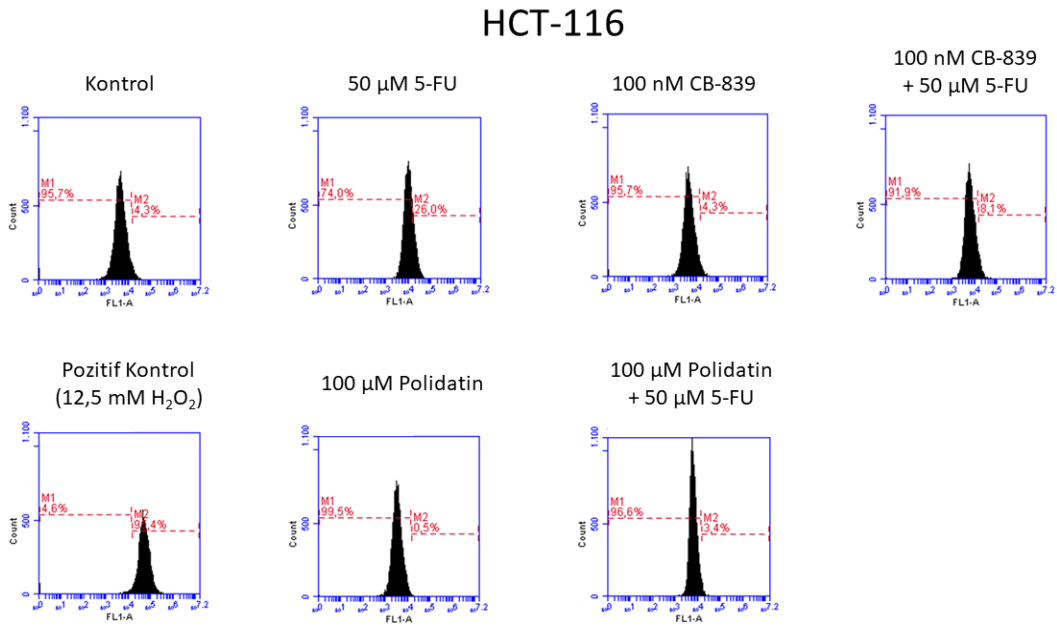
HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla SRB testi yapılmıştır. HCT-116 ve HT-29 hücrelerine seçilen dozlarda CB-839 uygulandıktan 2 saat sonra 50 μ M 5-FU 48 saat boyunca uygulanmıştır. İki hücre hattında da CB-839 5-FU'nun etkinliğini etkilememiştir. HCT-116 ve HT-29 hücrelerine seçilen dozda Polidatin uygulandıktan 2 saat sonra 50 μ M 5-FU 48 saat boyunca uygulanmıştır. İki hücre hattında da Polidatin 5-FU'nun etkinliğini etkilememiştir (Şekil 4.16).



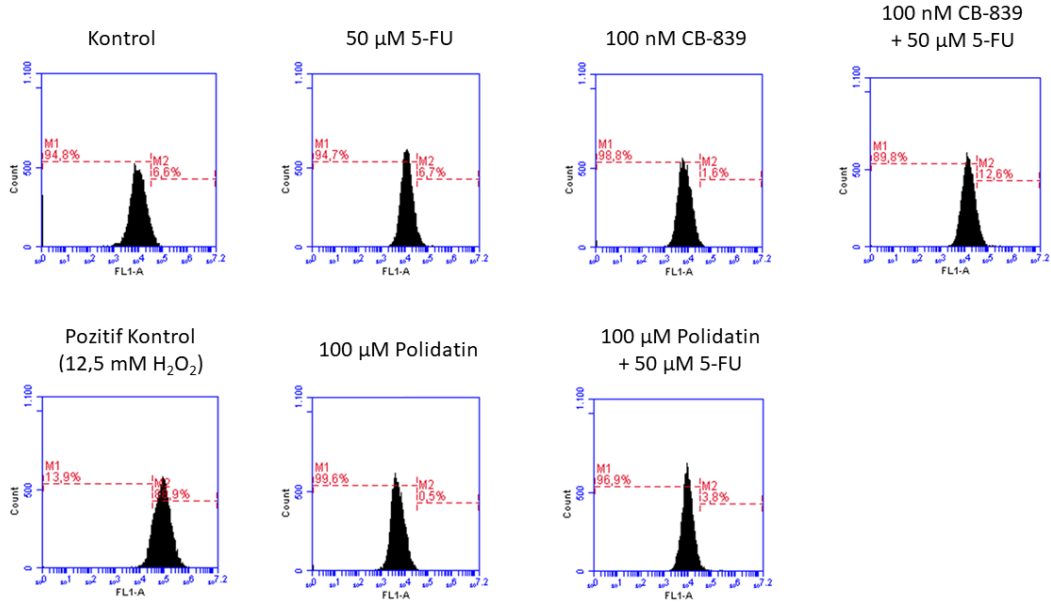
Şekil 4.16: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi SRB testi ile gösterilmiştir.

4.7. HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde CB-839 İle 5-FU ve Polidatin İle 5-FU Kombinasyonları ROS Seviyesini Değiştirmemiştir

HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının ROS seviyesindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla akış sitometrisi ile ROS analizi yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak 12,5 mM H₂O₂ hücrelere uygulanmıştır. Kontrole kıyasla H₂O₂ uygulanan hücrelerde ROS seviyesinin arttığı gösterilmiştir. İki hücre hattında da CB-839, Polidatin ve kombinasyonların ROS seviyesini etkilemediği görülmüştür (Şekil 4.17).



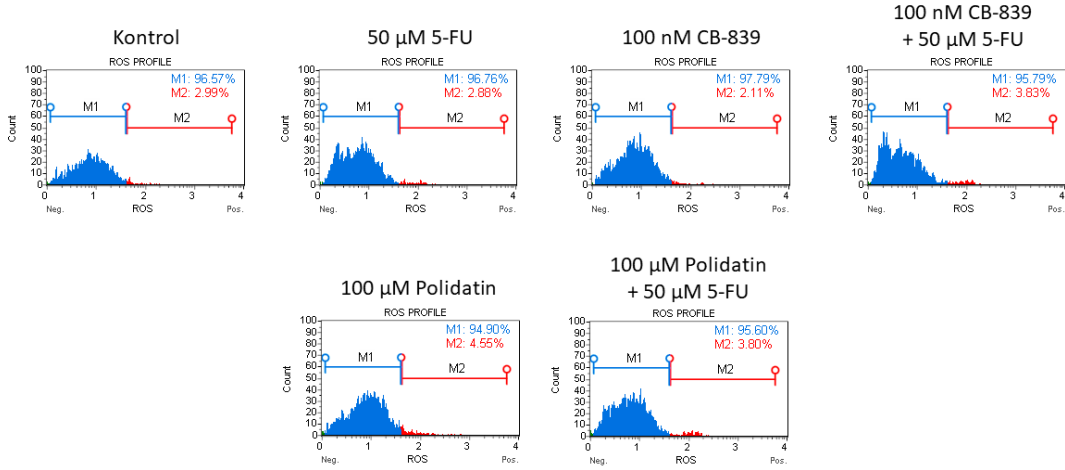
HT-29



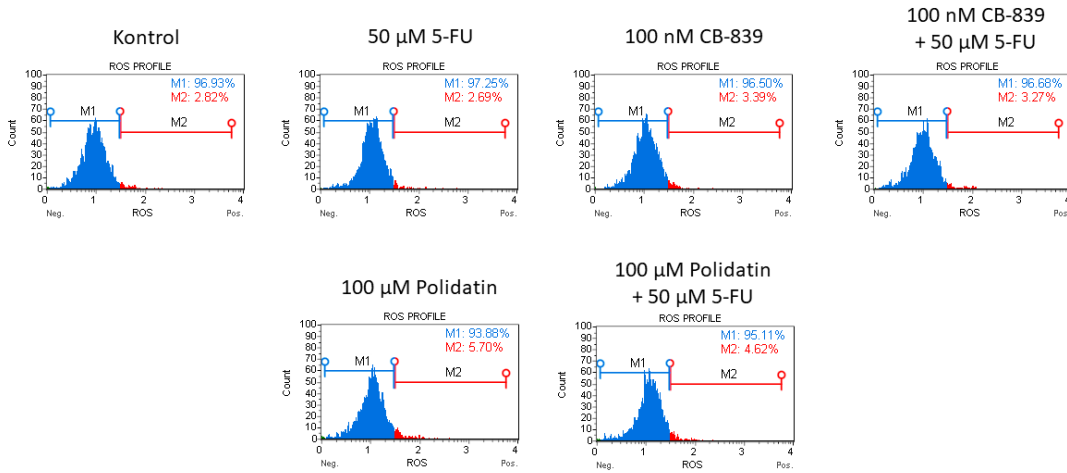
Şekil 4.17: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının ROS seviyesine etkisi akış sitometrisi ile ROS analizi yapılarak gösterilmiştir.

4.8. HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde CB-839 İle 5-FU ve Polidatin İle 5-FU Kombinasyonları Süperoksit Anyonunun Seviyesini Etkilememiştir

HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının süperoksit radikali seviyesindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla akış sitometrisi ile ROS analizi yapılmıştır. İki hücre hattında da CB-839, Polidatin ve kombinasyonların süperoksit radikali seviyesini etkilemediği görülmüştür (Şekil 4.18-19).



Şekil 4.18: HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının süperoksit radikali seviyesindeki etkisi akış sitometrisi ile ROS analizi yapılarak gösterilmiştir.

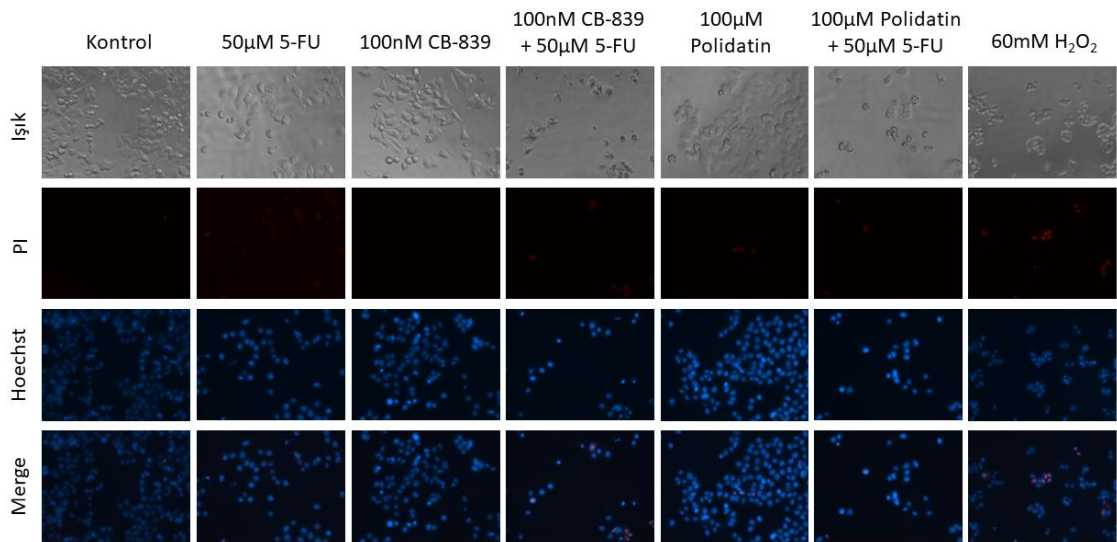


Şekil 4.19: HCT-116 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının süperoksit radikali seviyesindeki etkisi akış sitometrisi ile ROS analizi yapılarak gösterilmiştir.

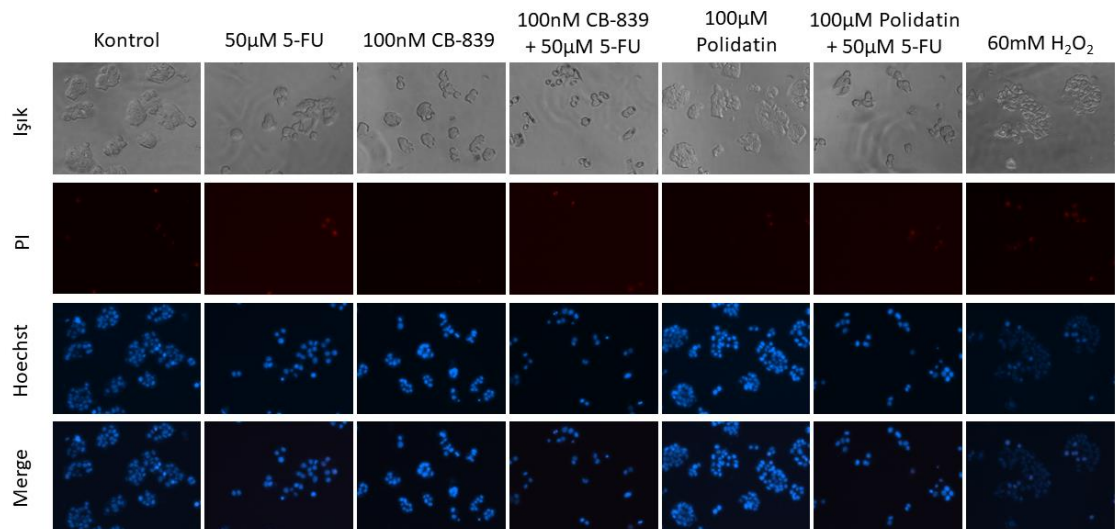
4.9. HCT-116 ve HT-29 Hücrelerinde CB-839 İle 5-FU ve Polidatin İle 5-FU Kombinasyonlarının Hücre Ölümünü Tetiklememiştir

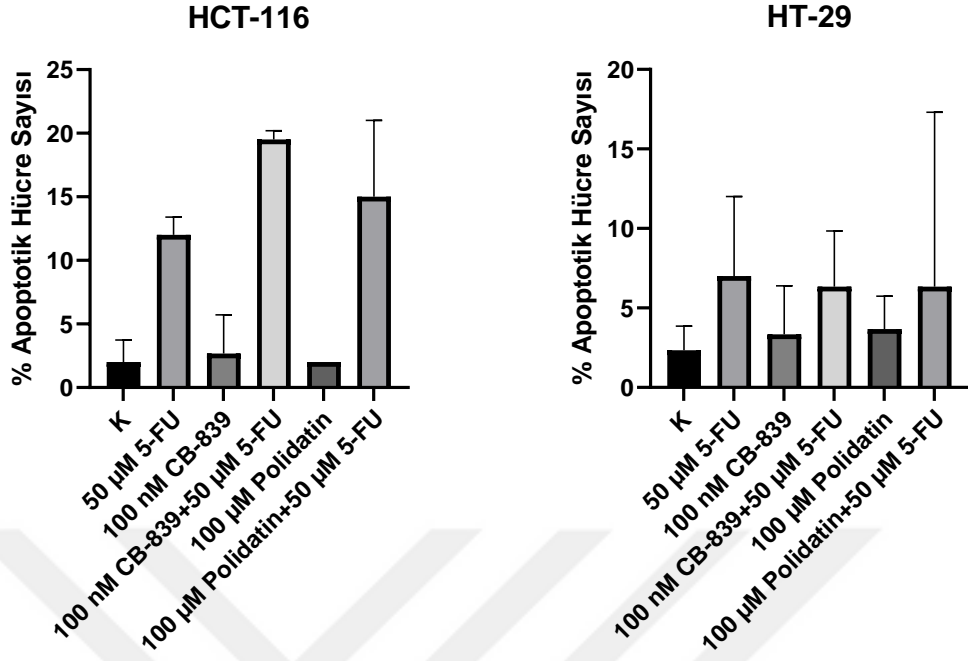
HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının hücre ölümü üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla Hoechst/PI boyaması yapılmıştır. İki hücre hattında da CB-839, Polidatin ve kombinasyonların hücre ölümünü tetiklemediği görülmüştür (Şekil 4.20).

HCT-116



HT-29





Şekil 4.20: HCT-116 ve HT-29 KKK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının hücre ölümü üzerine etkisi Hoechst/PI boyaması yapılarak gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser rektum veya kolonda oluşan benign hücrelerden oluşan poliplerin zamanla malign transformasyon geçirmesiyle başlamaktadır (*Colon cancer - Symptoms and causes - Mayo Clinic*, 2021). KRK dünya çapında insidans açısından üçüncü sırada ancak mortalite açısından ikinci sırada yer alan kanser türüdür (Sung vd., 2021). Kolorektal kansere sebep olan çevresel ve genetik faktörler, kolon epitel hücrelerinde kansere özgü özelliklerin kazanılmasını teşvik etmektedir (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; Kuipers vd., 2015). Hanahan ve Weinberg 2000 ve 2011 yıllarında ortaya çıkardığı kanserin temel ve ayırt edici özelliklerinden biri olan enerji metabolizmasının yeniden programlanması, kanser hücrelerinin sağkalımını sağlayan bir araç kazandırmaktadır (Yao vd., 2020; Zou vd., 2020). Bu nedenle, kanser hücrelerinin metabolik düğümlerini belirlemek ve hedeflemek, kanser hastalarında ümit vaadeden terapötik yaklaşımlar teşkil etmektedir (Tang vd., 2021). Bu çalışmamızda kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olan metabolik değişimlere odaklanılmıştır.

Kanser hastalığı için birçok terapi yaklaşımları benimsenmiştir (Stefani vd., 2017). Bu benimsenen yöntemlerin avantajları kadar tedavi etkinliğini olumsuz yönde etkileyen yan etkileri de bulunmaktadır (Fillion vd., 2003; V. Mishra vd., 2018; Stein vd., 2003; Usta Yeşilbalkan vd., 2005). Bu sebeple terapi yaklaşımlarının yan etkilerini ve antikanser ilaç direncini azaltacak etkili hedef tedavi arayışları devam etmektedir (Palumbo vd., 2013). Hedefe yönelik moleküller ile kemoterapötik ilaçların düşük dozlarının kombine uygulanması ile kemoterapinin sebep olduğu yan etkiler azaltılabilmekte ve tedavinin etkinliği artırılabilir (Zhong vd., 2021). Flor atomlu bir urasil analogu olan 5-fluorourasil, KRK tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapötik ilaçtır (Heidelberger vd., 1957; Longley vd., 2003; G. J. Peter & Van Groeningen, 1991). 5-FU bazlı kemoterapiye yanıt oranları, ileri seviye KRK için birinci basamak tedavide yalnızca %10-15 aralığındadır (Douillard vd., 2000). Bundan dolayı günümüzde, hedefe yönelik moleküller ile kemoterapötik ilaçların kombine uygulanması kanser tedavisinde gelecek vadetmektedir (Hingorani vd., 2016; Prete vd., 2018; Zhong vd., 2021).

5-FU, önemli hücrel mekanizmalara müdahale ederek, tetiklediği hasara yanıt olarak hücre ölümlerinden biri olan apoptozun indüksiyonuna sebep olmaktadır (H. Wang, 2020). Kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerini seçici olarak öldürmede reaktif oksijen türlerini sitotoksik seviyede artırmak için kullanılmaktadır (Y. Wang vd., 2021). Kanser hücreleri, ROS seviyesinin yükselmesine yanıt olarak, oksidatif hasarı engellemek amacıyla antioksidan sistemleri (örn. NADPH, GSH) artırmaktadır (K. Wang vd., 2019). Kanserde çoğu antioksidan savunma mekanizmaları, tripeptid molekül olan glutatyona bağlıdır (Kennedy vd., 2020; Schumacker, 2015). GSH seviyelerinin tümör gelişimi ve antikanser ilaç direnci ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir (Altman vd., 2016). Kanser hücrelerinde redoks dengesinin ve antioksidan sistemlerin hedeflenmesi, antikanser tedavi için ümit vericidir (De Berardinis & Chandel, 2016; Hay, 2016; Martinez-Outschoorn vd., 2017).

ROS nötralizasyonuna glutasyon sentezinde rol oynayarak katkıda bulunan glutamin, GSH'nin tüm bileşenleri için öncüdür (Welbourne, 1979). Antikanser tedavilerde glutamin'in glutamat'a dönüşümünü katalizleyen glutaminaz enzimi potansiyel bir hedef olarak kabul edilmektedir. Bundan dolayı GLS'ye özgü inhibitörler geliştirilmiştir (K. Wang vd., 2019). En çok kullanılan GLS inhibitörü CB-839 bileşiğidir (Zimmermann vd., 2016). CB-839 bileşiği, bir GLS inhibitörü olarak GSH'nin hedeflenmesi üzerinden antikanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde gelecek vadetmektedir.

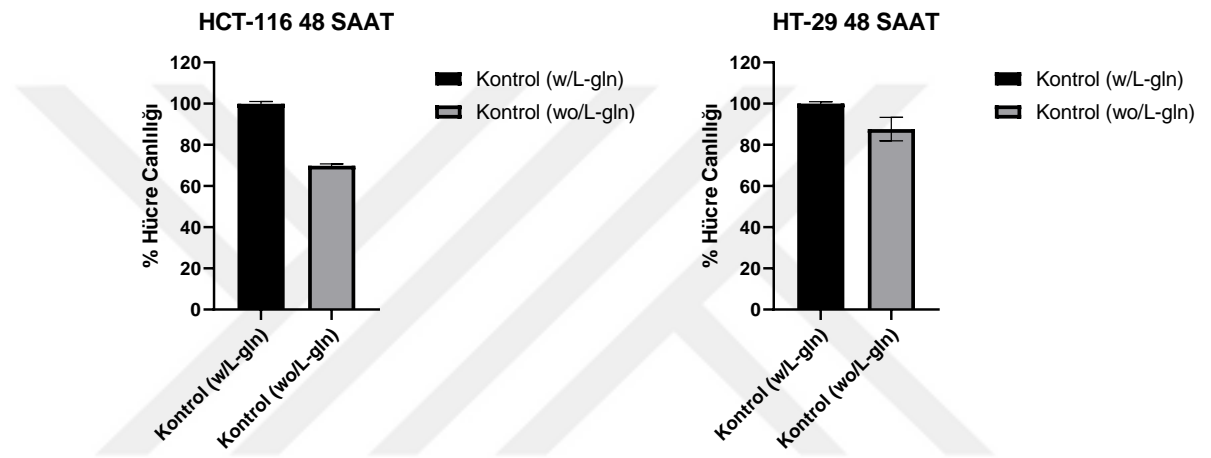
ROS nötralizasyonunda NADPH, antioksidan molekül olan GSH'nin rejenerasyonunu sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Gorrini vd., 2013). NADPH'nin hücrelerde ana kaynağı olan pentoz fosfat yolunda yer alan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz NADPH sentezinde önemli rol oynamaktadır (Compagno vd., 2009; Jiang vd., 2013; Quade vd., 2004; Rosenwald vd., 2002; Stearman vd., 2005). G6PDH'nin inhibisyonu kanser hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığını tekrardan sağlayabildiğinden PPP inhibisyonu antikanser tedavide iyi bir terapötik strateji olarak görülmektedir (Catanzaro vd., 2015; Jones & Schulze, 2012). G6PDH'nin inhibitörü olan Polidatin'in kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonu dahil olmak üzere birçok biyolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Dandawate vd., 2016; Kong vd., 2016; H. Liu vd., 2011). Bu bağlamda çalışma kapsamındaki amacımız; glutasyon'a bağlı antioksidatif

kapasiteyi küçük molekül inhibitörler ile baskılayarak kolorektal kanser hücrelerinde 5-fluorourasil etkinliğini araştırmaktır.

Bu bilgiler ışığında, HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde glutatyon inhibisyonunu hedefleyen glutaminaz inhibitörü CB-839'un hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla SRB testi; redükte glutatyon ve okside glutatyon seviyelerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla GSH/GSSG miktarı tayini yapılmıştır. SRB testi hücre metabolik aktiviteden bağımsız olduğundan bu inhibitörün canlılık tayininde SRB testinin kullanımı tercih edilmiştir. CB-839 konsantrasyonu artırıldıkça HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin canlılığını azaltmıştır. HCT-116 hücrelerinin CB-839 inhibitörüne HT-29 hücrelerinden daha duyarlı olduğu görülmüştür. Sonraki deneylerde uygulanacak CB-839 için hücrelerin canlılığı düşüren ilk doz, canlılığı etkilemeyen en yüksek doz ve canlılığı etkilemeyen en yüksek dozdan bir önceki doz seçilmiştir. İki hücre hattında da seçilen konsantrasyonlarda CB-839'un dozu artıkça GSH ve GSSG miktarının azaldığı görülmüş ve böylece CB-839'un glutaminazı inhibe ettiği gösterilmiştir. Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HCT-116 WT (doğal tip) hücrelerinin HCT-116 PIK3CA mutant hücrelerden μM konsantrasyonlarındaki CB-839'a daha az duyarlı olduğu ve KRAS mutasyonlarının KRK hücrelerinin glutamin bağımlılığı üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir. CB-839'un HCT-116 hücrelerinde GSH/GSSG oranını azalttığı belirlenmiştir. HCT-116 hücrelerinde CB-839'un 5-FU ile kombinasyonunda apoptotik hücrelerin yüzdesinin arttığı ve CB-839'un 5-FU'nun sitotoksikite mekanizma hedefi olan TS enziminin inhibisyonunu arttırdığı da görülmüştür (Y. Zhao vd., 2020). CB-839'un glutaminaz inhibisyonunu gerçekleştirdiğini Gross ve arkadaşlarının meme kanseri hücreleri ile yaptığı çalışmadaki gibi glutamin ve glutamat seviyelerinin ölçülmesi ile de gösterilebilir (Gross vd., 2014).

Davidson arkadaşlarıyla yaptığı çalışmada glutaminazın CB-839 ile inhibe edilmesine rağmen TCA'da glutamin türevli karbon atomuna rastlanmış buna karşın hücre canlılığında azalma görülmüştür. Böylece enerji üretiminin ve hücre canlılığının farklı mekanizmalarla ilerleyebileceği görülmektedir. Bu sonuç CB-839'un en büyük dezavantajlardan biri olan seçici bir özgüllüğe sahip olmadığını göstermektedir (Davidson vd., 2016). CB-839'un etkisine daha detaylı bakmak amacıyla metabolit

ölçümleri yapılarak daha çok araştırılabilir. Derlenen bir çalışmada farklı kanser tiplerinin farklı metabolik fenotiplere sahip olduğu bildirilmiştir. Akciğer, karaciğer kanseri gibi kolorektal kanser de glikolitik fenotipe sahiptir. Böylelikle kolorektal kanser glutamine bağımlı hale gelmemektedir (Lehúede vd., 2016). Bu çalışmada HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinin glutamin bağımlılığını tespit etmek amacıyla glutamin varlığında ve yokluğunda SRB testi ile hücre canlılığına bakılmıştır. Literatürle uyumlu olarak HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin glutamine bağımlı olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla CB-839 etkin etki gösterememiştir (Şekil 5.21).

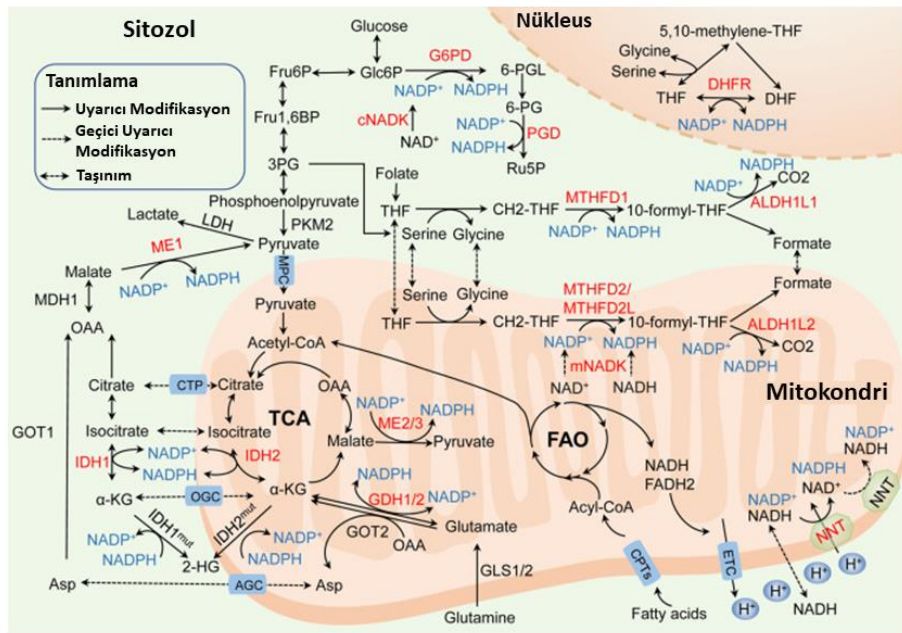


Şekil 5.21: HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde glutamin bağımlılığını göstermek amacıyla SRB testi yapılmıştır.

HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde glutatyonun antioksidatif mekanizmadaki aktivitesini hedefleyen G6PDH inhibitörü Polidatin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla SRB testi; NADPH ve NADP⁺ seviyelerindeki etkisine bakılması amacıyla NADP⁺/NADPH oranı tayini yapılmıştır. Polidatin HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin canlılığını etkilememiştir. Polidatin için iki hücre hattında da %0,1 DMSO oranında ve uygulanan en yüksek doz olan 100 µM seçilmiştir. Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HCT-116 hücrelerinde Polidatin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisine mitokondriyel dehidrogenazların metabolik aktivitesine dayanan bir yöntem olan CCK-8 metodu ile bakılmış ve Polidatin'in hücre canlılığını azalttığı görülmüştür (Chen vd., 2019). İki hücre hattında da Polidatin'in NADP⁺/NADPH

oranını minimal düzeyde artırmasıyla glukoz-6-fosfat dehidrogenazı inhibe ettiği gösterilmiştir. Mele ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, meme kanseri hücrelerinde Polidatin'in NADP⁺/NADPH oranını anlamlı şekilde artırdığı belirlenmiştir (Mele vd., 2018).

Kanser hücrelerinde NADPH homeostazı Şekil 5.22'de gösterildiği gibi temel olarak pentoz fosfat yolu, folat aracılı tek karbon metabolizması, malik enzimler (ME), NAD kinaz (NADK), nikotinamid nükleotit transhidrojenaz (NNT), sitozolik veya mitokondriyal NADP'ye bağlı izositrat dehidrogenaz (IDH1 ve IDH2), glutamin metabolizması ve yağ asidi oksidasyonu (FAO) dahil olmak üzere çeşitli metabolik yollar ve enzimler tarafından düzenlenmektedir (Ju vd., 2020). Bununla birlikte, hücrelerdeki genel NADPH üretimi için, bu yolların ve enzimlerin NADPH üretimine nispi katkısı belirsizliğini korumaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, hücresel NADPH'nin kanser hücrelerinde büyük ölçüde PPP, folat aracılı tek karbon metabolizması ve ME tarafından üretilebileceğini göstermektedir (Fan vd., 2014; L. Liu vd., 2016). Bu bilgiler, çalışmamızda G6PDH inhibisyonu ile PPP inhibisyonu yoluyla kanser hücrelerinde NADPH seviyesinin büyük ölçüde azaltılmasının mümkün olmadığını açıklayabilmektedir.



Şekil 5.22: Kanserde NADPH Homeostazının Moleküler Mekanizmaları (Ju vd., 2020)

HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde kemoterapötik ilaç olan 5-FU'nun hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla SRB testi yapılmıştır. 5-FU HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin canlılığını düşürmüştür. İki hücre hattında da 5-FU'nun yaklaşık IC₅₀ konsantrasyonu 50 µM bulunmuş ve sonraki deneyler için bu doz seçilmiştir.

HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla SRB testi yapılmıştır. İki hücre hattında da CB-839 ve Polidatin 5-FU'nun azalttığı canlılığa katkıda bulunmamıştır. Bae ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yüksek doz Polidatin'in (300 µM) kolorektal kanser hücrelerinde 5-FU'ya duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (Bae vd., 2021). Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, KRK hücrelerinde CB-839'un, 5-FU'nun aktif bileşik olan FdUMP'ye (Fluorodeoksiüridin monofosfat) dönüşümünü kolaylaştıran bir enzim olan UPP1'in (Üridin fosforilaz 1) ekspresyonunu düzenleyerek 5-FU'nun tümör inhibe edici etkisini artırdığı gösterilmiştir (Y. Zhao vd., 2020). CB-839'un multipl miyelom hücrelerinde karfilzomib ile sinerji oluşturduğu, apoptozu ve endoplazmik retikulum stresini indüklediği (Thompson vd., 2017) ve akciğer kanserinde ise erlotinib ile kombinasyon uygulandığında etkin etki gösterdiği ve apoptozu tetiklediği (Momcilovic vd., 2017) gösterilmiştir.

HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CB-839 ile 5-FU ve Polidatin ile 5-FU kombinasyonlarının ROS seviyesindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla akış sitometrisi ile ROS analizi; hücre ölümü üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla Hoechst/PI boyaması yapılmıştır. İki hücre hattında da CB-839, Polidatin ve kombinasyonların ROS seviyesini etkilemediği ve hücre ölümünü tetiklemediği görülmüştür. Kolorektal kanser dahil birçok kanser türünde Polidatin'in ROS seviyesini artırdığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (De Gregorio vd., 2022; Shah vd., 2022). Bu sonucun aksine Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, meme kanseri hücrelerinde DCFHDA boyası ve akış sitometrisi kullanılarak ROS düzey analizi ile Polidatin'in ROS seviyesini azalttığı ve daha önce literatürde Polidatin'in antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir. Polidatin'in ROS/PI3K/AKT/HIF1α/HK2 yolunu inhibe etmesi ve 2-deoksi-d-glukoz ile kombinasyonunda meme kanseri hücrelerinde apoptoza yol açtığı

görülmüştür (Zhang vd., 2019). Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 20 µM CB-839 ile 5-FU kombinasyonunun ROS seviyesini artırdığı ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Y. Zhao vd., 2020).

Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hepatoselüler karsinom hücresi HepG2, servikal karsinomdan izole edilen ölümsüz olan hücre HeLa ve akciğer kanser hücresi A549'da Artesunat'ın ROS'a bağlı apoptoz ve sitotoksosite üzerindeki etkisi araştırılmıştır. HeLa ve A549 hücrelerinde H₂O₂ sitotoksisiteyi önemli ölçüde indüklerken, HepG2 hücrelerinde sitotoksisiteyi indüklememiştir. Bu hücre hatlarında GSH ve GSSG miktarlarına baktıklarında HepG2 hücrelerinde GSH/GSSG oranı diğer hücrelerinkinin iki katı bulunmuştur. Glutatyon inhibisyonu HeLa ve A549 hücrelerinde Artesunat'ın indüklediği sitotoksisiteyi artırmış fakat HepG2 hücrelerinde artırmamıştır. Bu hücrelere GSH eklendiğinde HeLa ve A549 hücrelerinde Artesunat'ın indüklediği sitotoksisiteyi önlemiştir. Bu iki hücre hattında da GSH'nin ROS nötralizasyonuna katıldığını göstermektedir. HepG2 hücrelerinde katalaz aktivitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerde katalaz inhibisyonu ROS'a duyarlılığı artırmıştır (M. X. Zhao vd., 2019). HCT-116 ve HT-29 KKK hücrelerinde de katalaz gibi diğer antioksidan moleküllerin aktivitesi araştırılmalıdır.

6. SONUÇ, ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI

Kanser hücrelerinde antioksidan kapasite inhibisyonunun terapötik bir strateji olarak kullanımı özgün ve yeni bir yaklaşım sağlamaktadır. Bu çalışmamızın amacı kolorektal kanser hücrelerinde glutasyon aktivitesinin küçük molekül inhibitörler ile baskılanmasının, 5-fluorourasil'in etkinliği üzerindeki rolünün araştırılmasıdır. Sonuçta, CB-839 ve Polidatin inhibitörleri ile glutatyona bağlı antioksidan sistem inhibisyonu, 5-fluorourasil'in etkinliğine katkıda bulunmamıştır.

Kanser hücrelerinde NADPH homeostazı çeşitli metabolik yollar ve enzimler tarafından düzenlenmektedir. Bu bilgi kolorektal kanser hücrelerinde sadece pentoz fosfat yolunun inhibisyonuyla hücre içi NADPH seviyesinin büyük ölçüde düşürülmesinin mümkün olmayacağını açıklayabilmektedir. Çalışmamızın sonucuna göre kolorektal kanser hücrelerinde sanılanın aksine glutasyon inhibisyonu kanser tedavi stratejilerinin oluşturulmasında etkin görülmemiştir. Literatürde bir çalışmada kanser türleri arasında farklı antioksidan yolların daha baskın olabileceği gösterilmiştir. Kolorektal kanser hücrelerinde de antioksidan moleküllerin aktiviteleri ve ilişkili oldukları yolların mekanizmaları ayrıntılı araştırılmalıdır.

KAYNAKÇA

Adams, J. M., & Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01740-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01740-0)

Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324–1337. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1210220>

Adhikary, A., Mohanty, S., Lahiry, L., Hossain, D. M. S., Chakraborty, S., & Das, T. (2010). Theaflavins retard human breast cancer cell migration by inhibiting NF- κ B via p53-ROS cross-talk. *FEBS Letters*, 584(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.081>

Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome *c*. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01844-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01844-8)

Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016). From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* (C. 16, Sayı 10, ss. 619–634). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>

Anastasiou, D. (2017). Tumour microenvironment factors shaping the cancer metabolism landscape. *British Journal of Cancer* (C. 116, Sayı 3, ss. 277–286). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.412>

Avolio, R., Matassa, D. S., Criscuolo, D., Landriscina, M., & Esposito, F. (2020). Modulation of Mitochondrial Metabolic Reprogramming and Oxidative Stress to Overcome Chemoresistance in Cancer. *Biomolecules*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/BIOM10010135>

Bae, H., Lee, W., Song, J., Hong, T., Kim, M. H., Ham, J., Song, G., & Lim, W. (2021). Polydatin Counteracts 5-Fluorouracil Resistance by Enhancing Apoptosis via Calcium Influx in Colon Cancer. *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 1477, 10(9)*, 1477. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10091477>

Bansal, A., & Celeste Simon, M. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *The Journal of Cell Biology*, 217(7), 2291. <https://doi.org/10.1083/JCB.201804161>

Bellamy, C. O. C., Malcomson, R. D. G., Harrison, D. J., & Wyllie, A. H. (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminars in cancer biology*, 6(1), 3–16. <https://doi.org/10.1006/SCBI.1995.0002>

Bhardwaj, V., & He, J. (2020). Reactive oxygen species, metabolic plasticity, and drug resistance in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103412>

Boice, A., & Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1867(6), 118688. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118688>

Boku, S., Watanabe, M., Sukeno, M., Yaoi, T., Hirota, K., Iizuka-Ohashi, M., Itoh, K., & Sakai, T. (2020). Deactivation of Glutaminolysis Sensitizes PIK3CA-Mutated Colorectal Cancer Cells to Aspirin-Induced Growth Inhibition. *Cancers*, 12(5), 1097. <https://doi.org/10.3390/cancers12051097>

Brunelle, J. K., & Letai, A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of cell science*, 122(Pt 4), 437–441. <https://doi.org/10.1242/JCS.031682>

Cai, T., Kuang, Y., Zhang, C., Zhang, Z., Chen, L., Li, B., Li, Y., Wang, Y., Yang, H., Han, Q., & Zhu, Y. (2015). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase 4 control STAT3 activity in melanoma cells through a pathway involving reactive oxygen species, c-SRC and SHP2. *American Journal of Cancer Research*, 5(5), 1610–1620. www.ajcr.us/

Canpolat, F. (2016). Hücre Siklusu Ve Apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi*, 11–17.

Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(7), 395. <https://doi.org/10.1038/S41571-020-0341-Y>

Castillo Ferrer, C., Berthenet, K., & Ichim, G. (2021). Apoptosis – Fueling the oncogenic fire. *The Febs Journal*, 288(15), 4445. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15624>

Catanzaro, D., Gaude, E., Orso, G., Giordano, C., Guzzo, G., Rasola, A., Ragazzi, E., Caparrotta, L., Frezza, C., & Montopoli, M. (2015). Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase sensitizes cisplatin-resistant cells to death. *Oncotarget*, 6(30), 30102–30114. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4945>

Celepli, S., Bigat, İ., Celepli Pınar, & Karagin Peren Hatice. (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji* 24/3, 103–111.

Chazotte, B. (2011). Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb.prot5557. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT5557>

Chen, Q., Zeng, Y. N., Zhang, K., Zhao, Y., Wu, Y. Y., Li, G., Cheng, H. Y., Zhang, M., Lai, F., Wang, J. B., & Cui, F. M. (2019). Polydatin increases radiosensitivity by inducing apoptosis of stem cells in colorectal cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 15(2), 430–440. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27050>

Choi, Y. K., & Park, K. G. (2018). Targeting glutamine metabolism for cancer treatment. *Biomolecules and Therapeutics* (C. 26, Sayı 1, ss. 19–28). Korean Society of Applied Pharmacology. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.178>

Colon cancer - Symptoms and causes - Mayo Clinic. (2021). <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/syc-20353669>

Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., & Ricciardiello, L. (2013). Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 16365–16385. <https://doi.org/10.3390/IJMS140816365>

Compagno, M., Lim, W. K., Grunn, A., Nandula, S. V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., & Pasqualucci, L. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 459(7247), 717–721. <https://doi.org/10.1038/nature07968>

Coşkun, G., & Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *ARŞİV*, 20, 145.

Cryns, V., & Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes & Development*, 12(11), 1551–1570. <https://doi.org/10.1101/GAD.12.11.1551>

Dandawate, P. R., Subramaniam, D., Jensen, R. A., & Anant, S. (2016). Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology: C. 40_41* (ss. 192–208). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.09.001>

Danial, N. N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(24), 7254–7263. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1598>

Davidson, S. M., Papagiannakopoulos, T., Olenchock, B. A., Heyman, J. E., Keibler, M. A., Luengo, A., Bauer, M. R., Jha, A. K., O'Brien, J. P., Pierce, K. A., Gui, D. Y., Sullivan, L. B., Wasylenko, T. M., Subbaraj, L., Chin, C. R., Stephanopolous, G., Mott, B. T., Jacks, T., Clish, C. B., & Van Der Heiden, M. G. (2016). Environment impacts the metabolic dependencies of Ras-driven non-small cell lung cancer. *Cell metabolism*, 23(3), 517. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2016.01.007>

De Berardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* (C. 2, Sayı 5, s. e1600200). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>

De Gregorio, A., Krasnowska, E. K., Zonfrillo, M., Ravagnan, G., Bordignon, V., Bonmassar, E., & Fuggetta, M. P. (2022). Influence of Polydatin on the Tumor Microenvironment In Vitro: Studies with a Colon Cancer Cell Model. *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 8442*, 23(15), 8442. <https://doi.org/10.3390/IJMS23158442>

de la Cueva, A., Ramírez de Molina, A., Álvarez-Ayerza, N., Ramos, M. A., Cebrián, A., Pulgar, T. G. del, & Lacal, J. C. (2013). Combined 5-FU and ChoK α Inhibitors as a New Alternative Therapy of Colorectal Cancer: Evidence in Human Tumor-Derived Cell Lines and Mouse Xenografts. *PLoS ONE*, 8(6), e64961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064961>

Deberardinis, R. J., & Cheng, T. (2010). Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* (C. 29, Sayı 3, ss. 313–324). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.358>

Dengler, W. A., Schulte, J., Berger, D. P., Mertelsmann, R., & Fiebig, H. H. (1995). Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-cancer drugs*, 6(4), 522–532. <https://doi.org/10.1097/00001813-199508000-00005>

Di Donato, C., Lavorgna, M., Fattorusso, R., Isernia, C., Isidori, M., Malgieri, G., Piscitelli, C., Russo, C., Russo, L., & Iacovino, R. (2016). Alpha- and Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes with 5-Fluorouracil: Characterization and Cytotoxic Activity Evaluation. *Molecules*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21121644>

Distelhorst, C. W., & Bootman, M. D. (2011). Bcl-2 interaction with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: role in Ca(2+) signaling and disease. *Cell calcium*, 50(3), 234–241. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2011.05.011>

Długosz-Pokorska, A., Pięta, M., Janecki, T., & Janecka, A. (2019). New uracil analogs as downregulators of ABC transporters in 5-fluorouracil-resistant human leukemia HL-60 cell line. *Molecular Biology Reports*, 46(6), 5831–5839. <https://doi.org/10.1007/S11033-019-05017-W/FIGURES/6>

Douillard, J. Y., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L., & Rougier, P. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone. as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*, 355(9209), 1041–1047. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02034-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02034-1)

EAGLE, H. (1955). The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. *The Journal of experimental medicine*, 102(5), 595–600. <https://doi.org/10.1084/jem.102.5.595>

Ellis, R. E., Yuan, J., & Horvitz, H. R. (2003). Mechanisms and Functions of Cell Death. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 663–698. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CB.07.110191.003311>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Fan, J., Ye, J., Kamphorst, J. J., Shlomi, T., Thompson, C. B., & Rabinowitz, J. D. (2014). Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature*, 510(7504), 298. <https://doi.org/10.1038/NATURE13236>

Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)

Fillion, L., Gélinas, C., Simard, S., Savard, J., & Gagnon, P. (2003). Validation evidence for the French Canadian adaptation of the Multidimensional Fatigue Inventory as a measure of cancer-related fatigue. *Cancer Nursing*, 26(2), 143–154. <https://doi.org/10.1097/00002820-200304000-00008>

Fulda, S., & Debatin, K. M. (2003). Death receptor signaling in cancer therapy. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 3(4), 253–262. <https://doi.org/10.2174/1568011033482404>

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., ... Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1), 107–120. <https://doi.org/10.1038/CDD.2011.96>

Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M. L., Pitter, K., Bird, G. H., Katz, S. G., Tu, H. C., Kim, H., Cheng, E. H. Y., Tjandra, N., & Walensky, L. D. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*, 455(7216), 1076–1081. <https://doi.org/10.1038/NATURE07396>

Gersten, O., & Wilmoth, J. R. (2002). The Cancer Transition in Japan since 1951. *Demographic Research*, 7, 271–306. <https://doi.org/10.4054/DEMRES.2002.7.5>

Giam, M., Huang, D. C. S., & Bouillet, P. (2008). BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S128–S136. <https://doi.org/10.1038/ONC.2009.50>

Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* (C. 92, Sayı 1, ss. 90–101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.017>

Glasauer, A., Sena, L. A., Diebold, L. P., Mazar, A. P., & Chandel, N. S. (2014). Targeting SOD1 reduces experimental non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 124(1), 117–128. <https://doi.org/10.1172/JCI71714>

Godwin, A. K., Meister, A., O'Dwyer, P. J., Huang, C. S., Hamilton, T. C., & Anderson, M. E. (1992). High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 3070–3074. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.3070>

Gökhan, A., Kılıç, K., Gülle, K., Uyanıkgil, Y., & Çavuşoğlu, T. (2022). Apoptotik Yolaklar ve Hedefe Yönelik Tedaviler. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. <https://doi.org/10.17343/SDUTFD.619417>

Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery* (C. 12, Sayı 12, ss. 931–947). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>

Gortat, A., Sancho, M., Mondragón, L., Messeguer, À., Pérez-Payá, E., & Orzáez, M. (2015). Apaf1 inhibition promotes cell recovery from apoptosis. *Protein & cell*, 6(11), 833–843. <https://doi.org/10.1007/S13238-015-0200-2>

Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079–1099. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2008.07.076>

Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Çinde Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1099320>

Gross, M. I., Demo, S. D., Dennison, J. B., Chen, L., Chernov-Rogan, T., Goyal, B., Janes, J. R., Laidig, G. J., Lewis, E. R., Li, J., MacKinnon, A. L., Parlati, F., Rodriguez, M. L. M., Shwonek, P. J., Sjogren, E. B., Stanton, T. F., Wang, T., Yang, J., Zhao, F., & Bennett, M. K. (2014). Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(4), 890–901. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0870>

Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(6), 1625–1637. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-111005>

Güleş, Ö., & Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, *2*, 73–78. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/146555>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* (C. 100, Sayı 1, ss. 57–70). *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (C. 144, Sayı 5, ss. 646–674). *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hassan, M., Watari, H., Abualmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/150845>

Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: Can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer* (C. 16, Sayı 10, ss. 635–649). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.77>

Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., Dubois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S.

(2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *The Journal of biological chemistry*, 277(1), 432–438. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109721200>

Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E., & Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561), 663–666. <https://doi.org/10.1038/179663a0>

Hingorani, S. R., Harris, W. P., Beck, J. T., Berdov, B. A., Wagner, S. A., Pshevlotsky, E. M., Tjulandin, S. A., Gladkov, O. A., Holcombe, R. F., Korn, R., Raghunand, N., Dychter, S., Jiang, P., Shepard, H. M., & Devoe, C. E. (2016). Phase Ib study of PEGylated recombinant human hyaluronidase and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(12), 2848–2854. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2010>

Indra, Manginstar, C., Islam, A. A., Sampepajung, D., Hamdani, W., Bukhari, A., Syamsu, S. A., Prihantono, Smaradania, N., & Faruk, M. (2021). The relationship between NFkB, HER2, ER expression and anthracycline -based neoadjuvant chemotherapy response in local advanced stadium breast cancer: A cohort study in Eastern Indonesia. *Annals of Medicine and Surgery*, 63, 102164. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.02.010>

Jess, T., Rungoe, C., & Peyrin-Biroulet, L. (2012). Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 10(6), 639–645. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2012.01.010>

Jiang, P., Du, W., & Yang, X. (2013). A critical role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in TAp73-mediated cell proliferation. *Cell Cycle*, 12(24), 3720–3726. <https://doi.org/10.4161/cc.27267>

Jones, N. P., & Schulze, A. (2012). Targeting cancer metabolism - Aiming at a tumour's sweet-spot. *Drug Discovery Today* (C. 17, Sayılar 5–6, ss. 232–241). Drug Discov Today. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.017>

Ju, H. Q., Lin, J. F., Tian, T., Xie, D., & Xu, R. H. (2020). NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00326-0>

Kannarkat, G., Lasher, E. E., & Schiff, D. (2007). Neurologic complications of chemotherapy agents. *Current opinion in neurology*, 20(6), 719–725. <https://doi.org/10.1097/WCO.0B013E3282F1A06E>

Kanser İstatistikleri - Ulusal Kanser Enstitüsü. (2020). <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>

Katt, W. P., Lukey, M. J., & Cerione, R. A. (2019). Starving the Devourer: Cutting Cancer Off from Its Favorite Foods. *Cell Chemical Biology* (C. 26, Sayı 9, ss. 1197–1199). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.09.005>

Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M. E., & Cuperlovic-culf, M. (2020). Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*, 10(10), 1–27. <https://doi.org/10.3390/BIOM10101429>

Khan, K. H., Blanco-Codecido, M., & Molife, L. R. (2014). Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 90(3), 200–219. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2013.12.012>

Kim, H., & Xue, X. (2020). Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2020(160), 1–5. <https://doi.org/10.3791/60682>

Kinno, R., Kii, Y., Uchiyama, M., Owan, Y., Yamazaki, T., & Fukui, T. (2014). 5-fluorouracil-induced leukoencephalopathy with acute stroke-like presentation fulfilling criteria for recombinant tissue plasminogen activator therapy. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases: the official journal of National Stroke Association*, 23(2), 387–389. <https://doi.org/10.1016/J.JSTROKECEREBROVASDIS.2013.01.014>

Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159–170. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81333-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81333-1)

Kong, Y., Chen, G., Xu, Z., Yang, G., Li, B., Wu, X., Xiao, W., Xie, B., Hu, L., Sun, X., Chang, G., Gao, M., Gao, L., Dai, B., Tao, Y., Zhu, W., & Shi, J. (2016). Pterostilbene induces apoptosis and cell cycle arrest in diffuse large B-cell lymphoma cells. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37417>

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>

Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., Van De Velde, C. J. H., & Watanabe, T. (2015). Colorectal Cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2015.65>

L.Omonosova, E., & C.Hinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27 Suppl 1(Suppl 1), S2–S19. <https://doi.org/10.1038/ONC.2009.39>

Larsen, B. D., & Sørensen, C. S. (2017). The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *The FEBS journal*, 284(8), 1160–1170. <https://doi.org/10.1111/FEBS.13970>

Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., & Earnshaw, W. C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371(6495), 346–347. <https://doi.org/10.1038/371346A0>

Lehúede, C., Dupuy, F., Rabinovitch, R., Jones, R. G., & Siegel, P. M. (2016). Metabolic plasticity as a determinant of tumor growth and metastasis. *Cancer Research*, 76(18), 5201–5208. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0266/660578/P/METABOLIC-PLASTICITY-AS-A-DETERMINANT-OF-TUMOR>

Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81590-1)

Liu, G., Pei, F., Yang, F., Li, L., Amin, A. D., Liu, S., Ross Buchan, J., & Cho, W. C. (2017). Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS18020367>

Liu, H., Zhao, S., Zhang, Y., Wu, J., Peng, H., Fan, J., & Liao, J. (2011). Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to polydatin-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(12), 3695–3703. <https://doi.org/10.1002/jcb.23303>

Liu, L., Shah, S., Fan, J., Park, J. O., Wellen, K. E., & Rabinowitz, J. D. (2016). Malic enzyme tracers reveal hypoxia-induced switch in adipocyte NADPH pathway usage. *Nature chemical biology*, 12(5), 345. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.2047>

Liu, Y., Hyde, A. S., Simpson, M. A., & Barycki, J. J. (2014). Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. *Advances in Cancer Research* (C. 122, ss. 69–101). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00002-5>

Lockshin, R. A., & Williams, C. M. (1965). Programmed Cell Death-I. Cytology Of Degeneration In The Intersegmental Muscles Of The Pernyi Silkmoth. *Journal of insect physiology*, 11(2). [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(65\)90099-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(65)90099-5)

Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* (C. 3, Sayı 5, ss. 330–338). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>

Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2014.10.016>

Lv, H., Zhen, C., Liu, J., Yang, P., Hu, L., & Shang, P. (2019). Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3150145>

Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: A therapeutic perspective. *Nature Reviews Clinical Oncology* (C. 14, Sayı 1, ss. 11–31). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.60>

Martins, M. R., Petronilho, F. C., Gomes, K. M., Dal-Pizzol, F., Streck, E. L., & Quevedo, J. (2008). Antipsychotic-induced oxidative stress in rat brain. *Neurotoxicity research*, 13(1), 63–69. <https://doi.org/10.1007/BF03033368>

McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>

Mele, L., Paino, F., Papaccio, F., Regad, T., Boocock, D., Stiuso, P., Lombardi, A., Liccardo, D., Aquino, G., Barbieri, A., Arra, C., Coveney, C., La Noce, M., Papaccio, G., Caraglia, M., Tirino, V., & Desiderio, V. (2018). A new inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase blocks pentose phosphate pathway and suppresses malignant proliferation and metastasis in vivo. *Cell Death & Disease*, 9(5), 572. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0635-5>

Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics*, 14(11), 1037. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>

Mishra, V., Thakur, S., Kesharwani, P., Gupta, P., & Vyas, M. (2018). Precision Medicine in Cancer Treatment: An Update. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 12(01), 9. <https://www.asiapharmaceutics.info/index.php/ajp/article/view/2034>

Mohamed, A., Deng, X., Khuri, F. R., & Owonikoko, T. K. (2014). Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for lung cancer. *Clinical Lung Cancer* (C. 15, Sayı 1, ss. 7–15). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.clc.2013.09.001>

Momcilovic, M., Bailey, S. T., Lee, J. T., Fishbein, M. C., Magyar, C., Braas, D., Graeber, T., Jackson, N. J., Czernin, J., Emberley, E., Gross, M., Janes, J., Mackinnon, A., Pan, A., Rodriguez, M., Works, M., Zhang, W., Parlati, F., Demo, S., ...

Shackelford, D. B. (2017). Targeted Inhibition of EGFR and Glutaminase Induces Metabolic Crisis in EGFR Mutant Lung Cancer. *Cell Reports*, 18(3), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.061>

Nagarajan, A., Malvi, P., & Wajapeyee, N. (2016). Oncogene-Directed Alterations in Cancer Cell Metabolism. *Trends in Cancer* (C. 2, Sayı 7, ss. 365–377). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.06.002>

National Cancer Institute. (2021). *What Is Cancer? - NCI*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

Newbold, A., Martin, B. P., Cullinane, C., & Bots, M. (2014). Detection of apoptotic cells using immunohistochemistry. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014(11), 1196–1201. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT082537>

Noordhuis, P., Holwerda, U., Van der Wilt, C. L., Van Groeningen, C. J., Smid, K., Meijer, S., Pinedo, H. M., & Peters, G. J. (2004). 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 15(7), 1025–1032. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDH264>

Oakes, S. A., Scorrano, L., Opferman, J. T., Bassik, M. C., Nishino, M., Pozzan, T., & Korsmeyer, S. J. (2005). Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1), 105–110. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0408352102>

Olofsson, M. H., Ueno, T., Pan, Y., Xu, R., Cai, F., Van Der Kuip, H., Muerdter, T. E., Sonnenberg, M., Aulitzky, W. E., Schwarz, S., Andersson, E., Shoshan, M. C., Havelka, A. M., Toi, M., & Linder, S. (2007). Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(11), 3198–3206. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0009>

Omran, A. R. (1971). The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change. *The Milbank Memorial Fund quarterly*, 49(4), 509–538. <https://doi.org/10.2307/3349375>

Öni, H., Ssk, E., Eğitim, T., Çocuk, H., Ve, S., Kliniği, H., Onkoloji, Ç., İliği, K., & Ünitesi, T. (2004). Apoptoz: Ölmeye Yatmak. *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi*, 14(1).

Palumbo, M. O., Kavan, P., Miller, W. H., Panasci, L., Assouline, S., Johnson, N., Cohen, V., Patenaude, F., Pollak, M., Jagoe, R. T., & Batist, G. (2013). Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. *Frontiers in Pharmacology*: C. 4 MAY. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00057>

Patra, K. C., & Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences* (C. 39, Sayı 8, ss. 347–354). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.005>

PDQ Cancer Genetics Editorial Board. (2002). Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®): Health Professional Version. *PDQ Cancer Information Summaries*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389505>

Pereira, C. V., Nadanaciva, S., Oliveira, P. J., & Will, Y. (2012). The contribution of oxidative stress to drug-induced organ toxicity and its detection in vitro and in vivo. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 8(2), 219–237. <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.645536>

Peter, G. J., & Van Groeningen, C. J. (1991). Clinical relevance of biochemical modulation of 5-fluorouracil. *Annals of Oncology* (C. 2, Sayı 7, ss. 469–480). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a057994>

Peter, M. E., & Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation*, 10(1), 26–35. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4401186>

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Alessia Garufi, & D’Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603. <https://doi.org/10.18632/AGING.100934>

Prete, A., Lo, A. S., Sadow, P. M., Bhasin, S. S., Antonello, Z. A., Vodopivec, D. M., Ullas, S., Sims, J. N., Clohessy, J., Dvorak, A. M., Sciuto, T., Bhasin, M., Murphy-Ullrich, J. E., Lawler, J., Ananth Karumanchi, S., & Nucera, C. (2018). Pericytes elicit resistance to vemurafenib and sorafenib therapy in thyroid carcinoma via the TSP-1/TGFB1 axis. *Clinical Cancer Research*, 24(23), 6078–6097. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0693>

Quade, B. J., Wang, T. Y., Sornberger, K., Dal Cin, P., Mutter, G. L., & Morton, C. C. (2004). Molecular Pathogenesis of Uterine Smooth Muscle Tumors from Transcriptional Profiling. *Genes Chromosomes and Cancer*, 40(2), 97–108. <https://doi.org/10.1002/gcc.20018>

Rang H., R. J. . F. R. . H. G. (2016). *Rang & Dale Farmacologia* (C. 8). elsevier. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=mtNy9DgYCIgC&oi=fnd&pg=PR13&ots=dkN3Flm-cx&sig=QBFNI_6tax-oWIDVUk5Ao--g4u4&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Reckzeh, E. S., Karageorgis, G., Schwalfenberg, M., Ceballos, J., Nowacki, J., Stroet, M. C. M., Binici, A., Knauer, L., Brand, S., Choidas, A., Strohmam, C., Ziegler, S., & Waldmann, H. (2019). Inhibition of Glucose Transporters and Glutaminase Synergistically Impairs Tumor Cell Growth. *Cell Chemical Biology*, 26(9), 1214–1228.e25. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.06.005>

Ren, D., Villeneuve, N. F., Jiang, T., Wu, T., Lau, A., Toppin, H. A., & Zhang, D. D. (2011). Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1433–1438. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014275108>

Riess, J. W., Frankel, P., Shackelford, D., Dunphy, M., Badawi, R. D., Nardo, L., Cherry, S. R., Lanza, I., Reid, J., Gonsalves, W. I., Kunos, C., Gandara, D. R., Lara, P. N., Newman, E., & Paik, P. K. (2021). Phase 1 Trial of MLN0128 (Sapanisertib) and CB-839 HCl (Telaglenastat) in Patients With Advanced NSCLC (NCI 10327): Rationale and Study Design. *Clinical Lung Cancer*, 22(1), 67–70. <https://doi.org/10.1016/J.CLCC.2020.10.006>

Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Powell, J., ... Staudt, L. M. (2002). The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, *346*(25), 1937–1947. <https://doi.org/10.1056/nejmoa012914>

Russo, M. M., & Sundaramurthi, T. (2019). An Overview of Cancer Pain: Epidemiology and Pathophysiology. *Seminars in Oncology Nursing*, *35*(3), 223–228. <https://doi.org/10.1016/J.SONCN.2019.04.002>

Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research*, *45*(3), 528–537. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00384-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00384-3)

Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(10), 21087. <https://doi.org/10.3390/IJMS141021087>

Schumacker, P. T. (2015). Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil. *Cancer Cell* (C. 27, Sayı 2, ss. 156–157). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.01.007>

Shah, M. A., Hamid, A., Faheem, H. I., Rasul, A., Baokbah, T. A. S., Haris, M., Yousaf, R., Saleem, U., Iqbal, S., Alves, M. S., Khan, Z., Hussain, G., Alsharfi, I., Khan, H., & Jeandet, P. (2022). Uncovering the Anticancer Potential of Polydatin: A Mechanistic Insight. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 7175, *27*(21), 7175. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217175>

Shaw, A. T., Winslow, M. M., Magendantz, M., Ouyang, C., Dowdle, J., Subramanian, A., Lewis, T. A., Maglathin, R. L., Tolliday, N., & Jacks, T. (2011). Selective killing of K-ras mutant cancer cells by small molecule inducers of oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(21), 8773–8778. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105941108>

Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*, 12(1), 376–390. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2012.10.004>

Spierings, D. C., De Vries, E. G., Vellenga, E., Van Den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H., & De Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. <https://doi.org/10.1369/jhc.3A6112.2004>

Stearman, R. S., Dwyer-Nield, L., Zerbe, L., Blaine, S. A., Chan, Z., Bunn, P. A., Johnson, G. L., Hirsch, F. R., Merrick, D. T., Franklin, W. A., Baron, A. E., Keith, R. L., Nemenoff, R. A., Malkinson, A. M., & Geraci, M. W. (2005). Analysis of orthologous gene expression between human pulmonary adenocarcinoma and a carcinogen-induced murine model. *American Journal of Pathology*, 167(6), 1763–1775. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61257-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61257-6)

Stefani, L., Galanti, G., & Klika, R. (2017). Clinical Implementation of Exercise Guidelines for Cancer Patients: Adaptation of ACSM's Guidelines to the Italian Model. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*, 2(1), 4. <https://doi.org/10.3390/jfmk2010004>

Stein, K. D., Denniston, M., Baker, F., Dent, M., Hann, D. M., Bushhouse, S., & West, M. (2003). Validation of a modified Rotterdam Symptom Checklist for use with cancer patients in the United States. *Journal of Pain and Symptom Management*, 26(5), 975–989. [https://doi.org/10.1016/S0885-3924\(03\)00321-X](https://doi.org/10.1016/S0885-3924(03)00321-X)

Study of CB-839 in Combination w/ Paclitaxel in Patients of African Ancestry and Non-African Ancestry With Advanced TNBC - Full Text View - ClinicalTrials.gov. (2017). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03057600>

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(7). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24071317>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence

and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Tafazoli, S., Spehar, D. D., & O'Brien, P. J. (2005). Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity. *Drug metabolism reviews*, 37(2), 311–325. <https://doi.org/10.1081/DMR-55227>

Tanaka, T., & Gotay, C. C. (1998). Physicians' and medical students' perspectives on patients' quality of life. *Academic Medicine*, 73(9), 1003–1005. <https://doi.org/10.1097/00001888-199809000-00022>

Tang, Z., Xu, Z., Zhu, X., & Zhang, J. (2021). New insights into molecules and pathways of cancer metabolism and therapeutic implications. *Cancer Communications* (C. 41, Sayı 1, ss. 16–36). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cac2.12112>

Testa, U., Pelosi, E., & Castelli, G. (2018). Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences*, 6(2), 31. <https://doi.org/10.3390/MEDSCI6020031>

Thompson, R. M., Dytfeld, D., Reyes, L., Robinson, R. M., Smith, B., Manevich, Y., Jakubowiak, A., Komarnicki, M., Przybylowicz-Chalecka, A., Szczepaniak, T., Mitra, A. K., Van Ness, B. G., Luczak, M., & Dolloff, N. G. (2017). Glutaminase inhibitor CB-839 synergizes with carfilzomib in resistant multiple myeloma cells. *Oncotarget*, 8(22), 35863. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.16262>

Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery* (C. 8, Sayı 7, ss. 579–591). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd2803>

Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., Chiao, P. J., Achanta, G., Arlinghaus, R. B., Liu, J., & Huang, P. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell*, 10(3), 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.009>

Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., Marinari, U. M., & Domenicotti, C. (2013). Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/972913>

Ulukaya, E., Karaagac, E., Ari, F., Oral, A. Y., Adim, S., Tokullugil, A. H., & Evrensel, T. (2011). Chemotherapy increases caspase-cleaved cytokeratin 18 in the serum of breast cancer patients. *Radiology and oncology*, 45(2), 116–122. <https://doi.org/10.2478/V10019-011-0006-7>

Usta Yeşilbalkan, Ö., Durmaz Akyol, A., Çetinkaya, Y., Altın, T., & Ünlü, D. (2005). Kemoterapi Tedavisi Alan Hastaların Tedaviye Bağlı Yaşadıkları Semptomlar Ve Yaşam Kalitesine Olan Etkisinin İncelenmesi. *Ege Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi*, 21(1), 13–31. <https://dergipark.org.tr/en/pub/egehemsire/issue/49611/635861>

Van Kuilenburg, A. B. P. (2004). Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 40(7), 939–950. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2003.12.004>

Vasen, H. F. A., Tomlinson, I., & Castells, A. (2015). Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 12(2), 88–97. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2014.229>

Wang, H. (2020). MicroRNAs and Apoptosis in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–15. <https://doi.org/10.3390/IJMS21155353>

Wang, K., Jiang, J., Lei, Y., Zhou, S., Wei, Y., & Huang, C. (2019). Targeting Metabolic–Redox Circuits for Cancer Therapy. *Trends in Biochemical Sciences* (C. 44, Sayı 5, ss. 401–414). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.01.001>

Wang, Y., Qi, H., Liu, Y., Duan, C., Liu, X., Xia, T., Chen, D., Piao, H. L., & Liu, H. X. (2021). The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics*, 11(10), 4839. <https://doi.org/10.7150/THNO.56747>

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

Welbourne, T. C. (1979). Ammonia production and glutamine incorporation into glutathione in the functioning rat kidney. *Canadian Journal of Biochemistry*, 57(3), 233–237. <https://doi.org/10.1139/o79-029>

Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87/TABLES/3>

Wu, X., Zhu, Y., Yan, H., Liu, B., Li, Y., Zhou, Q., & Xu, K. (2010). Isothiocyanates induce oxidative stress and suppress the metastasis potential of human non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-269>

Yang, H. C., Wu, Y. H., Yen, W. C., Liu, H. Y., Hwang, T. L., Stern, A., & Chiu, D. T. Y. (2019). The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer. *Cells* (C. 8, Sayı 9). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells8091055>

Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19, 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>

Yao, D., Huang, L., Ke, J., Zhang, M., Xiao, Q., & Zhu, X. (2020). Bone metabolism regulation: Implications for the treatment of bone diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (C. 129). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110494>

Yuan, S., & Akey, C. W. (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure (London, England: 1993)*, 21(4), 501–515. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2013.02.024>

Zahra, K. F., Lefter, R., Ali, A., Abdellah, E. C., Trus, C., Ciobica, A., & Timofte, D. (2021). The Involvement of the Oxidative Stress Status in Cancer Pathology: A Double View on the Role of the Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9965916>

Zhang Dongmei; Zhang Yaming. (2016). Polydatin reverses the multi-drug resistance to oxaliplatin in human colon HT-29 cells. *Journal Of Modern Oncology*, 2505–2508. <http://www.xdzlyx.com/en/oa/darticle.aspx?type=view&id=201616001>

Zhang, T., Zhu, X., Wu, H., Jiang, K., Zhao, G., Shaukat, A., Deng, G., & Qiu, C. (2019). Targeting the ROS/PI3K/AKT/HIF-1 α /HK2 axis of breast cancer cells: Combined administration of Polydatin and 2-Deoxy-d-glucose. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(5), 3711–3723. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14276>

Zhao, M. X., Wen, J. L., Wang, L., Wang, X. P., & Chen, T. S. (2019). Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species. *Cell Stress & Chaperones*, 24(3), 609. <https://doi.org/10.1007/S12192-019-00993-1>

Zhao, Y., Feng, X., Chen, Y., Eva Selfridge, J., Gorityala, S., Du, Z., Wang, J. M., Hao, Y., Cioffi, G., Conlon, R. A., Barnholtz-Sloan, J. S., Saltzman, J., Krishnamurthi, S. S., Vinayak, S., Veigl, M., Xu, Y., Bajor, D. L., Markowitz, S. D., Meropol, N. J., ... Wang, Z. (2020). 5-fluorouracil enhances the antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 against PIK3CA-mutant colorectal cancers. *Cancer Research*, 80(21), 4815–4827. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0600>

Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., Yang, W., Tian, C., Miao, Z., Wang, T., & Yang, S. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 201. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w>

Zimmermann, S. C., Wolf, E. F., Luu, A., Thomas, A. G., Stathis, M., Poore, B., Nguyen, C., Le, A., Rojas, C., Slusher, B. S., & Tsukamoto, T. (2016). Allosteric Glutaminase Inhibitors Based on a 1,4-Di(5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-yl)butane Scaffold. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7(5), 520–524. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.6b00060>

Zou, Z., Tao, T., Li, H., & Zhu, X. (2020). MTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: Progress and challenges. *Cell and Bioscience* (C. 10, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1>



EKLER

EK - 1 : İNTİHAL RAPORU

EK - 2 : ÖZGEÇMİŞ



EK-1: İNTİHAL RAPORU

SM YL TEZ

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 10	% 1	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
4	yonetim.citius.technology İnternet Kaynağı	% 1
5	arastirma.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	iksadyayinevi.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Yakın Doğu Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	muweb.mu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1