

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM

DALI

HT-29 İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA
ERİODİCTYOL VE BRUSATOL'UN 5-FLOROURASİL
İLE KULLANIMININ HÜCRE CANLILIĞI VE
APOPTOZ ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUSE ARDIL

MART/2022

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

HT-29 İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA
ERİODİCTYOL VE BRUSATOL'UN 5-FLOROURASİL
İLE KULLANIMININ HÜCRE CANLILIĞI VE
APOPTOZ ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUSE ARDIL

MART/2022

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Buse Ardıl tarafından hazırlanan **HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattında Eriodictyol ve Brusatol'un 5-Florourasil ile Kullanımının Hücre Canlılığı ve Apoptoz Üzerindeki Potansiyel Etkilerinin Araştırılması** başlıklı tezin 10.03.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ (Jüri Başkanı) Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza
Dr. Öğr Üyesi Mehlika ALPER (Danışman) Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza
Prof. Dr. Reşat ÜNAL (Üye) Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza
Prof. Dr. Yavuz DODURGA (Üye) Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Pamukkale Üniversitesi, Denizli	İmza
Doç. Dr. Özgür TANRIVERDİ (Üye) İç Hastalıkları Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza

ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Reşat ÜNAL (Bölüm Başkanı / Anabilim Dalı Başkanı) Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mehlika ALPER Danışman, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza

Savunma Tarihi: 10.03.2022

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Buse ARDIL

10.03.2022

ÖZET

HT-29 İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA ERİODİCTYOL VE BRUSATOL'UN 5-FLOROURASİL İLE KULLANIMININ HÜCRE CANLILIĞI VE APOPTOZ ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Buse ARDIL

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehlika ALPER

Mart 2022, 98 sayfa

Kanser önemli ölüm nedenlerinden biridir. Kanser tedavisi için kullanılan geleneksel yöntemlerin yan etkileri nedeniyle, kanseri önlemek veya tedavi etmek için yeni stratejiler geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda kanser tedavisinde kombine yaklaşımın önemi vurgulanmıştır. Çok eski çağlardan beri insanoğlunun başvurduğu doğa aktif ve güvenli anti-kanser ajanları için büyük bir zenginliğe sahiptir.

Kolorektal kanser en sık teşhis edilen kanserler arasındadır. Bu hastalığın tedavisinde geleneksel olarak cerrahi yöntem ve kemoterapinin yanı sıra tedaviyi geliştirmenin ve yan etkileri ertelemenin potansiyel bir yolu olarak kombinasyon veya çok bileşenli tedavi gösterilmektedir. Bu çalışmada bildiğimiz kadarıyla ilk defa ticari Eriodictyol ve Brusatol'un insan kolon kanseri/kolorektal kanser hücre hattında (HT-29 hücre hattı) 5-FU antikanser ilacı ile birlikte kullanımlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra apoptoz üzerindeki potansiyel etkilerinin de değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle etken maddelerin ayrı ayrı ve kombine uygulamalarının HT-29 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkileri doz ve zamana bağlı olarak MTT deneyi ile araştırılmıştır ve her bir etken maddenin IC₅₀ değeri belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri dikkate alınarak etken maddelerin ayrı ayrı ve kombine uygulamalarının HT-29 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saat için değerlendirilmiştir ve kombinasyon indeksi değerleri hesaplanmıştır. Brusatol veya Eriodictyol'un IC₅₀ ve IC₅₀/2 konsantrasyonları ile 5-FU'nun IC₅₀ konsantrasyonları ile yapılan kombinasyon uygulamalarının apoptoz üzerindeki etkisi ise Annexin V/PI boyama ve apoptotik genlerin Real-Time PCR analizi ile 48 saat için araştırılmıştır. Ayrıca etken maddelerin tek başına ve kombin uygulamalarının hücre döngü profili üzerindeki etkisi de 48 saat için incelenmiştir. En düşük IC₅₀ değerleri Brusatol için hesaplanmıştır. Brusatol'un 24, 48 ve 72. saatler için hesaplanan IC₅₀ değerleri sırasıyla 109.5, 1.15 ve 0.96 µM'dır. Kombinasyon uygulamalarında hesaplanan Kİ değerleri farklılık göstermektedir. Brusatol ve 5-Florourasil'in yapılan

kombin uygulamaları arasında Brusatol'ün IC_{50} ve $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonları ile 5-FU'nun IC_{50} ve $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonları ile yapılan kombin uygulamaların ortak olarak 24 ve 48 saatte sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir. 48 saatte Eriodictyol'ün $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonu ile 5-FU'nun IC_{50} ve $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonlarının yanı sıra Eriodictyol'ün IC_{50} ve 5-FU'nun $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonları ile yapılan kombin uygulamaların etkisinin sinerjik olduğu grlmştr. Brusatol'dan farklı olarak Eriodictyol'n 5-FU ile 72 saat kombin uygulamalarında sinerjik etki belirlenmiştir. Brusatol, Eriodictyol ve 5-FU'nun test edilen l kombinasyonlarının ise her inkübasyon zamanı için antagonist olduğu tespit edilmiştir. Brusatol'n 5-FU ile denenen kombin uygulamalarında toplam apoptotik hücre yüzdesinin etken maddelerin tek başlarına neden olduğu toplam apoptotik hücre yüzdesine kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Real time PCR analizi sonuçlarına göre test edilen genler içerisinde *bax* ve *kaspaz-3* apoptotik gen seviyesindeki anlamlı artış Brusatol ve 5-FU'nun IC_{50} değerindeki konsantrasyonları ile yapılan kombinasyonda tespit edilmiştir. Bununla birlikte Brusatol ve Eriodictyol'n tek başlarına HT-29 hücrelerinde kontrole kıyasla özellikle S evresindeki hücre yüzdesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Brusatol'n 5-FU ile kombinasyon uygulamalarında yine özellikle S evresindeki hücre yüzdesinin kontrole kıyasla daha fazla olduğu grlmştr. 48 saat için yapılan deneylerden elde edilen veriler Eriodictyol'e göre Brusatol'n tek başına veya 5-FU ile kombinasyon halinde HT-29 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdesinde artışa neden olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler özellikle kolon kanserine karşı kombin veya diğer alternatif yaklaşımlarına temel veri sağlayabilir. Yapılacak in vivo çalışmalar bu etken maddelerin kullanımına yönelik çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Eriodictyol, Brusatol, HT-29 hücre hattı, hücre canlılığı, apoptoz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL EFFECTS OF ERIODICTYOL AND BRUSATOL WITH 5-FLOROURACIL ON CELL VITALITY AND APOPTOSIS IN HT-29 HUMAN COLON CANCER CELL

Buse ARDIL

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehlika ALPER

March 2022, 98 pages

Cancer is one of the major causes of death. Due to the side effects of traditional methods used for the treatment of cancer, studies on developing new strategies to prevent or treat cancer have gained momentum. In recent studies, the importance of a combined approach in cancer treatment has been emphasized. Nature has a great wealth of active and safe anti-cancer agents, which mankind has applied to since ancient times.

Colorectal cancer is among the most frequently diagnosed cancers. Combination or multicomponent therapy is traditionally indicated for the treatment of this disease alongside surgery and chemotherapy as a potential way to improve treatment and delay side effects. In this study, it was aimed to determine the effects of commercial Eriodictyol and Brusatol together with 5-FU anticancer drug in human colon cancer/colorectal cancer cell line (HT-29 cell line) on cell viability for the first time as far as we know, as well as to evaluate the potential effects on apoptosis. For this purpose, first of all, the effects of separate and combined applications of active substances on cell viability in the HT-29 cell line were investigated depending on dose and time with the MTT experiment, and the IC_{50} value of each active substance was determined. Considering the IC_{50} values, the effects of the individual and combined applications of the active substances on cell viability in the HT-29 cell line were evaluated for 24, 48 and 72 hours, and the combination index values were calculated. The effects of combination treatments with IC_{50} and $IC_{50}/2$ concentrations of Brusatol or Eriodictyol and IC_{50} concentrations of 5-FU on apoptosis were investigated for 48 hours by Annexin V/PI staining and Real-Time PCR analysis of apoptotic genes. In addition, the effect of the combined applications of the active substances on the cell cycle profile was also investigated for 48 hours. The lowest IC_{50} values were calculated for Brusatol. The IC_{50} values of Brusatol calculated for 24, 48 and 72 hours are 109.5, 1.15 and 0.96 μ M, respectively. CI values calculated in combination applications

differ. Among the combined applications of Brusatol and 5-Fluorouracil, it was determined that the IC_{50} and $IC_{50}/2$ value of Brusatol and the combined applications of 5-FU with the IC_{50} and $IC_{50}/2$ value of the combined applications showed a synergistic effect in 24 and 48 hours. It has been observed that the effect of combined applications with the $IC_{50}/2$ concentration of Eriodictyol and the IC_{50} and $IC_{50}/2$ concentrations of 5-FU in 48 hours, as well as the IC_{50} and $IC_{50}/2$ value of Eriodictyol concentrations, is synergistic. Unlike Brusatol, a synergistic effect was determined in the combination of 5-FU with Eriodictyol for 72 hours. The triple combinations of Brusatol, Eriodictyol and 5-FU tested were found to be antagonists for each incubation time. It was determined that the percentage of total apoptotic cells in combined applications of Brusatol with 5-FU was higher than the percentage of total apoptotic cells caused by the active substances alone. According to the results of real time PCR analysis, a significant increase in the level of *bax* and *caspase-3* apoptotic genes among the tested genes was detected in combination with the IC_{50} concentrations of Brusatol and 5-FU. However, it was determined that Brusatol and Eriodictyol alone caused an increase in the percentage of cells in HT-29 cells compared to the control, especially in the S phase. In the combination applications of Brusatol with 5-FU, it was observed that the percentage of cells, especially in the S phase, was higher than the control. Data from experiments for 48 hours showed that Brusatol, alone or in combination with 5-FU, can cause an increase in the percentage of apoptotic cells in HT-29 cells compared to Eriodictyol. The data obtained from this study can provide basic data for combination or other alternative approaches, especially against colon cancer. In vivo studies will contribute to studies on the use of these active substances.

Keywords: Eriodictyol, Brusatol, HT-29 cell line, cell viability, apoptosis

Canim aileme,



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübe ve fikirleri ile bana yol gösteren, tez çalışmamın tamamlanmasında manevi desteğini, teşviklerini, yardımlarını ve tavsiyelerini benden esirgemeyen danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehlika ALPER'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca verdiği destek ve tavsiyelerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini bana hissettiren Sayın Prof. Dr. Ramazan MAMMADOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yüksek lisans tez jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Reşat ÜNAL, Prof. Dr. Yavuz DODURGA ve Doç. Dr. Özgür TANRIVERDİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Flow sitometri ve Real-Time PCR analizleri çalışmalarımda emeği geçen öğretim görevlisi Özgür OKUR ve Dr. Arş. Gör. Mücahit SEÇME'ye teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, tez çalışmam sırasında beni her zaman destekleyen ve motive eden Ahmet CAN'a sonsuz sevgisi için teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardım ve desteğini benden esirgemeyen sevgili dostum ve laboratuvar arkadaşım Burcu ŞAHİN'e, doğal ürünler ve biyoteknoloji laboratuvarındaki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her anımda yanımda olan, bana inanan ve yol gösteren sevgili annem Ayşegül ARDIL, sevgili babam Ahmet ARDIL ve sevgili kardeşim Beste ARDIL'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu proje Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 20/113/01/1/4 proje numarası ile desteklenmiştir. Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne desteğinden ötürü teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser	3
1.1.2. Kanser Tedavi Yöntemleri.....	4
1.1.1.1. Cerrahi Müdahale	5
1.1.1.2. Radyasyon Terapisi	5
1.1.1.3. Kemoterapi	6
1.1.1.4. Hormon Terapisi	8
1.1.1.5. Antianjiyogenez İnhibitörleri	8
1.1.1.6. Kanser Tedavisinde Kök Hücrelerin Rolü	8
1.1.1.7. Kanser İmmünoterapisi İçin Otolog Dendritik Hücre Aşıları	9
1.1.1.8. Kombine Terapi.....	9
1.2. Kolorektal/Kolon Kanseri.....	10
1.2.1. 5-Florourasil (5-FU) ve Mekanizması.....	11
1.3. HT-29 İnsan Kolorektal Kanseri Hücre Hattı.....	14
1.4.Doğal Ürünlerin Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	14
1.4.1. Brusatol.....	15
1.4.2. Eriodictyol	16
1.5.Apoptoz	18
1.5.2.Apoptotik Proteinler	19
1.5.3.Apoptoz Yolakları	20

1.5.1.1.Mitokondria Aracılı Apoptoz: İçsel Yolak.....	20
1.5.1.2.Ölüm Reseptörü Aracılı Apoptoz: Dışsal Yolak.....	20
1.5.1.3.Perforin/Granzim Yolağı.....	21
1.5.1.4.İnfaz Yolu	22
1.5.3.Kanser Terapisinde Apoptozu Hedefleme.....	23
1.6.Hücre Döngüsü	24
1.6.1. Kanserde Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	25
1.6.2. Siklin:CDK Komplekslerinin Kanserde Rolü	26
1.6.3. Kanserde Hücre Döngüsünü Hedefleme	27
1.7.AmaçveKapsam.....	27
2. MATERYAL VE METOT.....	28
2.1.Materyaller	28
2.1.1.Kullanılan Kimyasallar.....	28
2.1.2.Kullanılan Kitler	28
2.1.3.KullanılanCihazlar.....	29
2.2.Yöntemler.....	30
2.2.1.Hücre Kültürü	30
2.2.1.1.Kullanılan Hücre Hattı	30
2.2.1.2.HT-29 Hücreleri İçin Hücre Kültürü Koşulları	30
2.2.1.3.HT-29 Hücrelerinin Pasajlanması ve Hücre Sayımı	30
2.2.1.4.HT-29 Hücre Hattından Stok Alma.....	31
2.2.1.5.Stoktaki HT-29 Hücrelerinin Çözülmesi	31
2.2.2.Etken Maddelerin Hazırlanması	31
2.2.3.MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	31
2.2.3.1.Kombinasyon İndeksinin Hesaplanması (Kİ)	33
2.2.4.Etken Maddelerin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi.....	33
2.2.4.1.Flow sitometi ile Apoptozun Araştırılması.....	33

2.2.4.2. Real Time PCR İle Apoptozun Araştırılması	34
2.2.5. Flow Sitometri ile Hücre Döngü Profilinin Belirlenmesi.....	36
3. BULGULAR	38
3.1. Brusatol'ün Konsantrasyon ve Zamana Bağlı Olarak HT-29 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	38
3.2. Eriodictyol'ün Konsantrasyon ve Zamana Bağlı Olarak HT-29 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	39
3.3. 5-Florourasil'in Konsantrasyon ve Zamana Bağlı Olarak HT-29 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	40
3.4. Kombin Uygulamalar.....	41
3.4.1. Brusatol ve 5-FU Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	41
3.4.1.1. Brusatol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 24 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri.....	41
3.4.1.2. Brusatol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 48 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri.....	42
3.4.1.3. Brusatol ve 5-Fluorourasil Kombinasyonunun 72 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri	43
3.4.2. Eriodictyol ve 5-FU Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	45
3.4.2.1. Eriodictyol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 24 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri	45
3.4.2.2. Eriodictyol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 48 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri	46
3.4.2.3. Eriodictyol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 72 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri	47
3.4.3. Brusatol ve Eriodictyol ile Brusatol, Eriodictyol ve 5-FU'nun Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	48
3.4.3.1. Brusatol-Eriodictyol Kombinasyonunun 24, 48 ve 72 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri	48

3.4.3.2. <i>Brusatol-Eriodictyol-5-FU Kombinasyonunun 24, 48 ve 72 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri</i>	50
3.5.Etken Maddelerin Ayrı Ayrı ve Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Hattında Apoptotik Etkilerinin Araştırılması	51
3.5.1.Etken Maddelerin Ayrı Ayrı ve Kombinasyonlarının Annexin-V/FITC Yöntemi ile Potansiyel Apoptotik Etkilerinin Araştırılması	51
3.5.2. Etken Maddelerin Ayrı Ayrı ve Kombinasyonlarının Real-Time PCR Analizi İle Potansiyel Apoptotik Etkilerinin Araştırılması	54
3.6.Etken Maddelerin Ayrı Ayrı ve Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Hattında Hücre Döngüsü Analizleri	56
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	61
KAYNAKÇA	71
ÖZGEÇMİŞ	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Çeşitli anti-kanser kemoterapötik ilaç sınıfları ve örnekleri (Abbas ve Rehman., 2018'den türkçeleştirilmiştir.)	7
Çizelge 2. 1. Kullanılan kimyasallar	27
Çizelge 2. 2. Kullanılan kitler	28
Çizelge 2. 3. Kullanılan cihazlar	28
Çizelge 2. 4. Etken maddelerin uygulama planı	31
Çizelge 3. 1. 24 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri	42
Çizelge 3. 2. 48 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri	43
Çizelge 3. 3. 72 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri	44
Çizelge 3. 4. 24 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri	46
Çizelge 3. 5. 48 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri	47
Çizelge 3. 6. 72 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri	48
Çizelge 3. 7. 24, 48 ve 72 saatte Bru ve Erio kombinasyonlarının Kİ değerleri	49
Çizelge 3. 8. 24, 48 ve 72 saatte Bru, Erio ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri	51
Çizelge 3. 9. 48 saatte Bru ve 5-FU'nun tek başlarına ve kombinasyonlarının flow sitometri sonuçları	53
Çizelge 3. 10. 48 saatte Erio ve 5-FU'nun tek başlarına ve kombinasyonlarının flow sitometri sonuçları	54
Çizelge 3. 11. 48 saatte 5-FU'nun Real-Time PCR analizleri	55
Çizelge 3. 12. 48 saatte Bru'nun tek başına ve 5-FU ile kombin uygulamalarının Real-Time PCR analizleri	56
Çizelge 3. 13. 48 saatte Erio'nun tek başına ve 5-FU ile kombin uygulamalarının Real-Time PCR analizleri	56
Çizelge 3. 14. 48 saatte Bru ve 5-FU'nun tek başlarına ve kombin uygulamalarının hücre döngüsü analizleri	59
Çizelge 3. 15. 48 saatte Erio'nun tek başına ve 5-FU ile kombinasyonlarının hücre döngüsü analizleri	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.Kanserin özellikleri (Hanahan., 2022’den türkçeleştirilmiştir.)	4
Şekil 1.2. 5-FU’nun farmakolojik mekanizması (Xie vd., 2020’den türkçeleştirilmiştir.)	13
Şekil 1.3. Brusatol’ün kimyasal yapısı (Yu vd., 2020)	15
Şekil 1.4. Eriodictyol’ün kimyasal yapısı (Islam vd., 2020).....	17
Şekil 1.5. Apoptotik hücrenin farklı evreleri (Panda vd., 2020’den türkçeleştirilmiştir.)	18
Şekil 1.6. Dışsal apoptotik yolak (Celepli vd., 2020)	21
Şekil 1.7. Perforin/Granzim yolağı (Celepli vd., 2020)	22
Şekil 1.8. İnfaz yolağı (Celepli vd., 2020)	23
Şekil 3. 1. Bru’nun konsantrasyon ve zamana bağlı olarak HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	38
Şekil 3. 2.Erio’nun konsantrasyon ve zamana bağlı olarak HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	39
Şekil 3. 3. 5-FU’nun konsantrasyon ve zamana bağlı olarak HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	40
Şekil 3. 4. 24 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	41
Şekil 3. 5.48 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	43
Şekil 3. 6. 72 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	44
Şekil 3. 7.24 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	45
Şekil 3. 8. 48 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	46
Şekil 3. 9. 72 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	47
Şekil 3. 10. 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatte Erio ve Bru kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	49

Şekil 3. 11. 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatte Bru, Erio ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	50
Şekil 3. 12. 48 saatte Bru ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombin uygulamalarının HT-29 hücrelerinde flow sitometri ile apoptozun analizi	52
Şekil 3. 13. 48 saatte Erio ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombin uygulamalarının HT-29 hücrelerinde flow sitometri ile apoptozun analizi	54
Şekil 3. 14. 48 saatte Bru ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombinasyonlarının HT-29 hücrelerinde flow sitometri ile hücre döngüsü analizi.....	58
Şekil 3. 15. 48 saatte Erio ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombinasyonlarının HT-29 hücrelerinde flow sitometri ile hücre döngüsü analizi.....	60



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
5-FdUMP	5-florourasildeoksinükleotid
5-FU	5-Florourasil
ABS	Absorbans
ALL	Akut lenfosittik lösemi
Aven	Hücre ölüm düzenleyicisi
Bcl-w	Bcl-2 benzeri protein
Bru	Brusatol
CAD	Kaspaz aktive edilmiş deoksinükleaz
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDKI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
c-FLIP	Hücresele FLICE inhibitör proteini
CO ₂	Karbondioksit
CRC	Kolorektal kanser
CTL	Sitotoksik T lenfositleri
DC	Dendritik hücreler
DED	Ölüm efektör alanı
DISC	Ölüm indükleyen sinyal kompleksi
Dk	Dakika

DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPD	Dihidropirimidin dehidrojenaz
dUMP	Deoksiüridilik asit
Erio	Eriodictyol
EST	Estramustin
FADD	Fas ile ilişkili ölüm alanı
FBS	Fetal Bovin Serum
FITC	Floresan İzotiyosinat
FP	Floropirimidinler
GLOBOCAN	Global kanser izlemi
GM-CSF	Granülosit Makrfaj-Koloni Uyarıcı Faktör
h	Saat
IC ₅₀	%50 öldürücü konsantrasyon
IL-4	İnterlökin-4
Kaspaz-9	Sisteinil aspartik asit-proteaz-9
KHDAK	Küçük hücreli olmayan akciğer karsinoma
Kİ	Kombinasyon İndeksi
LBH-589	Panobinostat
LV	Leucovorin
mL	Mililitre
MTHFR	Metilen tetrahidrofolat redüktaz
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)
NGF	Natoginseng çiçeği özütü

Nox	Phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1
PBS	Fosfat Tampon Çözeltilisi
ROS	Reaktif oksijen türleri
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SAC	İğ ipliği oluşum kontrol noktası
sn	Saniye
TRDD	TNF reseptörü ile ilişkili ölüm etki alanı
TS	Timidilat sentaz

1. GİRİŞ

Hücre ve dokuları etkileyen kanser (Klug ve Michaels, 2002), anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ile karakterize edilen geniş bir hastalık grubunu tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir (Hannahan ve Weinberg, 2000). Kanser, hücrelerin köklü metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdiği çok aşamalı bir süreçtir (Merlo vd., 2006). Dünyada en önemli ölüm nedenlerinden biri olan kanserin tedavisinde kullanılan yöntemler cerrahi girişim, kemoterapi ve ışınla tedavi olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir (Ölgen vd., 2002). Ancak bu tedavi yöntemleri hem tümör dokusuna hem de normal dokuya zarar verebilmektedir (Tran vd., 2017). Bununla birlikte hormon terapisi ve çeşitli biyolojik yöntemlerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar da mevcut diğer yöntemlere destek olacak şekilde uygulanabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunduğundan ayrıca tedaviler kişiden kişiye farklılık gösterebildiğinden kanserin tedavisi için kesin bir yöntemin varlığından söz etmek mümkün olmamaktadır (Baykara, 2016).

Bitkiler, hayvanlar ve minerallerin de dahil olduğu doğal ürünler çeşitli hastalıkların tedavisinde tarih boyunca yer almıştır. Birçok ilaç, ya doğal ürün ya da bunların türevleri olduğundan, doğal ürünler ilaç araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır (Lahlou, 2013). Kemoterapötik ilaçlara karşı direncin hızla gelişmesi nedeniyle kanser tedavisi için yeni ilaçların araştırılması hala öncelikli hedeflerdendir. Ayrıca, genellikle bazı kanser kemoterapi ilaçları ve bunların istenmeyen yan etkileri ile ilişkili yüksek toksisite, tedavi edilemeyen tümörlere karşı daha az yan etkili ve daha yüksek terapötik etkinlikli yeni aktif anti-tümör ilaçlarına olan talebi arttırmaktadır. Doğal ürünler önemli anti-kanser ajanlarıdır. Anti-tümör etki gösteren bileşenlerin çeşitli mekanizmalar ile etki ettikleri bilinmektedir. Bunlar arasında apoptozu indükleme, mitokondriyal permeabilizasyon, sinyal iletiminde veya hücresel metabolizmada görevli anahtar enzimlerin inhibisyonu ve tümör kaynaklı anjiyogenezi inhibe etme sayılabilir (Demain ve Vaishnav, 2011).

Geleneksel ilaçların yüksek maliyeti, yan etkileri ve terapötik kısıtlamaları nedeniyle, bitkisel tedaviler yeniden önem kazanmıştır. Bitkiler, belirli sentetik ve farmasötik koruyucu ve terapötik ajanlarla sinerjistik aktiviteye sahip olabilir (Gullet vd., 2010). Doğal biyoaktif moleküller, tümör hücresi davranışını değiştirerek ve birkaç anormal

olarak aktifleştirilmiş sinyal yolunu hedefleyerek karsinogenez sürecine müdahale edebilir (Fabiani, 2020; Nobili vd., 2009).

İki veya daha fazla terapötik ajanın birlikte kullanımı ile yapılan tedavi yöntemi kombinasyon terapisi olarak bilinir ve bu tedavi şekli kanser tedavisinin temel taşıdır (Bayat Mokhtari vd., 2017). Kanser tedavisinde kombine yaklaşımın etkisi ayrı uygulama üzerindeki etkilerine göre sinerjistik (artmış), antagonistik (azaltılmış) ve aditif/özdeş olarak ayrılabilir (Rejhová vd., 2018). Monoterapi yaklaşımına kıyasla anti-kanser ilaçlarının birlikte kullanılmasının tipik olarak sinerjik veya ek bir şekilde anahtar yolları hedeflediği için etkinliği arttırdığı belirtilmiştir. Bununla birlikte bu yaklaşımın potansiyel olarak ilaç direncini azaltırken aynı zamanda tümör büyümesini ve metastatik potansiyeli azaltmak, mitotik olarak aktif hücreleri tutuklamak ve apoptozu indüklemek gibi terapötik anti-kanser faydalar sağladığı ifade edilmiştir. Kullanılan ajanlardan biri kemoterapötik olduğunda kombinasyon tedavisi toksik olabilse de farklı yollar hedefleneceğinden toksisitenin önemli ölçüde daha az olması söz konusudur. Böyle bir durumda, her bir ilacın daha düşük terapötik dozajı gerekli olacaktır (Bayat Mokhtari vd., 2017).

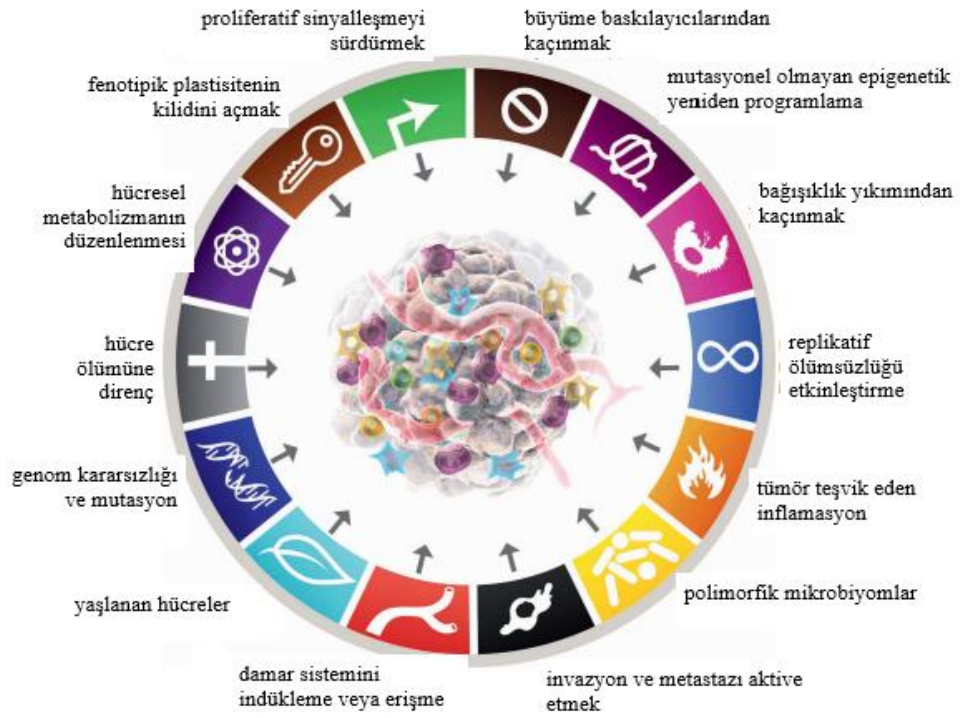
Kolorektal kanser önemli bir halk sağlığı sorunudur ve en sık teşhis edilen üçüncü kanserdir (Favoriti vd, 2016). Kolorektal kanserin geleneksel tedavisi arasında cerrahi yöntem ve kemoterapi yer almaktadır. En yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlar platin türevleri (oksaliplatin), antimetabolitler (kapesitabin, 5-florourasil), topoizomeraz inhibitörleri (irinotekan) ve Tegafur / urasil (UFT) 'dir. İleri kolorektal kanserin birinci basamak kemoterapisi 5-florourasil (5-FU) ile lökovorinin (folinik asit) tek başına veya oksaliplatin ile kombinasyon halinde kullanımına dayanmaktadır. Metastatik kolorektal kanser tedavisinin 5-FU veya irinotekan ile kombinasyonundan oluştuğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ileri kolorektal kanserde 5-FU monoterapisine genel yanıt oranının %10-15 ile sınırlı olduğu ifade edilmektedir. Tedaviyi geliştirmenin ve yan etkileri ertelemenin potansiyel bir yolu olarak kombinasyon veya çok bileşenli tedavi gösterilmektedir. Diğer sitotoksik ilaçlarla birlikte 5-FU'nun kullanımının tedaviye yanıt oranlarını arttırabileceği ve aynı zamanda bu ilaçların istenmeyen reaksiyonunu da azaltabileceği belirtilmiştir. Bazı doğal bileşikler, geleneksel sitotoksik tedaviyi duyarlı hale getirebilir, ilacın etkin konsantrasyonunu güçlendirebilir, uygulanan terapötiklerin kombine etkisini kuvvetlendirebilir veya

spesifik olarak tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere neden olabilir (Rejhová vd., 2018).

Eriodictyon californicum, *Millettia duchesnei*, *Eupatorium arnottianum* ve *Rosa canina* gibi birçok bitkiden ekstrakte edilebilen Eriodictyol (Wang vd., 2016) meyve ve sebzelerde, özellikle limon gibi turuncgillerde bulunan doğal bir flavanoiddir (Lee vd., 2015). Kuassinoid brusatol'ün ilk olarak 1968'de Brucea sumatrana tohumlarından izole ve karakterize edildiği bildirilmiştir (Cai vd., 2019).

1.1.Kanser

Kanser terimi, ilk kez Hipokrat tarafından tümörü tanımlamak için Yunanca "karsinom" ve "Karkinos" kelimelerinden türetilmiştir (Safarzadeh vd., 2014). Dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam eden kanser, hücrel homeostaz ve fonksiyonunun geri dönüşümsüz olarak bozulmasıyla tetiklenen heterojen bir hastalıktır. Kanser ilerlemesi, kontrolsüz hücre büyümesi ve farklılaşmasının yanı sıra, neoplastik hücre popülasyonunda büyük bir genişlemeye yol açan apoptotik fonksiyonların kaybının bir sonucudur (Abotaleb vd., 2019). Anormal hücre büyümesi (neoplazi), hastalığın biyolojik son noktasıdır. Çevre dokuların ve uzak organların tümör hücresi invazyonu, çoğu kanser hastasında morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir (Seyfried ve Shelton., 2010). Hanahan ve Weinberg (2011), proliferatif sinyalleşmeyi sürdürmek, büyüme baskılayıcılarından kaçınmak, bağışıklık yıkımından kaçınmak, replikatif ölümsüzlüğü etkinleştirme, tümör teşvik eden inflamasyon, invazyon ve metastazı aktive etmek, damar sistemini indüklemek veya erişme, genom kararsızlığı ve mutasyon, hücre ölümüne direnç ve hücrel metabolizmanın düzenlenmesine sahip on temel özelliğin kötü huylu hücre büyümesinin altında yatabileceğini öne sürmüşlerdir. Hanahan (2022), ise bu belirtilen özelliklere ek olarak polimorfik mikrobiyomlar, yaşlanan hücreler, mutasyonel olmayan epigenetik programlama ve fenotipik plastisitenin kildini açmak olmak üzere dört yeni özellik öne sürmüştür (Şekil 1.1).



Şekil 1.1.Kanserin özellikleri (Hanahan., 2022'den türkçeleştirilmiştir.)

Kanserin kökeni ve ilerlemesi, hücre içindeki birçok faktöre (ör; mutasyonlar, bağışıklık koşulları ve hormonlar) ve ayrıca çevreden gelen dış faktörlere (ör; sigara, kimyasallar, bulaşıcı organizma ve radyasyonlar) bağlıdır (Abbas ve Rehman., 2018). Önceki raporlar, dünyada gelişmekte olan ve gelişmiş ülkeler arasındaki kanser morbidite dağılımındaki farklılıkları göstermiş ve tüm kanserlerin yaklaşık %90-95'inin sigara, alkol tüketimi, obezite, diyet, fiziksel hareketsizlik gibi yaşam tarzı faktörlerine bağlı olduğunu kalan %5-10'unun ise kalıtsal genlerden kaynaklandığını belirtmiştir (Kikuchi vd., 2019).

1.1.2.Kanser Tedavi Yöntemleri

Malignitenin tanınmasından bu yana, araştırmaların çoğu, kanser için kaliteli tedavi yaklaşımlarının yeni yöntemlerini keşfetmektir. Halen, dünya çapında devam eden tüm tıbbi tedavi denemelerinin %60'ından fazlası kansere odaklanmaktadır. Tedavi seçimi ve ilerlemesi, kanserin tipine, lokalitesine ve ilerleme aşamasına bağlıdır. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi geleneksel ve en yaygın kullanılan kanser tedavi yöntemlerindendir. Modern yöntemler arasında şunlar sayılabilir: hormon

bazlı tedavi, anti-anjiyojenik yöntemler, kök hücre tedavileri, immünoterapi, dendritik hücre bazlı immünoterapi ve kombine terapi. Geleneksel kanser tedavisi yöntemleriyle ilişkili yan etkiler, yeni kanser tedavisi yöntemlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara hız kazandırmıştır (Abbas ve Rehman., 2018; Rejhova vd., 2018).

1.1.1.1 Cerrahi Müdahale

Kemoterapi ve radyoterapiye kıyasla çevre dokulara en az zararı garanti ettiği için cerrahi müdahale birçok iyi huylu ve kötü huylu tümörün en umut verici ve geleneksel tedavilerinden biri olarak düşünülmektedir. Tercih edilen tedavi seçeneği olarak görülmesinin bir başka nedeni de, gereksiz doku hasarı riski olmadan tümörün çıkarılabilmesidir (Abbas ve Rehman., 2018). Cerrahi, kanser hücrelerinin dolaşıma daha fazla dökülmesine neden olur, dolaşımdaki hücrelerin hayatta kalmasına izin veren anti-tümör bağışıklığını bastırır, hedef organlardaki adhezyon moleküllerini yeniden düzenler, tümör hücrelerini tutabilen bağışıklık hücrelerini toplar ve hedef dokuda ve kanser hücrelerinin kendisinde göçü artırmak ve invazyon için değişikliklere neden olur (Tohme vd., 2017).

1.1.1.2 Radyasyon Terapisi

Kanser tedavisinde radyasyon, kanser hücrelerini öldürmek için kullanılan fiziksel bir varlık olarak tanımlanabilir. Tedavide kullanılan radyasyon türü iyonlaştırıcı radyasyondur. Gelen radyasyon biyolojik cisimlerdeki parçacıkların elektriksel olarak yüklenmesine neden olur; bu nedenle, "iyonize edici"dir ve enerji bu şekilde ışınlardan vücudun geçtiği hücrelere aktarılır. Bu enerji, kanser hücrelerini doğrudan öldürebilir veya genetik olarak onları apoptoza ve hücre ölümüne neden olacak şekilde değiştirebilir. Radyasyon terapisi, lokalize kanserleri tedavi etmek için kullanılır; ayrıca lokal kontrol (tedavi edilen bölgede nüks olmaksızın tam yanıt) veya lokal olarak ilerlemiş veya yayılmış kanserlerde semptom rahatlama sağlayabilir. Cerrahi ile kombinasyon halinde ve ayrıca radyasyon öncesinde, sırasında veya sonrasında sistemik kemoterapi ile kombinasyon halinde sıklıkla kullanılır (Abbas ve Rehman., 2018; Jaffray ve Gospodarowicz., 2015).

1.1.1.3 Kemoterapi

Kemoterapi, bölünme yeteneklerini öldürerek ve apoptozu zorlayarak tümörün ilerlemesini durdurur. Vücudun normal biyolojik işleyişi, fazla hücreleri veya hasarlı hücreleri uzaklaştırarak yeni hücrelerin oluşumunu sağlamaktır. Buna karşılık, tümör hücreleri, apoptoz tarafından kontrol edilmediğinden, sınırsız bölünme kapasitesine ve ölümsüzlüğe sahiptir. Bu nedenle, normal hücre çoğalmasının hücre ölümü ile dengelendiği ve düzenlendiği durumlarda, kanserli kitlelerde hücre çoğalmasının hücre ölümüne oranı yüksektir. Kemoterapi yöntemi, tümör hücrelerinde büyümeyi durdurmaları veya ölmeleri için değişiklikler meydana getirmek üzere hareket eder; bu nedenle kemoterapötik ilaçlar sitostatik (biyolojik ilaçlar) ve sitotoksik olarak ikiye ayrılır (Abbas ve Rehman., 2018). Sitostatik ilaçlar, kanser hücrelerine karşı doğrudan sitotoksik aktivite olmaksızın tümör büyümesini inhibe etme yeteneklerine sahiptirler. Bu ilaçlar, hücre DNA veya RNA'yı ve bunların metabolizmasını hedefleyerek hücre çoğalmasına müdahale eder. Mevcut antikanser ilaçlarının büyük çoğunluğu, kanser hücrelerini öldürmek, böylece tümörleri yok etmek veya küçültmek için tasarlanmış sitotoksik ajanlardır (Millar ve Lynch., 2003) Bununla birlikte, kemoterapötik ilaçlar normal hücreleri de hedef alır ve bu da doza bağlı olarak saç dökülmesi, bulantı, yorgunluk, kusma vb. gibi çeşitli yan etkilere neden olabilir. Yoğun kemoterapi tedavisinin bir sonucu olarak, hastaların bağışıklığı baskılanır; bu, karmaşık enfeksiyonlara ve dolayısıyla ölüme neden olabilir. Abbas ve Rehman., (2018) keşfedilen kemoterapötik ilaçlardan toplam 132 tanesinin FDA onaylı olduğunu belirtmiştir. Bu ilaçlar, spesifik olarak tümör hücrelerini hedef almak ve onları genotoksik etki, yani reaktif oksijen türlerinin üretimi ile öldürmek için tasarlanmıştır. Bununla birlikte, bir dereceye kadar vücudun normal hücreleri de bu ilaçlardan etkilenir (Çizelge 1.1.).

Tek başına veya kombinasyon tedavileri şeklinde kemoterapide kullanılan ilaçların 100'den fazla olduğu bilinmektedir. Her bir ilaç farklı bir kimyasal yapıya ve bileşime sahiptir. Cerrahi ve radyasyon ile tedavi yöntemleri invaziv ve hedefe yönelik prosedürler olsa da, kemoterapi esas olarak sistemiktir ve kanser hücrelerine ulaşmak için vücutta dolaşmaktadır (Abbas ve Rehman vd., 2018; Schirrmacher., 2018).

Çizelge 1.1. Çeşitli anti-kanser kemoterapötik ilaç sınıfları ve örnekleri (Abbas ve Rehman., 2018'den türkçeleştirilmiştir.)

Sınıf	İlaçların İsimleri
Alkilleyici ajanlar	• Nitrojen hardalları: mekloretamin, klorambusil, siklofosfamid (Cytosan®), ifosfamid ve melfalan gibi • Nitrozoöreler: streptozosin, karmustin (BCNU) ve lomustin gibi • Alkil sülfonatlar: busulfan • Triazinler: dakarbazin (DTIC) ve temozolomid (Temodar®) • Etileminler: tiotepa ve altretamin (hekzametilmelamin)
Antimetabolitler	• 5-Florourasil (5-FU) • 6-Merkaptapurin (6-MP) • Kapesitabin (Xeloda®) • Kladribin • Klofarabin • Sitarabin (Ara-C®) • Floksuridin • Fludarabin • Gemsitabin (Gemzar®) • Hidroksiüre • Metotreksat • Pemetreks (Alimta®) • Pentostatin • Tioguanin
Antrasiklinler	• Daunorubisin • Doksorubisin (Adriamisin®) • Epirubisin • İdarubisin
Mitotik inhibitörler	• Taksanlar: paklitaksel (Taxol®) ve dosetaksel (Taxoten®) • Epotilonlar: iksabepilon (Ixempra®) • Vinka alkaloidler: vinblastin (Velban®), vinkristin (Oncovin®) ve vinorelbin (Navelbine®) • Estramustin (Emcyt®)
Hormon kemoterapötik ilaçlar	• Prednizon, metilprednizolon (Solu-Medrol®) ve deksametazon (Decadron®)

1.1.1.4 Hormon Terapisi

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler, hormonların hücre büyümesinde ve malign hücrelerin düzenlenmesindeki rolünü netleştirmiştir. Erkeklerde tümörlerin yaklaşık %25'inin, kadınlarda ise %40'ının hormonal temele sahip olduğu bilinmektedir. Hormonal tedavi, kemoterapi ile ilişkili herhangi bir sitotoksikite olmaksızın kanseri tedavi etmede etkilidir. Steroid hormonu ve bu tür hormon benzeri ilaçlar lenfoma, lösemi ve multipl miyelom gibi kanserlerin tedavisinde kullanılır (Abbas ve Rehman., 2018).

1.1.1.5 Antianjiyogenez İnhibitörleri

Tümör hücrelerinin beslenmesi kan damarları tarafından sağlanır ve bu damarların tümör dokuları içinde gelişmesine anjiyogenez denir. "Anjiyogenez 150 Neoplazma inhibitörleri" olarak bilinen bazı kimyasal inhibitörler, tümör hücrelerine giden kan akışını kesebilir. Bu anjiyojenik inhibitörler (talidomid, interferon, bevacizumab (Avastin), cilengitide (EMD 121974) ve cediranib (Recentin) VB-111) bazen her ilacın terapötik etkinliğini artırmak amacıyla kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde uygulanır (Abbas ve Rehman vd., 2018).

1.1.1.6 Kanser Tedavisinde Kök Hücrelerin Rolü

Kök hücreler, kemik iliğinde bulunan ve herhangi bir vücut hücresine farklılaşma yeteneği olan farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücre tedavi stratejisi de güvenli ve etkili olduğu düşünülen kanser tedavi seçeneklerinden biridir (Abbas ve Rehman vd., 2018). Kök hücreler hem embriyonik hem de yetişkin insan dokularından izole edilebilir, in vitro olarak genişletilebilir veya manipüle edilebilir ve ardından yeniden aşılanabilir. En önemlisi, kök hücreler (hem endojen hem de transplantasyon sonrası) onları tümör tedavisinde hedeflenmiş dağıtım vektörleri olarak kullanım için çekici kılan güçlü patotropik özelliklere sahiptir. Kanser kök hücrelerinin rol oynadığı tümörler için üç olasılık vardır. İlk olarak, normal kök hücrelerin veya progenitör hücrelerin kanser kök hücrelerine mutasyonu, birincil tümörün gelişmesine yol açabilir. İkincisi, kemoterapi sırasında birincil tümör hücrelerinin çoğu yok edilebilir, ancak kanser kök hücreleri yok edilmezse dirençli kanser kök hücreleri haline gelirler ve tümörün nüksetmesine yol açabilirler. Üçüncüsü, kanser kök hücreleri birincil

tümörden uzak bölgelere göç edebilir ve metastaza neden olabilir. Teorik olarak, kanser kök hücrelerinin tanımlanması, kanserdeki hücreleri hızla bölmek yerine kanser kök hücrelerini hedef alan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Bu, kanser büyümesinde kalan hücrelerin sınırlı proliferatif kapasiteye sahip olması nedeniyle kanseri tedavi edebilir (Sagar vd., 2007). Kök hücre uygulaması henüz deneysel klinik deneme aşamasındadır (Abbas ve Rehman., 2018).

1.1.1.7 Kanser İmmünoterapisi İçin Otolog Dendritik Hücre Aşıları

İmmünoterapi, bağışıklık sistemini manipüle ederek hastalıkların tedavisi olarak tanımlanan daha geniş bir terimdir. İmmünoterapi aktif immünoterapi ve pasif immünoterapi olarak iki tipe ayrılmaktadır. Kronik bulaşıcı hastalıkların veya kanserin tedavisi günümüzde immünoterapinin temel amacıdır bununla birlikte düzenleyici mekanizmaları, uygun antijenin tanımlanması ve antijen sunan hücreler (APC) ile T hücreleri arasındaki etkileşimin optimizasyonu açısından bağışıklık sistemlerinin daha iyi anlaşılmasını gerektirir. Dendritik hücreler (DC) profesyonel APC'dir. T ve B lenfosit aktivasyonunu düzenleyerek immün yanıtların başlatılmasında ve kontrolünde önemli bir rol oynarlar. Bu hücreler, olgunlaşmamış bir durumda vücut boyunca stratejik olarak konumlandırılmıştır.

Kısaca kanser immünoterapisi için otolog dendritik hücre aşıları üretmek için monositler kanser hastalarından lökaferez ile hasat edilir ve monosit türevli DC'ler oluşturmak için GM-CSF (Granülosit Makrofaj-Koloni Uyarıcı Faktör) ve IL-4 (İnterlökin-4) takviyelerinin varlığında kültürlenir. Bu olgunlaşmamış monosit kaynaklı DC'ler daha sonra farklı yöntemler kullanılarak tümör kaynaklı antijenlerle yüklenebilir. Tümör antijenleri ile yüklenen olgun DC'ler daha sonra otolog DC bazlı kanser aşısı olarak kullanılmak üzere kuru buzda saklanır ve taşınır. Kanser hastalarına enjekte edildiğinde, tümör antijeni yüklü DC'ler, lokal lenf düğümlerine boşaltılır ve hastanın kanser hücrelerine karşı savaşmaya yardımcı olan tümöre özgü T-hücresi bağışıklığını indükler (Abbas ve Rehman vd., 2018).

1.1.1.8 Kombine Terapi

Kanseri indükleyen veya hücre canlılığını sürdüren yolları spesifik olarak hedeflemek için iki veya daha fazla terapötik tedavinin kombinasyonu, kanser tedavisinin temel taşıdır. Monoterapi yaklaşımı halen çok yaygın bir tedavi yöntemi

olmasına rağmen birçok farklı kanser türlerinde, bu geleneksel yöntemin genellikle kombinasyon tedavisi yaklaşımından daha az etkili olduğu kabul edilir. Geleneksel mono-terapötik teknikler, seçici olmayan bir şekilde aktif çoğalmayı hedefleyerek hem sağlıklı hem de kanserli hücrelerin yok olmasına yol açar. Kullanılan ajanlardan biri kemoterapötik ise kombinasyon tedavisi toksik olabilse de, farklı yollar hedefleneceğinden toksisite önemli ölçüde daha azdır. Sonuç olarak, bu kombinasyon tedavisi sinerjik veya aditif bir şekilde çalışır ve bu nedenle her bir ilacın daha düşük bir terapötik dozu gereklidir. Bunlara ek olarak, kombinasyon tedavisi, kanser hücreleri üzerinde aynı anda sitotoksik etkiler üretirken normal hücreler üzerindeki toksik etkileri önleyebilir. Bu, kombinasyon rejimindeki bir ilacın sitotoksisite açısından normal hücrelerde başka bir ilaca karşı antagonistik olması ve esasen normal hücreleri sitotoksik etkilerden koruması durumunda ortaya çıkabilir.

Kombinasyon tedavisi ilk olarak 1965'te, Emil Frei, James F. Holland ve Emil J. Freireich'in akut lösemi için ilk kombine kemoterapi olasılığını öne sürdükleri yerde kavramsallaştırılmıştır. Akut lenfositik lösemili pediatrik hastalar metotreksat, 6-merkaptopurin, vinkristin ve prednizon kombinasyonu (POMP) ile tedavi edilmiştir ve tümör yükünü azaltmada ve remisyon süresini uzatmada başarılı olduğu kanıtlanmıştır. POMP'nin başarısının bir sonucu olarak, kanser terapisindeki araştırmalar, sinerjik veya aditif bir etki yaratmak için farklı yolları hedefleyen kombinasyon terapilerinin araştırılmasına odaklanmıştır (Mokhtari vd., 2017).

Tek ilaç uygulamaları yerine ilaç kombinasyonlarının kullanılması, aşağıdaki durumlarda faydalıdır: (1) kullanılan ilacın dozajını/konsantrasyonunu azaltmak, (2) biyoyararlanımı iyileştirmek, (3) bir ilaca karşı kazanılan direncin üstesinden gelmek, (4) kemoterapi/radyoterapiye dirençli kanserlerin tedaviye duyarlı hale getirmek, (5) kanser hücresi metastazını ve invazyonunu azaltmak, (6) nüks olasılığını azaltmak ve (7) kanser tedavisinin genel etkinliğini arttırmak (Abotaleb vd., 2019).

1.2. Kolorektal/Kolon Kanseri

Kolorektal kanser (CRC), yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahip yaygın bir gastrointestinal malignitedir (Xie vd., 2020). Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu'nun Global Kanser İzlemi (GLOBOCAN) 2020 verilerine göre, 1,9

milyondan fazla yeni CRC vakaları ve 935.000 ölümün meydana geldiği tahmin edilmektedir, bu da yaklaşık 10 kanser vakası ve ölümden birini temsil etmektedir. Genel olarak, CRC insidans açısından üçüncü sırada, ancak mortalite açısından ikinci sırada yer almaktadır (Sung vd., 2021). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı 2017 yılı Türkiye Kanser İstatistiklerine göre, hem kadınlarda hem de erkeklerde üçüncü sırada yer aldığı gösterilmiştir. Sıklığı ise erkeklerde yüz binde 25,1 iken kadınlarda yüz binde 14,7' dir (Kara ve Keskinlik, 2017).

Kolorektal adenokarsinoma olarak da bilinen CRC, genellikle kalın bağırsağın glandüler, epitel hücrelerinden ortaya çıkar. Bu kanser, epiteldeki belirli hücreler, kendilerine seçici bir avantaj sağlayan bir dizi genetik veya epigenetik mutasyon kazandığında ortaya çıkar. Anormal derecede yüksek replikasyon ve hayatta kalma ile bu hiper-proliferatif hücreler iyi huylu bir adenoma yol açar, daha sonra karsinomaya dönüşebilir ve on yıllar içinde metastaz yapabilir. CRC'ler aslında çok çeşitli mutasyonlar ve mutajenler tarafından yönlendirilen çok heterojen bir hastalık grubunu içerir. Tüm CRC'ler benzer mutasyonları paylaşmadığından, “hepsini yakalayan” bir moleküler tedavi tasarlamak zor olmuştur. Erken tanı konulan olgularda cerrahi birincil tedavi yöntemi olmaya devam etmektedir, ancak tanılarının yaklaşık %25'inde olduğu gibi kanserin metastaz yaptığı ileri vakalarda artık etkili değildir (Rawla vd., 2019). İlerlemiş ve metastatik CRC'li hastalar için, cerrahi sonuçları iyileştirmek ve tümör nüksünü önlemek amacıyla sıklıkla ilaç adjuvan tedavisi uygulanmaktadır. Şu anda, CRC adjuvan kemoterapisinde ve neoadjuvan kemoterapide kullanılabilecek, 5-florourasil (5-FU), oksaliptatin, irinotekan, setuksimab ve bevacizumab dahil olmak üzere çeşitli ilaçlar geliştirilmiştir (Xie vd., 2020). Bu kemoterapi ilaçlarının normal dokulara toksisitesi, başarılı kanser kemoterapisinin önündeki en büyük engellerden biri olmuştur. Bu nedenle, çeşitli kemoterapi ajanları ile kombine tedaviler, genellikle sadece tedavi etkisinin artırılması için değil, aynı zamanda bu ilaçların toksisitesini azaltmak için de kullanılmaktadır (Du vd., 2006).

1.2.1. 5-Florourasil (5-FU) ve Mekanizması

5-Florourasil (5-FU), urasil'in C-5 pozisyonunda hidrojen yerine florinin yer aldığı bir anti-metaboliti temsil eder. DNA'da timin yer değiştirmesinin neden olduğu timin-urasil/5-FU değişimi, sonuç olarak adenin-urasil/5-FU baz çiftlerinin oluşumuna yol

açar. 5-FU, anti-kanser aktiviteye sahip olduğu bildirilen ilk kemoterapötik ilaçlardan biridir ve ilk olarak 60 yıl önce, tümörler tarafından artan urasil alımını ortadan kaldırmak için Heidelberger vd (1957) tarafından sentezlenmiştir. 5-FU meme, pankreas, deri, mide, yemek borusu ve baş ve boyun kanserleri dahil olmak üzere farklı kötü huylu tümörleri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. CRC'de intravenöz ve oral 5-FU veya diğer floropirimidinler (FP'ler), 1990'lardan beri sistemik tedavinin temel dayanağı haline gelmiştir (Vodenkova vd., 2020). Yeni kanser tedavilerindeki ilerlemeye rağmen, 5-FU hala CRC tedavisinde en etkili ve en yaygın olarak kullanılan ajanlardan biridir ve kemoterapi kombinasyon rejimlerinin ana bileşenini temsil etmektedir. 5-FU en güvenli kemoterapi ajanları arasında yer almasına rağmen, CRC hastalarının bir kısmında ciddi yan ve toksik etkiler ortaya çıkmaktadır. 5-FU toksisitesinin klinik belirtisi ateş, yorgunluk, mukozit, stomatit, bulantı, kusma ve ishali içerir. Diğer yaygın toksik etkiler arasında lökopeni, nötropeni, trombositopeni, anemi, nöropati, deri döküntüsü ve el-ayak sendromu bulunur (Vodenkova vd., 2020).

5-FU insan vücuduna girdikten sonra, çoğu dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) tarafından inaktive edilir ve ayrıca 5-florourasildeoksinükleotide (5-FdUMP) dönüştürülür ya da timidilat sentazın (TS) aktivitesini inhibe edebilir ve deoksiüridilik asitin (dUMP) deoksitimidilik asite (dTMP) metilasyonunu önleyebilir. Ayrıca, 5-FdUMP metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) varlığında TS ile stabil bir kovalent kompleks oluşturur. 5-FU sonuçta TS aktivitesini inhibe ederek pürin sentezini inhibe eder, DNA replikasyonu ve onarımının azalmasına yol açar, tümör hücresi büyümesinin inhibisyonu ile sonuçlanır. Böylelikle, üç anahtar enzim (DPD, TS ve MTHFR), 5-FU'nun anti-tümör aktivitesini büyük ölçüde etkileyebilir. Ek olarak, 5-FU, protein sentezine müdahale etmek için bir psödo-metabolit olarak RNA'ya dahil edilen in vivo 5-florourasil nükleozide dönüştürülebilir (Şekil 1.2.) (Xie vd., 2020).

1.3. HT-29 İnsan Kolorektal Kanseri Hücre Hattı

İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı HT-29, 1964 yılında Fogh ve Trempe (1975) tarafından 44 yaşında bir Kafkas kadınının birincil tümöründen izole edilmiştir. HT29 hücreleri, bağırsak hücre farklılaşmasının moleküler mekanizmalarını incelemek için benzersiz bir model haline gelmiştir (Martínez-Maqueda vd., 2015). Bu hücrelerin kültür özelliği adherenttir ve myc +; ras +; myb +; fos + ; sis +; p53 +; abl -; ros -; src - onkogenlerine sahiptirler. IgA'nın salgı bileşeni; karsinoembriyonik antijen (CEA); dönüştürücü büyüme faktörü beta bağlayıcı protein; müsin; myc+; ras+; myb+; fos+; abla+; p53+; abl-; ros-; src-; kan grubu A; Rh+; (HLA: A1; A3; B12; B17; Cw5); hücreler CD4 negatif; galaktoz seramidin hücre yüzeyi ifadesi (HIV için olası bir alternatif reseptör) genlerini eksprese ederler (Anonim., 2022).

1.4. Doğal Ürünlerin Kansere Tedavisinde Kullanımı

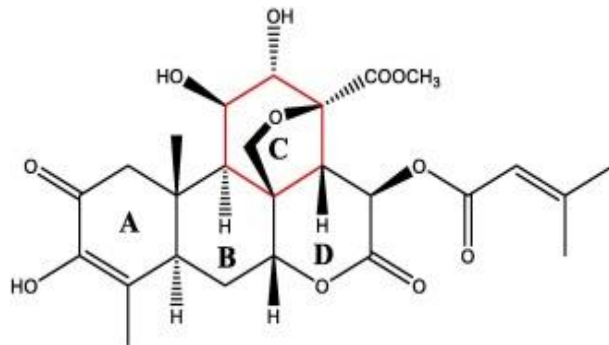
Doğal ürünler, çeşitli kaynaklardan gelen geniş ve çeşitli bir madde grubunu içermektedir. Deniz organizmaları, bakteriler, mantarlar ve bitkiler tarafından üretilirler. Doğal ürünler, bu üreticilerden elde edilen karmaşık ekstraktları, aynı zamanda bu ekstraktlardan türetilen izole edilmiş bileşikler de kapsar. Ayrıca vitaminler, mineraller ve probiyotikleri içerir (Chamberlin vd., 2019). Doğadaki dikkate değer kimyasal çeşitlilik göz önüne alındığında, doğal ürünler, terapötik potansiyelleri olan zengin bir biyoaktif bileşik deposu olarak kabul edilir. Geçtiğimiz yıllarda, anti-kanser özelliklerini değerlendirmek ve etki mekanizmasını keşfetmek için yeni doğal ürünleri mikroorganizmalardan, bitkilerden ve diğer canlı organizmalardan izole edildikleri bilinmektedir. 1981 ve 2019 yılları arasında, yeni onaylanan anti-kanser ilaçlarının yaklaşık %25'inin doğal ürünlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Huang vd., 2021).

Birçok çalışma, doğal ürün türevi ilaçların, insan kanserlerinde başlıca ayırt edici özellikleri olan metastaz, invazyon, apoptoz ve anjiyogenez üzerinde etki ederek anti-kanser etkiler gösterebileceğini belirtmiştir. Son yıllarda, doğal ürünlerden elde edilen ilaçlar, geniş kaynak yelpazesi, güçlü biyoaktiviteleri ve düşük toksisiteleri nedeniyle kanser tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Huang vd., 2019). Kombinasyon

stratejisi, kanser tedavisinde doğal ürünlerin kullanılması için önemli bir yaklaşım olarak hizmet etmektedir. Doğal ürünlerin adjuvan tedavisi yan etkinin azaltılması, ilaç direncinin üstesinden gelinmesi ve terapötik tepkinin iyileştirilmesi dahil olmak üzere birçok açıdan faydalı olabilir. Örneğin, yüzyıllık geçmişi olan dört bitkili bir Çin tıbbi formülü olan PHY906'nın, bağırsak hücresi rejenerasyonunu uyarma, inflamatuvar hücre göçünü bloke etme ve proinflamatuvar transkripsiyon faktörlerini etkileme gibi çoklu eylemler yoluyla kemoterapi aracılı gastrointestinal toksisiteyi hafiflettiği bildirilmektedir. Bu çalışma, kanser tedavisinin terapötik etkisini optimize etmek için doğal ürünler için terapötik kapsamın nasıl genişletileceğini gösteren temsili bir model sağlar (Huang vd., 2021). Son yıllarda, tek başına veya geleneksel kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılan bitkisel ilaçlar veya doğal bileşiklerin çeşitli kanserler üzerinde faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir (Lu vd., 2017).

1.4.1. Brusatol

Brusatol, *Bucea javanica*'dan elde edilen bir kuasinoid bileşiktir (Yu vd., 2020). Geleneksel Çin tıbbi olarak, ısıyı düşüren, zehirleri gideren ve sıtma etkilerini önleyen Çince'de “Yadanzi” olarak adlandırılır. Kuasinoidlerin anti-kanser, anti-malaryal, anti-mikrobiyal ve anti-inflamatuvar etkiler gibi kapsamlı biyoaktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. Brusatol'un yapısı bir α,β -doymamış siklo-hekza-halkasız (A), iki siklo-heksan halka (B ve C), altı üyeli bir lakton halka (D) ve tetra-hidro furan halka (E) içermektedir (Şekil 1.3.). Esas olarak *B. javanica*'nın tohum ve meyvelerinden elde edilmektedir (Yu vd., 2020).



Şekil 1.3. Brusatol'un kimyasal yapısı (Yu vd., 2020)

Brusatol ilk kez 1968 yılında izole edilip tanımlanmıştır, daha sonra üzerinde yoğun araştırmalar yapılmıştır (Keng ve ark., 2002). Brusatol'un iyi bir anti-tümör aktiviteye

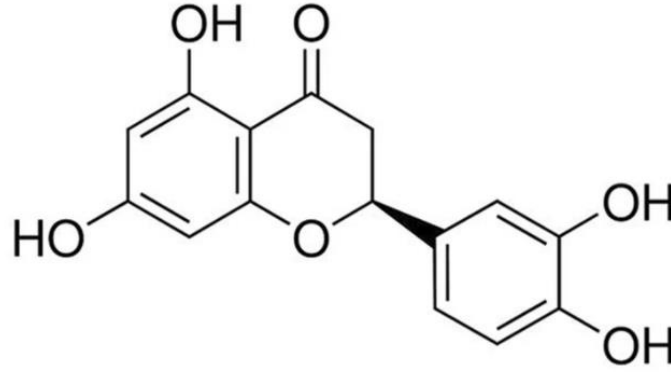
sahip olduğu gösterilmiştir ve güçlü anti-kanser etkisi farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur. Brusatol, ilk olarak lösemi için deneysel bir terapötik olarak değerlendirilmiştir. Hall vd., (1979)' da beş kuasinoidin biyolojik etkisini değerlendirmek için bir P-388 lenfositik lösemi modeli kullanmıştır. Hem in vitro hem de in vivo bulgular, Brusatol'ün tümör hücresi metabolizması ve proliferasyonu üzerinde güçlü baskılama sergilediğini göstermiştir (Cai vd., 2019). Lösemi hücrelerinde Brusatol'ün neden olduğu hücre döngüsünün durdurulması, sitotoksosite ve terminal farklılaşma c-myc'nin dikkate değer ölçüde aşağı regülasyonu ile, çoklu lösemi hücre hatları kullanılarak yapılan bir araştırmayla doğrulanmıştır (Meta-Greenwood vd., 2002). Ren vd., (2011) A549 ksenograftlarında Brusatol ve Sisplatinin birlikte tedavisinin, apoptozu indüklediğini, hücre proliferasyonunu azalttığını ve tek başına Sisplatin tedavisine kıyasla tümör büyümesini önemli ölçüde engellediğini bildirmişlerdir. Brusatol'ün pankreatik hücre hatları PATU-8988 ve PANC-1'de büyümeyi inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği kanıtlanmıştır (Xiang vd., 2017). Chen vd., (2018) tek ajan tedavisi ile karşılaştırıldığında, Sisplatin ve Brusatol'ün birlikte kullanımının sinerjik olarak fare kolorektal kanser CT-26 hücrelerinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücre apoptozu arttırdığını belirtmişlerdir.

Diğer potansiyel anti-kanser bileşikleri ile karşılaştırıldığında, Brusatol'ün üstünlüğü gösterilmiştir ve geniş bir kanser hücresi spektrumunu duyarlı hale getiren Nrf2 sinyal yolunu spesifik olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (Cai vd., 2019). Aynı zamanda, radyo-duyarlılığı artırabilme ve kemorezistansı azaltabilme özellikleri bildirilen Brusatol'ün birinci basamak kemoterapötik ajanların kombinasyonu, onları tek başına kullanmaya göre tercih edilen etkilere sahip olduğu ifade edilmiştir. Son yıllarda, Brusatol, iyi biyolojik aktiviteleri olan güncel bir konu haline gelmiştir ve birçok bilim adamı, etkisini iyileştirmek için yapısını ve dozaj şeklini değiştirmeye çalışmaktadır (Yu vd., 2020).

1.4.2. Eriodictyol

Bir flavonoid olan Eriodictyol, çeşitli şifalı bitkilerde, turuncgillerde ve sebzelerde bol miktarda bulunur (Islam vd., 2020). Eriodictyol, esas olarak Kuzey Amerika'ya özgü bir bitki olan yerba Noel Baba'dan (*Eriodictyon californicum*) elde edilen bir flavanondur (Deng vd., 2020). Eriodictyol aynı zamanda *Eriodictyon californicum*,

Millettia duchesnei, *Eupatorium arnottianum* ve *Rosa canina* gibi bitkilerden de ekstrakte edilmiştir (Wang vd., 2016). Eriodictyol'un ayrıca Afrika geleneksel ilaçlarında yaygın olarak kullanılan *Piptadeniastrum africanum* bitkisinin gövde kabuğundan ekstrakte edildiği bildirilmiştir (Şekil 1.4.) (Deng vd., 2020).



Şekil 1.4. Eriodictyol'un kimyasal yapısı (Islam vd., 2020)

Eriodictyol, hücre sinyalleme kaskadlarını modüle etme yeteneği ile ilişkili görünmektedir. Çeşitli çalışmalar, Eriodictyol'un antioksidan, anti-inflamasyon, anti-kanser, nöroproteksiyon, kardiyoproteksiyon, anti-diyabetik, anti-obezite ve hepatoproteksiyon etkilerini bildirmiştir. Ek olarak, Eriodictyol diyet takviyelerinin önemli bir bileşenidir ve yüksek antioksidan içeriği ile fonksiyonel bir gıda olarak kullanılmaktadır (Islam vd., 2020). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Eriodictyol'un anti-kanser etkisini apoptozu indükleyerek, mTOR/PI3K/Akt basamaklarını inhibe ederek G2/M hücre döngüsünü durdurarak sağladığı gösterilmiş ve Eriodictyol'un akciğer karsinomunun tedavisi için öncü bir bileşik olarak ileriye dönük etkileri olabileceği belirtilmiştir (Zhang vd., 2020). Ayrıca Eriodictyol lipid peroksidasyonunu ve antioksidan savunma mekanizması ile kolondaki preneoplastik lezyonlar üzerinde modülatör bir etkiyi inhibe etmiştir (Mariyappan vd., 2017). Eriodictyol'un, doz ve zamana bağlı olarak U87MG ve CHG-5 glioma hücrelerinde hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonu baskıladığı ayrıca bu hücrelerde apoptozu indüklediği in vitro ve in vivo bildirilmiştir (Li et al., 2020).

1.5.Apoptoz

Apoptoz, "düşme" veya "azalma" anlamına gelen Yunanca bir kelimedir ve elektron mikroskobu ile gözlemlenen hücresel nekrozun aksine organize hücre ölümü (apoptoz) geçiren hücrelerdeki benzersiz değişiklikleri ifade eder. İlk kez Kerr vd., (1972) tarafından tanımlanan apoptoz, son 30 yılda kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kapsamlı bir incelemeye tabii tutulmuştur (Huerta vd., 2006).

Apoptoz, başlangıçta hücre büzülmesi, zar kabarması, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma dahil olmak üzere morfolojik özellikleriyle tanımlanmıştır (Şekil 1.5.) (Lowe ve Lin., 2000). Apoptoz, hücre ölümünün sadece bir şeklidir. Hücreler, nekroz, priptoz ve otofaji dahil bir dizi alternatif mekanizma ile elimine edilebilir. Nekroz tipik olarak, plazma zar bütünlüğünün bozulması ve bunun sonucunda lokalize bir inflamatuvar yanıt ayrıca çevreleyen hücrelere ve dokulara zarar vermesi ile karakterize edilen, hücre ölümünün "spesifik olmayan" bir formu olarak tanımlanır (Kasibhatla ve Tseng., 2003). Piroptoz, plazma zarı bütünlüğünün kaybıyla sonuçlanan ve inflamazom sensörlerinin aktivasyonu ile indüklenen bir hücre ölüm türüdür (Bertheloot vd., 2021). Otofaji ise hücre içi bileşenlerin degradasyon ve geri dönüşüm için lizozomal bölmeye taşındığı moleküler yolları ifade eder (Klionsky vd., 2021). Buna karşılık, apoptoz, apoptotik hücrenin dış yüzeyinde görüntülenen sinyalleri tanıyan fagositik hücreler tarafından apoptotik hücrelerin hızlı bir şekilde yutulması ve çıkarılması ile ilişkilidir (Kasibhatla ve Tseng., 2003).



Şekil 1.5. Apoptotik hücrenin farklı evreleri (Panda vd., 2020'den türkçeleştirilmiştir.)

Apoptoz, bir dizi sinyal iletim kaskadları ve hücresel proteinler tarafından düzenlenen, sıkı bir şekilde organize edilmiş bir süreçtir. Kanser ve AIDS, diyabet ve Parkinson sendromu gibi diğer birçok hastalık, apoptotik yollardaki dengesizlikler ve anormal mekanizmalar sonucunda ortaya çıkar. Bu nedenle, apoptotik mekanizmaların ve ilgili yolların derinlemesine anlaşılması, yalnızca hastalığın anlaşılmasına değil, aynı zamanda hastalık tedavisine de hizmet eder (Abotaleb vd., 2019).

1.5.2.Apoptotik Proteinler

Apoptotik proteinlerin sınıflandırılması, öncelikle apoptozdaki rollerine bağlıdır.

(1) Kaspazlar, aspartat spesifik sistein proteazları apoptoz indüksiyonunda anahtar role sahiptir ve genellikle prokaspazlar olarak bilinen aktif olmayan heterodimerler olarak bulunur. Yapılarına ve işlevlerine göre sınıflandırılan kaspazlara ait bilinen 14 protein vardır. Apoptotik kaspazlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10), efektör kaspazlar (kaspaz-3,-6 ve -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1,-4,-5,-11,-12,-13,-14) olmak üzere üç grupta sınıflandırılmaktadır (Riedl ve Shi., 2004; Coşkun ve Özgür., 2011)

(2) Bcl-2 ailesi, programlanmış hücre ölümü yoluyla hücre davranışını düzenler. Bcl-2 protein ailesi, yapısal olarak bir BH3 alanının varlığı ile ayırt edilir. Bcl-2 ailesi ya çok alanlı Bax/Bak yoluyla apoptozu indükler ya da Puma, Noxa, Bim, Bad, Smac/Diablo, Hrt1/Omi, Arts dahil olmak üzere sadece BH3 ailesine ait anti-apoptotik proteinleri inhibe eder. Sitokinlerin neden olduğu apoptozda önemli olan Puma ve Noxa, DNA hasarı ve P53'ün transkripsiyonunun bir sonucu olarak üretilir. Apoptoz inhibitörleri olarak işlev gören Bcl-2 ailesinin üyeleri olan anti-apoptotik proteinler, Bcl-xL, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Bfl Diva/Boo içeren çoklu BH alanı olarak alt sınıflandırılır. Stressiz hücresel koşullar altında bu proteinler, proapoptotik Bax ve Bak'ı bağlamak, etkileşime girmek suretiyle mitokondriyal membran bütünlüğünü korur. Anti-apoptotik proteinlerin BIR (Baküloviral IAP Tekrar Etki Alanları) domaini, N-IAP, c-IAP 1, c-IAP 2 ve x-IAP'yi içerir (Abotaleb vd., 2019).

1.5.3. Apoptoz Yolakları

1.5.1.1. Mitokondria Aracılı Apoptoz: İçsel Yolak

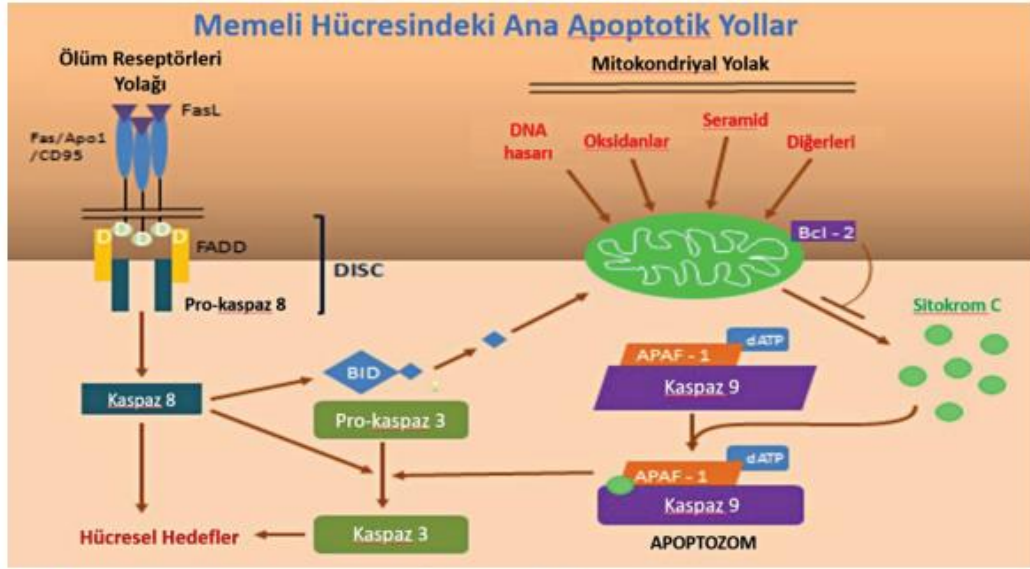
İçsel yolak, esas olarak mitokondriyal aracılı apoptotik yola karşılık gelir. Oksidatif stres, radyasyon ve sitotoksik ilaçlarla tedaviyi içeren çeşitli hücre dışı ve hücre içi stresler tarafından tetiklenen içsel yolak, Bax/Bak'in mitokondriyal membrana bağlanması ve ardından sitokrom c'nin mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitozole salınması aracılık eder. Bcl-2 ve Bcl-xL sitokrom c'nin salınmasını önleyen anti-apoptotik proteinlerdir. Sitokrom c, apoptozom üretmek için Apaf-1 ve prokaspaz-9 ile birleşir. Apoptozom, kaspaz 9'u tetikleyen, ardından hücrelerin yıkımına yol açan ve apoptoz ile sonuçlanan kaspaz-3 sinyal kaspaz kaskadının aktivasyonunu tetikleyen çok proteinli bir komplekstir.

Genel olarak içsel yolakta yer alan proteinler arasında SMAC/DIABLO (kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü), Kaspaz-9 (Sisteinil aspartik asit-proteaz-9), Bcl-2 (B-hücre lenfoma proteini 2), Bcl-w (Bcl-2 benzeri protein), Nox (Phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1), Aven (Hücre ölüm düzenleyicisi) ve Myc yer almaktadır. İç mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, süperoksit iyonlarının fazla üretimi, mitokondriyal biyogeneze bozukluk, matriks kalsiyum glutatyonun dışarı akışı ve membran proteinlerinin salınması ile sonuçlanan işlevsiz mitokondriyal sonuçlar, kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesi yoluyla kanser tedavi stratejileri için umut verici bir potansiyele sahiptir (Jan., 2019).

1.5.1.2. Ölüm Reseptörü Aracılı Apoptoz: Dışsal Yolak

Ölüm ligandlarının ölüm reseptörleri aracılığıyla etkileşimi yoluyla dışsal yolak indüklenir. TNF, Fas ligandları (Fas-1) ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligandı (TRAIL) içeren ölüm reseptörlerinin tümör nekroz faktörünün (TNF) üyeleri olduğu bilinmektedir. Bu süreçte ölüm reseptörleri ölüm ligandlarına (Fas ligandları, TNF ligandları) bağlanarak ölüm bölgesi/ adaptör proteinin bağlanmasına izin verir (Fas ile ilişkili Ölüm Alanı (FADD), TNF reseptörü ile ilişkili ölüm etki alanı (TRDD)). Ölüm alanı/adaptör proteinin reseptör ligand kompleksine bağlanması, başlatıcı kaspaz 8 veya 10'un ölüm efektör alanı (DED) yoluyla bağlanmasına, ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) adı verilen aktifleştirilmiş bir kompleks oluşturmaya izin verir.

Ayrıca, bağlanma ve aktivasyon, kaspaz 8'in ölüm sinyali apoptozu meydana getirmek için bir infaz kaspazına iletmeye izin verir. Bu işlemin sonlandırılması, ölüm alanlarına bağlanabilen hücreli FLICE İnhibitör Proteini (c-FLIP) olarak bilinen başka bir protein tarafından üstlenilir (Şekil 1.6.) (Obeng., 2020).



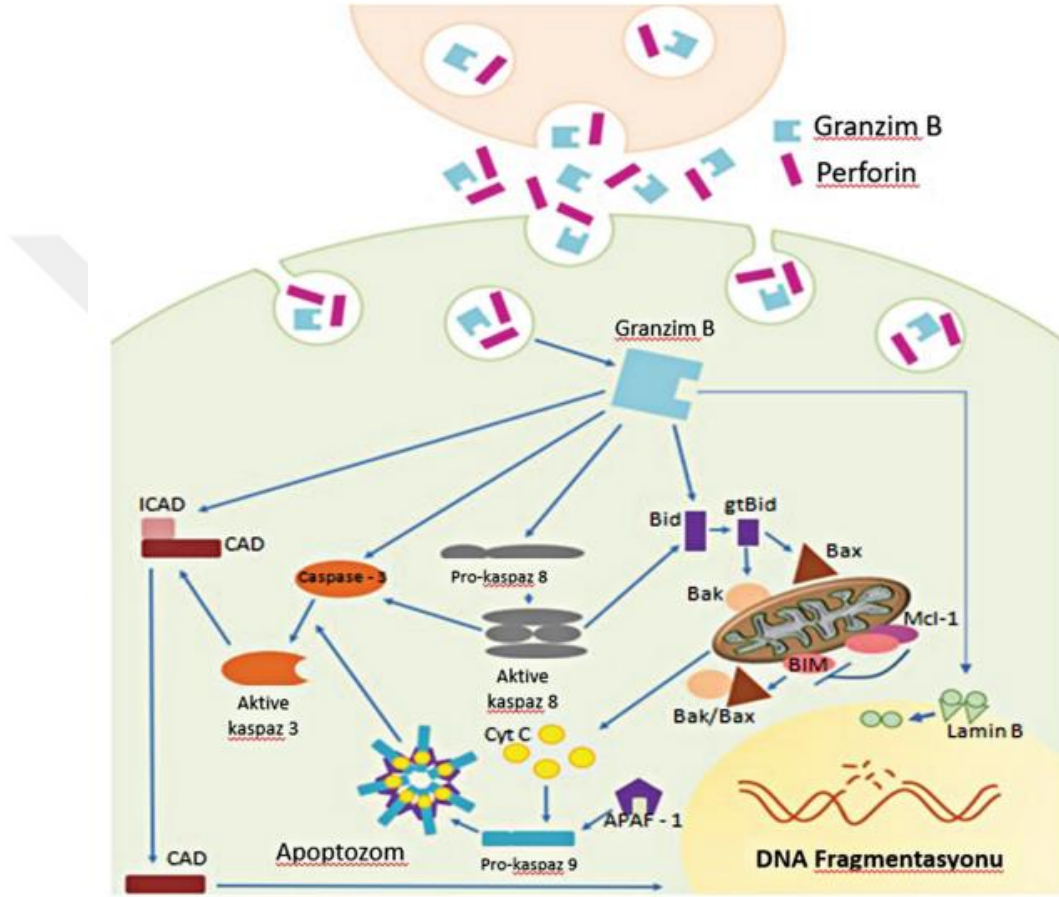
Şekil 1.6. Dışsal apoptotik yolak (Celepli vd., 2020)

1.5.1.3. Perforin/Granzim Yolu

Perforin/granzim apoptoz yolu, doğal öldürücü (NK) hücreleri ve CD8⁺ sitotoksik T lenfositlerini (CTL'ler) içeren adaptif bağışıklık sistemi tarafından virüs bulaşmış ve/veya dönüştürülmüş hücreleri hedeflemek ve ortadan kaldırmak için kullanılan ana hareket yoludur. Hedef hücreler bir kez tanındığında, NK hücreleri ve CTL'ler fonksiyon gösterirler. Bu, perforin ve granzimleri içeren sitotoksik granüllerin salınmasıyla gerçekleştirilir. Perforin gözenek oluşturan bir proteindir, granzim ise yapısal olarak ilişkili serin proteazların bir ailesidir ve her ikisi de hedef hücre apoptozunu indükler. Serpinin ile birlikte hedef hücrelerin yüzeyine tek bir makromoleküler kompleks olarak bağlanırlar ve bu da granzimlerin pasif difüzyonunu da önler.

Sitoplazmada Granzim B esas olarak Bid'i (BH3 etkileşimli alan ölüm agonisti) aktive eder. BCL-2 protein ailesinin üyesi, proapoptotik Bak ve Bax proteini ile birlikte sitokrom c'nin sitozole sızmasına neden olur. Sitokrom c proformal kaspaz-3, kaspaz-10 aktivasyonu yoluyla apoptoz uygulama yolunu başlatan aktif kaspaz-3'e dönüşür.

Buna karşılık Granzim A yolu, uygulama yolundan kaçınır, mitokondriyal iç zar potansiyeli ve reaktif oksijen türlerini (ROS) serbest bırakır. Tek sarmallı DNA çentikleri üretir. ROS'a yanıt olarak, ER ile ilişkili kompleks (SET, Ape 1, PP32, HMG2, TREX) granzim A'nın kompleksin bu üyelerini parçaladığı çekirdeğe yerleşir; örneğin SET kompleksi, DNA onarımında yer alan ve DNA degradasyonunu indükleyen apoptoz ile sonuçlanır (Şekil 1.7.) (Panda vd., 2020).

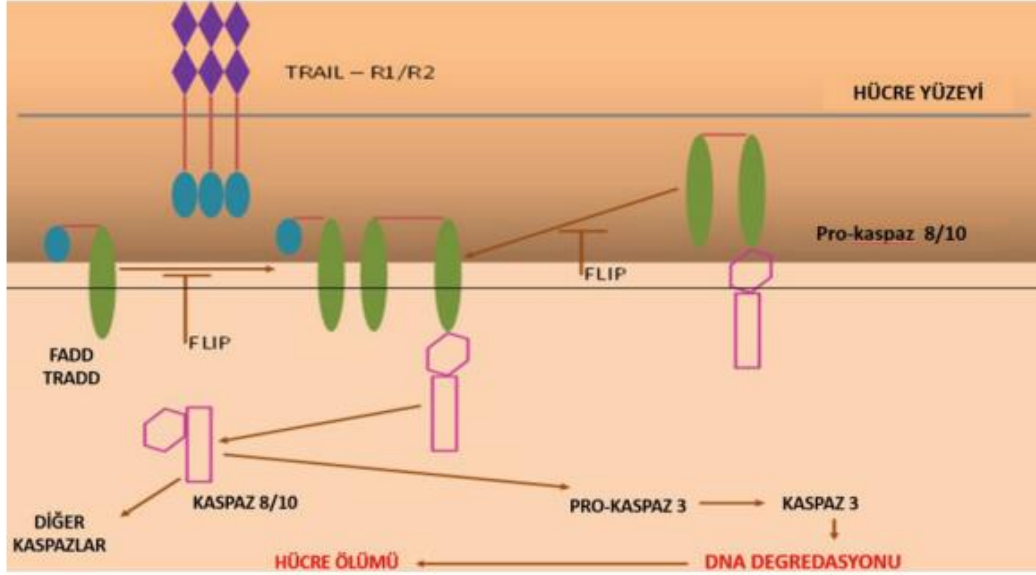


Şekil 1.7. Perforin/Granzim yolağı (Celepli vd., 2020)

1.5.1.4.İnfaz Yolu

Dışsal yolun kaspaz 8,10'u ve içsel yolun kaspaz 9'u gibi başlatıcı kaspazlar, spesifik tetikleyici sinyaller tarafından aktive edilir ve sonunda infaz yolunun infazcı kaspazlarını aktive eder. Kaspaz-3, 6, 7, efektör veya "infazcı" kaspazlar olarak işlev görür, bunlardan en önemlisi Kaspaz 3'tür ve başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilir. Kaspaz-3 özellikle nükleer apoptozdan sorumlu olan endonükleaz CAD'ı (kaspaz aktive edilmiş deoksinükleaz) aktive eder. CAD, çekirdeği DNA'yı parçalamak için yer değiştirir, çekirdek içindeki kromozomal DNA'yı bozarak

kromozomal yoğunlaşmaya neden olur. Kaspaz-3 ayrıca protein kinazların, Endonükleaz ailesi proteinlerinin ve DNA onarım inhibitörlerinin ayrılmasını da sağlar. Bununla birlikte, apoptozdaki karakteristik morfolojik değişikliklere katkıda bulunan hücrenin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve parçalanmasını da beraberinde getirir (Şekil 1.8) (Panda vd., 2020).



Şekil 1.8. İnfaz yolağı (Celepli vd., 2020)

1.5.3. Kanser Terapisinde Apoptozu Hedefleme

Apoptoz, çok hücreli organizmalardan hasar görmüş hücreleri uzaklaştıran yüksek düzeyde düzenlenmiş doğal bir süreçtir. Tipik bir yetişkin insanda, her gün milyarlarca hücre apoptoza uğramaktadır. Kanser hücrelerinde, çoklu genetik anormalliklerin varlığı ve malign transformasyonun genel hücresel stresleri, önemli pro-apoptotik aktivite ile ilişkilendirilmelidir ve yüksek bir bazal apoptotik hız, birçok kanser hücrelerinde yaygındır. Bununla birlikte, apoptozun düzensizliği birçok kanserin hayatta kalması için gerekli olabilmektedir (Call vd., 2008). Tümör hücrelerinde apoptotik yolları hedeflemek güçlü bir antikanser stratejisidir çünkü ölü tümör hücreleri klinik yanıtlara katkıda bulunabilir, ancak tümör nüksetmesine katkıda bulunmaz. Onaylanmış terapötik ajanlardan bazıları, venetoklaks gibi intrinsik apoptoz yolunu doğrudan hedefler, ancak çoğu, onkojenik sinyal yollarının inhibitörleri, proteazom inhibitörleri veya HDAC gibi dolaylı olarak apoptoz yollarını

hedefler. Doğrudan apoptotik yolları hedefleyen yeni ajanlar geliştirilme aşamasındadır. Apoptotik yolları doğrudan hedefleyen ajanların gelecekteki gelişimi, tedavisi zor tümörleri olan hastalarda hastalık gerilemesine veya iyileşmeye yol açabilir; bu ajanların onkojenik yolları, immünoterapötik ajanları, sitotoksik ajanları ve radyoterapiyi hedefleyenlerle kombinasyon halinde kullanılması beklenir. Apoptozun hedefleme mekanizmaları, gelecekteki klinik uygulamalarda gelişmeye devam edecek olan onkolojide umut verici bir strateji olmaya devam etmektedir (Carneiro ve El-deiry., 2020).

1.6. Hücre Döngüsü

Howard ve Pelc., (1953)'te, DNA sentezinin hücre bölünmesi sürecinde kesin bir periyotta gerçekleştiğini ilk kez tanımlamak için otoradyografik çalışmalar yapmışlardır. Bu dönüm noktası deneyi, bugün bildiğimiz şekliyle ökaryotik hücre döngüsü evrelerini tanımlamaya yönelik temel çalışmaları oluşturmuştur (Leal-Estaban ve Fajas., 2020). "Hücre döngüsü", deoksiribonükleik asit (DNA) duplikasyonu ve hücre bölünmesinin zamanlamasını ve sıklığını düzenleyen oldukça entegre bir süreçtir. Biyolojik bir kavram olarak, bir hücrenin bir bölünmeden diğerine geçtiği olaylar döngüsüne "hücre döngüsü" denir. Bu süre zarfında hücrenin içeriği doğru bir şekilde kopyalanmalıdır (Panda vd., 2019). Ökaryotik hücrelerin hücre döngüsü iki ana periyoda bölünür. En uzun periyot olan interfaz, G0, G1, S ve G2 fazı olarak dört farklı evreden oluşur. DNA'nın replikasyonu, interfazın S fazı adı verilen bölümünde gerçekleşir. S fazından önce hücrenin DNA sentezine hazırlandığı G1 adı verilen evre ve ardından hücrenin mitozu hazırlandığı G2 adı verilen evre gelir. G1'deki hücreler, DNA replikasyonundan önce G0 adı verilen dinlenme durumuna girebilir. G0'daki hücreler, insan vücudundaki büyümeyen, çoğalmayan hücrelerin büyük bir bölümünü oluşturur. İkinci ve daha kısa periyot aslında hücrelerin genetik materyalinin bölündüğü ve sitokinezin meydana geldiği mitoz veya M fazıdır. Mitozun evreleri ise profaz, metafaz,anafaz ve telofaz içermektedir (Leal-Estaban ve Fajas., 2020; Vermeulen vd., 2003).

Hücre döngüsü boyunca ilerleme, DNA sentezi ve kromozom ayrımı sırasında olası kusurları algılayan kontrol noktaları tarafından izlenir. Bu kontrol noktalarının

aktivasyonu, CDK aktivitesinin modülasyonu yoluyla hücre döngüsü durmasını indükler. Hücre döngüsü durdurma, hücrelerin bu kusurları düzgün bir şekilde onarmasına izin verir (Malumbres ve Barbacid., 2009). Düzenleyici kontrol noktaları, G1/S veya kısıtlama kontrol noktası, G2/M veya DNA replikasyon kontrol noktası ve metafaz/anafaz veya iğ ipliği oluşum kontrol noktasını içerir. G1/S kontrol noktası öncelikle büyüme faktörleri, hücre boyutu, hücre beslenmesi ve DNA hasarından etkilenir. G2/M kontrol noktası, uygun olmayan DNA replikasyonu ve hasarından etkilenir. Metafaz/anafaz kontrol noktası ise kromozomun mitotik iğ ipliklerine bağlanmasından etkilenir. Herhangi bir sürecin tamamlanmaması veya bu kontrol noktalarında hasar görülmesi durumunda, siklin-CDK düzenleyici aktivite bloke edilir. Hücrenin bu sorunlar çözülene ve hücre bir sonraki aşama için hazırlanana kadar döngü boyunca ilerlemesi engellenir (Wenzel ve Singh., 2018).

1.6.1. Kanserde Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, özellikle kısıtlama kontrol noktasında yer alan p53 ve pRb yollarının düzenlenmesinde büyük rol oynar (Wenzel ve Singh., 2018). Hücreler hücre döngüsünden ya geri dönüşümlü olarak ya da yaşlanma veya apoptoz yoluyla geri dönüşümsüz olarak çıkabilirler. Hücre döngüsünden çıkma kararı, hücre döngüsü kontrol noktalarından sadece birine, yani DNA hasarı kontrol noktasına bağlıdır. İnterfaz boyunca, onarılamaz DNA hasarına yanıt olarak, DNA hasarı kontrol noktası, büyük ölçüde p53'e bağlı yollar yoluyla durgunluk, yaşlanma veya programlanmış hücre ölümünü başlatabilir. p53 mutasyonları kanserde bulunan en yaygın mutasyonlardır (Matthews vd., 2022). Bir tümör baskılayıcı protein olan p53, G1 sırasında DNA hasarına yanıt verir ve CDK ile etkileşime giren bir protein olan p21'in transkripsiyonunu başlatır, pRb'yi fosforile etmek için G1'in gerekli CDK'lerinin aktivasyonunu inhibe eder ve bu nedenle DNA sentezinde ilerlemeyi önler. p53 ayrıca onarılamaz hasar durumlarında apoptoza yüksek oranda dahil olur (Wenzel ve Singh., 2018). Bununla birlikte, kanserle ilişkili mutasyonlar hücre döngüsü çıkışını engellese bile, E2F'ye bağlı transkripsiyonun aktivasyonuna bağlı olan prereplikatif G1 fazında hücre döngüsü girişi bloke edilerek sürekli çoğalma yine de önlenabilir. Buna paralel olarak, bu yolda kansere bağlı mutasyonlar tüm kanser türlerinde bulunmuştur ve birçok onkogen ve tümör baskılayıcıda mutasyon içerir. Bu mutasyonlar, E2F'ye bağlı

transkripsiyonu indükler, S faz girişini teşvik eder ve bir hücrenin prereplikatif fazda hücre döngüsünden çıkma yeteneğini tehlikeye atar (Matthews vd., 2022). pRb, başka bir tümör baskılayıcıdır. G1 ve kısıtlama kontrol noktasında yer alan CDK'lerin (CDK2, CDK 4 ve CDK6) bir hedefidir. Hatalı pRb işlevi, E2F'ye bağlanma eksikliği ile sonuçlanır, bu da daha sonra bu tür proteinleri düzenleme olmaksızın kopyalamasına ve hücreyi döngü boyunca ilerletmesine izin verir (Wenzel ve Singh., 2018).

Önemli olarak, diğer hücre döngüsü kontrol noktalarının (DNA replikasyonu stres kontrol noktası ve İğ ipliği oluşum kontrol noktası (SAC)) ana işlevlerinin kanser hücrelerinde hayati önem taşıdığı ve bunların sıklıkla mutasyona uğramadığı belirtilmiştir. Bu durum, replikasyon stresinden veya tamamlanmamış iğ iplikleri montajından kaynaklanan katastrofik DNA hasarı seviyelerini önlemek için gerekli olan mitoz öncesi ve sırasında geçici kontrol noktasına bağlı hücre döngüsü durdurulmasını içermektedir (Matthews vd., 2022).

1.6.2. Siklin:CDK Komplekslerinin Kanserde Rolü

Siklin proteinleri, üretim ve bozulmanın döngüsel doğasından dolayı böyle adlandırılır. Esas olarak kinaz aktivitesini tetiklerler. Yaklaşık 8 siklin tanımlanmıştır. Cyclin D, E, A ve B, her hücre döngüsü sırasında seri olarak rol gösterir. Kinazlar ise, hücrenin hücre döngüsünün çeşitli aşamalarından geçmesine yardımcı olan bu proteinlerin moleküler aktivitesini etkileyen enzimlerdir. Siklin-CDK kompleksi, önemli hedef proteinleri fosforile eder ve hücrenin hücre döngüsü boyunca ilerlemesini sağlar.

Kanser veya malignite, hücrelerin kontrolsüz ve kontrolsüz çoğalmasıdır. Örneğin meme, yemek borusu, karaciğer kanseri ve lenfomaların bir alt kümesinde siklin D'nin aşırı ekspresyonu durumunda görüldüğü gibi hücre döngüsü düzenleyici genler veya kontrol noktası genleri kanserde ya yanlış düzenlenir ya da mutasyona uğrar. Bununla birlikte, CDK4 geninin amplifikasyonu, melanomlar, sarkomlar ve glioblastomlar gibi malignitelere yol açar. Siklinler CDK'ları aktive ederken, inhibitörleri (CDKI'ler) hücre döngüsü üzerinde negatif kontrol uygulayarak CDK'leri baskılar. CDKI'ler, birçok insan malignitesinde yaygın olarak mutasyona uğrar veya baskılanır. Örneğin, p16'nın germ hattı mutasyonları melanoma neden olur. p16'nın somatik olarak

edinilmiş inaktivasyonu veya silinmesi karsinom pankreasa, glioblastomalara, yemek borusu kanserine, akut lenfositik lösemiye (ALL), küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları (KHDAK), yumuşak doku sarkomları ve idrar kesesi kanserlerine neden olur (Panda vd., 2019).

1.6.3. Kanserde Hücre Döngüsünü Hedefleme

Hücre sinyal yollarını hedefleyerek hücre döngüsünün düzenlenmesi, kanser tedavisi için nispeten yeni bir alandır ve hücre döngüsü aşamalarını ve kontrol noktalarını hedeflemek, kanser tedavisinin iyileştirilmesi için önemli fırsatlar sağlayabilir. Tümör hücreleri, hücre döngüsü mekanizmasının bileşenlerinde, özellikle hücre döngüsü ilerlemesini durdurarak DNA hasarına yanıt verme yeteneğinin bozulmasına neden olan değişiklikleri biriktirme eğilimindedir. Birçok anti-kanser ilacı DNA'ya zarar veren ajanlar olduğundan, hücre döngüsü mekanizmasının DNA hasarına yanıt verme yeteneğinin azalması kemorezistansa neden olabilir. Bugüne kadar, hücre döngüsü düzenlemesine odaklanan bir dizi kanser terapötik stratejisi bulunmaktadır. Bununla birlikte, önerilen ilaçların çoğu, normal hücreler üzerinde büyük sitotoksik etkilere de sahip olmadan kanser hücrelerini seçici olarak öldürmede başarısız olmuşlardır. Bu nedenle, kanser hücrelerine daha spesifik hücre döngüsü özelliklerini hedefleyen yeni nesil ilaçlara ihtiyaç vardır (Alimbetov vd., 2018).

1.7. Amaç ve Kapsam

Eriodictyol'un HT-29 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışma yapılsa da (Fernandez vd., 2021), 5-FU ile kombin çalışmaları mevcut değildir. Dolayısıyla, bu çalışmada bildiğimiz kadarıyla ilk defa ticari Eriodictyol ve Brusatol'un insan kolon kanseri/kolorektal kanser hücre hattında (HT-29 hücre hattı) 5-FU antikanser ilacı ile ayrı ayrı ve birlikte kullanımlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra apoptoz üzerindeki potansiyel etkilerinin de değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyaller

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Marka
RPMI-1640	Diagnovum
FBS	Diagnovum
Penisilin-Streptomisin	Capricorn
Trypsin	Diagnovum
DMSO	Santa Cruz
MTT	Appllichem A2231
Trypan Blue	Sigma T6146
Etanol	Merck
RNaz	Sigma
PI	Sigma
%0.1 Triton X-100	Sigma
Trizol Reagent	Ambion
Kloroform	Sigma
İzopropanol	Sigma
RNase free water	İnvitrogen

2.1.2. Kullanılan Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kitler Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2.Kullanılan kitler

Kullanılan Kitler	Marka
eBioscience™ Anneksin V-FITC Apoptosis Detection Kit	Thermo
OneScript® Plus cDNA sentez kiti	abm
WizPure™ qPCR Master Mix (SYBR)	Wizbiosolutions

2.7.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 3.Kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Marka
Class II Biyogüvenlik Kabini	Thermo Scientific
Karbondioksitli İnkübatör	Thermo Scientific
Su Banyosu	Daihan
İnverted Mikroskop	Zeiss Primovert
Binoküler Işık Mikroskobu	Nikon
Soğutmalı Santrifüj	Nüve
UV Spektrofotometre	Thermo Scientific
Çalkalayıcı (shaker)	Thermo Scientific
Otomatik Pipet Seti	Thermo Scientific
Multichannel Pipetör	Thermo Scientific
pH Metre	Hanna
Hassas Terazî	DENVER Instrument
Flow Sitometri Chazı	BDFACSCanto
Nanodrop Spectrophotometer ND-100	Thermo Scientific
PCR Cihazı	Techne
Real-Time PCR Cihazı	Thermo Scientific PIKO-RT 96
Otoklav	Nüve

2.2.Yöntemler

2.2.1.Hücre Kültürü

2.2.1.1.Kullanılan Hücre Hattı

Bu tez çalışmasında adherent HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) insan kanser hücre hattı kullanılmıştır.

2.2.1.2.HT-29 Hücreleri İçin Hücre Kültürü Koşulları

Hücreler %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve penisilin– streptomisin (100 U/ml-100 µg/ml) antibiyotiği içeren kararlı L-Glutaminli Roswell Park Memorial Institute Media (RPMI 1640) besiyeri ortamında 37°C sıcaklık, %5 karbondioksit (CO₂) ve %95 nemli ortam içeren CO₂ inkübatörü içerisinde ve 25-75 cm² lik hücre kültürü flasklarında büyütülmüştür. Hücreler inverted mikroskop ile düzenli olarak takip edilmiştir.

2.2.1.3.HT-29 Hücrelerinin Pasajlanması ve Hücre Sayımı

HT-29 hücreleri, hücre kültür flasklarında %70-80 yoğunluğa (confluency) ulaştıklarında temel hücre kültürü laboratuvarında tripsinizasyon yöntemi ile pasajlanmışlardır. Tripsinizasyon için öncelikle hücre kültür flasklarından besiyeri uzaklaştırılmıştır. Tripsinin etkili çalışabilmesi için hücreler iki kez PBS ile yıkanmıştır ve daha sonra uygun miktarda tripsin ile hücreler muamele edilerek 5-6 dk CO₂ inkübatörüne bırakılmıştır. Süre sonunda inverted mikroskop ile hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadıkları gözlemlenmiştir. Hücreler yüzeyden kalktıklarında hücre kültürü flasklarına kültürlerin sürekliliğinin sağlandığı besiyerinden eklenerek tripsinin inaktive edilmesi sağlanmıştır. Besiyeri ile toplanan hücreler 15 mL'lik falkona aktararak 24°C' de 800 rpm'de 6 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant dökülüp hücre pelletleri PBS ile yıkanmıştır ve 24°C' de 800 rpm'de 6 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar uzaklaştırılarak pellet yoğunluğuna göre hücre pelletleri uygun miktarda besiyeri içerisinde çözülmüştür. Daha sonrasında hücre süspansiyonundan ve trypan blue solüsyonundan eşit miktarlarda karıştırılıp Trypan blue exclusion yöntemi ile hemositometre kullanılarak

ışık mikroskobu altında canlı hücreler sayılmıştır. Hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Hücre yoğunluğu (hücre/mL) = Hücre sayısı x Seyreltme faktörü x 10^4 (Uğur vd., 2017)

2.2.1.4.HT-29 Hücre Hattından Stok Alma

Tripsinizasyondan sonra, hücrelerden 1×10^6 hc/mL olacak şekilde stoklar hazırlanmıştır. DMSO'nun her bir stokta son konsantrasyonu %10'dur. Daha sonra hücreler, kriyovial tüplere aktarılmıştır ve -20°C 'de 2 saat boyunca donmaya bırakılmıştır. Ardından stoklar -80°C 'ye alınarak 6 ay boyunca saklanmıştır.

2.2.1.5.Stoktaki HT-29 Hücrelerinin Çözülmesi

-80°C 'den alınan kriyovialler, aseptik şartlarda 37°C su banyosunda çözdürülmüştür. Stoktaki hücrelerin tamamı 10 mL PBS içeren falkon tüpe aktarılmıştır. 24°C 'de 800 rpm'de 6 dk santrifüjden sonra süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Her hücre pelleti 1-2 mL besiyerinde çözüldükten sonra 25 cm²'lik hücre kültürü flaskına alınarak 37°C 'de %5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

2.2.2.Etken Maddelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan Brusatol (Bru) (Sigma-Aldrich, SML1868, $\geq 95\%$ (HPLC)), Eriodictyol (Erio) (Sigma-Aldrich, 94258, $\geq 95\%$ (HPLC)) ve 5-FU antikanser ilacı (Sigma-Aldrich, F6627, $\geq 99\%$ (HPLC)) ticari olarak temin edilmiştir. Bru, Erio ve 5-FU etken maddelerinin stok solüsyonları DMSO içerisinde çözülerek hazırlanmıştır ve daha sonra tüplere bölünerek -20°C 'de saklanmıştır. Bru $9605.6 \mu\text{M}$, Erio $17346.1 \mu\text{M}$ ve 5-FU'nun ise $76875.8 \mu\text{M}$ olacak şekilde stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hücre kültürü deneylerinde kullanılan etken maddelerin farklı konsantrasyonları hücrelerin büyümesi için kullanılan medyum ile seyreltilerek elde edilmiştir.

2.2.3.MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Her etken maddenin tek başına ve kombinasyon uygulamalarının HT-29 hücre canlılığı üzerine etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)

yöntemi ile 24, 48 ve 72 saat için belirlenmiştir (Mossman, 1983). Bu test için, hücreler 96 kuyucuklu mikropalakalara hücre konsantrasyonu 2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir ve 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 nemli ortam sağlayan CO_2 inkübatöründe 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, kuyucuklara test örneklerinden 20 μL eklenmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan hücreler muamele edilmeyen hücrelerdir. İlgili inkübasyon süresinin (24, 48 veya 72 saat) tamamlanmasının ardından her kuyucuktaki besi ortamı uzaklaştırılmıştır ve her kuyucuğa 100 μL taze besi ortamı ve 10 μL MTT (5 mg/mL) eklenmiştir. Bu mikropalaklar 4 saat daha CO_2 inkübatöründe inkübe edildikten sonra, her kuyucuğa 100 μL DMSO canlı hücrelerde oluşan mavi-mor renkli suda çözülmeyen formazan kristallerinin çözünmesi için eklenmiştir. 150 rpm'de 5-6 dakika çalkalandıktan sonra, mikropalakaların absorbansı (Abs) bir spektrofotometre ile 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Etken maddelerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi aşağıdaki formüle göre % hücre canlılığı olarak hesaplanmıştır (Uğur., 2017).

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = (\text{Abs muamele edilen hücre ortalaması}) / (\text{Abs kontrol grubu}) * 100$$

Tüm inkübasyon zamanları için test edilen son konsantrasyonlar Bru için 0.087, 0.35, 1.43, 5.75, 23, 92 ve 192 μM ve 5-FU için 85.4, 256.22, 538, 768.66, 1537 ve 2306 μM 'dir. Erio'nun 24 ve 48 saatte 10.84, 21.68, 43.37, 86.75, 173.5, 347 ve 694 μM konsantrasyonları test edilirken 72 saatte iki yüksek konsantrasyonu (347 ve 694 μM) test edilmemiştir. Her bir test maddesi için HT-29 hücre hattında IC_{50} değerleri, SPSS istatistik programı (version 22.0) yardımıyla hesaplanmıştır. Kombin uygulamalarda kullanılacak olan konsantrasyonlar hesaplanan bu IC_{50} değerleri dikkate alınarak belirlenmiştir (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2. 4. Etken maddelerin uygulama planı

Etken Madde	Eriodictyol (E)+5-Fluorourasil (5-FU)	Brusatol (B)+5-Fluorourasil (5-FU)	Eriodictyol (E)+Brusatol (B)	Eriodictyol (E)+Brusatol (B)+5-Fluorourasil (5-FU)
Konsantrasyonlar	2XIC ₅₀ E+2XIC ₅₀ 5-FU	2XIC ₅₀ B+2XIC ₅₀ 5-FU		
		2XIC ₅₀ B+IC ₅₀ 5-FU		
		2XIC ₅₀ B+IC ₅₀ /2 5-FU		
		IC ₅₀ B+2XIC ₅₀ 5-FU	IC ₅₀ E+IC ₅₀ B	IC ₅₀ E+IC ₅₀ B+IC ₅₀ 5-FU
	IC ₅₀ E+IC ₅₀ 5-FU	IC ₅₀ B+IC ₅₀ 5-FU	IC ₅₀ /2 E+IC ₅₀ /2 B	IC ₅₀ /2 E+IC ₅₀ /2 B+IC ₅₀ /2 5-FU
	IC ₅₀ E+IC ₅₀ /2 5-FU	IC ₅₀ B+IC ₅₀ /2 5-FU		
		IC ₅₀ /2 B+2XIC ₅₀ 5-FU		
	IC ₅₀ /2 E+IC ₅₀ 5-FU	IC ₅₀ /2 B+IC ₅₀ 5-FU		
	IC ₅₀ /2 E+IC ₅₀ /2 5-FU	IC ₅₀ /2 B+IC ₅₀ /2 5-FU		

2.2.3.1.Kombinasyon İndeksinin Hesaplanması (Kİ)

İlaç kombinasyonlarının sinerjistik, aditif veya antagonistik etkilerinin araştırılması için Chou-Talalay’ın önerdiği kombinasyon indeksi kullanılmıştır (Banarjee vd, 2021). Bu tez çalışmasında etken maddelerin kombinasyon indeksleri Chou-Talalay’ın çalışmasını temel alan CompuSyn bilgisayar programı ile hesaplanmıştır (Chou ve Martin, 2005; Benerjee vd., 2021). Kİ değerlerine göre genel olarak sinerjik etkinin görüldüğü konsantrasyonlar dikkate alınarak apoptotik etkiler incelenmiştir.

2.2.4.Etken Maddelerin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

2.2.4.1.Flow sitometi ile Apoptozun Araştırılması

Bu tez çalışmasında ticari bir “eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, 88-8007-72)” kullanılarak flow sitometri ile HT-29 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdeleri 48 saat için belirlenmiştir. Hücreler her kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve 24 saat CO₂ inkübasyonunda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra ilgili kuyucuklara ilgili etken madde konsantrasyonlarından eklenmiştir ve hücreler CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlgili inkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra

kuyucuktaki hücreler toplanmıştır. Daha sonra negatif kontrol ile birlikte tek boyama içeren kontroller ve pozitif kontrol boyanmamış hücreler hazırlanmıştır. Kullanılan kitin tavsiye ettiği şekilde bağlanma tamponunda çözülen hücrelere Annexin V-FITC ile PI eklenmiştir. Bu hücreler oda sıcaklığında karanlıkta 10-15 dakika inkübe edilmiştir. Her bir hücre grubu için 10000 hücre, Flow sitometri cihazıyla analiz edilmiştir. Dolayısıyla, Flow sitometri ile apoptotik, geç apoptotik, canlı ve nekrotik hücreler kantitatif olarak belirlenmiştir.

Bu deneyde, HT-29 hücre hattında her etken maddenin tek başlarına ve 5-FU ile kombinasyonları test edilmiştir. Kombine uygulamaların HT-29 hücre hattındaki potansiyel apoptotik etkisini belirlemek için, IC_{50} ve $IC_{50}/2$ konsantrasyonlardaki Bru veya Erio'nun IC_{50} konsantrasyondaki 5-FU ile kombine uygulamaları denenmiştir.

2.2.4.2.Real Time PCR İle Apoptozun Araştırılması

Bu analiz de 48 saatte HT-29 hücre hattında her etken maddenin tek başlarına ve 5-FU ile kombinasyonları için yapılmıştır. Kombine uygulamalarda IC_{50} ve $IC_{50}/2$ konsantrasyonlardaki Bru veya Erio'nun IC_{50} konsantrasyondaki 5-FU ile kombin uygulamaları test edilmiştir.

2.2.4.2.1.Trizol Reagent İle Total RNA İzolasyonu

Bru, Erio ve 5-FU'nun 48 saatteki $2 \times IC_{50}$, IC_{50} ve $IC_{50}/2$ değerlerinin tek başına ve seçilen kombin konsantrasyonların Real Time analizi için öncelikle Trizol Reagent ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücreler, kuyucuk başına 3×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 24 saat sonrasında etken maddelerin tek başına ve belirlenen kombin uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Plakalar, 48 saatlik inkübasyon için CO_2 inkübatörüne bırakılmıştır. 48 saat sonunda, plakalardaki her kuyucuğa 500 μ L trizol eklenerek hücre kazıyıcı ile hücreler tamamen kaldırılıp ependorf tüplere toplanmıştır. Her bir ependorf tüpe 100 μ L kloroform eklendikten sonra şiddetli vorteks ile tüpler karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, soğutmalı santrifüj ile $+4^{\circ}C$ 'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir ve renksiz olan üst faz pipetle çekilerek ayrı bir ependorf tüpe alınmıştır. RNA'yı çöktürmek için toplanan üst fazların üzerine 250 μ L izopropanol eklenip tüpler vortekslenmiştir. Ardından tekrar tüpler $+4^{\circ}C$ 'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüplerdeki pelletlerin her

birinin üzerine %70'lik etanolden 200 µL eklenmiştir ve +4°C'de 15.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant atılıp tüplerin dibindeki alkol uzaklaştırılmıştır ve pellet 35 µL RNase içermeyen su (RNase free water) ile çözünmüştür. İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop cihazı (Thermo) ile ölçülmüştür.

2.2.4.2.2.cDNA Sentezi

RNA izolasyonundan elde edilen RNA'ların cDNA sentezi OneScript Plus cDNA sentez kitinin (Cat. No. G236) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2.5.'de verilen cDNA sentez karışım prosedürü doğrultusunda buz üzerinde karışım hazırlandıktan sonra 50°C'de 15 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dk bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar Real-Time PCR için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2. 5. cDNA sentez karışımı

	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	2 µg
Oligo(dT) Primer (10 µM)	1 µL	0.5 µM
dNTP karışımı (10 mM)	1 µL	500 µM
5X RT tamponu	4 µL	1X
OneScript Plus RTase (200 U/µL)	1 µL	200 U/rxn
Nuclease free su	Değişken	-
Son hacim	20 µL	-

2.2.4.2.3.Real-Time PCR Analizi

Bru, Erio ve 5-FU'nun tek başlarına ve seçilen kombinasyon uygulamalarının HT-29 hücrelerinde Real-Time PCR yöntemi ile apoptotik genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler araştırılmıştır. Apoptoz ile ilişkili yollarda görev alan *bax*, *puma*, *kaspaz 3* (pro-apoptotik genler) ve *bcl-2* (anti-apoptotik) olmak üzere 5 adet genin ekspresyon değişimi tespit edilmiştir. Normalizasyon için *beta aktin*

housekeeping gen olarak kullanılmıştır (Çizelge 2.6.). Real-Time PCR analizi için reaksiyon koşulları her bir kuyucukta 5.5 µL SYBR green, 6.5 µL nükleaz içermeyen su, 1 µL forward primer, 1µL reverse primer ve 1 uL cDNA olacak şekilde 96 kutucuklu plakaya eklenmiştir ve Real-Time PCR cihazına yüklenmiştir. Yüklenen plakalar, 95°C’de 10 dk, 95°C’de 15 sn ve 60°C’de 1 dk 40 döngü olacak şekilde amplifiye edilmiştir.

Çizelge 2. 6. Real-Time PCR için primer sekansları

Gen Adı	Primer Dizileri
<i>beta-aktin</i>	F 5’-CCAACCGCGAGAAGATGA-3’ R 5’-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3’
<i>bax</i>	F 5’-TCTGACGGCAACTTCAACTG-3’ R 5’-TTGAGGAGTCTCACCCAACC-3’
<i>bcl-2</i>	F 5’-CATGCTGGGGCCGTACAG-3’ R 5’-GAACCGGCACCTGCACAC-3’
<i>kaspaz-3</i>	F 5’-TGAAGCTACCTCAAACCTTCC-3’ R 5’-CAGCATCACTGTAACCTTGCT-3’
<i>puma</i>	F 5’-GACGACCTCAACGCACAGTA-3’ R 5’-GTAAGGGCAGGAGTCCCAT-3’

2.2.5.Flow Sitometri ile Hücre Döngü Profiline Belirlenmesi

Bu analiz Brusatol, Eriodictyol ve 5-FU’nun 48 saatteki 2xIC₅₀, IC₅₀ ve IC₅₀/2 değerindeki konsantrasyonlarının tek başına etkisi için yapılmıştır. Kombin uygulamalarda Brusatol’ün IC₅₀ veya IC₅₀/2 konsantrasyonları ile 5-FU’nun IC₅₀ konsantrasyonları kullanılırken Eriodictyol’ün IC₅₀ konsantrasyonu ile 5-FU’nun IC₅₀ konsantrasyonu kullanılmıştır. Belirlenen inkübasyon sürelerinin tamamlanmasından

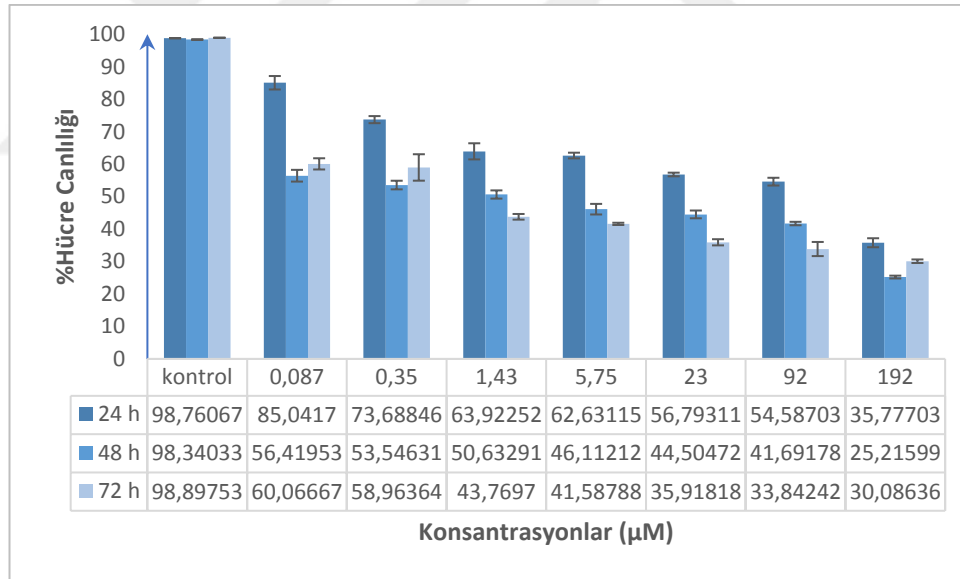
sonra toplanan hücreler 1 mL fosfat tampon içinde çözölmüştür ve hücrelere düşük hızda vorteksleme esnasında 4 mL soğuk etanol yavaşça ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan tüpler -20°C’de en az 24 saat saklanmıştır ve sonrasında hücreler 12000 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiştir ve pelletler soğuk 5 mL PBS’de yıkanmıştır. Daha sonra hücre pelletleri %0,1 Triton-X içeren PBS’de çözölmüştür. Her pellete 20 µL RNase A (200 µg/mL) eklenmiştir ve 30 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüplere 20 µL PI (1 mg/mL) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildikten sonra Flow sitometri ile ilgili program aracılığıyla (ModFitLT 30) okuma tamamlanmıştır (Yılmazer Çakmak, 2011).



3. BULGULAR

3.1. Brusatol'ün Konsantrasyon ve Zamana Bağlı Olarak HT-29 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

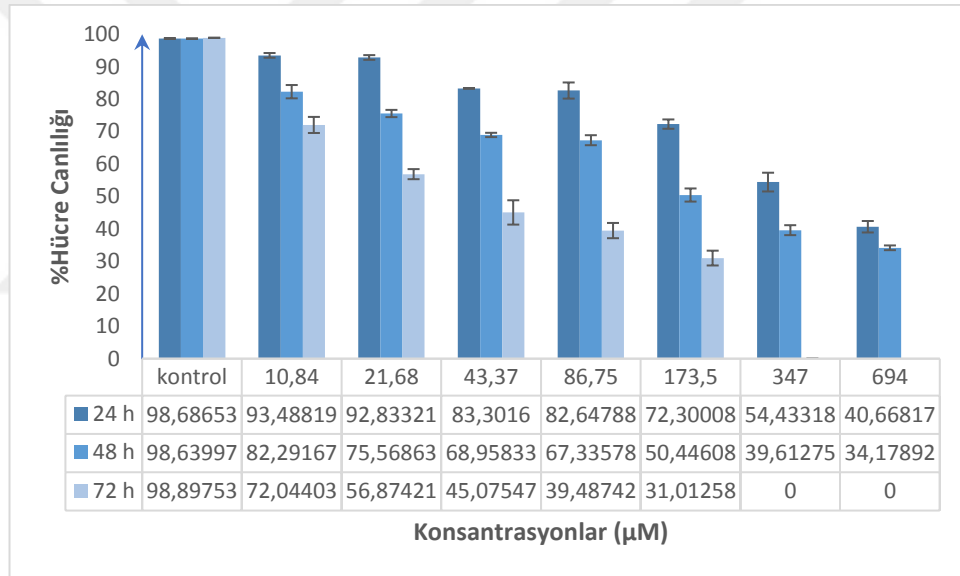
24, 48 ve 72 saatte Bru'nun 7 farklı konsantrasyonu ile muamele edilen HT-29 hücre hattında hücre canlılığı MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda her inkübasyon süresi için Bru'nun artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. 24 saatte 192 μM , 48 saatte 5.75 μM ve üzerindeki ve 72 saatte ise 1.43 μM ve üzerindeki konsantrasyonlardaki Bru ile muamele edilen HT-29 hücrelerinin hücre canlılığının %50'nin altında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.1.). MTT testindeki veriler doğrultusunda, Bru'nun 24, 48 ve 72 saatteki hesaplanan IC_{50} değerleri sırasıyla 109.5, 1.15 ve 0.96 μM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. 1. Bru'nun konsantrasyon ve zamana bağlı olarak HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

3.2.Eriodictyol'ün Konsantrasyon ve Zamana Bağlı Olarak HT-29 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

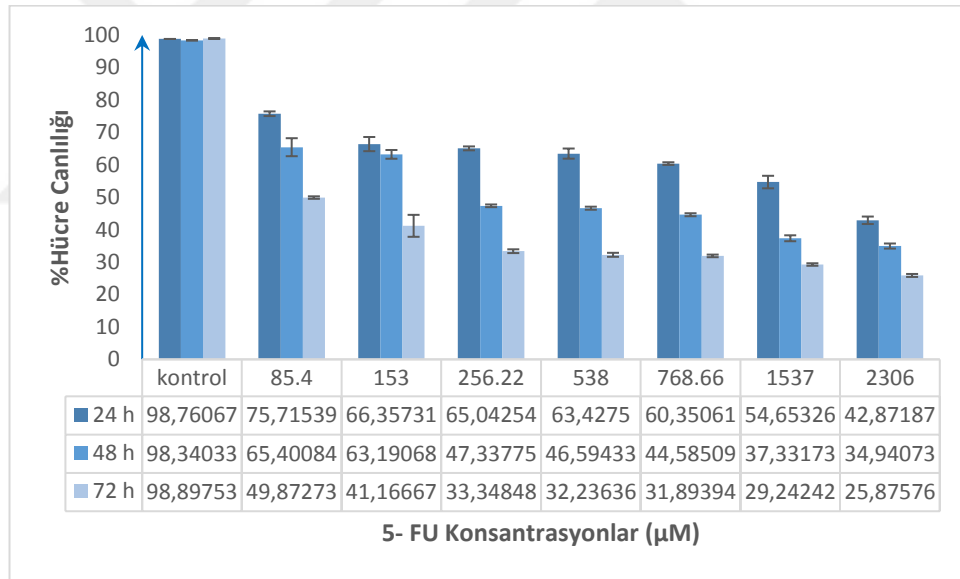
Erio'nun belirli konsantrasyonlarda HT-29 hücreleri üzerindeki canlılık etkileri 24, 48 ve 72 saat için MTT testi ile belirlenmiştir. Hücre canlılık grafiğinde görüldüğü üzere Bru'nun etkisine benzer şekilde Erio'nun artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. HT-29 hücrelerinde yaklaşık %50 veya %50'nin altında hücre canlılığı 24 saatte 694 μM , 48 saatte 173.5 μM ve üzerindeki konsantrasyonlar, 72 saatte ise 43.37 μM ve üzerindeki konsantrasyonlardaki Erio ile muamele edilen hücrelerde belirlenmiştir (Şekil 3.2.). MTT deneylerinin sonuçlarına göre, Erio'nun 24, 48 ve 72 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 486, 173 ve 38 μM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. 2.Erio'nun konsantrasyon ve zamana bağlı olarak HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

3.3.5-Florourasil'in Konsantrasyon ve Zamana Bağlı Olarak HT-29 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

5-FU'nun belirlenen 7 farklı konsantrasyonu ile muamele edilen HT-29 hücrelerinin hücre canlılığı 24, 48 ve 72 saat için MTT yöntemi ile test edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda hücre canlılığının zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür. 5-FU ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde hücre canlılığının %50'nin altında olduğu konsantrasyonlar 24 saatte 2306 μM , 48 saatte 256.22 μM ve üzeri, 72 saatte ise 84.5 μM ve üzerindeki konsantrasyonlardır (Şekil 3.3.). HT-29 hücre hattında 5-FU'nun 24, 48 ve 72 saatteki IC_{50} değerlerinin sırasıyla 1845, 653 ve 84.5 μM olduğu hesaplanmıştır.



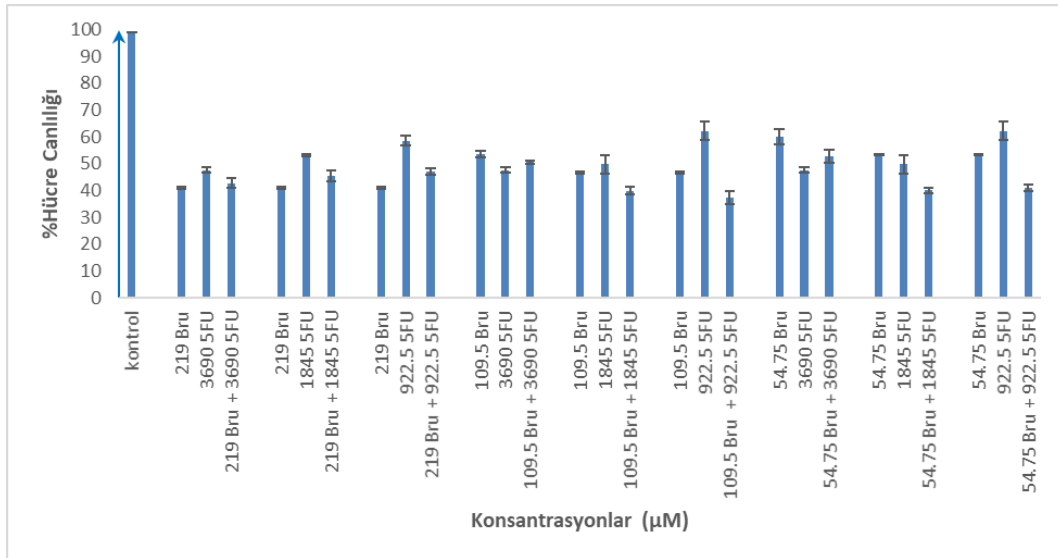
Şekil 3. 3. 5-FU'nun konsantrasyon ve zamana bağlı olarak HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

3.4.Kombin Uygulamalar

3.4.1.Brusatol ve 5-FU Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

3.4.1.1.Brusatol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 24 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri

Bru'nun 219 ($2 \times IC_{50}$), 109.5 (IC_{50}) ve 54.75 ($IC_{50}/2$) μM konsantrasyonları ile 5-FU'nun 3690 ($2 \times IC_{50}$), 1845 (IC_{50}) ve 922.5 ($IC_{50}/2$) μM konsantrasyonlarının tek başına ve kombin uygulamalarının 24 saatte HT-29 hücre hattında hücre canlılığı etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, kombin uygulamalarda belirlenen yüzde hücre canlılıkları genel olarak etken maddelerin tek başına neden oldukları yüzde hücre canlılığına kıyasla daha az olarak belirlenmiştir (Şekil 3.4.). Kombinasyon uygulamalarının kombinasyon indeksi değerleri Çizelge 3.1.'de görülmektedir. Buna göre, Bru'nun IC_{50} ve $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonlar ile 5-FU'nun IC_{50} ve $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonların kombin uygulamalarının sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir.



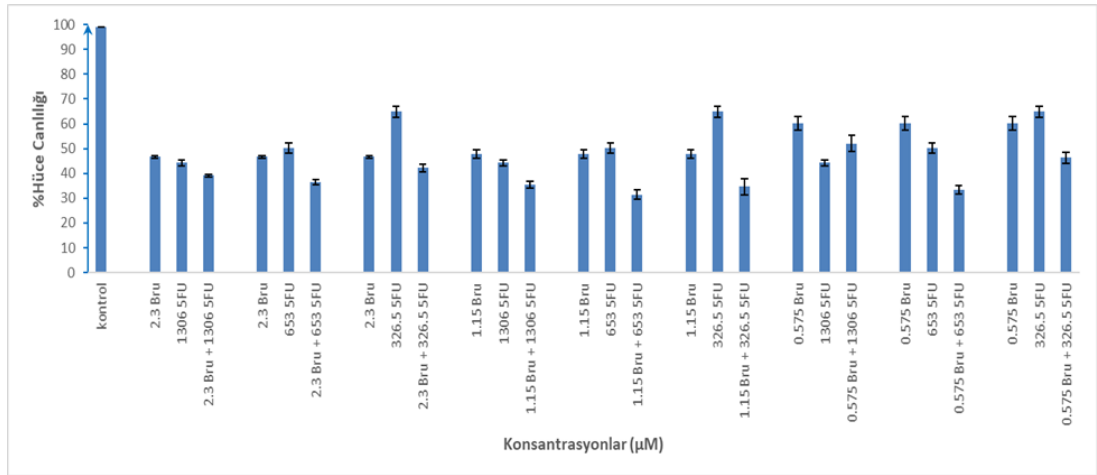
Şekil 3. 4. 24 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Çizelge 3. 1. 24 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri

Bru (µM)	5- FU (µM)	Kombinasyon İndeksi (Kİ)	Tanımlanan Etki
219	3690	1.76624	Antagonistik
219	1845	1.76202	Antagonistik
219	922.5	1.88007	Antagonistik
109.5	3690	2.67980	Antagonistik
109.5	1845	0.65774	Sinerjik
109.5	922.5	0.41271	Sinerjik
54.75	3690	2.60235	Antagonistik
54.75	1845	0.43567	Sinerjik
54.75	922.5	0.36300	Sinerjik

3.4.1.2. Brusatol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 48 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri

48 saatte HT-29 hücre hattında, Bru'nun $2 \times IC_{50}$, IC_{50} ve $IC_{50}/2$ değerleri sırasıyla 2.3, 1.15 ve 0.575 µM, 5-FU'nun ise 1306, 653 ve 326.5 µM olarak denenmiştir. Bru ve 5-FU'nun tek başına ve kombinasyonlarının HT-29 hücre hattında hücre canlılığına etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Buna göre, kombinasyon uygulamalarının genel olarak Bru'nun tek başına neden olduğu hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin altında bir etkinin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.5.). Bru ve 5-FU kombinasyon uygulamalarının HT-29 hücre hattı için Kİ değerleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Bu tablodaki Kİ verileri doğrultusunda, kombinasyon uygulamalarda 5-FU'nun IC_{50} (653 µM) ve $IC_{50}/2$ (326.5 µM) konsantrasyonları ile Bru'nun test edilen tüm konsantrasyonlarının (2.3, 1.15 ve 0.575 µM), aditif etkili $2 \times IC_{50}$ Bru + $IC_{50}/2$ 5-FU kombini dışında sinerjik bir etkiye neden olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3. 5.48 saate Bru ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

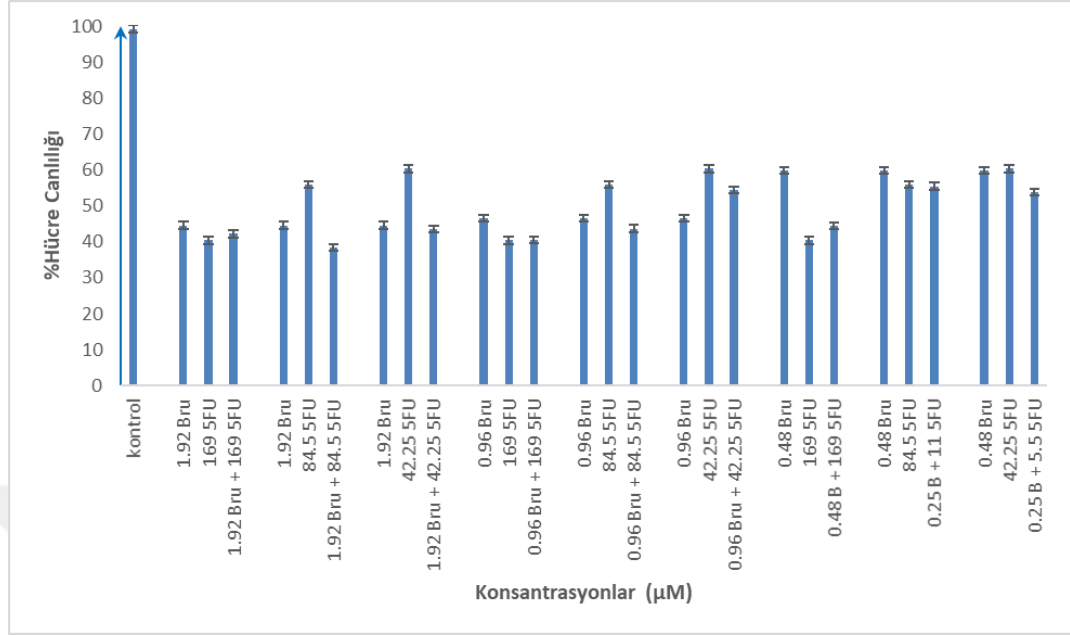
Çizelge 3. 2. 48 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri

Bru (µM)	5- FU (µM)	Kombinasyon İndeksi (Kİ)	Tanımlanan Etki
2.3	1306	1.33634	Orta Antagonistik
2.3	653	0.74650	Orta Sinerjik
2.3	326.5	1.00283	Aditif
1.15	1306	0.78622	Orta Sinerjik
1.15	653	0.34143	Sinerjik
1.15	326.5	0.31266	Sinerjik
0.575	1306	2.35068	Antagonistik
0.575	653	0.33081	Sinerjik
0.575	326.5	0.60495	Sinerjik

3.4.1.3. Brusatol ve 5-Fluorourasil Kombinasyonunun 72 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri

Etken maddelerin 72 saatteki IC₅₀ konsantrasyonları dikkate alınarak, Bru'nun 1.92 (2xIC₅₀), 0.96 (IC₅₀) ve 0.48 (IC₅₀/2) µM konsantrasyonları ile 5-FU'nun 169 (2xIC₅₀), 84.5 (IC₅₀) ve 42.25 (IC₅₀/2) µM konsantrasyonlarının tek başına ve kombin uygulamalarının HT-29 hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı etkileri MTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 5.6.). 72 saatte kombinasyon uygulamalarından elde edilen MTT sonuçlarına göre, Kİ değerleri Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir. Buna göre, 72 saatte Bru

ile 5-FU'nun 1.92 μM + 84.5 μM kombini aditif diğer kombinlerin ise antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 3. 6. 72 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

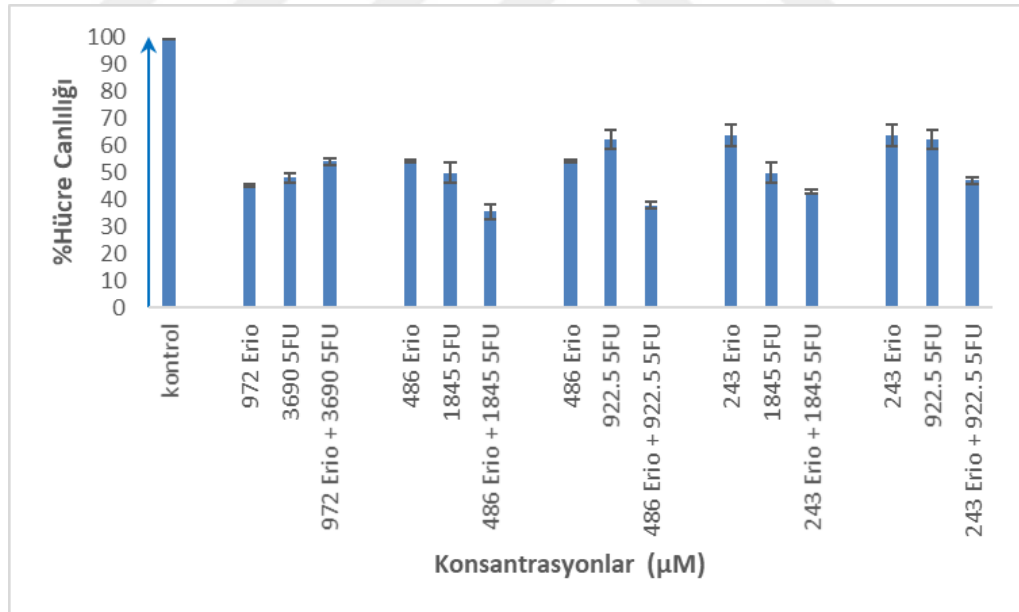
Çizelge 3. 3. 72 saatte Bru ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri

Bru (μM)	5- FU (μM)	Kombinasyon İndeksi (Kİ)	Tanımlanan Etki
1.92	169	1.96993	Antagonistik
1.92	84.5	1.05971	Aditif
1.92	42.25	1.35909	Orta Antagonistik
0.96	169	1.30544	Orta Antagonistik
0.96	84.5	1.10239	Hafif Antagonistik
0.96	42.25	2.02936	Antagonistik
0.48	169	1.46910	Antagonistik
0.48	84.5	2.04195	Antagonistik
0.48	42.25	1.24467	Orta Antagonistik

3.4.2.Eriodictyol ve 5-FU Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

3.4.2.1. Eriodictyol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 24 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri

24 saatteki IC₅₀ değerleri dikkate alınan Erio'nun 972 (2xIC₅₀), 486 (IC₅₀) ve 243 (IC₅₀/2) µM konsantrasyonları ile 5-FU'nun 3690 (2xIC₅₀), 1845 (IC₅₀) ve 922.5 (IC₅₀/2) µM konsantrasyonlarının tek başına ve kombin uygulamalarının 24 saatte HT-29 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 3.7.). Kombinasyon uygulamalarının neden olduğu yüzde hücre canlılık değerleri dikkate alınarak, hesaplanan Kİ değerleri Çizelge 3.4.'te verilmiştir. Buna göre, 5-FU'nun IC₅₀/2 (922.5 µM) konsantrasyonu ile Erio'nun test edilen konsantrasyonlarının IC₅₀ (486) ve IC₅₀/2 (243 µM) etkisinin aditif olduğu, diğer kombinasyon uygulamalarının ise antagonistik olduğu görülmektedir.



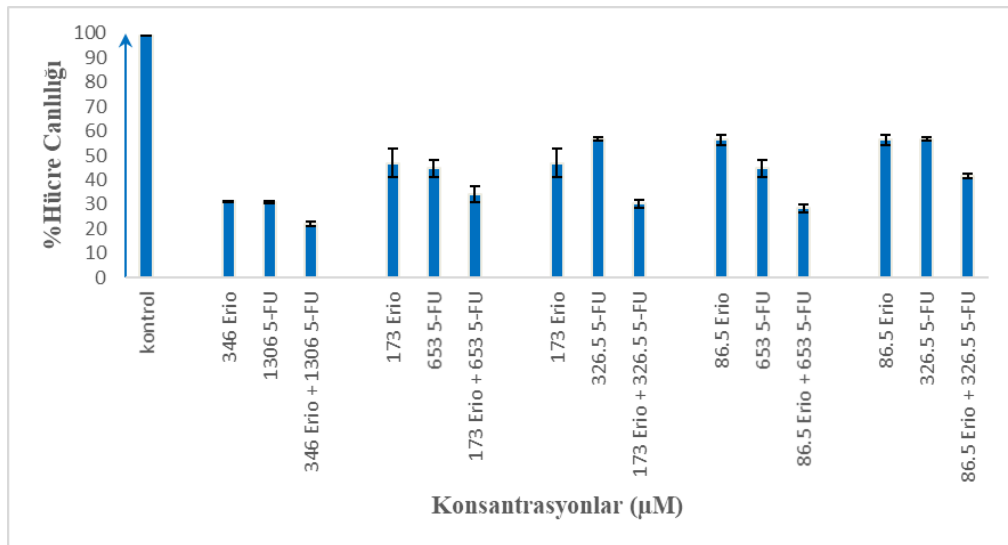
Şekil 3. 7.24 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Çizelge 3. 4. 24 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri

Erio (µM)	5- FU (µM)	Kombinasyon İndeksi (Kİ)	Tanımlanan Etki
972	3690	7.91842	Güçlü Antagonistik
486	1845	1.20353	Orta Antagonistik
486	922.5	1.06433	Aditif
243	1845	1.19389	Hafif Antagonistik
243	922.5	1.00749	Aditif

3.4.2.2. Eriodictyol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 48 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri

Erio ve 5-FU'nun 48 saatteki IC₅₀ değerleri dikkate alınarak, Erio'nun 346 (2xIC₅₀), 173 (IC₅₀) ve 86.5 (IC₅₀/2) µM konsantrasyonları ile 5-FU'nun 1306 (2xIC₅₀), 653 (IC₅₀) ve 326.5 (IC₅₀/2) µM konsantrasyonlarının tek başına ve kombin uygulamalarının 48 saatteki HT-29 hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı etkileri MTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 3.8.). Hesaplanan Kİ değerleri Çizelge 3.5.'te verilmiştir. Buna göre, Erio'nun IC₅₀/2 konsantrasyonu ile 5-FU'nun IC₅₀ ve IC₅₀/2 konsantrasyonlarının yanı sıra Erio'nun IC₅₀ ve 5-FU'nun IC₅₀/2 konsantrasyonları ile yapılan kombin uygulamalarının etkisinin sinerjik olduğu görülmüştür.



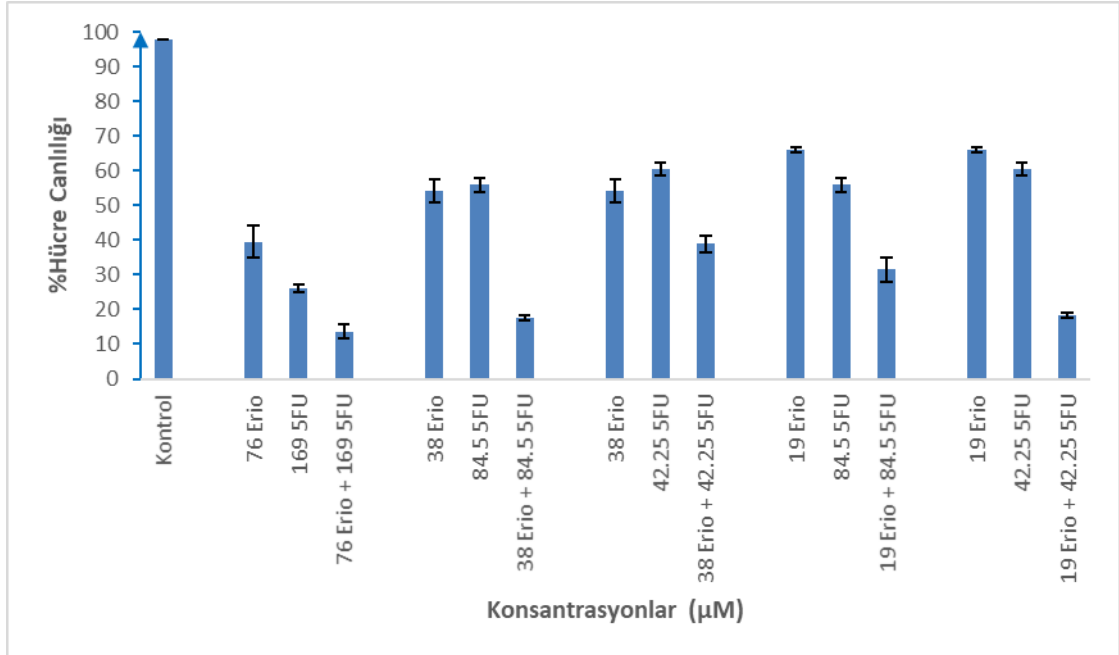
Şekil 3. 8. 48 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Çizelge 3. 5. 48 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri

Erio (µM)	5- FU (µM)	Kombinasyon İndeksi (Kİ)	Tanımlanan Etki
346	1306	1.02293	Aditif
173	653	1.12277	Hafif
173	326.5	0.65611	Antagonistik
86.5	653	0.60133	Sinerjik
86.5	326.5	0.86007	Sinerjik
			Hafif Sinerjik

3.4.2.3.Eriodictyol ve 5-Florourasil Kombinasyonunun 72 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri

Erio'nun 76, 38 ve 19 µM konsantrasyonları ile 5-FU'nun 169, 84.5 ve 42.25 µM konsantrasyonlarının tek başına ve kombin uygulamalarının 72 saatteki HT-29 hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı etkileri MTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 3.9.). MTT sonuçlarına göre hesaplanan Kİ değerleri Çizelge 3.6'da gösterilmektedir. Buna göre, hesaplanan Kİ değerlerine bakıldığında test edilen tüm kombinasyon uygulamalarının sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 3. 9. 72 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Çizelge 3. 6. 72 saatte Erio ve 5-FU kombinasyonlarının Kİ değerleri

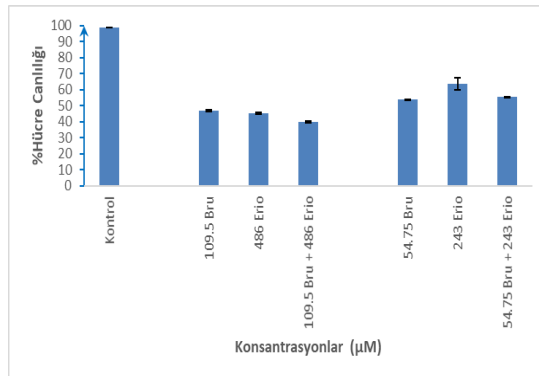
Erio (µM)	5- FU (µM)	Kombinasyon İndeksi (Kİ)	Tanımlanan Etki
76	169	0.47887	Sinerjik
38	84.5	0.33401	Sinerjik
38	42.25	0.84528	Orta Sinerjik
19	84.5	0.68833	Sinerjik
19	42.25	0.16701	Güçlü Sinerjik

3.4.3. Brusatol ve Eriodictyol ile Brusatol, Eriodictyol ve 5-FU'nun Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

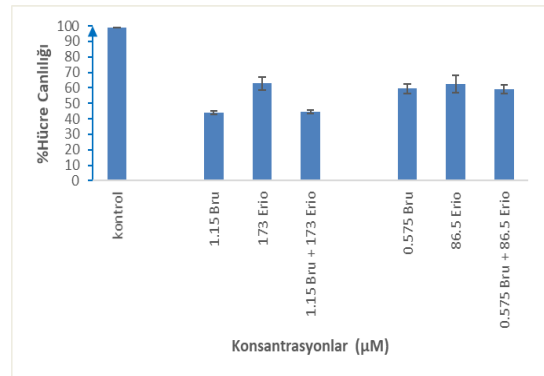
3.4.3.1. Brusatol-Eriodictyol Kombinasyonunun 24, 48 ve 72 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri

Bru ve Erio'nun birlikte kullanımının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmak için her iki etken maddenin ilgili inkübasyon zamanlarındaki IC₅₀ ve IC₅₀/2 değerindeki konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu kombin uygulamaların hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saat için araştırılmıştır (Şekil 3.10.).

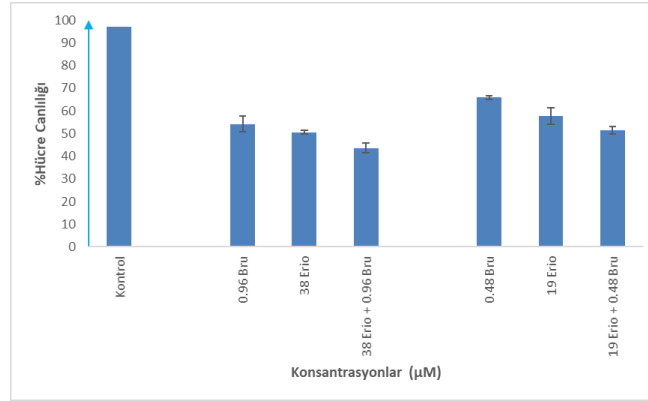
A



B



C



Şekil 3. 10. 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatte Erio ve Bru kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

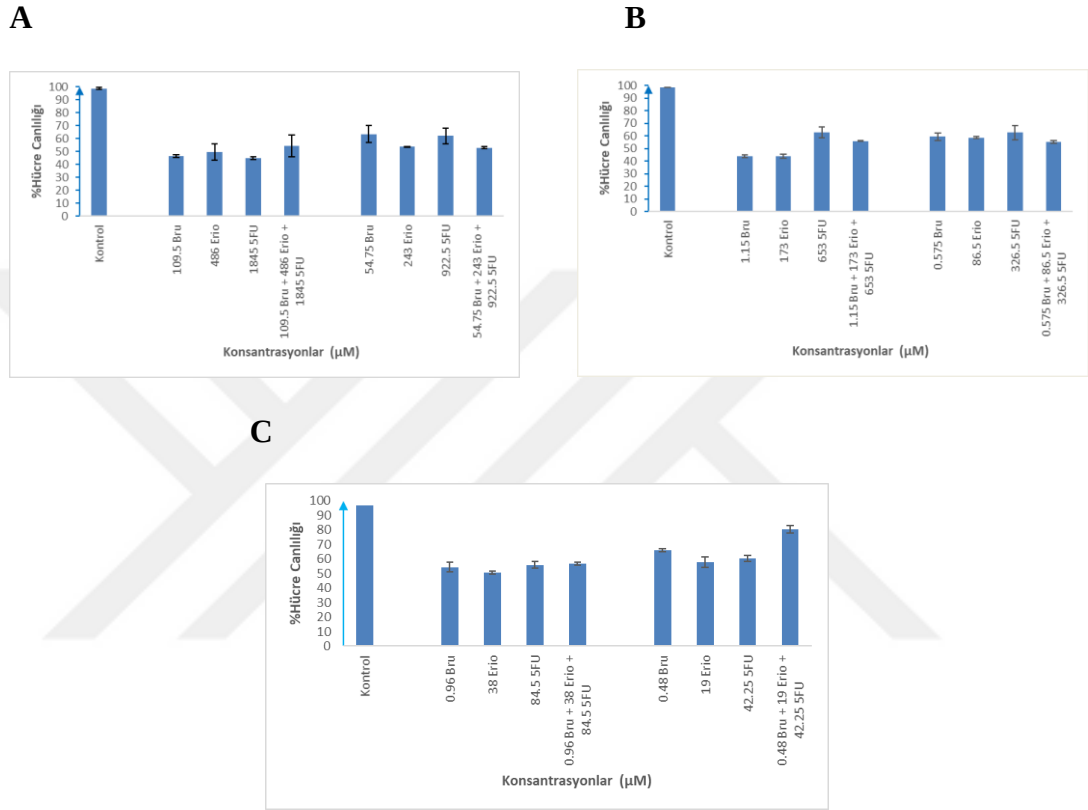
Bru ve Erio'nun kombin uygulamalarından elde edilen verilere göre hesaplanan Kİ değerleri Çizelge 3.7'de gösterilmektedir. Buna göre, kombinasyon uygulamalarının 24 ve 48 saatte antagonistik 72 saatte ise aditif etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 3. 7. 24, 48 ve 72 saatte Bru ve Erio kombinasyonlarının Kİ değerleri

Bru (µM)	Erio (µM)	İnkübasyon zamanı	Kombinasyon İndeksi (Kİ)	Tanımlanan Etki
109.5	486	24 h	1.36958	Antagonistik
54.75	243	24 h	1.95102	Antagonistik
1.15	173	48 h	1.58364	Antagonistik
0.575	86.5	48 h	1.62931	Antagonistik
0.96	38	72 h	1.07323	Aditif
0.48	19	72 h	0.98358	Aditif

3.4.3.2. Brusatol-Eriodictyol-5-FU Kombinasyonunun 24, 48 ve 72 Saatte Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ve Kombinasyon İndeksi Değerleri

Etken maddelerin üçlü kombinasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi 24, 48 ve 72 saat için her etken maddenin ilgili inkübasyon zamanındaki IC₅₀ ve IC₅₀/2 konsantrasyonları dikkate alınarak belirlenmiştir (Şekil 3.11.).



Şekil 3. 11. 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatte Bru, Erio ve 5-FU kombinasyonlarının HT-29 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Brusatol, Eriodictyol ve 5-FU'nun birlikte uygulanmaları sonucunda elde edilen verilere göre hesaplanan Kİ değerleri Çizelge 3.8'de özetlenmiştir. Buna göre, tüm kombinasyonların her inkübasyon zamanında antagonistik olduğu görülmüştür.

Çizelge 3. 8. 24, 48 ve 72 saatte Bru, Erio ve 5-FU kombinasyonlarının KI değerleri

Bru (µM)	Erio (µM)	5-FU (µM)	İnkübasyon zamanı	Kombinasyon İndeksi (KI)	Tanımlanan Etki
109.5	486	1845	24 h	4.92731	Güçlü Antagonistik
54.75	243	922.5	24 h	2.28003	Antagonistik
1.15	173	653	48 h	3.87934	Güçlü Antagonistik
0.575	86.5	326.5	48 h	1.87744	Antagonistik
0.96	38	84.5	72 h	4.15919	Güçlü Antagonistik
0.48	19	42.25	72 h	56.4743	Çok Güçlü Antagonistik

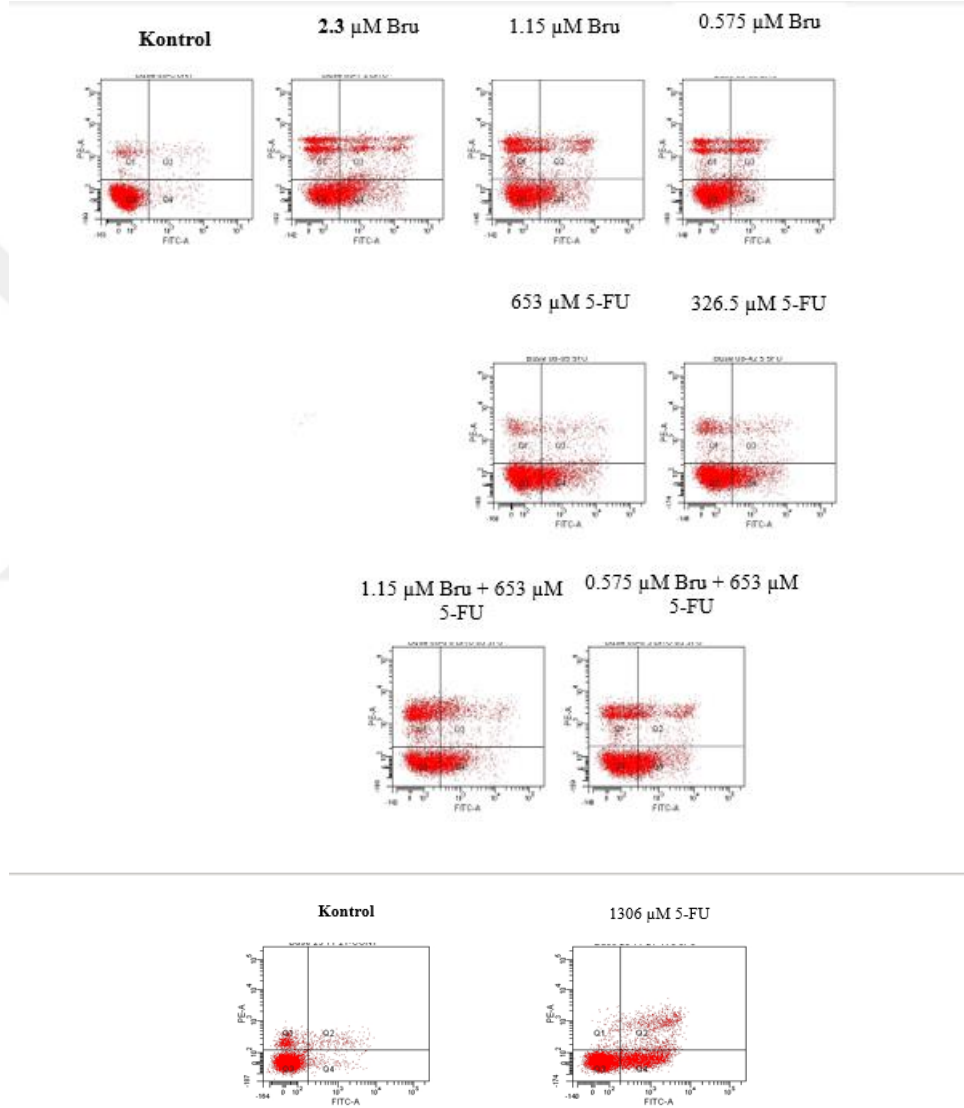
3.5.Etken Maddelerin Ayrı Ayrı ve Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Hattında Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

Etken maddelerin ve kombinasyon uygulamalarının HT-29 hücrelerindeki apoptotik etkilerinin araştırılması 48 saat için yapılmıştır. Kombinasyon uygulamaları için Bru veya Erio'nun IC₅₀ ve IC₅₀/2 konsantrasyonlarının 5-FU'nun IC₅₀ konsantrasyonları ile olan kombinasyon uygulamaları seçilmiştir.

3.5.1.Etken Maddelerin Ayrı Ayrı ve Kombinasyonlarının Annexin-V/FITC Yöntemi ile Potansiyel Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

Etken maddelerin tek başına ve seçilen kombinasyon uygulamalarının HT-29 hücrelerindeki apoptotik etkileri flow sitometri kullanılarak Annexin-V/FITC yöntemi ile ticari bir kit yardımıyla belirlenmiştir. Bru ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve test edilen kombinasyon uygulamalarının flow sitometri analiz sonuçları (Şekil 3.12.) Çizelge 3.9'da özetlenmiştir. Bru'nun 2.3, 1.15 ve 0.575 µM konsantrasyonları ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde toplam apoptotik hücre yüzdesinin (Q2+Q4) %3.3'ten (kontrol) sırasıyla %40.4, %25.6 ve %20.1 arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte Bru'nun test edilen bu konsantrasyonlarda kontrol hücrelerine kıyasla nekrotik hücre yüzdesinde artışa neden olduğu görülmüştür. 1306, 653 ve 326.5 µM

konsantrasyonlardaki 5-FU ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde toplam apoptotik hücre yüzdesi ise sırasıyla %32.8, %27.7 ve %23.7'dir. 1.15 μ M Bru + 653 μ M 5-FU ile muamele edilen hücrelerde toplam apoptotik hücre yüzdesinin %31.7 olduğu görülmüştür. 0.575 μ M Bru + 653 μ M 5-FU ile muamele edilen hücrelerde toplam apoptotik hücre yüzdesi %31.6 olarak belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda, bu çalışmada test edilen Bru ile 5-FU kombinasyonlarının etken maddelerin tek başına etkisine kıyasla apoptotik hücre yüzdesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3. 12. 48 saatte Bru ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombin uygulamalarının HT-29 hücrelerinde flow sitometri ile apoptozun analizi

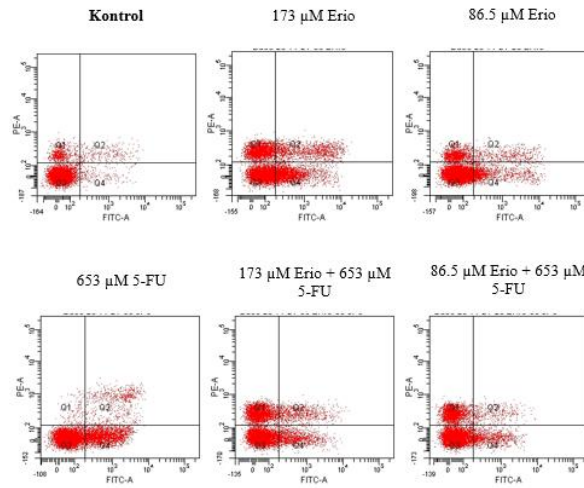
Hücreler dört kadrata dağıtıldı: Q3-canlı hücreler (Annexin-/PI-), Q4-erken apoptotik hücreler (Annexin+/PI-), Q2-geç apoptotik hücreler (Annexin+/PI+) ve Q1-nekrotik hücreler (Annexin-/PI+).

Çizelge 3. 9. 48 saatte Bru ve 5-FU'nun tek başlarına ve kombinasyonlarının flow sitometri sonuçları

Konsantrasyonlar (μ M)	Q1 (nekroz)	Q2 (geç apoptoz)	Q3 (canlı hücre)	Q4 (erken apoptoz)	Apoptotik Hücre (Q2+Q3)
2.3 Bru	24.4	16.4	35.1	24.0	40.4
1.15 Bru	25.4	11.3	49.0	14.3	25.6
0.575 Bru	17.9	11.9	62.0	8.2	20.1
653 5-FU	6.4	4.8	65.9	22.9	27.7
326.5 5-FU	8.4	4.2	67.8	19.5	23.7
1.15 Bru + 653 5-FU	27.3	10.8	41.1	20.9	31.7
0.575 Bru + 653 5-FU	17.6	9.4	50.8	22.2	31.6
Kontrol	4.5	1.5	92.2	1.8	3.3
Kontrol*	6.8	2.6	88.7	1.8	4.4
1306 5-FU*	1.4	9.6	65.8	23.2	32.8

*Ayrı bir denemeye ait sonuçlardır.

Erio ve 5-FU'nun test edilen kombinasyon uygulamalarına ait flow sitometri analiz sonuçları (Şekil 3.13.) ise Çizelge 3.10'da gösterilmektedir. Erio'nun 173 ve 84.5 μ M konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerde toplam apoptotik hücre yüzdesi sırasıyla %35.2 ve %16.6 olarak belirlenirken Erio'nun bu konsantrasyonlarının 5-FU'nun IC₅₀ (653 μ M) konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerin toplam apoptotik hücre yüzdesinin sırasıyla %18.0 ve %12.1 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3. 13. 48 saatte Erio ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombin uygulamalarının HT-29 hücrelerinde flow sitometri ile apoptozun analizi

Hücreler dört kadrata dağıtıldı: Q3-canlı hücreler (Annexin-/PI-), Q4-erken apoptotik hücreler (Annexin+/PI-), Q2-geç apoptotik hücreler (Annexin+/PI+) ve Q1-nekrotik hücreler (Annexin-/PI+).

Çizelge 3. 10. 48 saatte Erio ve 5-FU'nun tek başlarına ve kombinasyonlarının flow sitometri sonuçları

Konsantrasyonlar (µM)	Q1 (nekroz)	Q2 (geç apoptoz)	Q3 (canlı hücre)	Q4 (erken apoptoz)	Apoptotik Hücre (Q2+Q3)
173 Erio	22.2	11.9	42.6	23.3	35.2
86.5 Erio	11.0	4.2	72.4	12.4	16.6
653 5-FU	1.2	6.1	68.9	23.7	29.8
173 Erio + 653 5-FU	29.7	7.0	52.3	11.3	18.0
86.5 Erio + 653 5-FU	20.3	3.3	67.6	8.8	12.1
Kontrol	6.8	2.6	88.7	1.8	4.4

3.5.2. Etken Maddelerin Ayrı Ayrı ve Kombinasyonlarının Real-Time PCR Analizi İle Potansiyel Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

Bru, Erio ve 5-FU'nun tek başlarına ve kombinasyon uygulamalarının HT-29 hücrelerinde apoptotik süreçte yer alan *bax* (apoptotik), *bcl-2* (antiapoptotik), *puma* (apoptotik) ve *kaspaz-3* (apoptotik) gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi Real

Time PCR analizi ile 48 saatteki uygulamalar için değerlendirilmiştir. Etken maddelerin tek başlarına ve kombin uygulamalarının HT-29 hücreleri üzerindeki kontrol grubuna göre apoptozla ilişkili genlerin ifadelerinin kat değişimleri ve istatistiksel olarak anlamlılık değerleri GeneGlobe bilgisayar programı aracılığıyla analiz edilmiştir. Bu analizden elde edilen veriler Çizelge 3.11., 3.12. ve 3.13'te verilmiştir. Real time PCR analizleri sonucunda 5-FU'nun IC₅₀ (653 µM) ve IC₅₀/2 (326.5 µM) konsantrasyonlarının yanı sıra Bru'nun 2xIC₅₀ (2.3 µM) ve IC₅₀ (1.15 µM) konsantrasyonları ile ayrı ayrı muamele edilen hücrelerde kontrole kıyasla apoptotik *bax* ve *kaspaz-3* gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Etken maddelerin tek başlarına kıyasla bu iki genin (*bax* ve *kaspaz-3*) ekspresyon seviyesindeki anlamlı artış 1.15 µM Bru + 653 µM 5-FU kombinasyon uygulamasında da tespit edilmiştir. 0.575 µM Bru + 653 µM 5-FU kombinasyon uygulamasında *kaspaz-3* genlerinin her iki etken maddenin tek başlarına neden olduğu gen ekspresyon seviyesinin üstünde bir etki görülmüştür bununla birlikte anlamlı bir şekilde *bcl-2* gen ekspresyon seviyesinde etken maddelerin tek başlarına neden oldukları gen ekspresyon seviyelerine kıyasla azalma olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte Erio'nun tek başına ve kombin uygulamalarında test edilen genlerde anlamlı bir artış belirlenmemiştir.

Çizelge 3. 11. 48 saatte 5-FU'nun Real-Time PCR analizleri

Gen Adı	1306 µM 5-FU	p değeri	653 µM 5- FU	p değeri	326.5 µM 5-FU	p değeri
<i>β-aktin</i>	1.00	-	1.00	-	1.00	-
<i>bax</i>	15.93	0.129413	3.94	0.000000*	7.46	0.045293*
<i>bcl-2</i>	4.45	0.134078	0.48	0.001659*	0.10	0.568690
<i>kaspaz-3</i>	16.34	0.369787	1.97	0.019810*	12.76	0.000080*
<i>puma</i>	3.18	0.341223	0.23	0.002027*	2.76	0.538613

*p<0.05

Çizelge 3. 12. 48 saatte Bru'nun tek başına ve 5-FU ile kombin uygulamalarının Real-Time PCR analizleri

Gen Adı	2.3 μM Bru	p değeri	1.15 μM Bru	p değeri	0.575 μM Bru	p değeri	1.15 μM Bru + 653 μM 5-FU	p değeri	0.575 μM Bru + 653 μM 5-FU	p değeri
<i>β-aktin</i>	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
<i>bax</i>	16.19	0.028991*	10.24	0.000008*	19.43	0.310077	15.35	0.000330*	24.88	0.127399
<i>bcl-2</i>	4.06	0.025748*	0.50	0.002609*	2.95	0.004049*	3.45	0.001302*	0.21	0.019192*
<i>kaspaz-3</i>	5.66	0.002113*	2.71	0.000753*	2.57	0.111845	7.25	0.000077*	5.13	0.140700
<i>puma</i>	2.63	0.543558	0.17	0.001544*	0.31	0.004136*	0.80	0.117417	0.30	0.631650

*p<0.05

Çizelge 3. 13. 48 saatte Erio'nun tek başına ve 5-FU ile kombin uygulamalarının Real-Time PCR analizleri

Gen Adı	346 μM Erio	p değeri	173 μM Erio	p değeri	86.5 μM Erio	p değeri	173 μM Erio + 653 μM 5-FU	p değeri	86.5 μM Erio + 653 μM 5-FU	p değeri
<i>β-aktin</i>	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
<i>bax</i>	0.60	0.303701	3.32	0.348152	0.20	0.015880*	1.75	0.460051	0.41	0.402600
<i>bcl-2</i>	0.19	0.024886*	0.92	0.809145	0.10	0.008110*	1.00	0.825588	0.41	0.067802
<i>kaspaz-3</i>	0.78	0.670628	2.36	0.064741	2.46	0.099924	0.87	0.915185	14.45	0.366312
<i>puma</i>	0.31	0.357449	0.75	0.306780	0.25	0.037338*	0.58	0.273139	2.67	0.570461

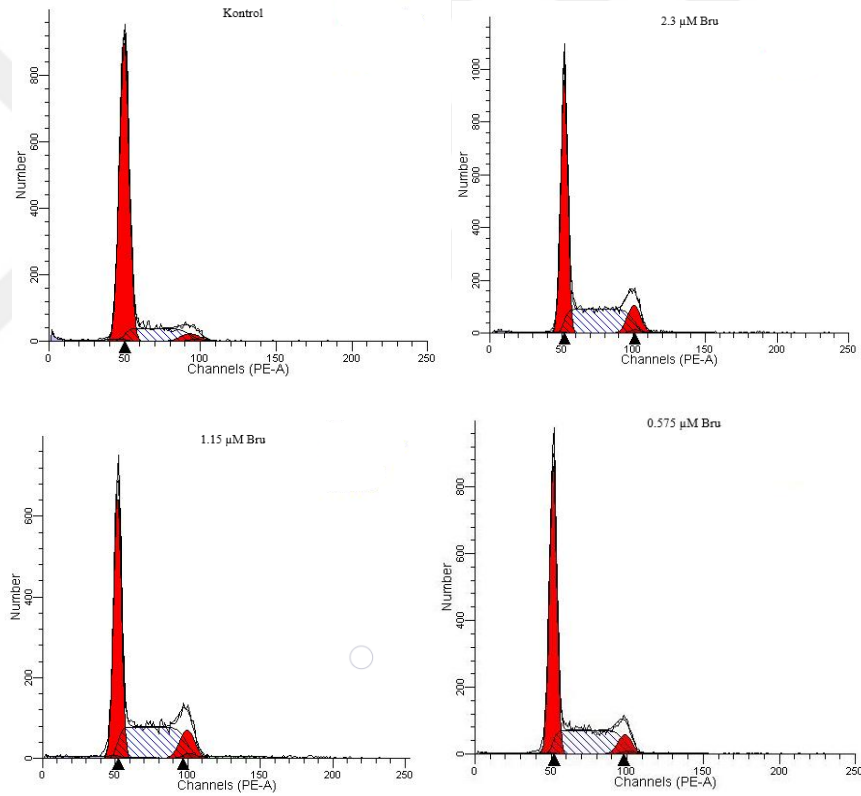
*p<0.05

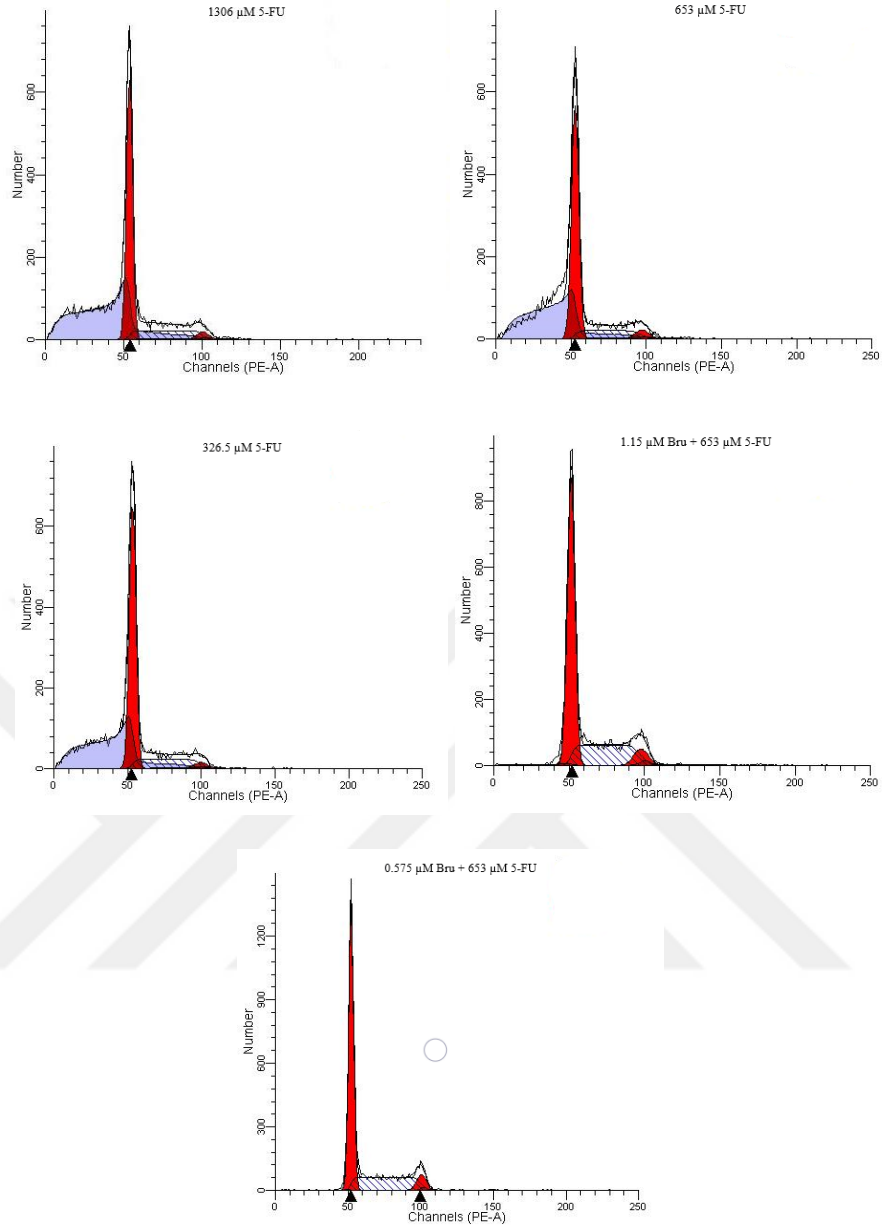
3.6.Etken Maddelerin Ayrı Ayrı ve Kombinasyonlarının HT-29 Hücre Hattında Hücre Döngüsü Analizleri

2.2.5. başlığının altında verilen konsantrasyon ve kombin uygulamalar için yapılmıştır. Etken maddelerin tek başlarına ve kombinasyon uygulamaları ile muamele edilen HT-29 hücre hattında hücre döngü analizleri flow sitometri ile 48 saat için gerçekleştirilmiştir. Kombinasyon uygulamalarında 5-FU'nun IC₅₀ değerindeki

konsantrasyonu ile Bru'nun IC_{50} ve $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonları denenirken Erio'nun IC_{50} değerindeki konsantrasyonu test edilmiştir (şekil 3.14.,3.15.). Sonuçlar izelge 3.14. ve 3.15.'te görülmektedir.

Tek başına Bru'nun test edilen konsantrasyonları (2.3, 1.15 ve 0.575 μM) ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde kontrole kıyasla özellikle S evresindeki hücre yüzdesinde belirgin bir artış olduğu bununla birlikte G1 evresinde hücre yüzdesinde azalma olduğu görülmektedir. 5-FU'nun tek başına 1306, 653 ve 326.5 μM konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerde kontrole kıyasla S evresinde görülen artış, Bru'nun neden olduğundan daha azdır. Bununla birlikte Bru ve 5-FU'nun yapılan kombin uygulamalarında da kontrole kıyasla özellikle S evresindeki hücre yüzdesinde artış olduğu belirlenmiştir.



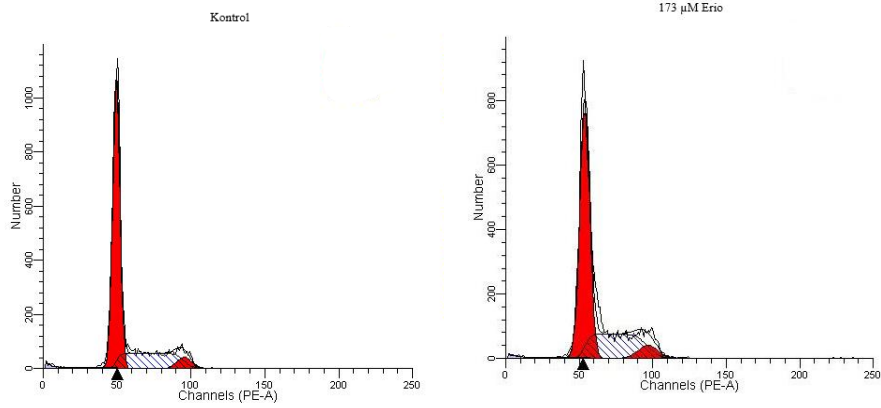


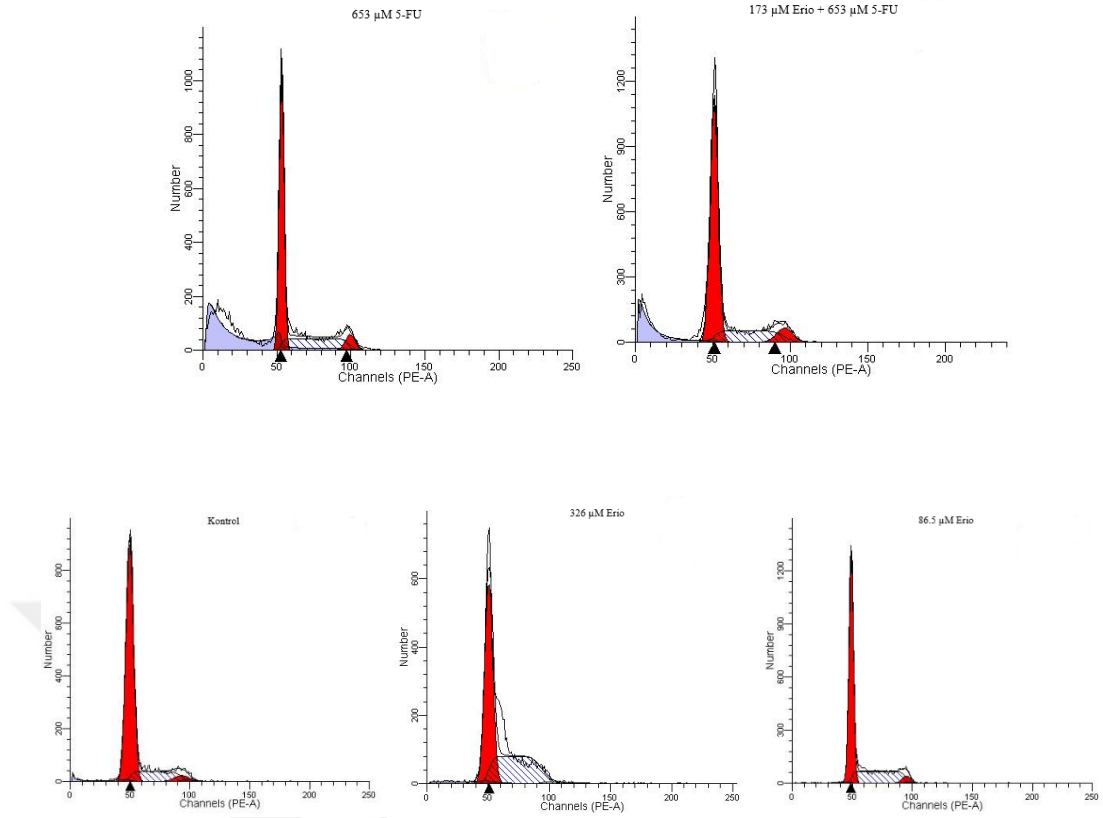
Şekil 3. 14. 48 saatte Bru ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombinasyonlarının HT-29 hücrelerinde flow sitometri ile hücre döngüsü analizi

Çizelge 3. 14. 48 saatte Bru ve 5-FU'nun tek başlarına ve kombin uygulamalarının hücre döngüsü analizleri

Konsantrasyonlar (μ M)	G1 (%)	S (%)	G2 (%)
2.3 Bru	50.81	38.59	10.60
1.15 Bru	48.16	41.62	10.21
0.575 Bru	56.39	36.42	7.19
1306 5-FU	72.07	23.82	4.11
653 5-FU	75.46	19.09	5.45
326.5 5-FU	74.85	21.62	3.54
1.15 Bru + 653 5-FU	61.37	31.85	6.77
0.575 Bru + 653 5-FU	61.26	32.13	6.61
Kontrol	77.83	18.26	3.91

Erio'un 346, 173 ve 86.5 konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerde kontrole kıyasla S evresindeki hücre yüzdesinde artış olduğu belirlenmiştir. 5-FU'nun 653 konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerde ise kontrole kıyasla hücre yüzdesinin S evresinde artış gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte, Erio ve 5-FU'nun kombin uygulaması ile muamele edilen hücrelerde kontrole kıyasla G1 evresinde hücre yüzdesinin artış gösterdiği gözlemlenmiştir.





Şekil 3. 15. 48 saatte Erio ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombinasyonlarının HT-29 hücrelerinde flow sitometri ile hücre döngüsü analizi

Çizelge 3. 15. 48 saatte Erio'nun tek başına ve 5-FU ile kombinasyonlarının hücre döngüsü analizleri

Konsantrasyonlar (µM)	G1 (%)	S (%)	G2 (%)
173 Erio	62.69	30.91	6.39
653 5-FU	63.47	29.63	6.90
173 Erio + 653 5-FU	69.81	22.25	7.94
Kontrol	67.94	26.96	5.10
Kontrol*	77.83	18.26	3.91
346 Erio*	58.29	41.71	0.00
86.5 Erio*	63.75	32.45	3.80

*Ayrı bir denemeye ait sonuçlardır.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kolorektal kanser, en çok teşhis edilen üçüncü kanser tipidir ve dünya çapında kanser türleri arasında ikinci en büyük ölüme yol açmaktadır. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi kolorektal kanser tedavisinde uygulanmaktadır (Zhang vd., 2021). Meme, pankreas, deri, mide, yemek borusu ve baş ve boyun kanserleri dahil olmak üzere farklı kötü huylu tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan 5-FU, 1990'ların başında kolorektal kanser tedavisinde standart kemoterapi ilacı olarak kabul edilmiştir (Vodenkova vd., 2020; Dey K. vd., 2020). Kemoterapide kullanılan yüksek dozda 5-FU, hücrel ve biyokimyasal süreç üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. 5-FU ile birlikte doğal ürünlerin kullanılması kemoterapötik ilacın yan etkilerini en aza indirgeyebilir veya önleyebilir ve sinerjik olarak aktivitesini artırabilir. Genellikle doğal bileşiklerden elde edilen sinerjiler, yan etkileri azaltabilir ve tedavinin terapötik potansiyelini iyileştirebilir (Dey K. vd., 2020). Bu tez çalışmasında, HT-29 insan kolorektal kanseri hücre hattında ticari Brusatol ve Eriodictyol'ün 5-FU ile kombinasyon uygulamalarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin yanı sıra ve hücrelerdeki potansiyel apoptotik etkileri araştırılmıştır.

Canlı hücreler tarafından substratın kromojenik ürüne dönüştürülmesine bağlı olan canlılık deneyleri arasında, MTT yöntemi hala çok yönlü ve popüler yöntemlerden biridir. MTT yöntemi, suda çözünür sarı renkli boya MTT'nin [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] mitokondriyal redüktazın etkisiyle çözünmeyen mor renkli bir formazana dönüştürülmesini içerir. Formazan daha sonra DMSO ile çözündürülür (Kumar vd., 2018). Bu tez çalışmasında ilk olarak HT-29 hücreleri üzerinde Brusatol, Eriodictyol ve 5-FU'nun konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı etkileri MTT testi ile belirlenmiştir ve her etken maddenin test edilen inkübasyon sürelerinde IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanmıştır. Buna göre 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla IC₅₀ konsantrasyonları, Bru için 109.5, 1.15 ve 0.96 µM, Erio için 486, 173 ve 38 µM ve 5-FU için ise 1845, 653 ve 84.5 µM olarak bulunmuştur.

Literatürde Brusatol'ün HT-29 hücre hattı üzerindeki etkisine ait bir çalışmaya rastlanılmamıştır bununla birlikte farkı kolon kanseri hücre hatları ile diğer kanser hücre hatları üzerindeki etkilerine dair çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda Brusatol'ün IC₅₀ konsantrasyonları, CT-26 kolorektal kanseri hücre hattında 48 saat için 0.27 µg/mL (Chen vd., 2018); başka bir çalışmada CT-26 ve HCT116 kolorektal

kanser hücre hatlarında 48 saat için sırasıyla 256.1 ve 87.43 nM (Evans vd., 2018); PC9, H1650, A549 ve HCC827 akciğer kanseri hücre hatlarında 72 saat için sırasıyla 18.40, 24.27, 14.41 ve 73.3 ng/mL (Xie vd., 2021); 24 saat için UMSCC 47, UD SCC2, JMAR, TU167, LN686, YD-10B, HN-9 ve FaDu baş ve boyun skuamöz kanseri hücre hatlarında sırasıyla 24, 38, 16, 14, 6, 22, 25 ve 20 nM (Lee J.H. vd., 2019); 48 saatte CNE-1, 5-8F, CNE-2 ve 6-10B nazofarenks karsinoma hücre hatlarında sırasıyla 22.69, 35.29, 65.20 ve 244.20 nM (Guo vd., 2020); hepatoselüler karsinoma hücrelerinde 0.69 μ mol/L (Hep3B), 0.34 μ mol/L (Huh-7), 12.49 μ mol/L (LM3) ve 18.04 nmol/L (Bel-7404) (Ye vd., 2018); 48 ve 72 saat için pankreas kanseri hücre hatlarında PANC-1 için sırasıyla 7.40 ve 1.30 μ g/mL CAPAN-1 için sırasıyla 2.09 ve 0.33 μ g/mL CAPAN-2 için sırasıyla 8.16 ve 1.15 μ g/mL ve SW1990 için sırasıyla 8.47 ve 4.26 μ g/mL (Lu vd., 2017) ve 48 saatte BT-474, SK-BR-3 meme kanseri hücre hatlarında sırasıyla 0.7537 μ M ve 8.631 μ M ayrıca yumurtalık kanseri hücre hattı SK-OV-3'te 0.7610 μ M (Yang vd., 2020) olarak belirlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda Eriodictyol'un IC₅₀ konsantrasyonları, akciğer kanseri hücre hattı (A549) üzerinde 48 saatte 50 μ M (Zhang vd., 2017); hepatoselüler karsinoma hücrelerinde (HepG2) 24 saatte 37.6 μ M (Wang vd., 2016); 48 saatte retinoblastoma kanseri hücre hattında (Y79) 50 μ M (Wen vd., 2021) olarak bulunmuştur. Fernandez vd., (2021) çalışmalarında Eriodictyol'un 20, 40, 60, 80 ve 100 μ M konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilen HCT116 hücrelerinde IC₅₀ değerini 54.2 μ M olarak belirtirken, HT-29 hücrelerinde HCT116 hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan daha düşük antitümoral aktivite bildirmişlerdir.

5-FU'nun anti-kanser etkisini araştıran çalışmalarda HT-29 hücre hattı dahil farklı kolon/kolorektal kanseri hücre hatlarında IC₅₀ konsantrasyonları, 72 saat inkübasyon süresinde HCT116'da 13.72 μ M ve HT-29'da 106.8 μ M (Focaccetti vd., 2015); Lovo92 ve Colo320 hücre hatlarında 72 saat muamele sonrası sırasıyla 1.1 ve 2.3 μ M (Bijnsdrop vd., 2009); 48 ve 72 saat için HT-29'da 5 μ M (Sasaki vd., 2010); başka bir çalışmada HT-29 hücre hattında 24 ve 48 saat için sırasıyla 39.13 ve 38 μ mol/L (Srimuangwong vd., 2012); 24 saatte HT-29'da 17.13 μ M (Du vd., 2005); 48 saat için SW620'de 99.50 μ M, LoVo'da 127.23 μ M, LS174t'de 177.45 μ M ve HT-29'da 798.38 μ M (Tong vd., 2011) olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada etken maddelerin test edilen her inkübasyon süresi için IC₅₀ konsantrasyonları belirlendikten sonra 24, 48 ve 72 saat için kombinasyon uygulamaları gerçekleştirilmiş ve Kİ değerleri belirlenmiştir. HT-29 hücrelerinde

Brusatol ve 5-FU'nun 9 farklı kombinasyonu test edilmiştir. Brusatol'ün IC_{50} veya $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonları ile 5-FU'nun IC_{50} veya $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonları ile yapılan kombin uygulamaların HT-29 hücrelerinde ortak olarak 24 ve 48 saatte sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir. 72 saatte Brusatol ve 5-FU kombinasyonlarının genel olarak antagonist etki gösterdiği söylenebilir. Yapılan literatür çalışmasında Brusatol ve 5-FU'nun HT-29 hücrelerinde kombin uygulamalarına yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte çalışmamızdaki gibi Brusatol'ün başka ajanlar ile kombinasyon uygulamalarının sinerjik etkileri farklı kanser hücrelerinde bildirilmiştir. Lu vd., (2017) yaptığı çalışmada Brusatol'ün gempitabin veya 5-FU ile kombinasyonunun 72 saatte hem PANC-1 hem de CAPAN-2 pankreas kanseri hücre hatlarına karşı sinerjistik (KI : 0.2-0.8) bir antiproliferatif etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bir başka çalışmada, 48 saatte CT-26 hücreleri üzerinde Brusatol'ün 0.27 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) konsantrasyonu ile cisplatin'in 1.44 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) konsantrasyonunun kombinasyon uygulamasının sinerjik etkiye ($KI < 1$) sahip olduğu görülmüştür (Chen vd., 2018). Evans vd., (2018) çalışmalarında Brusatol'ün 0.015 ve 0.1 μM konsantrasyonları ile Irinotecan'ın 1.23, 3.7, 11.1, 33.0, 100 ve 300 μM konsantrasyonlarının kombinasyon uygulamasının CT-26 hücrelerine karşı hücre canlılığı etkilerini 48 saat için araştırmışlardır. Sonuç olarak, 0.1 μM konsantrasyondaki Brusatol'ün 100 ve 300 μM Irinotecan ile kombinasyonları haricinde diğer tüm kombinasyon uygulamalarının sinerjik bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, aynı çalışmada Brusatol'ün 0.015 ve 0.3 μM konsantrasyonları ile Irinotecan'ın 1.23, 3.7, 11.1, 33.0, 100 ve 300 μM konsantrasyonlarını CT-26 hücreleri üzerinde denemişlerdir ve 0.015 μM Brusatol konsantrasyonunun 1.23, 3.7 ve 33 μM Irinotecan konsantrasyonu ile kombin uygulamalarını antagonistik diğer kombin uygulamalarının ise sinerjistik etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir (Evans vd., 2018). Yang vd., (2020) HER2-pozitif BT474 ve SK-OV-3 kanser hücre hatlarında 48 saat için 12,5 $\mu\text{g/mL}$ Trastuzumab ile 2,5 μM Brusatol, 25 $\mu\text{g/mL}$ Trastuzumab ile 5 μM Brusatol ve 50 $\mu\text{g/mL}$ Trastuzumab ile 10 μM Brusatol ilaç kombinasyonlarının sinerjik etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada, Eriodictyol ve 5-FU'nun 5 farklı kombinasyonu 24, 48 ve 72 saatlerde HT-29 hücreleri üzerinde uygulanmıştır ve KI değerleri hesaplanmıştır. Brusatol'den farklı olarak, Eriodictyol'ün 5-FU ile 72 saat için olan kombin uygulamalarında sinerjik etki belirlenmiştir. 48 saat için ise Eriodictyol'ün $IC_{50}/2$ değerindeki

konsantrasyonu ile 5-FU'nun IC_{50} ve $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonlarının yanı sıra Eriodictyol'ün IC_{50} ve 5-FU'nun $IC_{50}/2$ değerindeki konsantrasyonu ile yapılan kombin uygulamaların etkisinin sinerjik olduğu görölmüştür. Literatürde Eriodictyol ve 5-FU kombinasyonunun veya Eriodictyol ile farklı ajanın kombinasyonun kanser hücre hatlarına karşı potansiyel etkilerini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler literatüre katkı sağlayacak ilk temel verilerdir.

Yapılan tez çalışmasında, Brusatol-Eriodictyol kombinasyonu dışında Brusatol, Eriodictyol ve 5-FU'nun üçlü kombinasyonun da HT-29 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisi her inkübasyon süresi için test edilmiş ve Kİ değerleri hesaplanmıştır. Brusatol ve Eriodictyol'ün iki farklı kombinasyon uygulamasının ($IC_{50}:IC_{50}$ ve $IC_{50}/2:IC_{50}/2$) 24 ve 48 saatte antagonistik 72 saatte ise aditif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Brusatol, Eriodictyol ve 5-FU'nun test edilen üçlü kombinasyonlarının ($IC_{50}:IC_{50}:IC_{50}$ ve $IC_{50}/2:IC_{50}/2:IC_{50}/2$) her inkübasyon zamanı için ise antagonistik olduğu görölmüştür. Literatürde Brusatol, Eriodictyol ve 5-FU kombinasyonunun kanser hücre hatlarındaki etkilerine dair çalışma bulunmamakla birlikte başka ajanların üçlü kombinasyonlarının farklı kanser hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Budman vd., (2002) çalışmalarında 72 saat inkübasyon süresinde Docetaxol, Estramustine (EST) ve retinoik asit-1 üçlü kombinasyonunun DU145, PC3 ve LnCaP prostat kanseri hücre hatlarında Kİ değerlerini sırasıyla 1.12, 2.19 ve 1.93 Docetaxol, EST ve dexrazoxane üçlü kombinasyonunda ise sırasıyla 2.17, 2.29 ve 1.65 olarak belirlemişlerdir ve bu üçlü kombinasyonların prostat kanseri hücrelerinde antagonistik etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, 72 saatte LBH-589, Gemcitabin ve Karboplatinin üçlü kombinasyonunun SK-OV-3 ve CaOV-3 yumurtalık kanseri hücrelerindeki Kİ değerleri 0.9 olup sinerjik bir etki gözlemlenmişlerdir. LBH-589, Gemcitabin ve Paklitaksel üçlü kombinasyonunda ise SK-OV-3 ve CaOV-3 hücrelerinde Kİ değerlerini sırasıyla 1.2 (antagonistik) ve 0.3 (sinerjik) olarak hesaplamışlardır (Budman vd., 2011). Lopez-Acevedo vd., (2014) çalışmalarında IC_{50} konsantrasyonlarında Gemcitabin, Docetaxol ve Dasatinib üçlü kombinasyonunun SK-UT-1 ve SK-UT-1B uterin korpus leiomyosarkomu kanseri hücre hatlarında 72 saat muamele sonrası Kİ değerleri sırasıyla 0.46 (sinerjik) ve 1.42 (antagonistik) olarak belirlemişlerdir.

Apoptoz, normal doku homeostazının merkezi bir düzenleyicisidir (Koff vd., 2015; Pistritto vd., 2016). Çeşitli antikanser ajanları, kanser hücrelerinde apoptozu

indükleme ve kanser gelişimini önleme işlevi görür. Bu nedenle, apoptozun uyarılması, ajanların terapötik etkinliğine katkıda bulunan önemli bir hücresel olay olarak kabul edilir. (Lopez ve Tait, 2015). Bu tez çalışmasında, apoptozun değerlendirilmesi flow sitometri (Annexin V/PI-FITC) ve Real-Time PCR analizleri ile 48 saat için gerçekleştirilmiştir. 48 saat için Brusatol ile muamele edilen hücrelerde toplam apoptotik hücre yüzdesinin kontrole kıyasla konsantrasyona bağlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Brusatol'ün 0.575, 1.15 ve 2.3 μM konsantrasyonları ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde toplam apoptotik hücre yüzdesinin (Q2+Q4) %3.3'ten (kontrol) sırasıyla %20.1, %25.6 ve %40.4 arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte Bru'nun test edilen bu konsantrasyonlarda kontrol hücrelerine kıyasla nekrotik hücre yüzdesinde artışa neden olduğu görülmüştür. Ayrıca Brusatol ve 5-FU'nun 48 saat kombin uygulamaları sonrasında ise belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesinin etken maddelerin tek başlarına kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. 653 μM konsantrasyondaki 5-FU ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde toplam apoptotik hücre yüzdesi %27.7 iken, 1.15 μM Bru + 653 μM 5-FU ve 0.575 μM Bru + 653 μM 5-FU ile muamele edilen hücrelerde toplam apoptotik hücre yüzdesi sırasıyla %31.7 ve %31.6 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçların 48 saatte Brusatol ve 5-FU kombinasyonu için hesaplanan Kİ değerlerine göre belirlenen sinerjik etki ile uyumlu olduğu söylenebilir. Literatürde çalışmamızı destekleyebilecek şekilde Brusatol'ün farklı kombinasyonları ve farklı kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalar yer almaktadır. Xie vd., (2021) yaptıkları çalışmada, Brusatol'ü A549, H1650 ve EGFR mutant PC9 insan küçük olmayan akciğer kanseri hücre hatlarında denemişler ve PC9 hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. 48 saatte Brusatol'ün 20, 40 ve 80 ng/mL konsantrasyonları ile muamele edilen PC9 hücrelerinde toplam apoptotik yüzdelelerini sırasıyla %13.75, %21.18 ve %28.88 olarak belirlemişlerdir. Lee H. vd., (2019) çalışmalarında 24 saat için Brusatol'ün 5 nM konsantrasyonlarında UD SCC2, JMAR ve YD-10B baş ve boyun kanseri hücre hatlarında erken apoptotik hücrelerin sırasıyla %13.3, %14.2 ve %12.4 olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, 80 nM Brusatol konsantrasyonunun CNE-1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri 24, 48 ve 72 için araştırılmıştır ve sırasıyla toplam apoptotik hücre oranının %23.83, %29.61 ve %35.38 olduğunu ifade edilmiştir (Guo vd., 2020). Brusatol'ün hücreler üzerinde büyüme inhibisyon etkisinin apoptoz indüksiyonu ile ilgili olup olmadığını belirlemek için yapılan bir çalışmada PANC-1 hücreleri 4 μM ve PATU-8988 hücreleri 0.4 μM Brusatol ile muamele edilmiştir.

Zamana bağı bir şekilde Brusatol ile muamele edilen hücrelerde apoptotik hücrelerin arttığı gözlemlenmiştir (Xiang vd., 2017). CT-26 hücrelerinde IC50 konsantrasyonlarında Brusatol (0.27 µg/mL) ve Sisplatin (1.44 µg/mL) ile muamele sonrası apoptotik hücre oranları sırasıyla %13.1 ve %14.05 olarak belirlenirken kombin uygulamanın apoptotik hücre oranının %20.6 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçların, Brusatol ve Sisplatin'in, tek başına veya kombinasyon halinde, CT-26 hücrelerinin apoptotik popülasyonunda önemli bir artış oluşturabildiğini ortaya koyduğu bildirilmiştir (Chen vd., 2018). Yumurtalık kanseri hücrelerinde Brusatol'ün Tratsuzumab ile kombin uygulamasının potansiyel etkilerini araştıran bir çalışmada, Brusatol (5 µM) ile muamele edilen BT-474 ve SK-OV-3 hücrelerinde toplam apoptotik hücre oranı sırasıyla %24,65 ve %23.59 iken Tratsuzumab (25 µg/mL) ile muamele edilen hücrelerde toplam apoptotik oranları sırasıyla %7.34 ve %3.21 olarak gözlemlenmiştir. Kombin uygulamanın BT-474 ve SK-OV-3 hücre hatlarındaki toplam apoptotik oranlarını ise sırasıyla %42.02 ve %60.24 olarak bulunmuştur (Yang vd., 2020).

Eriodictyol ile 48 saat için muamele edilen hücrelerde toplam apoptotik hücre yüzdesinin kontrole kıyasla arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte Eriodictyol ve 5-FU kombinasyonları ile 48 saat muamele edilen hücrelerde ise belirlenen toplam apoptotik hücre yüzdesinin etken maddelerin tek başlarına muameleleri sonrasında belirlenen toplam hücre apoptotik yüzdesinden daha fazla olmadığı görülmüştür. Eriodictyol'ün 86.5 ve 173 µM konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerde toplam apoptotik hücre yüzdesi sırasıyla %16.6 ve %35.2 olarak belirlenirken Erio'nun bu konsantrasyonlarının 5-FU'nun IC₅₀ (653 µM) konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerin toplam apoptotik hücre yüzdesinin sırasıyla %12.1 ve %18.0 olduğu tespit edilmiştir. Literatürde Eriodictyol'ün farklı kanser hücre hatlarında apoptotik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yer almaktadır. Eriodictyol'ün artan konsantrasyonları (0, 25, 50 ve 100 µM) ile 48 saat muamele edilen U87MG ve CHG-5 glioma kanseri hücreleri üzerinde apoptotik hücre sayılarının artan konsantrasyona bağı olarak arttığı tespit edilmiştir (Li vd., 2020). 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda Eriodictyol ile 48 saat muamele edilen A549 hücrelerinde kontrole kıyasla toplam apoptotik hücre popülasyonunun yüzdesinin artan konsantrasyona bağı olarak artış gösterdiği görülmüştür (Zhang vd., 2017). Yu ve Liu (2020) çalışmalarında, 24 saatte 5, 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda Eriodictyol ile muamele edilen HeLa hücrelerinde toplam apoptotik hücre oranının konsantrasyona

bağlı şekilde arttığını göstermişlerdir. Oh (2020) yaptığı tez çalışmasında, Panc-1 ve SNU-313 pankreas kanseri hücrelerinin 72 saat 25 ve 50 μM Eriodictyol konsantrasyonları ile muamele sonrası toplam apoptotik hücre yüzdesinin sırasıyla %11.1 ve %27.2, %27.7 ve %41.2 olduğunu gözlemlemiştir. Literatür taramaları sonucunda Eriodictyol'ün herhangi bir ajan ile kombine uygulamasının apoptotik etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

5-FU'nun tek başına hücreler üzerindeki apoptotik etkisi araştırıldığında 5-FU'nun artan konsantrasyona bağlı olarak toplam apoptotik hücre yüzdesinde artışın olduğu belirlenmiştir. Önemli bir anti-kanser ajanı olan 5-FU'nun kolorektal kanseri hücre hatlarında tek başına ve kombin uygulamalarının apoptoza neden olduğu literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir. Kodach vd. (2006) çalışmalarında, HCT116 hücre hattında 5-FU'nun 1 ve 10 μM konsantrasyonları ile 24 saat muamelesi sonrasında toplam apoptotik oranının sırasıyla %11.0 ve %14.0 olduğunu göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, 48 saatte 10 μM konsantrasyondaki 5-FU ile muamele edilen SW-480 hücrelerinde toplam apoptotik hücre popülasyonunun yaklaşık %17.0 olduğu bildirilmiştir (Garcia vd., 2011). 5-FU'nun 20 μM konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen HCT116 hücrelerinde toplam apoptotik hücre oranının <%1 olduğu belirtilmiş buna karşılık 1 mg/mL NGF (Natoginseng çiçeği özütü) ile 20 μM 5-FU'nun kombinasyon uygulaması sonrasında hücrelerdeki toplam apoptotik hücre oranının %41.0 olduğu ifade edilmiştir (Wang vd., 2007).

Bcl-2 ve Bax dahil olmak üzere Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyal apoptotik yolun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bax, mitokondriden sitokrom c salınımını teşvik ederek apoptozu ve uyarılmış hücre ölümünü ortaya çıkarır. Salınan sitokrom c, sitozolik apoptoz proteaz aktive edici faktöre bağlanır ve kaspaz-9'un aktivasyonunu indükler. Bcl-2, apoptozun başlamasını baskılar ve sitokrom c salınımını engelleyerek hücrenin hayatta kalmasını destekler (Chen vd., 2018). Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan Puma ise, radyasyon ve kemoterapi ile tedavi altında mitokondriyal apoptozu ortaya çıkaran P53'ün doğrudan transkripsiyonel hedefidir (Li., 2021). Apoptozun başlaması için kaspaz kaskadlarının aktivasyonu hayati öneme sahiptir. Apoptozun başlatılmasının, kaspaz-9 aktivasyonu ile ilişkili içsel mitokondriyal apoptotik yol ve kaspaz-3 aktivasyonu ile ilişkili olan dışsal apoptotik yol dahil olmak üzere en az iki farklı apoptotik yolun katılımını içerdiği bildirilmiştir (Chen vd., 2018). Real time PCR analizleri sonucunda 5-FU'nun IC_{50} (653 μM) ve $\text{IC}_{50}/2$ (326.5 μM) konsantrasyonlarının yanı sıra Brusatol'ün $2\times\text{IC}_{50}$ (2.3 μM) ve IC_{50} (1.15 μM)

konsantrasyonları ile ayrı ayrı muamele edilen hücrelerde kontrole kıyasla apoptotik bax ve kaspaz-3 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Etkin maddelerin tek başlarına kıyasla bu iki genin (bax ve kaspaz-3) ekspresyon seviyesindeki anlamlı artış 1.15 μ M Bru + 653 μ M 5-FU kombinasyon uygulamasında da tespit edilmiştir. 0.575 μ M Bru + 653 μ M 5-FU kombinasyon uygulamasında kaspaz-3 genlerinin her iki etkin maddenin tek başlarına neden olduğu gen ekspresyon seviyesinin üstünde bir etki görülmüştür bununla birlikte anlamlı bir şekilde bcl-2 gen ekspresyon seviyesinde etkin maddelerin tek başlarına neden oldukları gen ekspresyon seviyelerine kıyasla azalma olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte Eriodictyol'un tek başına ve kombin uygulamalarında test edilen genlerde anlamlı bir artış belirlenememiştir. Çalışmamızdan farklı olarak, Lu vd., (2017) yaptıkları çalışmalarında hem PANC-1 hem de Capan-2 hücrelerinde Brusatol'un tek başına veya Gemitabin/5-FU ile kombinasyon tedavisinde E-cadherin ekspresyonun arttığı, vimentin ve Twist ekspresyonunun bastırıldığını gözlemlemişlerdir. Chen vd., (2018) çalışmalarında, western blotlama ile CT-26 hücrelerinde pro-apoptotik Bax, anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyon seviyelerini tespit etmişlerdir. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, tedavi edilen hücrelerde Bax'ın ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde artarken, Bcl-2'nin protein ekspresyon seviyelerinin belirgin bir şekilde azaldığını belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada, araştırmacılar, Brusatol'un 20 nmol/L'de %20 ve 40 nmol/L'de %45 ile A549 hücreleri üzerindeki hücre canlılığını azalttığını ve Nrf2 aktivitesinin inhibisyonu nedeniyle kaspaz-3'ten bağımsız olarak apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir (Zhou vd., 2016). Zhang vd., (2020) çalışmalarında, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, Eriodictyol ile tedavi edilen A549 hücrelerinin konsantrasyona bağlı Bcl-2 proteinlerinin aşağı regülasyonunu ve Bax proteinlerinin yukarı regülasyonunu western blot yöntemi ile göstermişlerdir, bunun sonucunda Bax/Bcl-2 oranını arttırdığını ve nihayetinde apoptozu indüklediğini ortaya koymuşlardır. Wang vd., (2016) çalışmalarında farklı Eriodictyol konsantrasyonlarının (10, 50 ve 100 μ M) Hep-G2 hücrelerinde Bax ve PARP'ın yukarı regülasyonuna yol açarken, aynı zamanda Bcl-2 proteininin aşağı regülasyonuna da yol açtığını göstermişlerdir.

Hücre döngüsü, tüm canlılar arasında hayatta kalmak için gerekli bir mekanizmadır. Hücre döngüsü kontrolünün kaybı, tümörjenezdeki tipik özelliklerden biridir (Zhou vd., 2021). Flow sitometri ile 48 saat için Brusatol ve Eriodictyol'un tek başlarına ve 5-FU ile olan kombinasyonlarının hücre döngüsü üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tek

başına Brusatol'ün test edilen konsantrasyonları (0.575, 1.15 ve 2.3 μ M) ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde kontrole kıyasla özellikle S evresindeki hücre yüzdesinde belirgin bir artış olduğu bununla birlikte G1 evresinde hücre yüzdesinde azalma olduğu görülmektedir. Bununla birlikte Brusatol ve 5-FU'nun yapılan kombin uygulamalarında da kontrole kıyasla özellikle S evresindeki hücre yüzdesinde artış olduğu belirlenmiştir. Zhou vd., (2021) çalışmalarında Brusatol'ün laringeal skuamöz karsinom hücrelerini (Hep-2) S evresinde bloke ederek hücresel apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir. Eriodictyol'ün 86.5, 173 ve 346 μ M konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerde kontrole kıyasla S evresindeki hücre yüzdesinde artış olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, Eriodictyol ve 5-FU'nun kombin uygulaması ile muamele edilen hücrelerde kontrole kıyasla G1 ve G2 evrelerinde hücre yüzdesinin arttığı görülmüştür. Bir çalışmada, Eriodictyol'un hücre döngüsü üzerindeki etkilerini araştırmak için U87MG ve CHG-5 hücrelerin 48 saat boyunca Eriodictyol ile muamelesi sonrasında Eriodictyol'ün hücre döngüsünü S evresinde durdurduğunu göstermişlerdir (Liv d., 2020). Oh vd., (2020) çalışmasında, Eriodictyol'ün 48 saatte PANC-1 hücrelerinin S evresinde durdurduğunu bildirmiştir. 5-FU'nun mevcut tez çalışmasında test edilen konsantrasyonlarında (326.5, 653 ve 1306 μ M) HT-29 hücre yüzdelерinin kontrole kıyasla S evresinde artış gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde 5-FU'nun HT-29 dahil olmak üzere farklı kolon kanseri hücre hatlarında da hücreleri S evresinde tutuklandığı farklı çalışmalarla bildirilmiştir (Suehiro vd., 2018; Choi vd., 2012; Backus vd., 2001).

Sonuç olarak, bu tez çalışması farklı çalışmalarla çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif etkileri gösterilen Brusatol ve Eriodictyol'ün HT-29 hücrelerinde tek başlarına ve 5-FU antikanser ilacı ile birlikte yapılan kombin uygulamalarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak ilk kez ortaya koymaktadır. Bununla birlikte bu çalışmadan elde edilen sonuçlar 48 saatte Brusatol veya Eriodictyol'ün IC₅₀ ve IC₅₀/2 değerindeki konsantrasyonlarının tek başına ve ayrıca 5-FU'nun IC₅₀ değerindeki konsantrasyonları ile yapılan kombin uygulamalarının HT-29 hücre hattında potansiyel apoptotik etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesine imkan sağlayabilecektir. Bu çalışmada Brusatol ve Eriodictyol'ün tek başlarına ve 5-FU ile kombinasyon uygulamalarının HT-29 hücrelerinde potansiyel apoptotik etkileri ile ilgili sonuçlar ilk kez elde edilmiştir.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde özellikle Brusatol'ün tek başına ve 5-FU ile olan kombinasyonlarının HT-29 hücre hatlarında 48 saat için apoptotik potansiyelinin

Eriodictyol'ün tek başına ve 5-FU ile olan kombinasyonlarına kıyasla daha iyi olduğu görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen veriler özellikle kolon kanserine karşı kombin veya diğer alternatif tedavi yaklaşımlarına temel veri sağlayabilir. İn vivo yapılacak çalışmalar tedavi yaklaşımlarının uygulanabilirliğine önemli katkı sağlayacaktır.



KAYNAKÇA

- Abbas, Z., & Rehman, S. (2018). An overview of cancer treatment modalities. *Neoplasia*, 1, 139-157.
- Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., & Büsselberg, D. (2019). Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*, 11(1), 28.
- Alimbetov, D., Askarova, S., Umbayev, B., Davis, T., & Kipling, D. (2018). Pharmacological targeting of cell cycle, apoptotic and cell adhesion signaling pathways implicated in chemoresistance of cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1690.
- Anonim (2022). American Type Culture Collection. HT-29 Cell Line. www.atcc.org.
- Backus, H. H. J., Pinedo, H. M., Wouters, D., Kuiper, C. M., Jansen, G., Van Groenigen, C. J., & Peters, G. J. (2001). Differences in the induction of DNA damage, cell cycle arrest, and cell death by 5-fluorouracil and antifolates. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 12(5), 231-239.
- Bayat Mokhtari, R., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022–38043.
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balikesir Saglik Bil Derg*, 5(3),154-165.
- Budman, D. R., & Calabro, A. (2002). In vitro search for synergy and antagonism: evaluation of docetaxel combinations in breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment*, 74(1), 41-46.
- Budman, D. R., Tai, J., Calabro, A., & John, V. (2011). The histone deacetylase inhibitor panobinostat demonstrates marked synergy with conventional chemotherapeutic agents in human ovarian cancer cell lines. *Investigational new drugs*, 29(6), 1224-1229.
- Cai, S. J., Liu, Y., Han, S., & Yang, C. (2019). Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic. *Cell & bioscience*, 9, 45.
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., & Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Ankara: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu*.
- Chamberlin, S. R., Blucher, A., Wu, G., Shinto, L., Choonoo, G., Kulesz-Martin, M., & McWeeney, S. (2019). Natural product target network reveals potential for cancer combination therapies. *Frontiers in pharmacology*, 557.
- Chen, H. M., Lai, Z. Q., Liao, H. J., Xie, J. H., Xian, Y. F., Chen, Y. L., ... & Su, Z. R. (2018). Synergistic antitumor effect of brusatol combined with cisplatin on colorectal cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(3), 1447-1454.

- Choi, J. H., Yoon, J. S., Won, Y. W., Park, B. B., & Lee, Y. Y. (2012). Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration. *Apmis*, 120(7), 597-604.
- Chou TC, Martin N. ComboSyn Inc Paramus NJ. 2005. CompuSyn for drug combinations. Pc software and user's guide.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial biotechnology*, 4(6), 687–699.
- Deng, Z., Hassan, S., Rafiq, M., Li, H., He, Y., Cai, Y., ... & Yan, T. (2020). Pharmacological activity of Eriodictyol: the major natural Polyphenolic Flavanone. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
- Dey, D. K., Chang, S. N., Vadlamudi, Y., Park, J. G., & Kang, S. C. (2020). Synergistic therapy with tangeretin and 5-fluorouracil accelerates the ROS/JNK mediated apoptotic pathway in human colorectal cancer cell. *Food and Chemical Toxicology*, 143, 111529.
- Du, B., Jiang, L., Xia, Q., & Zhong, L. (2006). Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy*, 52(1), 23-28.
- Evans, J. P., Winiarski, B. K., Sutton, P. A., Jones, R. P., Ressel, L., Duckworth, C. A., ... & Kitteringham, N. R. (2018). The Nrf2 inhibitor brusatol is a potent antitumour agent in an orthotopic mouse model of colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(43), 27104.
- Fabiani R. (2020). Antitumoral Properties of Natural Products. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(3), 650.
- Favoriti, P., Carbone, G., Greco, M., Pirozzi, F., Pirozzi, R. E., & Corcione, F. (2016). Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates in surgery*, 68(1), 7–11.
- Fernández, J., Silván, B., Entrialgo-Cadierno, R., Villar, C. J., Capasso, R., Uranga, J. A., ... & Abalo, R. (2021). Antiproliferative and palliative activity of flavonoids in colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112241.
- Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., ... & Albini, A. (2015). Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PloS one*, 10(2), e0115686.
- Fogh, J., & Trempe, G. (1975). New human tumor cell lines. *In Human tumor cells in vitro* (pp. 115-159). Springer, Boston, MA.
- García, M. A., Carrasco, E., Aguilera, M., Alvarez, P., Rivas, C., Campos, J. M., ... & Aranega, A. (2011). The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes PKR-mediated apoptosis in a p53-independent manner in colon and breast cancer cells. *PLoS One*, 6(8), e23887.
- Gullett, N. P., Ruhul Amin, A. R., Bayraktar, S., Pezzuto, J. M., Shin, D. M., Khuri, F. R., Aggarwal, B. B., Surh, Y. J., & Kucuk, O. (2010). Cancer prevention with natural compounds. *Seminars in oncology*, 37(3), 258–281.

- Guo, S., Zhang, J., Wei, C., Lu, Z., Cai, R., Pan, D., ... & Zhang, Z. (2020). Anticancer effects of brusatol in nasopharyngeal carcinoma through suppression of the Akt/mTOR signaling pathway. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 85(6), 1097-1108.
- Hall, I. H., Lee, K. H., ElGebaly, S. A., Imakura, Y., Sumida, Y., & Wu, R. Y. (1979). Antitumor agents XXXIV: Mechanism of action of bruceoside a and brusatol on nucleic acid metabolism of P-388 lymphocytic leukemia cells. *Journal of pharmaceutical sciences*, 68(7), 883-887.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., ... & Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561), 663-666.
- Howard, A., & Pelc, R. R. (1953). Division of cell cycle in G₁, S, G₂ and M. *Heredity*, 6(Suppl.), 261.
- Hu, T., Li, Z., Gao, C. Y., & Cho, C. H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World journal of gastroenterology*, 22(30), 6876.
- Huang, M., Lu, J. J., & Ding, J. (2021). Natural products in cancer therapy: past, present and future. *Natural Products and Bioprospecting*, 11(1), 5-13.
- Huang, X. M., Yang, Z. J., Xie, Q., Zhang, Z. K., Zhang, H., & Ma, J. Y. (2019). Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109142.
- Huerta, S., Goulet, E. J., & Livingston, E. H. (2006). Colon cancer and apoptosis. *The American Journal of Surgery*, 191(4), 517-526.
- Islam, A., Islam, M. S., Rahman, M. K., Uddin, M. N., & Akanda, M. R. (2020). The pharmacological and biological roles of eriodictyol. *Archives of pharmacal research*, 43(6), 582-592.
- Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(2), 205.
- Kara ve Kesinkılıç. Türkiye Kanser İstatistikleri 2017. T.C. Sağlık Bakanlığı., Ankara., 2021.
- Kasibhatla, S., & Tseng, B. (2003). Why target apoptosis in cancer treatment?. *Molecular cancer therapeutics*, 2(6), 573-580.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Kikuchi, H., Yuan, B., Hu, X., & Okazaki, M. (2019). Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with

- conventional chemotherapeutic agents. *American journal of cancer research*, 9(8), 1517.
- Klug, W. S., & Michael, R. (2002). Cummings. Concepts of genetics.
- Kodach, L. L., Bos, C. L., Durán, N., Peppelenbosch, M. P., Ferreira, C. V., & Hardwick, J. C. (2006). Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 27(3), 508-516.
- Koff, J. L., Ramachandiran, S., & Bernal-Mizrachi, L. (2015). A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*, 16(2), 2942-2955.
- Kumar, N., Afjei, R., Massoud, T. F., & Paulmurugan, R. (2018). Comparison of cell-based assays to quantify treatment effects of anticancer drugs identifies a new application for Bodipy-L-cystine to measure apoptosis. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- Lahlaou, M. (2013). The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 17-31.
- Leal-Esteban, L. C., & Fajas, L. (2020). Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165715.
- Lee, J. H., Rangappa, S., Mohan, C. D., Sethi, G., Lin, Z. X., Rangappa, K. S., & Ahn, K. S. (2019). Brusatol, a Nrf2 inhibitor targets STAT3 signaling cascade in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomolecules*, 9(10), 550.
- Lee, S. E., Yang, H., Son, G. W., Park, H. R., Park, C. S., Jin, Y. H., & Park, Y. S. (2015). Eriodictyol Protects Endothelial Cells against Oxidative Stress-Induced Cell Death through Modulating ERK/Nrf2/ARE-Dependent Heme Oxygenase-1 Expression. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 14526–14539.
- Li, M. (2021). The role of P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) in ovarian development, cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Apoptosis*, 26(5), 235-247.
- Li, W., Du, Q., Li, X., Zheng, X., Lv, F., Xi, X., ... & Liu, S. (2020). Eriodictyol inhibits proliferation, metastasis and induces apoptosis of glioma cells via PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 114.
- Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*, 112(6), 957-962.
- Lopez-Acevedo, M., Grace, L., Teoh, D., Whitaker, R., Adams, D. J., Jia, J., & Secord, A. A. (2014). Dasatinib (BMS-35482) potentiates the activity of gemcitabine and docetaxel in uterine leiomyosarcoma cell lines. *Gynecologic oncology research and practice*, 1(1), 1-10.
- Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495.
- Lu, Z., Lai, Z. Q., Leung, A. W., Leung, P. S., Li, Z. S., & Lin, Z. X. (2017). Exploring brusatol as a new anti-pancreatic cancer adjuvant: Biological evaluation and mechanistic studies. *Oncotarget*, 8(49), 84974.
- Mariyappan, P., Kalaiyarasu, T., & Manju, V. (2017). Effect of eriodictyol on preneoplastic lesions, oxidative stress and bacterial enzymes in 1, 2-dimethyl hydrazine-induced colon carcinogenesis. *Toxicology Research*, 6(5), 678-692.

- Mata-Greenwood, E., Cuendet, M., Sher, D., Gustin, D., Stock, W., & Pezzuto, J. M. (2002). Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G1 arrest is associated with down-regulation of c-myc. *Leukemia*, 16(11), 2275-2284.
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88.
- Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, 6(12), 924-935.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., & Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research*, 59(6), 365-378.
- Obeng, E. (2020). Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*, 81, 1133-1143.
- Oh, U. H. (2020). Eriodictyol induced anticancer and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells (Doctoral dissertation, 제주대학교 대학원).
- Ölgen, S., Bıçak, I., & Nebioğlu, D. (2002). Angiogenesis ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 31 (3)193-214.
- Panda, D., Ray, D., Behera, D., Tripathy, D., Bhanja, D., Sangeeta, S., & Acharya, D. (2020). A Review on Apoptosis: When Death Precedes Life. *Eur. J. Mol. Clin. Med*, 7, 1174-1182.
- Panda, S. K., Ray, S., Nayak, S., Behera, S., Bhanja, S., & Acharya, V. (2019). A review on cell cycle checkpoints in relation to cancer. *J. Med. Sci*, 5, 88-95.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd gastroenterologiczny*, 14(2), 89.
- Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., Slíva, D., & Vodička, P. (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European journal of medicinal chemistry*, 144, 582-594.
- Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Tsurita, G., Okaji, Y., Kawai, K., ... & Nagawa, H. (2010). Chloroquine potentiates the 5-fluorouracil-induced cell cycle arrest on HT-29 colon cancer cells.
- Sim, K. Y., Sims, J. J., & Geissman, T. A. (1968). Constituents of *Brucea sumatrana*. I. Brusatol. *The Journal of Organic Chemistry*, 33(1), 429-431.
- SPSS. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0, Armonk, NY.
- Srimuangwong, K., Tocharus, C., Chintana, P. Y., Suksamrarn, A., & Tocharus, J. (2012). Hexahydrocurcumin enhances inhibitory effect of 5-fluorouracil on HT-29 human colon cancer cells. *World journal of gastroenterology: WJG*, 18(19), 2383.

- Suehiro, Y., Takemoto, Y., Nishimoto, A., Ueno, K., Shirasawa, B., Tanaka, T., ... & Hamano, K. (2018). Dclk1 inhibition cancels 5-FU-induced cell-cycle arrest and decreases cell survival in colorectal cancer. *Anticancer Research*, 38(11), 6225-6230.
- 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.
- Thirion, P., Michiels, S., Pignon, J. P., Buyse, M., Braud, A. C., Carlson, R. W., ... & Piedbois, P. (2004). Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(18), 3766-3775.
- Tong, J., Xie, G., He, J., Li, J., Pan, F., & Liang, H. (2011). Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Tran, S., DeGiovanni, P. J., Piel, B., & Rai, P. (2017). Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clinical and translational medicine*, 6(1), 1-21.
- Uğur, D., Güneş, H., Güneş, F., Mammadov, R. (2017). Cytotoxic Activities of Certain Medicinal Plants on Different Cancer Cell Lines. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 14(3), 222–230.
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology & therapeutics*, 206, 107447.
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology & therapeutics*, 206, 107447.
- Wang, C. Z., Luo, X., Zhang, B., Song, W. X., Ni, M., Mehendale, S., ... & Yuan, C. S. (2007). Notoginseng enhances anti-cancer effect of 5-fluorouracil on human colorectal cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 60(1), 69-79.
- Wang, F., Wang, Y. H., Wang, J. J., Xu, H. L., & Wang, C. M. (2016). Eriodictyol-induced anti-cancer and apoptotic effects in human hepatocellular carcinoma cells are associated with cell cycle arrest and modulation of apoptosis-related proteins. ||| *Bangladesh Journal of Pharmacology*|||, 11(2), 285-291.
- Wang, F., Wang, Y.H., Wang, J.J., Xu, H.L., & Wang, C.M. (2016). Eriodictyol-induced anti-cancer and apoptotic effects in human hepatocellular carcinoma cells are associated with cell cycle arrest and modulation of apoptosis-related proteins. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11, 285.
- Wen, S., Hu, M., & Xiong, Y. (2021). Effect of Eriodictyol on Retinoblastoma via the PI3K/Akt Pathway. *Journal of Healthcare Engineering*, 2021.
- Xie, J., Lai, Z., Zheng, X., Liao, H., Xian, Y., Li, Q., ... & Yang, X. (2021). Apoptotic activities of brusatol in human non-small cell lung cancer cells: involvement of ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicology*, 451, 152680.

- Xie, Q., Liu, Y., & Li, X. (2020). The interaction mechanism between autophagy and apoptosis in colon cancer. *Translational Oncology*, 13(12), 100871.
- Yang, Y., Tian, Z., Guo, R., & Ren, F. (2020). Nrf2 inhibitor, brusatol in combination with trastuzumab exerts synergistic antitumor activity in HER2-positive cancers by inhibiting Nrf2/HO-1 and HER2-AKT/ERK1/2 pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020.
- Yang, Y., Tian, Z., Guo, R., & Ren, F. (2020). Nrf2 inhibitor, brusatol in combination with trastuzumab exerts synergistic antitumor activity in HER2-positive cancers by inhibiting Nrf2/HO-1 and HER2-AKT/ERK1/2 pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020.
- Yılmaz Çakmak, Ö. “ DNA Fragmentation, Cell Cycle Analysis, Apoptotic Cell Analysis (Annexin V). 1st Theoretical Cell Death research Techniques Course. Book Chapter ISBN: 978-975-441-349-6, s223-232.
- Yu, L., & Liu, X. (2020). Eriodictyol Suppresses Survival of Cervical Cancer Cells Through Mediation of PTEN/Akt Signaling Pathway. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 18(2).
- Yu, X. Q., Shang, X. Y., Huang, X. X., Yao, G. D., & Song, S. J. (2020). Brusatol: A potential anti-tumor quassinoid from *Brucea javanica*. *Chinese Herbal Medicines*, 12(4), 359-366.
- Zhang, Y., Liu, Y., Zhou, Y., Zheng, Z., Tang, W., Song, M., ... & Wang, K. (2021). Lentinan inhibited colon cancer growth by inducing endoplasmic reticulum stress-mediated autophagic cell death and apoptosis. *Carbohydrate Polymers*, 267, 118154.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad: B**e A****L
Uyruk: T.C.
Doğum Tarihi: 1*/0*/9*
Medeni Hali: Bekar
Telefon: 0 5*7**6 5* 1*
E-posta: b*****l@gm**l.c*m

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/ Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Tekirdağ Anadolu Lisesi	2015
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2019

Yabancı Dil

Dil(İngilizce)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama			X
Okuma			X

Bilimsel Faaliyetler

Makaleler

Atay, M. Ö., **Ardıl, B.**, Alper, M., & Ceylan, O. (2021). Determination of Toxic and Anthelmintic Activities of *Ornithogalum nutans* L., *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawl. ex Spreng. and *Allium stylosum* O. Schwarz. *Natural Products and Biotechnology*, 1(1), 38-48.

Bildiriler

R. Mammadov, M. Alper. **B. Ardıl**, M. O. Atay, O. Ceylan & N. Deniz, The Antioxidant and Cytotoxic Potential of *C. Cancellatus* SUBSP. *Mazziaricus*, Tam Metin, Belarus Gradno Ekoloji Konferansı, 8 Ekim 2021.

B. Ardıl, M. Alper, Kolorektal Kanser Tedavisinde Kombine Uygulama Yaklaşımı, Sözlü sunum, XII. Fen Bilimleri Araştırma E-Sempozyumu, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 28 Mayıs 2021.

Deneyimler

İsteğe Bağlı Yaz Stajı, Namık Kemal Üniversitesi Fen Fakültesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü- Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı (1 Temmuz-1 Ağustos 2018)