

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM
DALI
(SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ İLE ORTAK DOKTORA
PROGRAMI)**

**MEBENDAZOLÜN KANSERLİ HÜCRELERDE APOPTOZ
İNDÜKLEYİCİ VE TUBULİN İNHİBİSYONU YAPICI
ETKİLERİ BAKIMINDAN, PAKLİTAKSEL VE
VİNKRİSTİN İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Mahmut ŞAHİN**

**Danışman
Prof. Dr. Haki KARA**

Doktora Tezi

**Haziran 2020
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM
DALI
(SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ İLE ORTAK DOKTORA
PROGRAMI)**

**MEBENDAZOLÜN KANSERLİ HÜCRELERDE APOPTOZ
İNDÜKLEYİCİ VE TUBULİN İNHİBİSYONU YAPICI
ETKİLERİ BAKIMINDAN, PAKLİTAKSEL VE
VİNKRİSTİN İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Mahmut ŞAHİN**

**Danışman
Prof. Dr. Haki KARA**

Doktora Tezi

**Bu çalışma; Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından V-065 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2020
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.



Mahmut ŞAHİN

“Mebendazolün Kanserli Hücrelerde Apoptoz İndükleyici ve Tubulin İnhibisyonu Yapıcı Etkileri Bakımından, Paklitaksel ve Vinkristin İle Karşılaştırılması” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Mahmut ŞAHİN

Danışman
Prof. Dr. Haki KARA

Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ABD Başkanı
Prof. Dr. Gökhan ERASLAN

Prof. Dr. Haki KARA danışmanlığında **Mahmut ŞAHİN** tarafından hazırlanan “**Mebendazolün Kanserli Hücrelerde Apoptoz İndükleyici ve Tubulin İnhibisyonu Yapıcı Etkileri Bakımından, Paklitaksel ve Vinkristin İle Karşılaştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında **doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

22/06/2020

JÜRİ:

Danışman: Prof. Dr. Haki KARA
 (CÜ Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ABD)
 Üye : Prof. Dr. Murat KANBUR
 (ERÜ Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ABD)
 Üye : Dr. Öğr. Üyesi Emre ARSLANBAŞ
 (AÜ Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ABD)
 Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin GÜNGÖR
 (CÜ Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ABD)
 Üye : Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Yasin TEKELİ
 (ERÜ Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ABD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/...../2020 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /...../ 2020

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle, öğrencisi olmaktan büyük gurur duyduğum hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Haki KARA'ya tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi birikimini ve deneyimlerini mesai mefhumu gözetmeksizin sunmasının yanı sıra teşvik edici ve alicenap tavrından ötürü teşekkürlerimi sunarım. Benim için kendisi, ömrüm boyunca saygıdeğer bir büyüğüm ve örnek aldığım ulvi bir şahsiyet olarak kalacaktır.

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin GÜNGÖR, Dr. Öğr. Üyesi Emre ARSLANBAŞ ve Arş. Gör. Alper Serhat KUMRU'ya tez çalışmalarım boyunca verdikleri desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Hücre kültürü konusunda deneyimlerinden istifade ettiğim ve çalışmalarımı sürdürmem için gerekli tüm laboratuvar imkanlarını hiç çekinmeden sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Hakan IŞIDAN, Dr. Öğr. Üyesi Turhan TURAN'a ve Arş. Gör. Mustafa Ozan ATASOY'a katkılarından dolayı minnet duyduğumu ifade ederim ve bilahere teşekkürlerimi sunarım.

Kanser modellemesi ve hücre temininde yardımlarını esirgemeyen, Erciyes Üniversitesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mehtap NİSARİ, Dr. Öğr. Üyesi Özge AL ve Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Yasin TEKELİ'ye de desteğinden ve her türlü resmi işlemlerde kendisine verdiğim çeşitli zahmetlerden ötürü çok teşekkür ederim.

Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu Sivas İl Koordinatörlüğü ve Sivas Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'nden çalışma arkadaşlarımdan hepsine teşvikleri ve samimi destekleri için ayrı ayrı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sürekli beni kollayan ve gözetken anneme, babama ve kardeşlerime ne kadar teşekkür etsem de onlara karşı vefa borcumu ödeyemem. Tez çalışmalarım esnasında onlarla çok fazla ilgilenememe rağmen yine de benimle ilgilenen, hayatın sefasını da cefasını da paylaştığımız eşime ve çocuklarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Beni bu yaşıma kadar büyüten ve yetiştiren aziz Türk Milletine, Türkiye Cumhuriyeti Devletine olan borcumun ise teşekkürle değil ancak daha fazla çalışmakla ödenebileceği kanısında olduğumu ve onlara olan bağlılığımın ve minnettarlığımın ömrüm boyunca süreceğini de ifade etmek isterim.

Mahmut ŞAHİN
Kayseri, 22/06/2020

MEBENDAZOLÜN KANSERLİ HÜCRELERDE APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ VE TUBULİN İNHİBİSYONU YAPICI ETKİLERİ BAKIMINDAN, PAKLİTAKSEL VE VİNKRİSTİN İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Mahmut ŞAHİN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı**

Doktora Tezi, Haziran 2020

Danışman: Prof. Dr. Haki KARA

ÖZET

Mebendazolün, kanserli ve sağlıklı hücrelerde etkinliğinin paklitaksel ve vinkristin ile karşılaştırıldığı bu çalışmada, MRC-5 ve NCI H-209 hücre hatlarına her üç etken maddenin 0,5µM – 1,0µM – 1,5µM – 2µM konsantrasyonlarında uygulaması yapılmıştır. İn-vitro denemelerde, kaspaz 3, 8, 9 ile hücre sitotoksitesi elisa metoduyla, apoptotik DNA düzeyi jel elektroforez ile, hücre proliferasyonu ise yara iyileşmesi deneyi ile ölçülmüştür. Çalışmanın in-vivo kısmında, farelere 200.000 adet Ehrlich asites tümörü hücresi enjekte edilip tümör oluştuktan sonra terapötik dozlarda 21 gün ilaç uygulamasını takiben tümör hacmi ve anjiyogenez ölçümleri yapılmıştır.

İn-vitro çalışmalar sonucunda mebendazolün kanserli hücre hattı üzerinde apoptoz ve hücre sitotoksitesini doza bağlı olarak artırdığı, sağlıklı hücre hattı üzerinde ise paklitaksel ve vinkristine nazaran daha az sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. İn-vivo çalışmalar sonucunda, tümör hacmi ve doku hemoglobin aracılı anjiyogenez düzeyleri bakımından mebendazol en etkili ajan olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak; mebendazolün, kanserli hücrelerde tubulin proteini yapısını bozarak apoptozu artırdığını, bununla birlikte sağlıklı hücrelerde paklitaksel ve vinkristinden daha az düzeyde sitotoksik etki oluşturduğu, paklitaksel ve vinkristinin mebendazol ile kombine edilerek kullanılması durumunda tedavide farmakolojik etkinliklerinin artacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Tubulin, Mebendazol, Paklitaksel, Vinkristin

**COMPARISON OF MEBENDAZOL WITH PACLITAXEL AND VINCRISTINE
IN TERMS OF APOPTOSIS INDUCING AND TUBULIN INHIBITION IN
CANCER CELLS**

Mahmut ŞAHİN

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology**

Phd. Dr. Thesis, June 2020

Supervisor: Prof. Dr. Haki KARA

ABSTRACT

In this study, the effectiveness of mebendazole in cancerous and healthy cells was compared with paclitaxel and vincristine, in the MRC-5 and NCI H-209 cell lines at concentrations of 0.5µM - 1.0µM - 1.5µM - 2µM. In in vitro experiments, cell cytotoxicity and caspase 3, 8, 9 was measured by elisa method, apoptotic DNA level was measured by gel electrophoresis, and cell proliferation by wound healing assay. In the in vivo part of the study, 200,000 Ehrlich acid tumor cells were injected into the mice and tumor volume and angiogenesis were measured after 21 days of drug administration at therapeutic doses after the tumor was formed.

As a result of in-vitro studies, it was observed that mebendazole increased apoptosis and cell cytotoxicity on the cancerous cell line depending on the dose and showed less cytotoxic effect on the healthy cell line compared to paclitaxel and vincristine. Consequently of in vivo studies, mebendazole was found to be the most effective agent in terms of tumor volume and tissue hemoglobin-mediated angiogenesis levels.

In conclusion; mebendazole increases apoptosis by disrupting the tubulin protein structure in cancerous cells, however it creates less cytotoxic effect in healthy cells than paclitaxel and vincristine. We believe that if paclitaxel and vincristine are used in combination with mebendazole, their pharmacological activity may increase in treatment.

Keywords: Apoptosis, Tubulin, Mebendazole, Paclitaxel, Vincristin

İÇİNDEKİLER

MEBENDAZOLÜN KANSERLİ HÜCRELERDE APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ VE TUBULİN İNHİBİSYONU YAPICI ETKİLERİ BAKIMINDAN, PAKLİTAKSEL VE VİNKRİSTİN İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Sayfa

İÇ

KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	xvii
ABSTRACT.....	xviii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xv
TABLolar LİSTESİ	xvii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xviii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Hücre Siklusu ve Önemi.....	3
2.2.Apoptoz	5
2.2.1.Apoptoz Kontrolü	6
2.2.2.Apoptoz Sürecinde Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9.....	7
2.2.2.1.Ekstrinsik Apoptoz Yolağı ve Kaspaz 8	7
2.2.2.2.İntrinsik Apoptoz Yolağı ve Kaspaz 9	8
2.2.2.3. Efektör Kaspaz, Kaspaz 3	9
2.2.3.Apoptotik DNA Laddern Patherni	10
2.3.Tubulin Proteini ve Tubulin Proteininin Hücre Siklusundaki Önemi	12
2.3.1.Mikrotubulin Yapısı	12

2.3.2. Antineoplastik Ajanlarca Mikrotubulin Yapısının Hedeflenmesi	14
2.4. Benzimidazoller	16
2.4.1. Benzimidazollerin Etki Mekanizması	16
2.4.2. Benzimidazollerin Farmakokinetiği	17
2.4.3. Benzimidazollerin Toksisitesi	17
2.4.4. Benzimidazollerin Anti-Kanser Etkileri	18
2.5. Mebendazol	19
2.5.1. Mebendazolün Kimyasal Yapısı	19
2.5.2. Mebendazolün Etki Mekanizması	19
2.5.3. Mebendazolün Farmakokinetiği	19
2.5.4. Mebendazolün Toksisitesi	20
2.6. Antineoplastik İlaçlar	21
2.6.1. Paklitaksel	23
2.6.1.1. Paklitakselin Kimyasal Yapısı	23
2.6.1.2. Paklitakselin Etki Mekanizması	23
2.6.1.3. Paklitakselin Farmakokinetiği	24
2.6.1.4. Paklitakselin Toksisitesi	24
2.6.2. Vinkristin	26
2.6.2.1. Vinkristinin Kimyasal Yapısı	26
2.6.2.2. Vinkristinin Etki Mekanizması	26
2.6.2.3. Vinkristinin Farmakokinetiği	27
2.6.2.4. Vinkristinin Toksisitesi	27
2.7. Hücre Kültürü	29
2.7.1. Hücre Kültürünün Tarihçesi	29

2.7.2.Hücre Kültürü Avantajları ve Dezavantajları	29
2.7.3.Hücre Kültürü Besiyerleri	30
2.7.4.Hücre Kültüründe Hücre Üretilmesine Etki Eden Fizikokimyasal Faktörler	33
2.7.4.1.pH	33
2.7.4.2.Sıcaklık	33
2.7.4.3.CO ₂ ve O ₂ Saturasyonu	33
2.7.5.Hücre Kültür Tipleri	34
2.7.5.1.Primer Hücre Kültürü	34
2.7.5.2.Subkültür Hücre Kültürü (Hücre Hattı)	35
2.7.5.3.Monolayer Hücre Kültürü	35
2.7.5.4.Süspanse Hücre Kültürleri	36
2.7.5.5.Adherent Hücre Kültürleri	36
2.7.6.Hücre Kültürlerinde Büyüme Kinetiği	36
2.8.Ehrlich-Letter Tümörü	38
2.8.1.Asit Formu (EAT)	38
2.8.2.Solid Formu (SEC)	39
3.GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1.İN VİTRO DENEYLER	40
3.1.1.Hücre Kültüründe Kullanılan Gereçler ve Yöntem	40
3.1.1.1.Kullanılan Hücre Hatları ve Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları	40
3.1.1.1.1. MRC-5 Hücre Hattı	40
3.1.1.1.2. NCI-H209 Hücre Hattı	41
3.1.1.2.Hücre Kültüründe Kullanılan Vasatlar	42

3.1.1.2.1.D-MEM	42
3.1.1.2.2.RPMI-1640	42
3.1.1.3.Hücre Kültürü Süreçleri	43
3.1.1.3.1.Hücre Kültüründe Hücrelerin Büyütülmesi	43
3.1.1.3.2.Hücrelerin Pasajlanması	44
3.1.1.3.2.1.MRC-5 Hücre Kültürünün Pasajlanması	45
3.1.1.3.2.2. NCI-H209 Hücre Kültürünün Pasajlanması	46
3.1.1.3.3.Hücrelerin Dondurulması ve Stoklanması	47
3.1.2. Mebendazol	47
3.1.3. Paklitaksel	47
3.1.4. Vinkristin	48
3.1.5.Deneylerde Kullanılan Hücre Sayılarının Optimizasyonu	47
3.1.6.Deneylerde Kullanılan Etken Madde Konstrasyonlarının Optimizasyonu	48
3.1.7.MTT Hücre Canlılığı Deneyi	49
3.1.8.Kaspaz-3 Düzeylerinin Tespit Edilmesi	53
3.1.9.Kaspaz-8 Düzeylerinin Tespit Edilmesi	54
3.1.10. Kaspaz-9 Düzeylerinin Tespit Edilmesi	55
3.1.11.Apoptotik DNA Laddern Deneyi	55
3.1.12.Wound Healing (Yara iyileşmesi ve hücre göçü) Deneyi	60
3.2.İN VİVO DENEYLER	63
3.2.1.Ehrlich Asites Tümörü Oluşturulması	64
3.2.2.Solid Ehrlich Tümörü Oluşturulması	66

3.2.3.SEC’li Deney Hayvanlarında İlaç Denemeleri ve Ölçümlerin Yapılması	68
3.2.4.Kanserli Dokularda Doku Hemoglobin Düzeyinin Tayin Edilmesi	73
3.3.İSTATİSTİKSEL ANALİZ	76
4.BULGULAR	77
4.1.İN VİTRO BULGULAR	77
4.1.1.Hücre Canlılığı Bulguları	77
4.1.1.1. MRC-5 Hücresinde Hücre Canlılığı Düzeyleri	77
4.1.1.2. NCI-H209 Hücresinde Hücre Canlılığı Düzeyleri	78
4.1.2.Apoptotik DNA Laddern Bulguları	79
4.1.2.1. MRC-5 Hücresinde Apoptotik DNA Laddern Bulguları	79
4.1.2.2. NCI-H209 Hücresinde Apoptotik DNA Laddern Bulguları	81
4.1.3.Kaspaz (3-8-9) Düzeyi Bulguları	84
4.1.3.1. MRC-5 Hücresinde Kaspaz-3 Düzeyi Bulguları	83
4.1.3.2. NCI-H209 Hücresinde Kaspaz-3 Düzeyi Bulguları	84
4.1.3.3. MRC-5 Hücresinde Kaspaz-8 Düzeyi Bulguları	85
4.1.3.4. NCI-H209 Hücresinde Kaspaz-8 Düzeyi Bulguları	86
4.1.3.5. MRC-5 Hücresinde Kaspaz-9 Düzeyi Bulguları	87
4.1.3.6. NCI-H209 Hücresinde Kaspaz-9 Düzeyi Bulguları	88
4.1.4.Wound Healing Düzeyi Bulguları	89
4.1.4.1. MRC-5 Hücresinde Wound Healing Düzeyi Bulguları	89
4.2.İN VİVO BULGULAR	91

4.2.1.SEC Tumor Hacmi Düzeyleri	91
4.2.1.1.Antemortem SEC Tumor Hacmi Düzeyi	91
4.2.1.2.Postmortem SEC Tumor Hacmi Düzeyi	93
4.2.2.SEC Doku Hemoglobin Düzeyi	95
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	97
5.1. Bulguların Tartışılması.....	97
5.1. 1. <i>İn-Vitro</i> Bulguların Tartışılması.....	97
5.1.2. <i>İn-Vivo</i> Bulguların Tartışılması.....	109
5.2. Sonuç.....	113
6.KAYNAKLAR	115
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotik protease activating factor-1
ATP	Adenozin Tri Fosfat
CAD	Caspase Acitvated DNase
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CCS	Cell Cyclus Specific
CCNS	Cel Cyclus Non Spesific
CED-(1-4)	Caenorhabditis elegans Death gen (1-4)
Cyto c	Cytochrome c
CYP3A4	Cytocrom P450 3A
DISC	Death Inducing Singnaling Complex
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DR5	Death Receptor 5
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EAT	Ehrlich Ascites Tumor
Endo-G	Endonukleaz-G
E-MEM	Eagle's Minimal Essential Medium
FADD	Fas-Associated Death Domain
FBS	Fetal Bovine Serum
GTP	Guanozin Trifosfat
GDP	Guanozin Difosfat

HBBS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HÜKÜK	Hücre Kültürü Kataloğu
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
H ₂	Histamin 2
IAP	İnhibitör Apoptotik Protein
ICAD	Inhibitor of Caspase Activated DNase
IC ₅₀	Inhibitoric Consantration ₅₀
LD ₅₀	Lethal Dose ₅₀
NCI	National Cancer Institute
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
SEC	Solid Ehrlich Carcinoma
SMAC	Second Mitochondria-Derived Activator Of Caspase
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TRADD	Tumour Necrosis Factor Receptor-Associated Death Domain
USDA	United States Department of Agriculture
VEGF	Vascular Endothelial Growt Factor
WHO	World Health Organisation
5-FU	5-Flouro Urasil

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Antineoplastik ajanların hücre siklusuna göre olan etkinlikleri bakımından sınıflandırılmaları	24
Tablo 3.1. <i>İn-vivo</i> çalışma grupları ve ilaç uygulamaları	30
Tablo 4.1. SEC'li deneklerin antemortem kanserli kitle hacimleri	73
Tablo 4.2. Deney farelerinden çalışma sonunda çıkarılan SEC kitlerinin hacimleri.	94
Tablo 2.6.2.4. Vinkristinin Toksisitesi.....	96

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Hücre siklusu ve fazları	5
Şekil 2.2. Kaspaz-8/Kaspaz-10 ve apoptoz süreci.....	9
Şekil 2.3. Kaspaz-3 aktivasyonu süreci	11
Şekil 2.4. Apoptotik DNA Laddern elektroforez görüntüsü	12
Şekil 2.5. Mikrotubulin yapısı	14
Şekil 2.6. Mikrotubulin yapısına etki eden antineoplastik ajanlardan paklitaksel ve vinka alkaloidlerinin etki mekanizmalarını gösterir şekil.....	16
Şekil 2.7. Kültür ortamında bikarbonat temelli pH kontrol mekanizmasının Henderson–Hasselbalch eşitliğine göre davranışı	36
Şekil 2.8. Hücre kültüründe hücrelerin büyüme kinetiğinin zamana göre gösterimi.....	40
Şekil 3.1. Tam konfluens halinde MRC-5 hücresi	44
Şekil 3.2. NCI-H209 hücresi görseli.....	45
Şekil 3.3. Hücre kültüründe kullanılan hücre kültür flaskları ve pleytler.....	47
Şekil 3.4. Monolayer halindeki MRC-5 hücresinin tripsin uygulanmadan önceki görseli.....	49
Şekil 3.5. Tripsin uygulanarak yerinden kaldırılmış MRC-5 hücreleri	49
Şekil 3.6. MRC-5 hücresinde ilaç yoğunluğu / hücre canlılığı görünümü	52
Şekil 3.7. MTT eklenmiş hücre pleytine ait görsel.....	55
Şekil 3.8. MTT eklenmiş hücre pleytine ait deney sonrası görseli.....	56
Şekil 3.9. Elektroforez tarağının hazırlanması ve elektroforeze yerleştirilmesi.....	60
Şekil 3.10. Elektroforez tankına agaroz jel dökülmesi	60
Şekil 3.11. Donmuş jelin elektroforez kuvetine alınması ve TE Buffer eklenmesi... 61	
Şekil 3.12. Jel içerisindeki tarak boşluklarına yürütme solüsyonu ile boyanmış örneklerin verilmesi	62
Şekil 3.13. Elektroforez düzeneğinin güç kaynağına bağlanması	63
Şekil 3.14. Wound healing deneyinde kullanılan 6 kuyucuklu hücre pleytleri.....	65
Şekil 3.15. Mikropipet ucu kullanılarak monolayerde hücre yaralanması Oluşturulması	65
Şekil 3.16. Hücresel yara iyileşmesi görüntüsü.....	66
Şekil 3.17. Deney faresine ip. enjeksiyonla EAT hücresi inokülasyonu yapılması .. 68	
Şekil 3.18. EAT inokülasyonu sonrası asites gelişmiş EAT’li deney faresi.....	68

Şekil 3.19. Stok oluşturulmuş EAT'li deney faresinden asites sıvısıyla birlikte tümör hücrelerinin alınması.....	69
Şekil 3.20. Deri altı EAT hücresi enjekte edilen deney faresinde gelişen SEC kitlesi.....	70
Şekil 3.21. EAT enjekte edilen SEC'li hayvanda palpe edilebilir kitlenin Görünümü.....	71
Şekil 3.22. SEC'li deney faresinin kanserli dokusunun wernier kaliper ile dıştan ölçümü.....	74
Şekil 3.23. SEC'li deney faresinden cerrahi operasyonla kanserli dokunun Çıkarılması	75
Şekil 3.24. Deney faresinden çıkarılan SEC dokusunun ölçülmesi	76
Şekil 3.25. Doku hemoglobin düzeyinin belirlenmesi.....	79
Şekil 4.1. MRC-5 hücresinde hücre canlılığı grafiği	81
Şekil 4.2. NCI-H209 hücresinde hücre canlılığı grafiği	82
Şekil 4.3. MRC-5 hücresinde apoptotik DNA düzeyinin kontrol grubuna oranla değişimi	83
Şekil 4.4. MRC-5 hücresinde apoptotik DNA elektroforez görüntüsü.....	83
Şekil 4. 5. NCI-H209 hücresinde apoptotik DNA düzeyinin kontrol grubuna oranla değişimi	85
Şekil 4.6. NCI-H209 hücresinde apoptotik DNA elektroforez görüntüsü.....	85
Şekil 4.7. MRC-5 Hücresinde Kaspaz-3 Düzeyinin kontrol grubuna göre değişimi	87
Şekil 4.8. NCI-H209 Hücresinde Kaspaz-3 Düzeyinin kontrol grubuna göre değişimi	88
Şekil 4.9. MRC-5 Hücresinde Kaspaz-8 Düzeyinin kontrol grubuna göre değişimi	89
Şekil 4.10. NCI-H209 Hücresinde Kaspaz-8 Düzeyinin kontrol grubuna göre değişimi	90
Şekil 4.11. MRC-5 Hücresinde Kaspaz-9 Düzeyinin kontrol grubuna göre değişimi	91
Şekil 4.12. NCI-H209 Hücresinde Kaspaz-9 Düzeyinin kontrol grubuna göre değişimi	92
Şekil 4.13. MRC-5 hücresinde yara iyileşme düzeyinin kontrol grubuna göre değişimi	93

Şekil 4.14. SEC kitle hacminin kontrol grubuna göre % olarak değişimi ve değişim eğrisi	95
Şekil 4.15. SEC’li deneklerin antemortem kanserli kitle hacimlerinin zamana göre değişimi	96
Şekil 4.16. Postmortem SEC kanserli doku hacminin kontrol grubuna göre değişimi	97
Şekil 4.17. Deney hayvanlarından çıkarılan SEC kanserli dokuların Karşılaştırılması.....	98
Şekil 4.18. Kanserli doku hemoglobin miktarının ilaçlara göre düzeyleri	99

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılında yayımladığı kanser raporuna göre kanser; 172 ülke arasından 91 ülkede 70 yaş altı ölümlerin en temel birinci veya ikinci sebebi iken sadece 22 ülkede 70 yaş altı ölümlerin üçüncü veya dördüncü sebebi olarak yer almaktadır. 2018 yılında kanser vakalarına 18,1 milyon yeni vaka eklenmiş ve aynı yılda kanser kaynaklı ölümlerin sayısının 9,6 milyon kişi olduğu hesaplanmıştır (Bray et al., 2018). Hem insanlarda hem de hayvanlarda kanser tedavisinde kullanılan ilaçların ciddi yan etkilerinin olması ve pek çok kanser türünde halen istenilen tedavi başarısına ulaşılamaması, kanser ile mücadelede bilim insanlarını yeni stratejiler ve yeni tedavi yolları bulmaya zorlamaktadır. Bu yeni stratejilerden biri de; kanser harici tedavilerde hali hazırda kullanılan ve anti-kanser etkinliğinin de olması muhtemel ilaçların kanser tedavilerinde denenmesidir (N. A. Doudican, Byron, Pollock, & Orlow, 2013; Nygren, Fryknas, Agerup, & Larsson, 2013; Pan Pantziarka, Gauthier Bouche, Lydie Meheus, Vidula Sukhatme, & Vikas P Sukhatme, 2014).

Benzimidazol grubu ilaçlardan olan mebendazol uzun yıllardır insan ve hayvan sağlığında kullanılmaktadır. Mebendazolün anti-kanser etkileri hakkında pek çok kanser türü üzerinde yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak mebendazol tek başına kullanılarak etkinliği konvansiyonel anti-kanser ilaçlar ile mukayese edilmiştir. Literatür kaynaklarında mebendazolün apoptoz indüksiyonu ile sonuçlanan anti-kanser etkilerinin temelde hücre iskeletinin önemli bir bileşeni olan tubulin proteininin inhibisyonuna dayandığı bildirilmektedir (Mukhopadhyay, Sasaki, Ramesh, & Roth, 2002). Mebendazolün kanserli hücreler üzerinde etkinliğinin araştırıldığı pek çok çalışmada polimerize formdaki tubulin proteini düzeyinin azaldığı yapılan çalışmalarla *in-vitro* olarak izah edilmiştir (Katiyar, Gordon, McLaughlin, & Edlind, 1994; Laclette, Guerra, & Zetina, 1980; Morgan, Reynoldson, Thompson, & chemotherapy, 1993).

Halen yoğun olarak kullanılmakta olan ve CCS (Cell Cycle Specific- Hücre siklusuna özel) antineoplastik ilaçlardan olan paklitaksel; tubulin dimerlerinin bir araya gelmeleri

ile oluşmuş mikrotubulinleri stabilize ederek etki gösterirken, vinkristin; tubulin dimerlerinin polimerize olmaları ile oluşan mikrotubulin proteinini depolimerize ederek mikrotubulin destabilizatörü olarak etki etmekte ve her iki ilaçta mitoz geçirmekte olan hücrelerde mitozu durdurarak anti-kanser etkilerini göstermektedirler ((Mary Ann Jordan & Wilson, 1998). Bu çalışmada mebendazol, hem tek başına hem de paklitaksel ve vinkristin ile kombine edilerek *in-vitro* ve *in-vivo* deneyler yapılmıştır. Mebendazolün kanserli hücreler üzerindeki etkisinin; hücresel boyutta paklitaksel gibi mikrotubulin stabilizasyonu aracılığı ile mi yoksa vinkristin gibi tubulin depolimerizasyonu yoluyla mı oluştuğunun, bilinen bir durumun referansı ile bilinmeyen durum hakkında bilgi edinilmesi prensibi temelinde aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmada mebendazolün anti-kanser ilaçları ile arasında sinerjistik bir etkileşim olup olmadığının ortaya çıkarılması için mebendazol ve konvansiyonel anti-kanser ilaçlardan paklitaksel ve vinkristin tek başlarına ve birbirleri ile oluşturulan ilaç kombinasyonları halinde *in-vitro* ve *in-vivo* şartlarda kanserli hücrelerdeki apoptoz indüksiyonu ve tubulin proteini üzerinde oluşturdukları inhibisyon düzeyleri bakımından incelenmiştir.

Mebendazolün, anti-kanser ilaçları ile kombine edilmesi durumunda; mebendazolün kanserli hücrelerde apoptoz indükleyici ve tubulin inhibisyonu oluşturucu etkileri sebebiyle konvansiyonel anti-kanser ilaçları ile sinerjistik etki meydana getirmesi ve klasik anti-neoplastik ilaçların ciddi yan etkilerinin minimize edilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, büyük bölümü edinsel olarak kendiliğinden veya çevresel etmenlerden kaynaklanan streslere bağlı olarak gelişen DNA mutasyolarının neden olduğu genetik bir hastalıktır olarak tanımlanmaktadır (Kumar, 2013). Dünya Sağlık Örgütü tarafından ise kanser; invazyon ve metastaz yapabilen kontrolsüz hücre bölünmesi olarak tarif edilmekte ve ölüm sebepleri arasında en yaygın ikinci sağlık problemi olarak bildirilmektedir. Erkeklerde akciğer, prostat, kolon, mide ve karaciğer kanserleri, kadınlarda ise meme, kolon, akciğer, serviks ve mide kanserleri en yaygın kanser türleri arasında yer almaktadır ("Cancer," 2020). WHO 2018 yılı kanser raporunda dünyada 9,6 milyon insanın kanser sebebiyle öldüğü ve bu sayının dünya çapında aynı yılda olan tüm ölüm vakalarının tahminen %16,6'sına denk geldiği bildirilmiştir.

Kanserli hücrelerin temelde; proliferasyon bakımından kendine yeterli olmak, hücre büyümesini engelleyen faktörler karşısında duyarsızlaşmak, apoptozdan kurtulmak, sınırsız replikasyon yeteneği kazanmak, sürekli anjiyogenez yeteneği kazanmak ile invazyon ve metastaz oluşturmak gibi özellikleri bulunmaktadır (Kumar, 2013). Kanserli hücrelere has bu indikatif özellikler dikkatlice irdelendiğinde aslında WHO'nun tanımında da yer bulduğu üzere; kanserin tüm belirleyici özelliklerinin kontrolsüz hücre bölünmesiyle ilgili olduğu düşünülmektedir.

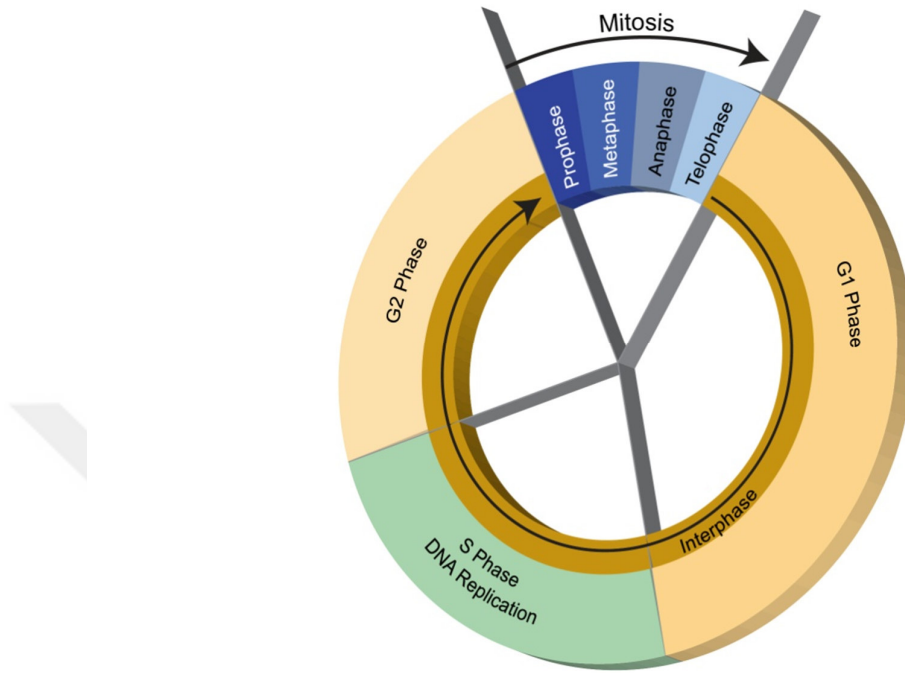
2.1. Hücre Siklusu ve Önemi

Hücreler, büyüme ve bölünmedeki yer aldıkları konuma göre çeşitli fazlardan geçerler. Genel olarak hücre siklusu olarak bilinen bu döngü; G1, S, G2 ve M fazları olmak üzere farklı evreler ile tanımlanmaktadır (Şekil 2.1.). G1 fazında hücre DNA'sı mutasyonlar bakımından baştan sona taranır ve replikasyon öncesi DNA ve böylelikle hücre genomu taranarak kontrol edilir, S fazında DNA replikasyonu başlar ve bu faza

giren bir hücre asla geri dönemez, G2 fazında replikasyonunu tamamlayan hücre mitoz için gerekli komponentleri sentezleyerek mitoz hazırlanır (Edward & Katzung, 2014). Son olarak tüm kontrollerden başarıyla geçen hücre M fazına girerek mitoz bölünmeyi gerçekleştirir. Ayrıca hücre siklusu içerisinde sayılmayan ancak dormant haldeki hücrelerin bulundukları ve M ile G1 fazı arasında olduğu kabul edilen G0 fazı adında bir faz da mevcuttur (Kumar,2013).

Fizyolojik koşullarda, hücre bölünmesini tamamlayabilmek için hücre siklusuna giren bir hücre, hücre siklusundaki fazları sırasıyla geçer ve her faz sonrasında hücre genomu pek çok faktör ile kontrol edilerek bir sonraki hücre siklusu fazına ancak bir önceki fazın sonunda yapılan kontrollerden hasarsız olarak geçmek şartıyla girebilir. Bu şekilde her faz arasında hücrenin kontrol ediliyor olmasına karşın hücre bölünmesinde özellikle G1-S fazı geçişi ve G2-M geçişi hücrenin mutasyonlardan korunması ve mitozun sağlıklı olarak tamamlanabilmesi bakımından kritik öneme sahiptirler. Bu sebeple bu denetim noktalarına hücrenin ve mitozun denetim kapıları denilmektedir (Cabadak, 2008).

Hücre siklusunda denetim kapılarından herhangi birinde ya da herhangi başka bir fazın sonunda kusurlu bulunan hücreler için hücrenin akıbeti şu şekilde cerayan eder. Herhangi bir fazda kusurlu olduğu anlaşılan hücre, ya DNA onarımına tabi tutularak hücre DNA'sı düzeltilir ve hücre siklusa kaldığı yerden devam eder, ya da hasar düzeltilemiyor ama hasarın boyutunun hayati öneme sahip bir potansiyeli de yok ise hücre yaşlanmaya sevk edilir ve G0 fazında bekler ((Allan & Clarke, 2007). Şayet hasar ciddi ve düzeltilemeyecek boyutta ise hücre, içinde bulunduğu hücre siklusu fazını başarıyla tamamlayamadığı için bir sonraki faza giremez ve apoptoza uğrayarak ölür (Bellamy, 1997).



Şekil 2.1. Hücre siklusunda hücreler sırasıyla G1, S, G2 ve M olarak adlandırılan hücre siklusu fazlarını takip etmektedirler (National Human Genome Research Institute, 2020).

Yıllardır devam eden kanser araştırmaları neticesinde artık pek çok onkogenik faktörün kanserli hücre oluşumunda, hücre siklusunda yer alan protein ve enzim yapılarındaki faktörlerden en azından bir veya birden fazlasının anormal bir işleyiş kazanması sonucunda kanser gelişimine yol açtığı fikri yaygın biçimde kabul görmüştür ((DeVita & Chu, 2008). Özellikle hücre siklusunda G1-S fazı geçişi apoptoz bakımından, G2-M fazı ise mitoz bölünmenin artık geri dönüşsüz olarak başlaması bakımından hayati öneme sahip basamaklar olarak görülmektedirler (Vermeulen & Berneman, 2003).

2.2. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir (Cummings & Winterford, 1997). Eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, yahut hücre hasarı ciddi boyutlara varmışsa hücre içi haberci sistemleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır (Mak, 2003). Bu intihar

süreci Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz ya da programlı hücre ölümüyle gerçekleşir (Pınarbaşı, 2007).

Hücre ölümleri fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak da adlandırılır (Bellamy, Malcolmson, Harrison, & Wyllie, 1995; Cohen, 1993; Schwartzman & Cidlowski, 1993) Embriyonal dönemde de canlının başarılı bir organ gelişimini sağlayabilmesi embriyonik gelişme sırasında gerçekleşen apoptoza ve apoptozun kontrolüne bağlıdır (Pınarbaşı, 2007; Thompson, 1995).

2.2.1. Apoptoz Kontrolü

Apoptoz; gelişim, dokularda hücre popülasyonun korunması ve yaşlanma gibi homeostatik mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak meydana gelir (Elmore, 2007). Ayrıca apoptoz, hücreler hastalıklar veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde, immun reaksiyonlarda veya kanserli dokuların bertaraf edilmesinde koruyucu bir mekanizma olarak da ortaya çıkar (Vaux & Flavell, 2000).

Fizyolojik sınırlar dahilinde hücrelerde cereyan eden apoptoz faaliyetleri apoptotik ve antiapoptotik genlerle eksprese edilen proteinlerle sürekli olarak dinamik bir denge halinde tutulmaktadır (Ito, Deng, Carr, & May, 1997). İlk kez insan B hücreli lenfomasında tespit edilen Bcl ailesi üyelerinden bir kısmının apoptozu indüklediği (başlıcaları Bax olmak üzere Bad, Bid) bir kısmının ise apoptozu inhibe ettiği (Bcl-2 ve Bcl-XL) belirlenmiştir (Tchernev & Orfanos, 2007; Zhuang et al., 2007).

Bcl ailesinin yanı sıra apoptoz mekanizmasında önemli rol üstlenen bir diğer unsur ise kaspazlardır. Kaspazlar siklin bağlayıcı kinazlar (Cdk, Cyclin Dependent Kinase) tarafından inaktif pozisyonda tutulmaktadır ((N. Doudican, Rodriguez, Osman, & Orlow, 2008). Ancak kaspazların CdK etkisinden kurtulması durumunda (cleaved kaspaz) aktifleşen kaspazlar apoptozu indüklerler (Sasaki et al., 2002). Biyokimyasal özellikleri ve hücresel süreçlerde üstlendikleri fonksiyonlarına göre; 1 ile 14 arasında kategorize edilen kaspazlar arasında özellikle kaspaz 3, 8 ve 9 un apoptoz mekanizmasında görev aldıkları bildirilmiştir ((Martarelli, Pompei, Baldi, & Mazzoni, 2008).

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadırlar ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir (Elmore, 2007). Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini devam ettirmek üzere dinamik bir denge halinde süregelir. Kanseri hücrelerin ise sınırsız ve hızlı replikasyon özelliklerinin yanı sıra apoptozdan kurtulabilme yeteneği kazanmış hücreler olmaları sebebiyle apoptoz indüksiyonu yapabilmek kanserli hücre sayısını azaltmak veya bütünüyle ortadan kaldırmak için önemli bir tedavi yaklaşımı olarak görülmektedir (Kumar, 2013).

2.2.2. Apoptoz Sürecinde Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9

Kaspazlar, (caspases=cysteine aspartate-specific proteases) sistein aspartat spesifik proteazlardır (Slee et al., 1999). Kaspazlar interleukin-1 β -converting enzim ailesinden proteazlardır ve *Caenorhabditis elegans*'ın hücre ölüm geninin (CED-3) çok yakın homologudurlar. Birden ondörde kadar farklı kaspaz tanımlanmıştır (Fan, Han, Cong, & Liang, 2005)). Kaspazlar hücre boyutunda meydana getirdikleri etkileri bakımından 3 grup altında sınıflandırılmaktadırlar (Walsh et al., 2008).

- I- Başlatıcı kaspazlar (initiator caspases); Kaspaz 2, 8, 9, 10
- II- Efektör kaspazlar (effector caspases); Kaspaz 3, 6, 7
- III- İnflamatuar kaspazlar; Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14

Apoptoz başlatıcı kaspazların apoptoz sürecini;

I- İntrinsik (Mitokondriyal) yolak

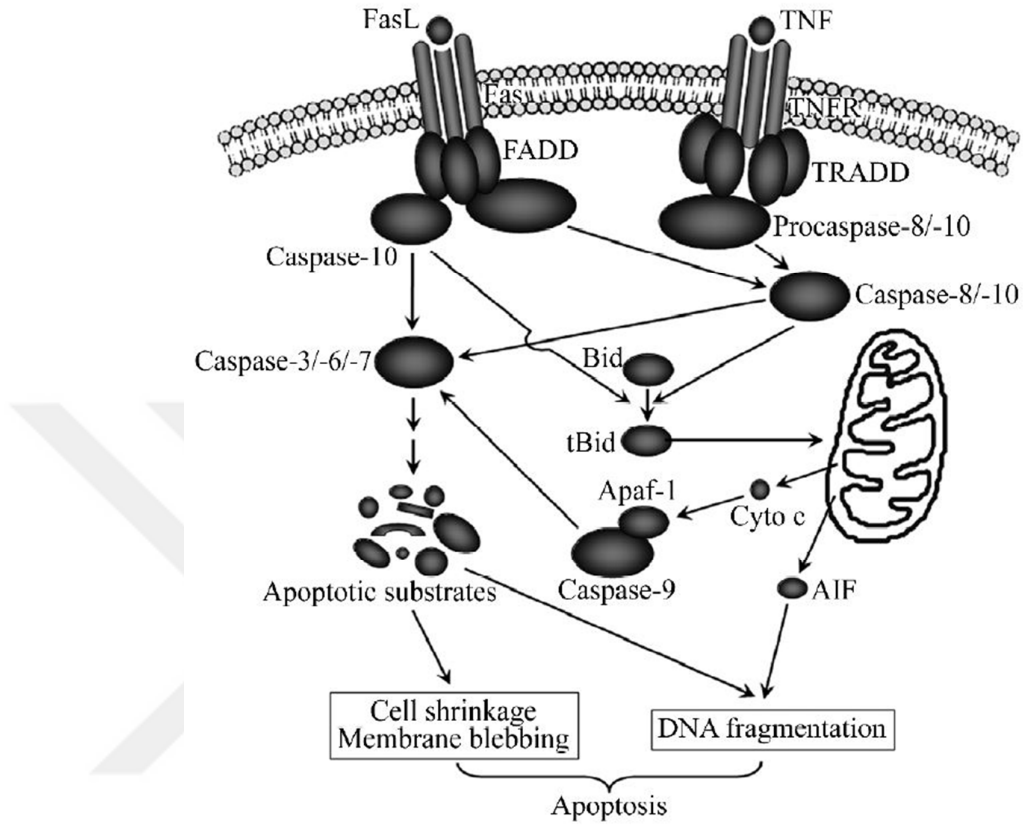
II- Ekstrinsik yolak

şeklinde olmak üzere iki farklı yolakla başlattıkları bilinmektedir (Fan et al., 2005).

Apoptoz sürecini başlatan hücre içi sinyaller; DNA hasarları, pH değişimleri, hücre içi Ca^{++} düzeyinin fizyolojik olmayan artışı, metabolik bozukluklar, hücre siklusundaki bozukluklar ve hipoksidir. Apoptoz sürecinde hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği ve yokluğu, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand bağlantılı apoptoz, TNF vasıtasıyla apoptoz), sitotoksik T lenfositleri ve dış etkenler (hücre iskemisi, toksinler, radyasyon ve kemoterapötik ilaçlar)'dır ((Danial & Korsmeyer, 2004). Her iki sinyal yolunda da kaspazların önemli etkileri bulunmaktadır. Hücre içi sinyaller intrinsik apoptoz sürecini başlatırken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yolak ile apoptoz sürecini başlatırlar (Jin et al., 2009).

2.2.2.1. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı ve Kaspaz-8

Temelde TNF ailesinden olan ve sitoplazma yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) ulaşmasıyla bu reseptörler etkinlik kazanırlar (Kuwana et al., 1998; Riedl et al., 2001; Stennicke et al., 1998). Bu şekilde etkinleşen ölüm reseptörü; adaptör moleküller ve prokaspaz-8 ile birleşince DISC (Death inducing singnaling complex) adı verilen yapıyı oluşturmaktadır. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in inaktif kısımları ayrılarak aktif kaspaz-8'in (cleaved capsase 8) oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan veya dolaylı olarak kaspaz-3'ün aktive edilmesine sebep olur. Bu durum ya direkt olarak kapsaz-8 in katalizleyerek kaspaz-3'ü aktive etmesi ya da Bid'i inhibe ederek dolaylı olarak instrinsik mekanizmada kaspaz-9'un aktive olması şeklindedir (Li, Zhu, Xu, & Yuan, 1998). Aktif kaspaz-9 da efektör kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive eder ve aktifleşmiş kaspaz-3 CAD (Caspase Acitvated Dnase) aktivasyonu ile DNA'nın fragmentasyonuna sebep olur (Şekil 2.2.) (Fan et al., 2005).



Şekil 2.2. Kaspaz8/Kaspaz10 la ilgili prokaspaz aktivasyonu süreci. (Fan et al., 2005).

2.2.2.2. İntrinsik Apoptoz Yolağı ve Kaspaz-9

DNA hasarları, pH değişimleri, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, metabolik bozukluklar, hücre siklusundaki bozukluklar ve hipoksi gibi apoptozu uyaran hücre içi sinyallerin alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid; Bcl ailesinden bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive ederken aynı aileden apoptotik Bax ve Bak faktörlerini aktifleştirir (Arnoult et al., 2003). Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında porların oluşumunu indükleyerek, mitokondri zarının zar potansiyelini değiştirirler. Mitokondri zar potansiyelinin değişmesi neticesinde, mitokondri membranındaki porlardan sitokrom-c, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca^{++} ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) faktörlerinin mitokondri dışına salınması gerçekleşir. Mitokondri dışına salınan bu faktörlerden, Sitokrom-c; oksidatif fosforilasyon basamakları için elektron taşıyıcı. Smac; IAP (İnhibitör apoptotik protein)'i baskılayarak apoptozu inhibe eden bu faktörü etkisizleştirerek

dolaylı olarak apoptoz sürecini indükler. Çünkü IAF apoptozun efektör kaspazı olan kaspaz-3 ve ekstrinsik başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9' un aktivasyonunu engeller (Shi, 2002). AIF; çekirdeğe transloke olur ve hücre çekirdeğini parçalar. Endo-G; nükleus içeriğinde bulunan DNA'yı oligonükleotidler halinde keserek parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c; Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde pro-kaspaz 9'u bağlayıp aktive ederek apoptozom denen bir kompleks oluşturur (Adrain & Martin, 2001; Allan & Clarke, 2007; Fan et al., 2005). Apoptozom inaktif halde bulunan prokaspaz-9'un inaktif kısımlarını etkisizleştirerek cleaved kaspaz-9'u oluşturur. Aktif kaspaz-9'un varlığında prokaspaz-3 katalizlenerek aktif kaspaz-3 haline dönüşür (Allan & Clarke, 2007). Aktifleşen kaspaz-3 ise apoptozun efektif fazını gerçekleştirir.

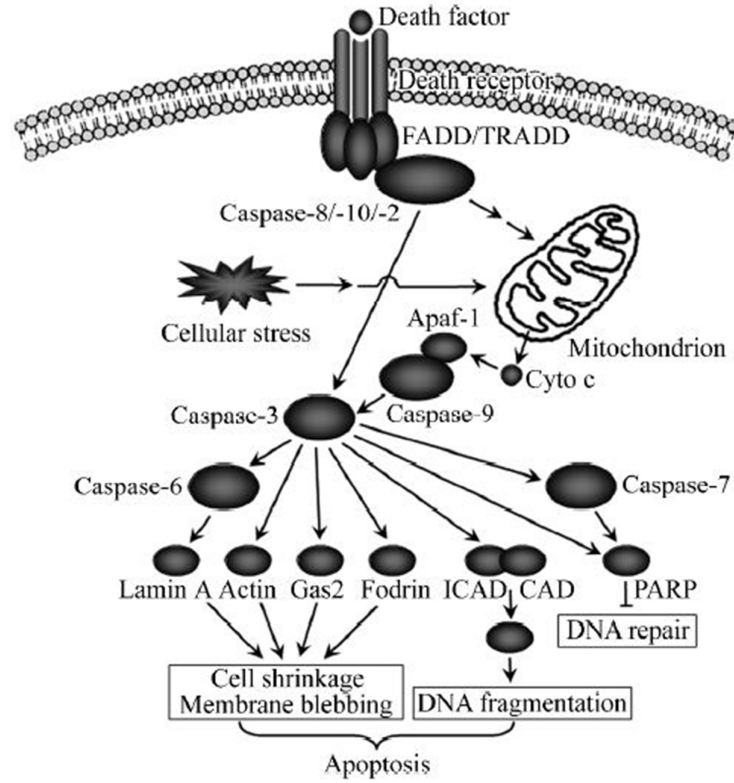
2.2.2.3. Efektör Kaspaz, Kaspaz-3

1993 yılında *Coenorhabditis elegans* adlı nematodun apoptotik genlerinin apoptoz sürecindeki rolü Yuan ve ark. (1998) tarafından araştırılmış ve ortaya CED1, CED2, CED3 ve CED4 olmak üzere 4 farklı apoptotik gen tanımlanmıştır (Alnemri et al., 1996). İlerleyen süreçte *Coenorhabditis elegans* CED3 geninin metazoon hücrelerinde karşılığının bugün kaspaz-3 olarak bilinen efektör apoptotik kaspaz olduğu anlaşılmıştır (Namura et al., 1998).

İster ekstrinsik yolak ile isterse de intrinsik yolak ile birbirini tetikleyen süreçlerle iletilen apoptoz sinyalleri sonucunda apoptozun efektif fazı, efektör kaspazlar olarak da tanımlanan kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) tarafından gerçekleştirilirler (Putt et al., 2006; Riedl et al., 2001; Walsh et al., 2008). Apoptozun efektif fazında her ne kadar kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin etkinliği söz konusu olsa da anahtar rolü üstlenen kaspaz, kaspaz-3 dür (Hirata et al., 1998).

Fizyolojik koşullarda sitozolik fraksiyonda kaspaz-3, inaktif prokaspaz-3 halinde bulunmaktadır. Hücre apoptoz başlatıcı sinyaller altında iken bu sinyaller proaktif kaspaz-3'ü proteolitik etkileri neticesinde aktif kaspaz-3'e dönüştürürler ((X. Liu, Zou, Slaughter, & Wang, 1997). Aktif kaspaz-3 ise ICAD (İnaktifi, kaspazla Aktive edilen DNaz inhibitörü)'ı inhibe ederek CAD (Kaspazla aktive edilen DNaz)'ın etkinleşmesine yol açar (Wyllie, 1980). CAD ise apoptoz sürecine spesifik olarak, çekirdekte kromatinin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler şeklinde 180-200 baz

çiftleri ve katları halinde oligonükleotidlerine parçalanmasına yol açarak, süreç hücrenin ölümü ile sonlanır (Şekil 2.3.) ((Balakumaran, Campbell, & Moslen, 1996; Nagata, Nagase, Kawane, Mukae, & Fukuyama, 2003).



Şekil 2.3. Kaspaz-3 aktivasyonu süreci. (Fan et al., 2005).

2.2.3. Apoptotik DNA Laddern Patherni

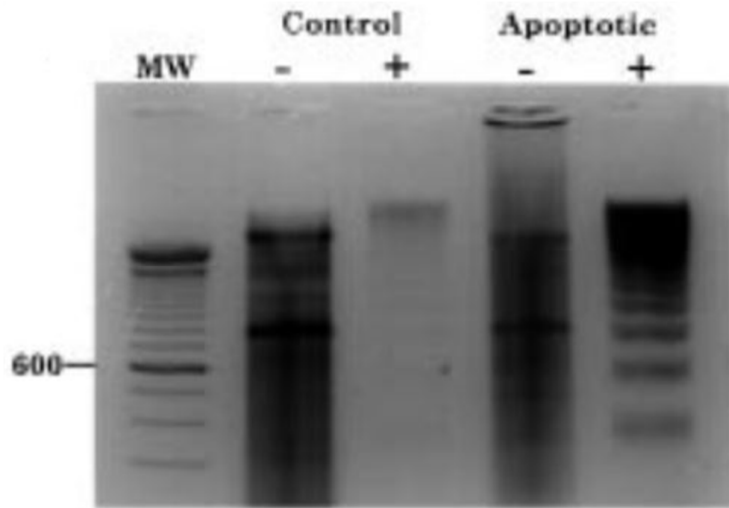
Apoptoz süreci hücre ve nükleer içeriğin büzüşüp çekilmesi, kromatinin yoğunlaşması, apoptotik cisimlerin oluşması ve hücrenin fagosite edilmesi gibi morfolojik değişikliklerle karakterize bir süreçtir (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972).

Apoptotik indeks, apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı ile belirlenmektedir. Bunun için öncelikle apoptozun hücresel boyutta görülebilir ve gözlemlenebilir hale getirilerek belirlenmesi gereklidir. Bu amaçla çeşitli morfolojik ve biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir (Güleş & Ülker, 2008).

Apoptoz sürecine giren hücreler, nekrotik hücrelerden farklı olarak ölmektedirler. Bu sebeple apoptoz ile nekroz arasındaki farklar hücresel düzeyde uzun yıllar boyunca araştırılarak farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalar neticesinde apoptotik hücrelerdeki Bax/Bcl-2 oranı azalması (Bcl-2'nin artması sebebiyle), cleaved Kaspazların tayin edilmesi gibi hücresel parametreler yanında, apoptotik hücrelerde DNA'nın apoptoza spesifik olarak fragmente olması apoptozun önemli belirteçlerinden biri olarak kullanılmaktadır (Bortner, Oldenburg, & Cidlowski, 1995).

1998 yılında Wyllie tarafından, kaspazlar ile aktive edilen bir DNaz vasıtasıyla apoptoz sürecindeki hücrenin DNA'sının parçalandığı bildirilmiş ve bu enzim caspase-activated DNaz'ın kısaltılmış haliyle CAD olarak tanımlanmıştır (Wyllie, 1980). CAD taşımayan ve taşıyan deney fareleri ile yapılan denemeler neticesinde; apoptotik DNA parçalanmasının CAD ve lizozomal DNaz'larla ilişkili olmak üzere iki farklı şekilde olduğu bildirilmiştir (Nagata et al., 2003).

Apoptotik hücrelerde DNA'nın 180-200 baz çifti ve katları halinde parçalanması ve bu durumun elektroforez gibi laboratuvar tanı metotları vasıtasıyla görünür hale getirilmesi ile elde edilen görünüm (Şekil 2.4.) apoptoza spesifik olarak "laddern patherni" olarak tanımlanmaktadır ((Eastman, 1995; GÜLEŞ & Ülker, 2008; Wyllie, 1980; Zhang & Xu, 2000).



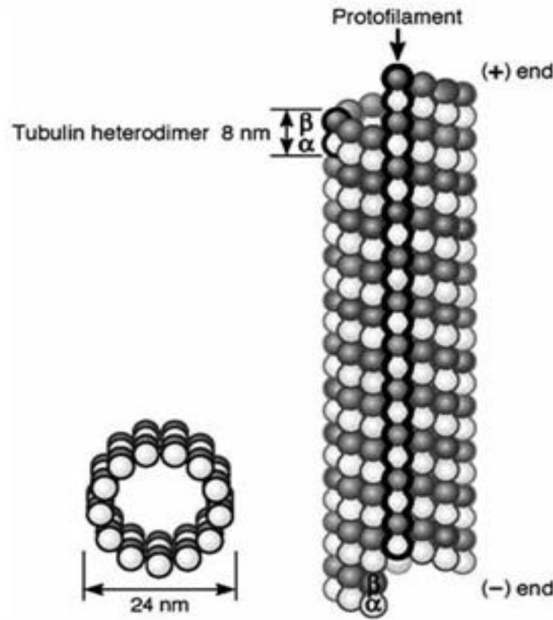
Şekil 2.4. Apoptotik DNA Laddern elektroforez görüntüsü (Ioannou & Chen, 1996).

2.3. Tubulin Proteini ve Tubulin Proteininin Hücre Siklusundaki Önemi

2.3.1. Mikrotubulin Yapısı

Tubulin proteini, sitoskeleton adı verilen hücre iskeletini oluşturan başlıca protein olup, hücre büyümesinde ve hücre bölünmesinde hayati rolleri bulunmaktadır (Soengas & Lowe, 2003; Zhuang et al., 2007). Tubulin proteini heterodimer yapıda olup, toplamda 55 kDa ve yaklaşık 450 amino asitten oluşan, α ve β alt ünitelerinden meydana gelmektedir (Mollinedo & Gajate, 2003; Wade, 2009). Omurgalı canlılarda en azından 6 genin tubulin formasyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir (Mary, 2013).

Tubulin proteininin alt üniteleri olan α ve β üniteleri birbirlerine kovalent bağ ile bağlanarak tubulin dimerlerini ve tubulin dimerlerinin polimerize olmaları ile de tubulin mikrofilamentleri ya da diğer adıyla mikrotubulin proteinleri oluşmaktadır. 13 adet tubulin mikrofilamenti de 3 boyutlu olarak bir araya gelerek çapı 24 nm olan silindirik yapıdaki mikrotubulin proteinini meydana getirmektedir (Mary A Jordan & Kamath, 2007). Tubulin filamentlerinin bu şekilde polimerize olmaları ile serbet ucu β tubulin (+ uç) ve diğer ucu α tubulinden (- uç) oluşan polarize formdaki içi boş mikrotubulin oluşmaktadır. Mikrotubulinlerin + ucuna yeni tubulin heterodimerleri eklenerek 3 boyutlu mikrotubulin yapısı uzatılmaktadır (Şekil 2.5.) (Mollinedo & Gajate, 2003).



Şekil 2.5. Mikrotubulin proteinin α - β tubulin heterodimerlerinden oluşan yapısı.

Mikrotubulin proteini 13 filamentten teşekkül etmekte olup silindirik çapı 24 nm. dir. Mikrotubulin filamentinin β alt ünitesi molekülün + ucunu, α alt ünitesi ise molekülün – ucunu oluşturmaktadır (Mary A Jordan & Kamath, 2007).

Mikrotübüller, her iki uca tubulin dimerlerinin ilave edilmesiyle uzarlar (polimerizasyon) veya tam tersine uçlardan tubulin dimerlerinin ayrılmasıyla kısalırlar (depolymerizasyon). Mikrotubulinler hareket, besin alımı, hücre şeklinin kontrolü, hücreler arası madde alışverişi ve hücrel sinyaller gibi çeşitli hücrel fonksiyonlardan sorumludurlar (Lee, Shiau, & Shyur, 2012; Singla, Garg, & Aggarwal, 2002). Mikrotubulinlerin besin alımı, hücre şeklinin kontrolü, hücrel sinyallerin iletimi gibi görevleri bulunmakla birlikte temel görevleri mitoz sırasında kromozomların ayrılmasını (kromozom segregasyonu) sağlamalarıdır. Mikrotübüllerin birleşmesi ve ayrılması hücrede dinamik bir denge halindedir. Mikrotübüllerde polimerizasyon GTP (Guanozin trifosfat)'ye bağlıdır. GTP bağlı tübülün dimerleri mikrotübülünün artı ucuna eklenirken GTP'nin hidroliz edilmesi ile tubulin moleküllerinin komşu moleküllere olan bağlanma eğilimini zayıflatır ve daha sonra GDP bağlı tubulin ayrılarak hızlı depolarizasyona ve mikrotübülün kısalmasına yol açar (Akhmanova & Steinmetz, 2008).

Mikrotubuller hücre iskeletinin en önemli bileşeni olup, hücre canlılığı için gerekli olan motilite, organellerin fonksiyonlarını sürdürmesi, mitozun interfaz aşamasında mitoz içciklerinin oluşturulması, veziküllerin hareket ettirilmesi, hücre bölünmesi esnasında kromozomun ayrılması gibi hücresel boyutta pek çok hayati fonksiyonları sürdürürler (Mollinedo & Gajate, 2003).

Memelilerde 8 α ve 7 adette β tubulin izotipi vardır (Chao et al., 2012). Çok sayıda kanser türünde anormal β tubulin ekspresyonu olduğu ve bu tür fenotipteki kanserlerin çok agresif ve kanser kemoterapisine dirençli olduğu bilinmektedir ((Katsetos, Herman, & Mörk, 2003; Kavallaris, 2010). β III tubulinin akciğer, prostat, over ve meme kanserlerinde aşırı ekspresyonunun kanserli hücrelerde ilaç direncine yol açtığı bildirilmiştir (English, Roque, & Santin, 2013; Kavallaris, 2010).

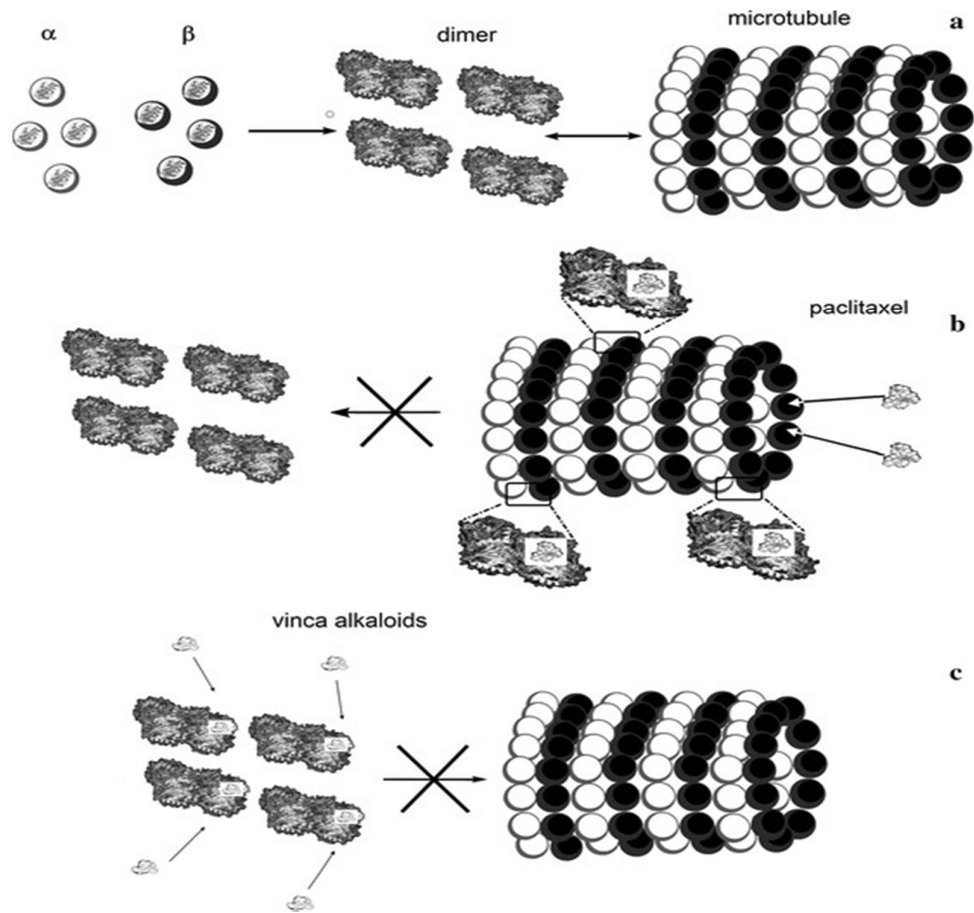
2.3.2. Antineoplastik Ajanlarca Mikrotubulin Yapısının Hedeflenmesi

Mikrotubulinlerin hücre canlılığının korunması, organellerin fonksiyonlarını sürdürmesi gibi hayati özelliklerinin yanı sıra bilhassa hücre siklusunda mitoz evresindeki (Hücre Siklusu M fazı) hücrelerde mitoz içciklerinin oluşmasında rol aldığı fonksiyonları da bulunmaktadır (McNally, 1996; Nogales, 2001). Kanserli hücrelerde mitozu durdurarak kanserli hücrelerin replikasyonunu sonlandırmak ve hücre siklusu bozulan kanserli hücrelerde bu sebeple dolaylı olarak apoptozu indüklemek amacıyla mikrotubulin inhibisyonu yapan pek çok ajan antineoplastik ilaç olarak kullanılmaktadır ((Saunders & Limbird, 1997; Tapas, Ji-ichiro, Ramesh, & Roth, 2002).

Antineoplastik ajanlarla oluşturulan tubulin inhibisyonu; temelde prototipi kolşisin olan vinka alkaloidleri ve taksanlar grubu olarak adlandırılan iki grup antineoplastik ajanın mikrotubulinler üzerinde oluşturdukları birbirinden farklı iki etkiden biri vasıtasıyla meydana getirilmektedir (Mary Ann Jordan, Thrower, & Wilson, 1991; Mary Ann Jordan & Wilson, 1998)).

Aralarında paklitaksel ve dosatakselin yer aldığı taksan gurubu antienoplastik ilaçlar temelde mikrotubulin polimerizasyonunu artırarak mikrotubulin stabilizatörü olarak işlev görmektedirler ((Fossella et al., 1994; Mary Ann Jordan et al., 1996; Kelly et al., 2001). Polimerizasyonun artışı mikrotubulin + ucunun stabilizasyonuna ve bu sebeple de yeni tubulin filamenetlerinin mikrotubulin konformasyonuna katılamamasına yol açmaktadır (Amos & Löwe, 1999; Yvon, Wadsworth, & Jordan, 1999).

Vinka alkaloidleri (Vinkristin, Vinblastin) ve kolşisin ise mikrotubulin destabilizasyonu yapmaktadırlar (Mary Ann Jordan et al., 1991). Kolşisin mikrotubulini oluşturan tubulin filamenetlerinden serbest uç olan β tubulin son ucuna bağlanarak, Vinka alkaloidleri ise mikrotubulin yapısını oluşturan tubulin α ve β heterodimerleri arasında reversibl şekilde bağlanarak mikrotubulin polimerizasyonunu engellemekte ve mikrotubulin depolimerizatörü (destabilizatörü) olarak etkilimtedirler (Şekil 2.6.) ((Henry, Dubois, & Quick, 2011; Mary Ann Jordan et al., 1991).



Şekil 2.6. Mikrotubulin yapısına etki eden antineoplastik ajanlardan paklitaksel ve vinka alkaloidlerinin etki mekanizmalarını gösterir şekil, a: tubulin dimerlerinin bir araya gelmeleri ile mikrotubulin yapısının oluşumu, b: paklitakselin oluşturduğu mikrotubulin stabilizasyonu, c: vinkristinin oluşturduğu mikrotubulin depolimarizasyonu (Miele, Mumot, Zappa, Romano, & Ottaggio, 2012).

Sonuçta her iki etki şekliyle de mikrotubulin yapısında meydana getirilen konformasyonel değişim mikrotubulin fonksiyonlarının bozulmasına ve mikrotubulinler aracılığı ile yürütülen hüresel faaliyetlerin kısıtlanmasına yol açmaktadır. mikrotubulin inhibisyonu yaparak etki eden ilaçların ortamdaki varlığında mikrotubulinlerin mitoz aşamasında mitoz içciklerinin oluşması ve hücre bölünmesindeki fonksiyonları engellenmekte ve mitoz aşamasındaki hücrelerin replikasyon yetenekleri baskılanarak kanserli hücreler ile mücadele edilmeye çalışılmaktadır ((Mary Ann Jordan et al., 1991; Nogales, 2001).

2.4. Benzimidazoller

Benzimidazoller; kimyasal yapılarına eklenen imidazol ve benzen grupları taşıyan, heterosiklik aromatik ve organik yapıda kimyasal bileşiklerdir (Barker et al., 1960). 1961 yılında tiyabendazolün gastrointestinal parazitlere karşı geniş bir etki spektrumuna sahip olduğunun keşfedilmesi ile birlikte kullanımları hızla artmıştır. Takip eden yıllarda ise; tiyabendazole ek olarak parabendazol, kambendazol, mebendazol, oksibendazol ve albendazol gibi diğer benzimidazollerin üretimi ile benzimidazol grubu olarak antihelmintik ilaç olarak kullanımda çeşitlilik kazanılmıştır ((McKellar & Scott, 1990).

Günümüzde benzimidazoller insan ve hayvanlarda helmint ve funguslara karşı kullanılmakla birlikte insanlarda peptik ülser tedavisinde de kullanılmakta olup; insan ve hayvanlarda kullanımı oldukça yaygındır ((Laryea, Gullbo, Isaksson, Larsson, & Nygren, 2010).

2.4.1. Benzimidazollerin Etki Mekanizması

Benzimidazollerin hücresel boyutta mitokondride oksidatif fosforilasyonu bozmak, parazitin enerji rezervlerini tüketmek, parazitik hücrede oksidatif stresi artırmak gibi pek çok etkisi olmakla birlikte en temel etkisi tubulin proteini üzerindeki etkileri ile ilişkilidir (Mary, 2013). Tubulin proteini, hücre iskeletini oluşturan ve hücre içi organelleri bir bütün halinde tutmaya yarayan temel bir proteindir. Yanı sıra tubulin proteininin hücre büyümesinde ve hücre bölünmesinde hücre canlılığı için hayati rolleri bulunmaktadır (Soengas & Lowe, 2003; Zhuang et al., 2007).

Benzimidazol grubunda yer alan ilaçlar antiparaziter etkilerini mikrotubulin inhibisyonu yoluyla gerçekleştirmektedirler. Mikrotubulin proteinini oluşturacak tubüllerin polimerizasyonu ve bu tubüllerin bir araya gelmesi neticesinde mikrotubulin oluşmakta olup, benzimidazoller mikrotubüllerin polimerize olacakları uçlara bağlanarak mikrotubüllerin polimerizasyonunu bozmakta ve sonuç olarak mikrotubulin oluşumunu inhibe etmektedirler (Bai, Staedtke, Aprhys, Gallia, & Riggins, 2011; Doudican et al., 2013; Spagnuolo et al., 2010). Tubulin yapısı bozulduğunda ise parazite ait bölünme aşamasındaki hücrelerin mitoz iplikçikleri kopmakta ve parazit hücre bölünmesini gerçekleştirememektedir (Clément et al., 2008). Bu durum parazit hücrelerinin G2/M fazı arasında kalmasına ve parazit hücrelerinin mitoz girememesine sebep olarak bu aşamada kalan hücrelerin apoptoz yoluyla ölümüyle sonuçlanmaktadır (Mary, 2013).

2.4.2. Benzimidazollerin Farmakokinetiği

Benzimidazoller arasında yer alan ve kullanımı oldukça yaygın olan mebendazol ve albendazolün ilk geçiş etkisine maruz kaldığı bilinmektedir (Coyne, Jones, & Bear, 2018; Dayan, 2003; Sanchez, Sallovitz, Savio, Mckellar, & Lanusse, 2000). Bu sebeple benzimidazoller biyoyararlanımı düşük ilaçlardır. Diğer yandan benzimidazollerin yağlı diyetler ile birlikte kullandıklarında oral emilimlerinin arttığı bildirilmiştir (Wei, Chun, & Fengquan, 2002). Mebendazolün sebze yağları ile formüle edilmesi kristal yapısının değiştirilmesi ve PEGilasyonu ile düşük olan biyoyararlanımının artırılabilirliği bildirilmiştir (Chiba, Kohri, Iseki, & Miyazaki, 1991; Garcia-Rodriguez et al., 2011).

H₂ reseptör antagonisti olan simetidin ile albendazol ve mebendazol birlikte kullanılabilirler. Simetidin ile mebendazolün kombine kullanımlarında mebendazolün plazma konsantrasyonunun yükseldiği bilinmektedir (Pirotte & Bethki, 1987). Ayrıca Deva ve Jameson (2012) tarafından simetidin'in antikanser etkileri olabileceğini de bildirilmiştir (Deva & Jameson, 2012).

2.4.3. Benzimidazollerin Toksisitesi

Benzimidazollerin hayvanlarda ve insanlarda kullanım güvenliği ve toksisitesi hakkında geçmişten günümüze çalışılmıştır. Uzun yıllardır yapılan toksite ve sağaltım güvenliği

çalışmaları sonucunda benzimidazollerin grup olarak, iyi tolere edilebilir ve minimal toksisiteye sahip ilaçlar olduğu kanaatine varılmıştır (Campbell, 1990).

Albendazolün toksik dozlarında köpek, kedi ve insanlarda kemik iliği toksisitesi ve buna bağlı olarak gelişen lökopeni ve anemiye yol açtığı bilinmektedir. Albendazol kullanılarak 6 aylık süre ile ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada günlük 30 mg/kg konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyondaki kullanımında, vücut ağırlığında azalma, karaciğer büyümesi ve kemik iliği hipoplazisi bildirilmiştir (Dayan, 2003).

Fenbendazolün ise günlük 250 mg/kg konsantrasyonda 30 günlük kullanımında veya 90 gün boyunca 125 mg/kg konsantrasyonda herhangi bir yan etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Gary, Kerl, Wiedmeyer, Turnquist, & Cohn, 2004)). Ratlarda fenbendazolün oral LD50 dozunun 500 mg/kg' dan yüksek olduğu bilinmektedir (Düwel, 1977).

Mebendazolün köpeklerde iki yıl boyunca günlük 40 mg/kg konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonlarda kullanımında bile herhangi bir toksisiteye sebep olmadığı bilinmektedir (Van den Bossche, Rochette, & Hörig, 1982). Benzimidazollerin içerisinde mebendazol, insanlarda uzun süreli kist hidatik tedavisinde kullanılan başlıca antihelmintik olarak yer almaktadır (Ammann, Hoffmann, Grimm, & Johannes, 1998). İnsanlarda ekinokokkosisin uzun süreli tedavisinde genel olarak hastaların mebendazolü iyi tolere ettikleri; 17 hasta üzerinde 24 ay süresince yapılan bir çalışmada sadece 3 hastada reverzibl alopesi, dikkat dağınıklığı ve fiziksel güç düşüklüğü gibi yan etkilerin çıktığı, diğer hastaların ise tedaviye devam ettikleri bulguları ile ortaya konulmuştur (Reute, Jensen, Buttenschoen, Kratzer, & Kern, 2000).

2.4.4.Benzimidazollerin Anti-Kanser Etkileri

Benzimidazollerin anti-kanser etkileri ilk kez 1957 yılında Hirschberg ve ark. (1957) tarafından bir benzimidazol türevi olan amino-metil benzimidazol molekülüne 2 farklı kloroetil bileşeni eklendiğinde farelerde meme adenokarsinomu ve sarkomunun inhibe edildiğinin gösterilmesi ile ortaya çıkarılmıştır ((Hirschberg, Gellhorn, & Gump, 1957). 1980'li yıllarda ise farklı benzimidazol türleri alkilleyici ajanlar ile kombine edilerek yeni elde edilen alkillenmiş benzimidazol türlerinin anti-kanser etkileri olup olmadığı denenmiş ve alkillenmiş benzotiazolün lenfositik lösemide etkinliği olduğu bildirilmiştir (Habib & Aboulwafa, 1982; Ibrahim, Omar, & Khalil, 1980).

Uzun yıllar boyunca ve çok sayıda araştırmacı tarafından çeşitli benzimidazol türlerinin anti-kanser etkinliklerinin hücresel düzeyde mekanizması/mechanizmaları tam anlamı ile izah edilemese bile bu çalışmalar sonucunda benzimidazollerin anti-kanser etkilerinin canlı türü ve kanser çeşidi ile değil kullanılan benzimidazol bileşiğinin dozuna ve uygulama süresine bağlı olduğu anlaşılmıştır (Mary, 2013). Ancak 1980’li yılların başlarında Holden ve ark. (1980) insan lenfosit hücre kültürleri üzerinde mebendazol, parabendazol, kambendazol ve fenbendazolün mitozu durdurarak hücre büyümesini inhibe ettiğini, tiyabendazol ve oksfendazolün ise böyle bir etkisinin olmadığını ortaya çıkarmaları ile birlikte benzimidazollerin hücresel boyuttaki etki mekanizmasına açıklık getirilebilmiştir (Holden, Crider, & Wahrenburg, 1980). Ayrıca fenbendazolün anti-kanser etkilerinin olabileceği daha önceden rutin olarak fenbendazol verilen ratların kazara karıştırılarak insan lenfoma hücre zenograftlarının bu ratlara verilmesi ve sonuçta bu ratlarda deneysel insan lenfoma kanserinin başlatılamaması ile anlaşılmıştır (Gao, Dang, & Watson, 2008).

2.5. Mebendazol

2.5.1. Mebendazolün Kimyasal Yapısı

Mebendazol, sentetik benzimidazol türevlerinden antihelmintik bir ilaçtır. Kimyasal formülü $C_{16}H_{13}N_3O_3$ olup, moleküler ağırlığı 295,29 g/mol’dür. Tatsız ve hafif sarı renkli toz halinde bulunur. Mebendazol: su, eter, kloroform gibi çözücülerde iyi çözünmez. 25 °C Sıcaklıktaki suda çözünme oranı 71,3 mg/L dir. Formik asitte çözünürlüğü yeterlidir. Kaynama derecesi 288,5 °C dır (U.S. National Library of Medicine, 2020).

2.5.2. Mebendazolün Etki Mekanizması

Mebendazol, mikrotubullerin polimerizasyonunu inhibe ederek mikrotubulin proteinine etki eder (National Center for Biotechnology Information, 2020; Laclette et al., 1980). Bu etki, sitoplazmik mikrotubulin düzeyinde düşüşle neticelenir. Mebendazol helmintlerin tubulin proteinleri ile seçici ve irreversibl şekilde etkileşime girerek helmintin mikrotubulin proteini yapısını bozar (National Center for Biotechnology Information, 2020; Morgan et al., 1993). Sitoplazmik mikrotubulin miktarı ve

formasyonu değişen helmintlerin glukoz alımı bloke olur. Glukoz alımı bloke olan helmintin glukoz depoları tükendiğinde ATP üretimi duran helmint artık canlılığını sürdüremez ve süreç helmintin ölümü ile son bulur (Drugbank, 2020).

Mebendazolün mikrotubulin proteini üzerindeki dejeneratif etkilerini, tubulin proteini üzerinde yer alan ve kolşisine özel bağlanma noktasına bağlanması ile oluşturduğu ve mikrotubullerin polimerizasyonunu böylelikle inhibe ettiği bildirilmektedir (Katiyar et al., 1994).

2.5.3. Mebendazolün Farmakokinetiği

Mebendazol gastroisntestinal yoldan zayıf şekilde absorbe edilir. Mebendazolün mide bağırsak kanalından emilim yüzdesi %5-10 arasındadır. Yağlı gıdalar ile alınması durumunda emiliminin arttığı bildirilmiştir (National Center for Biotechnology Information, 2020; Dawson & Wattson, 1985).

Mebendazol emilim sonrasında 2 ile 5 saat arasında serum pik konsantrasyonuna ulaşır (National Center for Biotechnology Information, 2020). Mebendazol plazma proteinlerine sıkı bir şekilde (%90-95) bağlanır (Drugbank, 2020). Mebendazolün süte geçip geçmediği hakkında ise yeterli bilgi bulunmamakla birlikte emziren kadınlarda kullanımında herhangi bir yan etki gözlenmemiştir (Karra et al., 2016).

Mebendazolün metabolizasyonu öncelikle karaciğerde gerçekleştirilmektedir. Mebendazolün karaciğerde geçirdiği metabolizasyonu konjugasyon ile gerçekleşmektedir. Mebendazol metabolizasyonu sonucunda etkinliğini kaybeder ve inaktif metabolitlerine dönüşür. Mebendazol metabolizasyonu sonucunda mebendazolün birincil metaboliti olarak, 2-amino-5-benzoilbenzimidazol aktif metaboliti meydana gelmektedir. Yanı sıra oluşan hidroksi ve hidroksiamino metabolitleri ise inaktiftirler (National Center for Biotechnology Information, 2020).

Mebendazolün karaciğer enzimleri ile metabolizasyonu normal karaciğer fonksiyonu olan kişilerde 2,5-5 saat arasında sürmektedir (Drugbank, 2020). Karaciğer fonksiyonları gerilemiş kişilerde ise bu sürenin 35 saate kadar yükseldiği bildirilmektedir (National Center for Biotechnology Information, 2020).

İnsanlarda mebendazolün %2-5'i idrar ile atılır. Alınan mebendazolün %95'i mebendazol veya metaboliti olan 2-amino türevi halinde gaita ile atılır (Dawson, Allan, & Watson, 1982).

2.5.4. Mebendazolün Toksisitesi

Mebendazolün terapötik dozlarında kullanılması halinde serum enzimlerinde yükselme gibi toksikolojik belirtiler gözlenmemiştir (Dayan, 2003). Ancak yüksek konsantrasyonlardaki mebendazol kullanımlarında; özellikle serum aminotransferaz enzim düzeyinin normalden 2 veya 10 katı kadar yükseldiği tespit edilmiştir (Rodriguez-Caabeiro et al., 1987). Mebendazolün yüksek konsantrasyonda kullanılması ve aminotransferaz enzim düzeyini fazlaca artırmaya karşılık bu durum hastalar tarafından iyi tolere edilebilmiş ve bu konuda ciddi toksikasyon belirtileri bugüne kadar bildirilmemiştir (Messaritakis et al., 1991). Mebendazol kullanımı sonrasında akut karaciğer hasarı ender olarak görülmekle birlikte bu durumun ancak çok yüksek konsantrasyonda mebendazolün kısa süreler içerisinde uygulanması sonucunda çıktığı bildirilmiştir. Mebendazole aşırı duyarlılığı bulunan hastalarda mebendazol kullanımına bağlı olarak döküntü, kaşıntı, ateş ve eozinofili ortaya çıkabilmektedir. Mebendazole bağlı toksik ve yan etkiler mebendazol kullanımının kesilmesi ile birlikte hızlıca ortadan kalkmaktadırlar (Braithwaite, Roberts, Allan, & Watson, 1982; LiwerTox., 2020).

Mebendazol son derece emniyetli bir ilaç olmakla birlikte başka ilaçlar ile kombine kullanımlarında dikkatli olunması gerekmektedir. Özellikle histamin reseptör blokörlerinden simetidin ile mebendazolün birlikte kullanımları durumunda mebendazol dozu iyi ayarlanmalıdır. Çünkü simetidin mebendazolün plazma konsantrasyonunu yükseltmektedir (Bekthi & Pirotte, 1987).

Mebendazolün farelerde akut oral toksik dozu (LD₅₀): 620 mg/kg olarak ölçülmüştür. Mebendazolün toksik dozlarında klinik belirtiler; serum karaciğer enzimlerinde yükselme, baş ağrısı, tüy ve saç kaybı, beyaz kan hücrelerinin sayısında düşme (nötropeni), ateş ve kaşıntı olarak izlenmektedir (Drugbank, 2020).

Mebendazolün teratojenik etkileri canlı türüne göre değişmektedir. Ratlar üzerinde tedavi dozunun bile altında olan 10 mg/kg konsantrasyonda dahi teratojenik ve embriyotoksik etkiler gözlenmiştir. Buna karşılık farelerde ise; mebendazolün 40 mg/kg doz ile 60 gün boyunca erkeklerde ve 14 gün süreyle gebe dişi farelerde uygulanması

durumunda dahi farelerde herhangi bir yan etki, embriyotoksik veya teratojenik etki gözlenmemiştir (National Center for Biotechnology Information, 2020; The European Agency for the Evaluation of Medicinal Product, 2001). Mebendazolün gebe inek ve koyunlarda kullanımı önerilmemekle birlikte herhangi bir kısıtlama bulunmamaktadır (Dayan, 2003). Ayrıca WHO tarafından gebe kadınlarda kullanılması sakıncalı olarak raporlanmıştır (Dayan, 2003; World Health Organisation, 1995).

2.6. Antineoplastik İlaçlar

Antineoplastik ilaçlar kullanıldıkları kanser türünden veya üyesi oldukları kemoterapötik gruptan bağımsız olarak temelde, hücre siklusuna olan etkileri bakımından majör bir sınıflandırmaya tabi tutulurlar (Tablo 2.1.). Bu sınıflandırmaya göre antineoplastik ilaçlar;

- a- Hücre Siklusuna Spesifik Antineoplastik ilaçlar (CCS, Cell Cyclus Spesific)
- b- Hücre Siklusuna Spesifik Olmayan Antineoplastik ilaçlar (CCNS, Cell Cyclus Non Spesific) olmak üzere ayrılırlar.

Hücre siklusuna spesifik antineoplastik ilaçlar etki mekanizmaları bakımından hücre siklusunda belirli safhalarda etkindirler. Hücre siklusunda etkin oldukları basamak ise kendi fizikokimyasal özellikleri ve etki mekanizmasına bağlıdır.

Hücre siklusuna spesifik olmayan antineoplastik ilaçlar ise etki edecekleri hücrenin hücre siklusunun hangi evresinde olduğu fark etmeksizin hücre siklusunun her evresinde neoplastik hücrelere etki edebilmektedirler (Edward Chu, 2012).

Tablo 2.1. Antineoplastik ilaçların hücre siklusuna göre olan etkinlikleri bakımından sınıflandırılmaları (Edward Chu, 2012).

Antineoplastik Ajanların Hücre Siklusu Esaslı Majör Sınıflandırması	
Hücre Siklusuna Spesifik İlaçlar CCS	Hücre Siklusuna Spesifik Olmayan İlaçlar CCNS
Antimetabolitler 5-fluorourasil, Kapesitabin, Gemsitabin, Metotreksat, Kladribin, Klofarabin, Sitarabin, Fludarabin, 6-merkaptopurin, Nelarabin, Plaratreksat, 6-tioguanin	Alkilleyici Ajanlar Siklofosfamid, Dakarbazin, Temozolamid, Karmustin, Altretamin, Bendamustin, Busulfan, Klorambusil, Lomustin, Meklorektamin, Melfalan, Tiotepa
Epipodofilotoksin (Topoizomera II inhibitörü) Etoposid (G ₁ -S fazı geçişinde etkili)	Antitümör Antibiyotikler Daktinomisin, Mitomisin
Taksanlar Paklitaksel, Kabazitaksel, Albumin-bağı Paklitaksel (M fazında etkili)	Kamptotesinler (Topoizomera I inhibitörleri) İrinotekan, Topotekan
Vinka Alkaloidleri Vinblastin, Vinkristin, Vinorelbin (M fazında etkili)	Platin Analogları Karboplatin, Sisplatin, Oksplatin
Antimikrotübül İnhibitörü İksabepilon (M fazında etkili)	Antrasiklinler Daunorubisin, Doksorubisin, Epirubisin, İdarubisin, Mitoksantron
Antitümör Antibiyotikler Bleomisin (G ₂ -M fazı geçişinde etkili)	

2.6.1. Paklitaksel

2.6.1.1. Paklitakselin Kimyasal Yapısı

1960 yılından 1981 yılına kadar Amerika Birleşik Devletleri'nde Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI, National Cancer Institute) ve Amerikan Tarım Bakanlığının (USDA, United States Department of Agriculture) ortaklığında bir araştırma projesi yürütülmüştür. Bu proje dahilinde antikanser etkinliklerini test etmek için 15.000 bitki türünden elde edilen 115.000 bitki ekstraktı antikanser özellikleri bakımından incelenmişlerdir. 1962 yılında USDA çalışanlarından botanikçi Arthur Barclay tarafından pasifik porsuk ağacından (*Taxus brevifolia*) alınan örnekler çalışmaya katılmıştır (Weaver, 2014).

Paklitaksel pasifik porsuk ağacından (*Taxus brevifolia*) ve Avrupa Porsuk ağacından (*Taxus baccata*) 1971 yılında elde edilen bir ester alkaloiddir (Edward Chu, 2012). Paklitaksel suda çözünürlüğü iyi olan bir ajandır (Mastropaolo, Camerman, Luo, Brayer, & Camerman, 1995). Kimyasal formülü $C_{47}H_{51}NO_{14}$ olup kaynama derecesi $216-217^{\circ}C$ dir (Drugbank, 2020). Paklitaksel, beyaz renkli, kristal toz şeklinde, oldukça lipofilik yapıdadır ve moleküler ağırlığı 853,9 dalton'dur (Panchagnula, 1998).

2.6.1.2. Paklitakselin Etki Mekanizması

1979 yılında Schiff ve Horwitz, paklitakselin etki mekanizmasını açıklamışlardır (Schiff & Horwitz, 1980). Paklitakselin mikrotubulin proteinine bağlanması, yeni tedavi uygulamaları için öneminin artmasına neden olmuştur (Lee et al., 2012; Singla et al., 2002). Paklitaksel antineoplastik etkisini mikrotübüllerin toplanmasını arttırmak ve mikrotubulin depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotübül grupları oluşturmak suretiyle göstermektedir (Terwogt, Nuijen, Huinink, & Beijnen, 1997). Paklitakselin mikrotübüller üzerindeki stabilizasyonu hücreler üzerinde iki şekilde etkinlik oluşturur.

1) Hücre Siklusunu Durdurmak: Paklitaksel, mikrotübüller üzerindeki etkisini gösteren vinka alkaloidlerinden farklı olarak tubulin proteinlerine bağlanarak mikrotübül yapılanmasını engellemek yerine mikrotübülleri stabilize ederek mitoz bölünmenin durmasına sebep olmaktadır (Peter B Schiff, Fant, & Horwitz, 1979). Paklitaksel mikrotubulin yapısında yer alan dimerlerden β tubulin alt ünitesinin N-terminal ucunun

31. amino asitine bağlanarak mitozun başlamamasına ve hücrelerin G2/M evresinde kalmasına neden olmaktadır (Chu, Badar, Morris, & Pourgholami, 2009; P Bea Schiff & Horwitz, 1980; Yang & Horwitz, 2017). Hücre siklusu sırasında mitotik faza geçemeyen hücreler bölünememekte ve G2 kontrol noktası tarafından apoptoza yönlendirilmektedir.

2) Apoptoz İndüksiyonu: Paklitakselin apoptoz indükleyici etkisinin temelde antiapoptotik Bcl-2 faktörünün fosforilasyonunu inhibe etmesine bağlı olduğu bildirilmiştir (Srivastava, Mi, Hardwick, & Longo, 1999). Ardından bu konuda farklı hücre hatlarında ve çeşitli *in-vivo* hayvan modelinde çok sayıda araştırma yapılmış ve paklitakselin hücrelerin mitotik evreye geçmelerini engellemesi sonucu hücrelerin bölünemedikleri anlaşılmıştır (Cory & Adams, 2002). Mitotik evrede kalan hücre sayısındaki artış o hücrelerde apoptoza yönlendirici sinyaller oluşmasına neden olmaktadır (Marupudi et al., 2007). Aynı zamanda yapılan çeşitli çalışmalarla paklitakselin Bcl-2 adı verilen ve apoptozu bloke eden proteine bağlanarak onu inhibe ettiğini göstermektedir. Böylece apoptozun sürdürülmesi sağlanmış olmaktadır (Blagosklonny & Fojo, 1999; Horwitz, 1994).

2.6.1.3. Paklitakselin Farmakokinetiği

Paklitaksel yüksek oranda (%88-98) plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Ortalama dağılım yarı-ömrü 0,34 saat; eliminasyon yarı-ömrü 5,8 saattir (Lee et al., 2012). Plazmadan eliminasyonu bifazik olmaktadır. Başlangıçtaki hızlı düşüş merkezi kompartmanlara dağılmasına, sonra gözlenen faz ise periferik kompartmanlara sızıntı yapmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir (Singla et al., 2002). Paklitaksel oral yoldan absorbe olmamaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda paklitakselin nonlineer farmakokinetik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Paklitaksel büyük oranda P-450 aracılı hepatik metabolizmaya uğrar ve %10'undan daha azı değişmeden idrarla atılır (Singla et al., 2002). Paklitaksel'in metabolizasyon sonucu C6 ve C3 pozisyonları hidroksilasyona uğrar ve 6 α -hidroksi-paklitaksel, 3'-p-hidroksi-paklitaksel ve 6 α ,3'- p-hidroksi-paklitaksel olmak üzere üç majör metabolit oluşur (Erdemoğlu & Şener, 2000). Paklitakselin, sıçanlarda 6 saatlik infüzyonunu takiben akciğer, karaciğer ve dalakta yüksek konsantrasyonlarda, beyin ve testislerde ise eseri düzeyde biriktiği bildirilmiştir (Singla et al., 2002).

2.6.1.4. Paklitakselin Toksisitesi

Paklitaksel toksisitesi sıklıkla miyelosüpresyon, hipersensitivite, mukozitis ve periferik sinirlerde nöropati şeklindedir (Cavaletti et al., 1995). Paklitakselin periferik nöronal toksisitesi diğer yan etkilerine oranla öncelikle ve sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Rowinsky, Eisenhauer, Chaudhry, Arbuck, & Donehower, 1993). Paklitaksel neoplastik hücrelerde ve proliferatif hücrelerde mikrotubulin polimerizasyonunu baskılayarak G2-M fazında hücre siklusunun durmasına sebep olmaktadır. Nöron hücrelerinin proliferatif özellikte olmadıkları halde paklitaksel kullanılarak uygulanan tedaviler esnasında periferik nöropati tablosu oluşması bu konuda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda paklitaksel uygulanması sonucunda çıkan periferik nöropatinin; paklitakselin sinir hücrelerinde akson boyunca uyarıların taşınmasında rol oynayan mikrotubulin proteinine de etki etmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Scuteri et al., 2006).

Cavaletti ve ark. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada ise 3 saat boyunca 135 ve 175 mg/m² konsantrasyonda paklitaksel uygulanan hastalarda duysal nöronlarda dejenerasyonlar ortaya çıktığı, ancak motor ve otonomik sinirlerde böyle bir hasarın oluşmadığı bildirilmiştir. Meydana gelen nörofizyolojik hasarın duysal nöronlardaki paklitaksel kaynaklı aksonopati ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Cavaletti et al., 1995). Scuteri ve ark. (2006) tarafından yapılan başka bir çalışmada da paklitaksel kullanımı sonrasında ortaya çıkan periferik nöropati oluşumu hücresel düzeyde irdelenmiş ve nöron hücrelerinde akson boyunca meydana gelen hasarın paklitakselin sitotoksik etkileri sonucu olduğu kanaatine varılmıştır. Bu çalışmada akson hasarına ilişkin apoptotik parametrelere hücresel ve morfolojik düzeyde rastlanılmamış ve akson hasarının nekroz ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Scuteri et al., 2006). Buna karşılık bir başka araştırmada aksonopatinin paklitaksel ile indüklenen apoptoz ile meydana geldiği ancak oluşan apoptotik sinyalin Bcl-2'nin fosforilasyonundan bağımsız olduğu ifade edilmiştir (Figuerola-Masot, Hetman, Higgins, Kokot, & Xia, 2001).

Paklitaksel tedavisi esnasında gözlenen periferik nöropatinin doza bağımlı olup olmadığını belirlemek amaçlı tasarlanan bir çalışmada; üç grup hastaya hafta da bir kez 3 saatlik infüzyon şeklinde 3 hafta boyunca paklitaksel; 135, 175 ve 250-300 mg/m² dozlarında uygulanmıştır. Bu gruplarda periferik nöropati semptomları gruplara göre sırasıyla %83, %86 ve %100 olarak tespit edilmiş ve paklitaksel uygulanan tedavilerde

toksisitesinin doza bağımlı olarak şekillendiği ortaya konulmuştur (Postma, Vermorken, Liefing, Pinedo, & Heimans, 1995).

Paklitaksel ve dosataksel periferik nöropati oluşumu bakımından karşılaştırılmışlardır. Paklitaksel uygulanan kişilerde nöropati insidansı %60 iken bu oran dosataksel kullanılan hastalarda %15 olarak hesaplamıştır (Postma, Vermorken, Liefing, Pinedo, & Heimans, 1995).

Genel adı ile taksan grubu antineoplastikler ile ortaya çıkan nöronal toksisite parestezi, hissizlik ve uyuşukluk, nöropatik ağrı, ellerde eldiven, ayaklarda ise çorap varmışçasına sensorik duyularda azalma gibi klinik bulgularla gözlenmektedir. Tedavinin kesilmesini takiben 3 ay içerisinde nöropatiye ilişkin semptomlar ortadan kalksa dahi nöropati kalıcı olabilmekte veya kaybolması uzun zaman alabilmektedir (Argyriou et al., 2007).

2.6.2. Vinkristin

2.6.2.1. Vinkristinin Kimyasal Yapısı

Cezayir menekşesi (*Vinca rosea*)’dan elde edilen bir alkaloiddir. Yapı olarak vinblastine çok benzer (127). Kimyasal formülü $C_{46}H_{56}N_4O_{10}$, kaynama derecesi $220^{\circ}C$, suda çözünürlüğü 0,03 mg/ml dir (Drugbank, 2020).

2.6.2.2. Vinkristinin Etki Mekanizması

Vinkristin mikrotubulin proteinine bağlanıp mikrotubulin yapısını inhibe ederek etki göstermektedir. Bu inhibisyon hücreler özellikle S fazından M fazına geçerken ve mitoz fazlarından metafaz aşamasında mitotik içciklerin bozulmasına ve hücre siklusunun durmasına sebep olmaktadır (Below & M Das, 2019).

Vinkristinin mikrotubulin yapısını bozması ise mikrotubulleri depolarize etmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Sips, Beijnen, Bult, & Nooijen, 1992). Vinkristinin mikrotubuller üzerindeki etkisi vinkristin dozu ile değişmektedir. Vinkristinin düşük dozlarında vinkristinin mikrotubullerin üzerindeki etkisi ile mitotik içcikler stabilize olarak kromozom segregasyonu engellenir ve sonuçta hücre bölünmesi metafaz aşamasında bloke olur. Yüksek konsantrasyonlarda vinkristin uygulanması halinde ise

mikrotubuller bütünüyle depolarize olur ve mikrotubullerin kopması ile süreç sonlanır (Mohammad et al., 1995; Silverman & Deitcher, 2013).

Vinkristin etkinliği dozla olduğu kadar maruziyet süresi ile de ilişkilidir. Vinkristinin kısa süreli uygulanması durumunda mitoz reversibl şekilde bloke edilmektedir ve ilaç uygulamasının sonlandırılması halinde hücre yeniden normal hücre siklusuna dönebilmektedir. Tam tersine vinkristine yüksek konsantrasyonda uzun süreli maruziyet durumunda ise mitotik blokaj irreveribl şekillenmekte ve süreç sitotoksiste ile son bulmaktadır (Geyp, Ireland, & Pittman, 1996). Vinkristin etki mekanizması ve etkinliği vinkristin uygulandığı anda mitoz aşamasında bulunan hücre yoğunluğuna, uygulanan vinkristinin dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak hücre siklusunun durmasından hücre ölümüne kadar gidebilen bir süreçte değişkenlik göstermektedir (Silverman & Deitcher, 2013)).

Vinkristinin kanserli dokular ve hücreler üzerinde hücre siklusu üzerindeki baskılayıcı etkilerinin yanı sıra kanser gelişimi için önemli bir evre olan anjiyogenez süreci üzerinde de inhibitorik etkileri bulunmaktadır. Avramis ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada vinkristinin hem normal hücrelerde hem de ilaca dirençli insan tümör hücreleri üzerinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF, vascular endothelial Growt Factor) sekresyonunu baskılayarak anjiyogenzi baskıladığı gösterilmiştir (Avramis, Kwock, & Avramis, 2001). Kapiller damarlar üzerinde baskılanan proliferatif etkiler damar endotel yapısını ve damarlanmayı azalttığından dolayı kanserli hücre migrasyonu ve kanserli dokuya vasküler akış azalmakta ve bu etkiler neticesinde sağlıklı hücrelerde ve kanserli hücrelerde migrasyon ve hücre proliferasyonu engellenmektedir (Hayot et al., 2002; Silverman & Deitcher, 2013).

2.6.2.3. Vinkristinin Farmakokinetiği

Vinkristin kan dolaşımı ile hızlıca vücuda dağılır ve dokulara ulaşır ancak kan beyin bariyerini geçmesi ve beyin dokusuna olan penetrasyonu yetersizdir. Vinkristin karaciğer CYP3A4 (Cytochrom P450 3A) enzim sistemi ile metabolize olmaktadır. Serum bilirubin düzeyi 3 mg/dl'den yüksek olan hastalarda vinkrsitin dozunun ayarlanması gerekmektedir. Vinkristinin başlıca atılım yolu gaita vasıtasıyladır (Rahmani & Zhou, 1993).

Vinkristinin oral biyoyararlanımı düşük olduğu için vinkristin sülfat şeklinde intravenöz uygulamaya uygun şekilde formülize edilen şekli kullanılmaktadır. Vinkristin sülfat yakıcı ve intraspinal uygulamalarında ölümcüldür. İntravenöz uygulanmasını takiben, vinkristin hızlıca pek çok vücut kompartmanına dağılır ancak kan beyin bariyerini geçişi oldukça zayıftır. Vinkristinin temelde karaciğer sitokrom enzim sistemi ile metabolizasyonu sebebiyle kişiden kişiye bu enzim sistemlerindeki değişiklikler sebebiyle vinkristin metabolizasyonu da farklılık gösterebilmektedir (Dennison et al., 2006).

Vinkristin uzun yarılanma ömrüne sahip olup, yarılanma ömrü yaklaşık 85 saattir (Mora, Smith, Donohoe, & Hertz, 2016).

2.6.2.4. Vinkristinin Toksisitesi

Başlıcaları kardiyovasküler sistem, santral sinir sistemi, dermatolojik, endokrin sistem, metabolik, gastrointestinal, genitoüriner, hepatik, renal, respiratorik, nöromusküler, otik ve oftalmik olmak üzere, vinkristinin pek çok sistem üzerinde yan etkileri ve toksisitesi bulunmaktadır (Tsubaki et al., 2018). Vinkristinin istenmeyen ve toksik etkileri organ sistemleri üzerinde tablo 2.6.2.4’de gösterilmiştir (Below & Das, 2019).

Tablo 2.6.2.4. Vinkristinin Toksisitesi

Etki edilen sistem	Meydana gelen toksik etkiler
Kardiyovasküler sistemle ilgili:	Ödem, hiper/hipotasniyon, myocardial enfarktüs (Mandel, Lewinskind, & Djaldetti, 1975), iskemik kalp hasarı
Santral Sinir Sistemi ile ilgili:	Koma, motor disfonksiyonlar, paralizis, nevralji, perifirik nöropati, uyuşma karıncalanma, baş dönmesi ve sersemleme, kas gücünde azalma, tendon reflekslerinde gerileme (Mora et al., 2016)
Dermatolojik olarak:	Alopesi, deri kızarıklıkları
Endokrin sistem ve metabolizma ile ilgili:	Hiperürisemi, kilo kaybı, ürik asit nefropatisi

Gastrointestinal sistemle ilgili:	Abdominal kramp, konstipasyon, mide bulantısı, kusma, boğaz ağrısı ve incebağırsak nekrozları
Genitoüriner sistemle ilgili:	İdrar bozuklukları, üriner retensiyon
Hematolojik ve onkolojik:	Anemi, hemolitik üremik sendrom, lökopeni, trombositopeni ve trombotik trombositopenik purpura. Lökopenili veya trombositopenili hastalarda bile vinkristinin miyelosüpresif etkileri nadiren de olsa gözlenir (Mora et al., 2016).
Karaciğerle ilgili:	Hepatik sinüzoidallerin daralması sendromu
Nöromusküler ve kas-iskelet sistemi ile ilgili:	Çene eklemi ağrıları, kas kaybı, kas ağrısı, kulak ağrısı
Oftalmik:	Körlük, nistagmus, optik atrofi

2.7. Hücre Kültürü

2.7.1. Hücre Kültürünün Tarihçesi

1885 yılında embriyolog Roux, tavuk embriyo hücrelerini sıcak tuzlu suda canlı olarak muhafaza edebilmiştir. Bu çalışması ile Roux hücre kültürlerinin öncüsü olarak gösterilmektedir (Priyabrat, Nanda, Nayak, & Mishra, 2014).

Harrison tarafından 1907 yılında hücrelerin canlı vücudu dışında uzun süreler yaşatılabileceğinin gösterilmesiyle birlikte bugün hücre kültürü olarak adlandırdığımız vücut dışında hücre üretme teknikleri başlamıştır. Hücrenin *in-vitro* koşullarda büyütülmesi, *in-vivo* koşullarda homeostaz gereği süregelen pek çok sistemik değişikliklerden bağımsız olarak hücreyi gözlemleme fırsatı vermiştir. Harrison çalışmasında, kurbağayı kullanmış ve doku parçalarının vücut dışında canlılığını sürdürmesini amaçlamıştır (Harrison, Greenman, Mall, & Jackson, 1907). Harrison'dan sonra hücre kültürü çalışmaları başka bilim insanları tarafından da devam ettirilmiştir. Earle ve ark. (1943) hücre kültüründe ürettikleri fare hücrelerinde *in-vitro* malignite

oluşturmayı başarmışlardır (Earle et al., 1943). 1961 yılında Leonard Hayflick kendinden önceki bilim insanlarının tezlerinin aksine, hücrelerin kültür ortamında ölümsüz olmadıklarını ve sınırlı bir ömre sahip olduklarını rapor etmiştir ((Shay & Wright, 2000). Hayflick tarafından ortaya konulan bu durum bugün dahi “Hayflick Limiti” olarak tanımlanmaktadır (Priyabrat et al., 2014; Shay & Wright, 2000). Hücre kültürü çalışmalarının zamanla artışı ile, hücre içerisinde gerçekleşen aktiviteleri, hücrenin bulunduğu ortam, hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bunlara karşı verilen tepkileri hücresel boyutta inceleme ve değerlendirebilme imkânı sağlamıştır (Koçaklı, Akıllıoğlu, & Doğan, 2015).

Günümüzde ise hücre kültürü kullanılarak; efikasite ve toksikoloji çalışmaları, yeni ilaç geliştirme çalışmaları, aşı ve biyofarmasötik madde geliştirme faaliyetleri gibi araştırma alanlarında araştırmalar yapılabilmekte olup tıbbi bilimler açısından hücre kültürünün önemi neredeyse paha biçilemez kıymete gelmiş durumdadır (Yao & Asayama, 2017).

2.7.2. Hücre Kültürü Avantajları ve Dezavantajları

Vücut dışında hücre canlılığının devam ettirilmesinin çeşitli avantajlarının yanı sıra birtakım dezavantajları da bulunmaktadır. Hücre kültürünün en önemli avantajı sıcaklık, osmotik basınç, pH, O₂ ve CO₂ yoğunluğu gibi fizikokimyasal şartların kültür ortamında kontrol altına tutulabilmesi ve buna bağlı olarak fizyolojik koşulların sabitlenebilmesidir (Koçaklı et al., 2015). Hücre kültüründe stabil fizikokimyasal koşulların sağlanabilmesi için hormon, serum ve aminoasit gibi çeşitli maddelerin, hücre tipinin ihtiyacına göre gerekli miktarlarda kültür ortamına verilmesi oldukça önemlidir (Harrison et al., 1907; Oyeleye, Ola, & Omitogun, 2016). Hücre kültürünün bir diğer avantajı ise, özel bir hücre tipi üzerinde çalışma yapmaya imkan vermesidir. Dokudan elde edilen hücrelerden, zaman içerisinde tekrarlanan pasajlama işlemleri ile çalışılmak istenilen hedef hücre saf bir şekilde hücre kültürü yardımıyla izole edilebilmektedir. Hedeflenen hücre üretildikten sonra, hücreler ileride yeni araştırmalar için ve tekrarlı deneylerde kullanılmak için uygun şartlar altında uzun yıllar saklanabilmektedirler (Koçaklı et al., 2015).

Hücre kültürünün avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da mevcuttur. Hücre kültürü çalışmalarının öncelikli dezavantajı kültür ortamının üretilmesi için çalışılan hücre dışında birtakım ajanlarca kontamine olmasıdır. Kültür ortamında bakteriler,

virüsler, mikoplazma ve endotoksinlerin bulunması, hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını yavaşlatmakta ve hatta durdurmaktadır (Yao & Asayama, 2017). Bu problemi en aza indirmek için çalışmaların, uygun steril koşullar altında gerçekleştirilmesiyle birlikte kemoterapötik ilaçların kültür ortamına eklenmesi gibi ilave tedbirler almakta gerekmektedir (Priyabrat et al., 2014). Hücre kültürünün bir diğer dezavantajı ise, hücrelerin uzun süre pasajlanması sonucunda, hücrelerin diferansiye olmaları ve heterojenite oranlarının artmasıdır (Freshney, 2006). Bu sebeple, çalışmalar sırasında ilk birkaç kuşak hücrelerin kullanılması oldukça önemlidir (Koçaklı et al., 2015).

2.7.3. Hücre Kültürü Besiyerleri

Hücrelerin *in-vitro* koşullar altında canlılıklarını ve hücresel faaliyetlerini sürdürebilmeleri için *in-vivo* ortamlarındaki fizyolojik gereksinimlerinin *in-vitro* ortamda simüle edilmeleri gerekmektedir. Bu sebeple hücre kültürlerinde hücrenin gereksinimlerine uygun olarak besi yerleri kullanılmaktadır. Hücre kültürü besiyerleri, hücrelerin normal metabolik aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gerekli olan ortam koşullarını sağlamak üzere hazırlanmış besleyici solüsyonlar olarak tanımlanabilirler (Butler & Christie, 1994).

Hücre kültürü çalışmalarının başladığı ilk yıllarda besi yeri olarak, plazma, serum, lenf sıvısı, amniyotik sıvı gibi biyolojik sıvılar ve embriyonik tavuk, karaciğer, dalak, kemik iliği gibi dokuların ekstraktları kullanılmıştır. Günümüzde ise sentetik besi yerleri sıklıkla kullanılmaktadır (Nema & Khare, 2012).

Besiyerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlar hücrenin gelişimi için, bazı iyonlar da hücrelerin çoğalabilmesi için uygun osmolarite ve pH'nın sağlanmasında rol oynarlar (Chandrashekara, 2015). Besiyeri seçimi sırasında üretilcek hücrenin türü, kültür metodu, hücreye spesifik büyüme faktörleri gibi parametreler dikkate alınmalıdır. Bu sebeple tek bir hücre serisinin gelişmesine yönelik olarak hücre kültürü yapılacaksa üretilcek hücrenin gereksinimlerini karşılayan besiyeri seçilmelidir (Butler & Christie, 1994).

Harry Eagle 1955'de hücre kültür ortamı olarak bir besi yeri geliştirmiştir. Bu besi yeri Eagle'ın Temel Besiyeri (Eagle's Minimal Essential Medium, E-MEM) olarak tanımlanmıştır. E-MEM sığır, insan veya embriyo ekstraktları kullanılarak hazırlanan ve

ticari olarak piyasaya arz edilen ilk besiyeridir (Pombinho, Laizé, Molha, Marques, & Cancela, 2004). Bu besiyerinin içeriğinde aminoasitler, tuzlar (CaCl_2 , KCl , MgSO_4 , NaCl ve monosodyum fosfat), glukoz ve vitaminler (folik asit, nikotinamid, riboflavin, B12) bulunmaktadır.

E-MEM'in Dulbecco tarafından yeniden formülize edilmesi ile Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) olarak bilinen besi yeri oluşturulmuştur. D-MEM, E-MEM'e göre dört kat daha fazla vitamin ve aminoasit, karbonhidrat içeriği bakımından ise iki kat daha fazla glukoz içermektedir. D-MEM içeriğinde ayrıca demir ve fenol kırmızısı da bulunabilmektedir (Pombinho et al., 2004). Günümüzde sıklıkla kullanılan besiyerleri: Eagle's Minimal Essential Medium (E-MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM), Medium 199 (M-199), Hank's Minimal Essential Medium (H-MEM), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Ham's Nutrient Mixtures (F-10 ve F-12), Leibovitz (L-15), Glasgow MEM ve Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) olarak sayılabilmektedir (Lester, 2007).

Besiyerleri serum içeriklerine göre serumlu besiyerleri ve serumsuz (serum-free, serum w.o.) besiyerleri olarak ikiye ayrılırlar. Serum içeren besiyerleri serum içeriğinin çok sayıdaki büyüme faktörlerini içermesi sebebiyle hücre proliferasyonu ve hücre gelişimini artırır. Serumsuz besiyerleri ise serumlu besiyerlerine oranla daha az reptorduktiftirler. Serum içeren besiyerlerinde mikrobiyel kontaminasyon riski serumsuz besi yerlerine nazaran daha yüksektir (Yao & Asayama, 2017). Besi yeri içeriğinde bulunan serumlar, hücre çoğalmasını ve hücre tutunmasını artıran büyüme faktörleri, mineral, lipid ve hormonları içermektedirler (Yamada & Olden, 1978). Yetişkin sığır serumu, fetal sığır serumu, dana, at ve insan serumları hücre ve doku kültürlerinde kullanılan temel serum tipleridir (Koçaklı et al., 2015).

Fötal sığır serumu (FBS, Fetal Bovine Serum) rutin hücre kültürü uygulamalarında en yaygın kullanılan serumdur (Yao & Asayama, 2017). Sığır fetüsünden alınan kandan hazırlanmaktadır. FBS içinde hormonları, enzimleri, büyüme faktörlerini, hücrenin yüzeye ve birbirlerine tutunmalarını sağlayan matriks proteinleri gibi proteinleri ihtiva etmektedir (Jochems, Van Der Valk, Stafleu, & Baumans, 2002)).

Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan dengeli tuz çözeltisi 1940 yılında mikrobiyolog John H. Hanks tarafından geliştirilmiş ve HBBS (HBBS, Hanks' Balanced Salt Solution) olarak adlandırılmıştır. HBBS hücre kültürü ortamında ortam

pH'nin 7,0-7,4 arasında olmasını sağlamakla birlikte tampon vazifesi de görmektedir (Gilbert, Sellaro, & Badylak, 2006).

Hücre kültürü ortamında hücrelerin zaman içerisinde büyüyüp gelişmeleri neticesinde oluşan laktat gibi metabolik atıklar besi yeri ortamının pH'sını değiştirmektedirler. Ancak hücre kültürü ortamında hücre büyümesi ve proliferasyonun sürdürülebilmesi için ortam pH'sının belirli değerler arasında kalması gerekmektedir. Bu sebeple hücre kültürü ortamlarına pH değişikliklerini minimize etmek için tampon solüsyonlar eklenmektedirler. Bu amaçla sodyum bikarbonat (NaHCO_3) besi yeri içeriklerine ilave edilmektedir. Sodyum bikarbonat Handerson-Hasselbach denkliği çerçevesinde iyon alışverişi ve pH'yı dengede tutmaktadır. Sodyum bikarbonatın yanı sıra 4-(2-hidroksimetil)-1piperazinetano sülfonik asit (HEPES)'de tampon olarak sıklıkla kullanılmaktadır. HEPES pH değişimleri bakımından sodyum bikarbonata oranla daha stabil bir ortam sağlamaktadır (Yao & Asayama, 2017). Ancak tavuk embriyosu epifizyal kondrosit hücresi gibi bazı hücre türlerinde HEPES'in hücre kültürüne negatif etkileri olduğu da bildirilmiştir (Poole, Reilly, & Flint, 1982). Ayrıca HEPES içeren hücre kültürlerinin görünür ışığa maruz kalmaları halinde hücre kültürü ortamında hidrojen peroksit gibi sitotoksik ajanlar oluşabilmektedirler (Zigler, Lepe-Zuniga, Vistica, & Gery, 1985).

Hücre kültürü ortamları her ne kadar aseptik şartlar altında çalışılan ortamlar olsalar da yine de kontaminasyona açık uygulamalardır. Bu sebeple kültür ortamında oluşması muhtemel kontaminasyonlardan korunmak için kültür ortamına antibiyotikler ve antifungal ajanlar eklenmektedir. Hücre kültürlerinde sıklıkla mikoplazma türleri ile olan kontaminasyonlara rastlanılmaktadır (Freshney, 2006).

2.7.4. Hücre Kültüründe Hücre Üretilmesine Etki Eden Fizikokimyasal Faktörler

2.7.4.1. pH

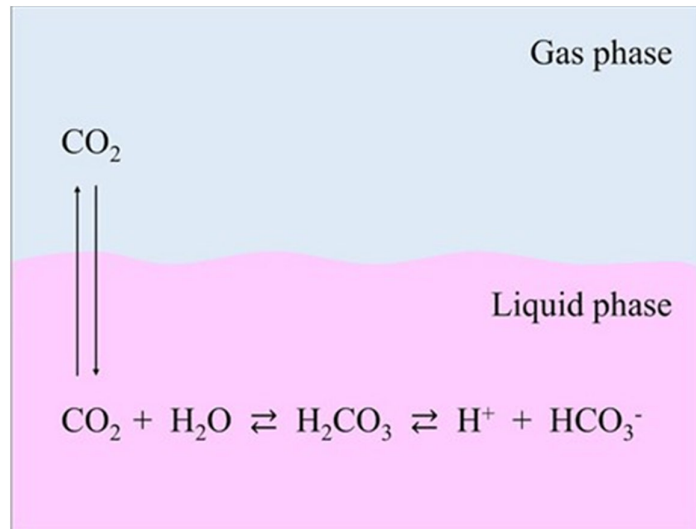
Pek çok hücre türü için hücre kültüründe en uygun pH aralığı pH 7,2-7,4 arasındır. Hücre kültürü ortamındaki pH değişimleri çok hızlı şekilde hücrelerin gelişimin durmasına ve hücrelerin ölmesine yol açmaktadır (Butler & Christie, 1994). Bu sebeple ortam pH'sının iyi ayarlanması ve yeterince tamponlanması gerekmektedir.

2.7.4.2. Sıcaklık

Hücre kültürü ortamları temelde üretilmek istenilen hücrenin yer aldığı *in-vivo* koşulların simüle edildiği bir ortam olması sebebiyle sıcaklığın hücrenin alındığı canlının iç sıcaklığında olması gerekmektedir. Bu sebeple, sıcakkanlı canlıların hücreleri için gerekli hücre kültürü ortam sıcaklığı +37 °C'dir. Düşük sıcaklıklarda CO₂ çözünürlüğü arttığı için ortam pH'ı düşük sıcaklıktan etkilenmektedir (Koçaklı et al., 2015). Sıcaklığın bu şekildeki indirekt ve direkt etkileri göz önünde bulundurularak hücre kültürü ortamındaki sıcaklığın optimize edilmesi gerekmektedir.

2.7.4.3. CO₂ ve O₂ Saturasyonu

Hücre kültürü besi yerinde CO₂ ile HCO₃⁻ pH'nın belirli aralıkta sabit kalmasına yardımcı olmaktadır. Hücreler için gerekli olan pH'ın 7,4'de sabit bir şekilde kalabilmesi için CO₂ gereklidir (Şekil 2.7.). Hücre kültürü ortamında bulunan CO₂ Handerson-Hasselbach denkliği gereği ortam pH'sını da tamponlamaktadır (Yao & Asayama, 2017). Bu sebeple hücre kültürü ortamlarında ortalama %2-5 arası CO₂ saturasyonu sağlanmalıdır (Nema & Khare, 2012).



Şekil 2.7. Kültür ortamında Bikarbonat temelli pH kontrol mekanizmasının Henderson–Hasselbalch eşitliğine göre davranışı. Sodyum bikarbonat (NaHCO₃) besi yeri içindeki suda çözündüğünde, pozitif sodyum iyonu (Na⁺) ve negatif bikarbonat iyonu (HCO₃⁻) oluşur. Bikarbonat iyonu (HCO₃⁻) ortamda bulunan serbest hidrojen protonları H⁺ ile reaksiyona girer ve karbonik asit (H₂CO₃) oluşur. Karbonik asit (H₂CO₃) ise yüksüz haldeki CO₂ ve H₂O ya dönüşür (Yao & Asayama, 2017).

Hücre kültürü ortamındaki hücreler oksijensiz solunum yapmasından dolayı *in-vivo* koşullardaki gibi O₂ saturasyonuna bağımlı değildir (Koçaklı et al., 2015). Hücre tiplerine göre, ihtiyaç duyulan oksijen miktarı farklı hücre tiplerine göre değişmekle birlikte çoğu hücre için, atmosfer basıncı ya da düşük oksijen basıncı yeterlidir (Baicu & Taylor, 2002). Geç dönem embriyo hücreleri ise yoğun O₂ saturasyonuna ihtiyaç duymaktadırlar (Laken & Leonard, 2001).

2.7.5. Hücre Kültür Tipleri

2.7.5.1. Primer Hücre Kültürü

Dokulardan yeni elde edilmiş kültürler, pasajlanana veya subkültürler oluşturuluncaya kadar primer kültür olarak isimlendirilirler. Üretildikleri dokunun hücre tiplerini ve alındıkları dokuya özgü özellikleri temsil ederler. Primer hücre kültürleri dokudan yeni alındığı için genellikle heterojen haldedirler ve büyüme fraksiyonları yavaştır (Oyeleye et al., 2016).

Primer hücre kültürleri genellikle üç aşamada elde edilirler. Birinci adımda primer hücre kültürü elde edilecek dokuyu çıkarmak için dokunun alınacağı organ parçalarına ayrılır ve doku organdan izole edilir. İkinci adımda ise hücrelerin dokudan ayrılması için mekanik veya enzimatik yollarla dokuya muamele edilir. Dokulardan hücrelerin ayrılması ve hücreler arası matriksi koparmak için tripsin, kollajenaz gibi enzimler kullanılmaktadırlar. Dokudan ayrılmış olan hücreler son aşamada büyümeleri için inkübasyona alınırlar (Nema & Khare, 2012). İnkübe edilen hücreler yeniden proteolitik enzimlere tabi tutularak primer hücre kültürü elde edilmesi istenilen hücreler toplanırlar. Hücre özelliğine göre bu hücreler içerisinde serumlu veya serumsuz besi ortamı bulunan kültür kaplarında homojen halde inkübe edilirler (Tekeli, 2018).

2.7.5.2. Subkültür Hücre Kültürü (Hücre Hattı)

Primer hücre kültürü elde edilmesi çalışmalarında kültür kabında üretilen primer hücreler, gelişip sayıca arttıkça kültür kabının tabanını kaplarlar. Konfluens olarak adlandırılan bu süreçle kültür kabının tamamını hücreler büyüyüp çoğalarak kaplarlar. Tam konfluens gerçekleştiğinde hücrelerin büyümelerini ve gelişmelerini sağlayabilmeleri için hücrelere yer açmak gerekmektedir. Bu aşamada pasajlama olarak

adlandırılan işlemle primer hücreden üretilen subkültür hücreleri kültür kabından toplanarak yeni kültür kaplarına aktarılırlar (Chandrashekara, 2015). Hücrelerin kültür kabından kaldırılabilmesi için tripsin veya cell-scaper olarak adlandırılan mekanik kazıyıcı kullanılmaktadır. Elde edilen hücreler yeni kültür kaplarına alındığı gibi hücrelerin bir kısmı dimetilsülfoksit (DMSO, dimetil sülfoksit) gibi kriyoprotektif kimyasallar eşliğinde dondurularak saklanabilirler. Subkültür aşamasındaki hücreler ayrıca hücre hattı olarak da tanımlanmaktadır (Tekeli, 2018).

2.7.5.3. Monolayer Hücre Kültürü

Monolayer hücre kültürü, kültür kabı tabanında yer alan bir tek hücre tabakasının tüm tabanı kapladığı hücre kültürü türüdür. Enzimatik veya mekanik ayırmaya gerek duymazlar. Monolayer hücre kültürlerinde hücre büyümesi hücre konsantrasyonu ile sınırlıdır (Oyeleye et al., 2016).

2.7.5.4. Süspanse Hücre Kültürleri

Süspanse hücre kültürleri, sıvı haldeki besi yerleri içerisinde herhangi bir yüzeye tutunma ihtiyacı duymadan büyüebilen hücre kültürleridir. Süspanse hücre kültürleri pasajlanacakları zaman enzimatik veya mekanik ayırmaya gerek duyulmaz (Oyeleye et al., 2016).

2.7.5.5. Adherent Hücre Kültürleri

Kültür kabının tabanına adhezyon molekülleri ile yapışan hücrelerce kültür kabının tabanının kaplandığı hücre kültürü tipidir. Bu hücre kültüründe büyütülen hücreler pasajlanmadan önce hücrelerin enzimatik olarak tutundukları yüzeyden ayrılmaları gerekmektedir. Bu hücre kültürlerinin belirli aralıklarla pasaj yapılması gerekmektedir. Adherent hücre kültürleri invert mikroskop altında gözlemlenebilirler. Ankraj bağımlı hücreler olarak da isimlendirilirler (Oyeleye et al., 2016).

2.7.6. Hücre Kültürlerinde Büyüme Kinetiği

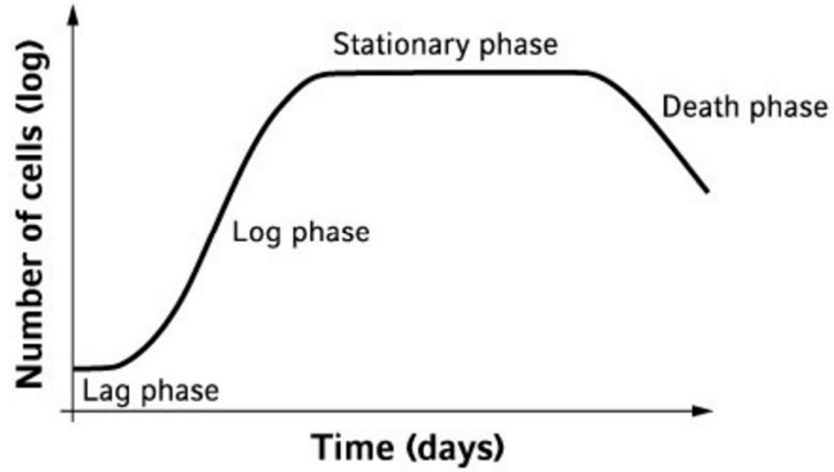
Nobel ödüllü Fransız cerrah Alexis Carrel'in hücre kültüründe üretilen hücrelerin ölümsüz olduğu tezi uzun yıllar kabul görmüştür (Shay & Wright, 2000). 1961 yılında

Leonard Hayflick bu tezin tam tersini açıklamış ve hücrelerin kültür ortamında ölümsüz olmadıklarını ve sınırlı bir ömre sahip olduklarını belirtmiştir ((Hayflick, 1965; Shay & Wright, 2000).

Hücre kültüründe üretilen hücreler sınırsız replikasyon kabiliyeti bulunan hücreler olsalar dahi kültür ortamında her zaman aynı büyüme hızında büyüyemezler. Hücre kültüründeki hücreler sırasıyla; gecikme fazı (lag fazı), logaritmik büyüme fazı (log fazı, exponential faz), yavaşlama fazı (deceleration faz), durağan faz (stationary faz veya plato fazı) ve ölüm fazı (death faz) olarak farklı hızlarda büyüme kinetiği gösterirler (Şekil 2.8.) (Oyeleye et al., 2016; Tekeli, 2018).

Gecikme fazı birkaç saat ya da 48 saat dahi sürebilirken genellikle 12-24 saat arasında tamamlanır. Bu fazda hücreler evvelce maruz kaldıkları tripsinden kurtulur, sitoskeletonu yeniden kurarlar. Bu fazdaki hücreler adherent hücre iseler tutunmak için matriks proteinlerini üreterek ortama tutunur ve besi ortamının tabanına yayılırlar (Freshney, 2006). Gecikme fazından logaritmik büyüme fazına geçen hücreler yeni ortamlarına uyum sağlayarak dengeli ve hızlı bir biçimde büyümeye başlarlar (Freshney, 2006; Oyeleye et al., 2016). Bu evrede hücre sayısının ikiye katlanması için gerekli süre doubling time olarak adlandırılır (Freshney, 2006). Doubling time hücreden hücreye değişkenlik göstermektedir. Logaritmik fazdaki yoğun hücre büyümesi ve hücre çoğalması zamanla toksik metabolik artıkların oluşmasına ve kültür ortamında hücreler için gerekli besin elementlerinin azalmasına sebep olur. Bu sebeple hücreler yavaşlama fazı adı verilen faza geçerler ve bu fazda hücrelerin üreme hızları yavaşlar. Hücreler artık büyüyemez ve bölünemez olduklarında yani net büyüme hızı sıfırlandığında hücreler durağan faza geçmiş olurlar (Oyeleye et al., 2016). Bu fazda hücreler, hücre siklusundaki G0 fazı aşamasındaki hücreler gibi davranırlar. Bu fazda hücreler büyüyüp bölünmezler ancak kendilerine özgü pigmentleri, enzimleri ve büyüme ile ilgili olmayan sekonder metabolik faaliyetlerini sürdürürler. Bu fazda hücre bölünme göstermemekle birlikte oldukça aktif ve canlıdır. Pasajlamanın veya subkültüre almanın hücrelerin bu faza ulaştıktan sonra yapılması gerekmektedir (Freshney, 2006). Büyüme fazındaki aktif metabolik faaliyetler ve büyümenin önceki fazlarından ortama eklenen toksik metabolitler sebebiyle zamanla hücreler ortamdaki besin yetersizliğinden ve toksik metabolitlerden zarar görerek ölmeye başlarlar (Stoker,

1973). Bu faz ise ölüm fazı olarak isimlendirilir (Tekeli, 2018). Ölüm fazında canlı hücre sayısı giderek azalırken ölü hücrelerin popülasyondaki oranı gittikçe artar.



Şekil 2.8. Hücre kültüründe hücrelerin büyüme kinetiğinin zamana göre gösterimi ("Culture Practice," 2020).

2.8. Ehrlich-Letter Tümörü

Deneyisel kanser modellemesi çalışmaları içerisinde Ehrlich hücreleri ile yapılan modeller en yaygın kullanılan tümör modellerinden biridir. Ehrlich tümörleri; hiperdiploid, transplante edilebilme kapasitesi yüksek, regresyon göstermeyen, hızlı proliferasyon gösteren, tümör spesifik transplantasyon antijeni bulunmayan, malignite oranı %100 olan, diferasyone olmamış karsinoma hücresidir (Ozaslan, Karagoz, Kilic, & Guldur, 2011).

Ehrlich karsinoma, Ehrlich ve Apolant tarafından 1905 yılında dişi farenin spontan meme adenokarsinoma hücrelerinden izole edilmiştir. Farelere özgü olup günümüze kadar farklılaşmadan gelmiş olan, yaygın kullanımı olan bir tümör modelidir (Ahmed, Chatterjee, & Debnath, 1988). Loewenthal ve Jahn (1932), solid Ehrlich karsinoma hücrelerini farelerin periton boşluğuna seri enjeksiyonlarla inoküle etmişler zamanla asites sıvısının içerisinde sferik şekilli tümör hücreleri geliştirmişlerdir (Ozaslan et al., 2011). Periton boşluğu içinde hücreler ile birlikte asit sıvısı da oluşması sebebiyle bu yeni tümöre Ehrlich Asites Tümörü adı verilmiştir (Senger et al., 1983). Sıvı formun elde edilmesiyle, çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Çünkü sıvı

formdaki hücreler süspansiyon halinde yer almaktadır ve hücre sayımına olanak sağlayıp istenilen sayıda hücre başka hayvana transplante edilebilmektedir (Ozaslan et al., 2011).

Ehrlich tümör hücreleri H2 histokompatibilite antijenlerinden yoksundurlar (Carry, Prescott, & Ogilvie, 1979; Chen & Watkins, 1970). Bundan dolayı da herhangi bir farede hızlı bir şekilde çoğalabilirler (Patt & Straube, 1956).

Ehrlich tümör hücreleri iki şekilde oluşur. Bunlar asit form ya da solid form olarak isimlendirilir. Ehrlich tümör hücresi deney hayvanına intraperitoneal yolla enjekte edilirse enjekte edilen hayvanın asites sıvısında Ehrlich tümörü asit formu, deri altı olarak enjekte edilmesi halinde ise enjekte edilen hayvanda solid formu oluşur.

2.8.1. Asit Formu (EAT)

EAT (Ehrlich Ascites Tumor) hücreleri, farelerin peritoneal boşluğunda süspansiyon halinde çoğalırlar ve *in-vitro* ortamda yapay yüzeylere yapışmazlar (Subiza et al., 1989). Ehrlich hücrelerinin periton içi enjeksiyonunu takiben 4-6 gün içinde asites oluştuğu anlaşılabılır ve toplam 5-12 ml asites sıvısı oluşabilir. Tümör hücrelerinin proliferasyonuna gereken besin kaynağı asites sıvısından sağlanır (Gupta, Mazumder, Kumar, Sivakumar, & Vamsi, 2004).

EAT hücreleri 2 fazda çoğalırlar. Hücreler farenin peritoneal boşluğuna inokule edildikten sonra hücre sayısının logaritmik olarak arttığı faza çoğalma fazı denir. Bunu izleyen, hücre sayısının hemen hemen sabit kaldığı faza ise plato fazı denir ((Lazebnik, Medvedeva, & Zenin, 1991; Siems, Grune, Schmidt, Tikhonov, & Pimenov, 1993; Skog, He, & Tribukait, 1990).

Ehrlich asit tümörü taşıyan farelerin plato fazında asit sıvısının çoğunun alınması sonucu tümör miktarında artış gözlenir. EAT hücreleri plato fazına geçtiklerinde hücre siklusları G2 fazında bloke halde kalırlar. Bu fazdaki hücreler asites sıvısı ile alınıp yeniden periton içi başka bir hayvan enjekte edilirse bu hücreler hücre siklusuna G1 fazından başlayarak yeniden mitotik aktivite kazanırlar (Lazebnik et al., 1991).

EAT hücresi içeren farelerin peritoneal kavitesinde mikrovasküler permeabilite önemli ölçüde artmıştır (Senger et al., 1983). Sıvı tümörler intraperitoneal olarak hayvana enjekte edildiğinde deney fareleri 22 güne kadar yaşayabilirler (Aggeler, Kapp, Tseng,

& Werb, 1982). Asitesin artması ile artan iç basınç ve tümörün virulansının yüksek olmasından dolayı artan tümör hacmi sebebiyle hayvanlarda ölümler gözlenir ((Sakai et al., 2010).

2.8.2. Solid Formu (SEC, Solid Ehrlich Carcinoma)

Ehrlich tümör hücreleri, tümör spesifik transplantasyon antijeni içermemeleri sebebiyle transplantasyonları kolay ve sorunsuz tümör hücreleridirler (Ozaslan et al., 2011). Solid tümörlerin oluşturulmasında subkutan, intramuskuler, intradermal veya intravenöz yolla hücre süspansiyonlarının inokulasyonu sonucunda transplante edilirler (Baillif, 1954).

EAT'nün solid formunu elde etmek için tümör hücre süspansiyonunu subkutan olarak hayvana enjekte etmek gerekir. Yaklaşık olarak 1×10^6 hücre içeren Ehrlich tümörü hücre süspansiyonu deney faresine subkutan olarak enjekte edildikten 1 hafta sonra enjeksiyon bölgesinde solid tümör kitlesi elle palpe edilebilir hale gelir (Joseph et al., 2014). Gelişen solid tümörün merkezinde kromatofilik hücreler ve perivaskuler bağ dokusu oluşur (Baillif, 1954).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İN VİTRO DENEYLER

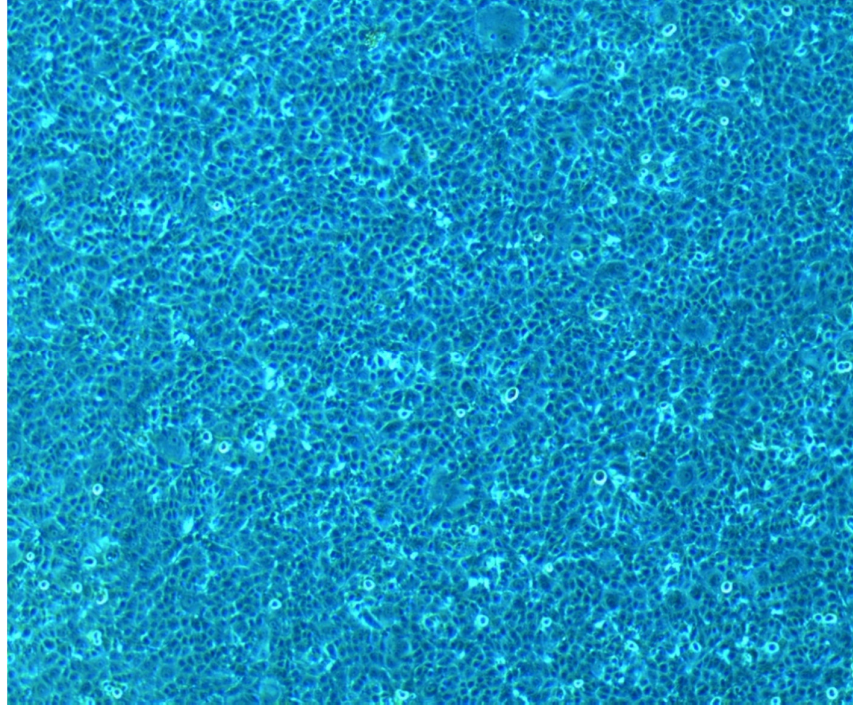
3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Gereçler ve Yöntem

3.1.1.1. Kullanılan Hücre Hatları ve Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları

Hücre kültürü çalışmalarında; Hepa filtreli laminar kabin, vakum pompası, 0,22 ve 0,45 mikron por çapında besi yeri süzme tertibatları, otoklav, CO₂ saturasyonu ayarlanabilir inkübatör, kültür aşamasındaki hücrelerin görsel takipleri için invert mikroskop, soğutuculu santrifüj, vortex, orbital çalkalayıcı, pH metre ve genel laboratuvar malzemeleri ve cam malzemelerden faydalanılmıştır.

3.1.1.1.1. MRC-5 Hücre Hattı

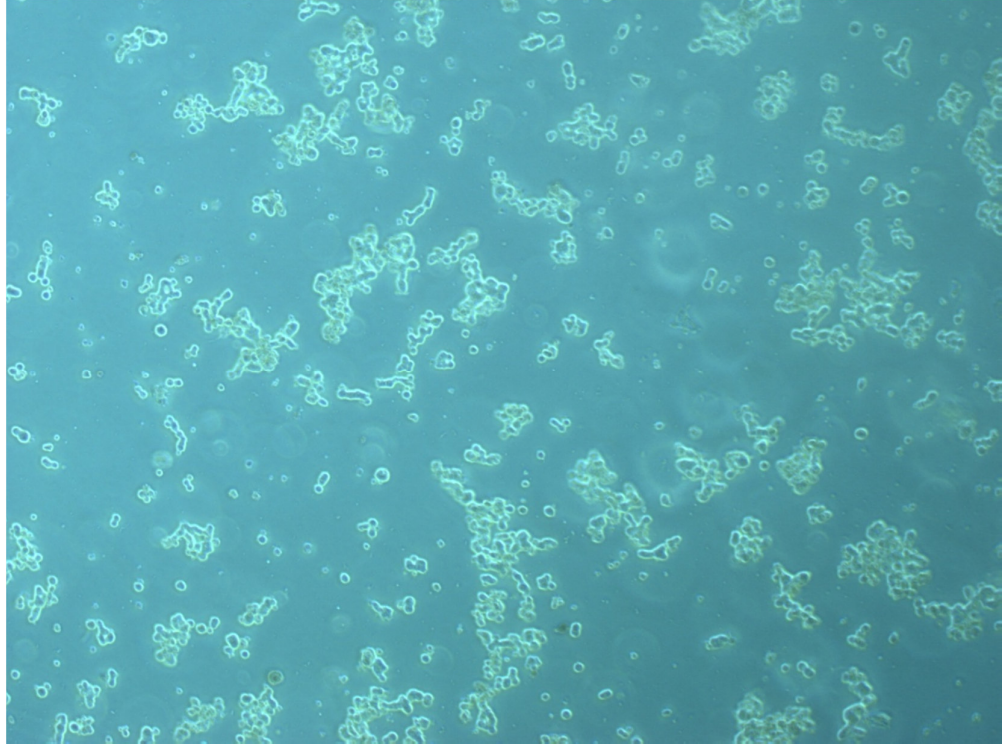
MRC-5 hücre hattı Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Şap Enstitüsü Müdürlüğü'ne ait HÜKÜK (Hücre Kültürü Kataloğu) içerisinde seçilerek, Hücre Kültürü laboratuvarından ücreti mukabilinde temin edilmiştir. Temin edilen MRC-5 hücresinin HÜKÜK katalog numarası 96101701 olup, çalışmalarımızda MRC-5 An₁ hücre hattı kullanılmıştır. MRC-5 hücresi, insan akciğer fibroblast hücresi olup, adherent karakterli ve fibroblastik morfolojide, sağlıklı hücre hattıdır (Şekil 3.1.) (American Tissue and Cell Cathalogue, 2020).



Şekil 3.1. Tam konfluens halinde MRC-5 hücresi

3.1.1.1.2. NCI-H209 Hücre Hattı

NCI-H209 hücre hattı, HLSCC (Human Lung Small Cell Carcinoma, İnsan Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Hücresi) hücre hattıdır. Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Şap Enstitüsü Müdürlüğü'ne ait HÜKÜK (Hücre Kültürü Kataloğu) içerisinde seçilerek, Hücre Kültürü laboratuvarından ücreti karşılığında temin edilmiştir. Temin edilen HLSCC hücresinin HÜKÜK katalog numarası 96041102 olup, çalışmalarımızda NCI-H209/An₁ hücre hattı kullanılmıştır. NCI-H209/An₁ hücresi, insan akciğeri küçük hücreli karsinom hücresi olup, süspanse karakterli ve epitelyal morfolojide, karsinom hücre hattıdır (Şekil 3.2.) (American Tissue and Cell Cathalogue, 2020).



Şekil 3.2. NCI-H209 hücresi görseli

3.1.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Vasatlar

3.1.1.2.1. D-MEM

D-MEM besi yeri ticari stok preparatının ürün üzerinde yer alan hazırlanma talimatına uygun olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan D-MEM besi yerine beher litresinde 100 µl olacak şekilde penisilin, streptomisin karışımı eklenmiştir. Kullanıma alınmadan önce besi yerinin pH değeri ölçülerek pH'sı 7,0 – 7,2 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan besi yeri sırasıyla 0,45 ve 0,22 mikron por çapındaki filtre tertibatından vakum pompası yardımıyla cebri olarak filtrelenerek stok besi yeri olarak +4 °C da muhafaza edilmiştir.

3.1.1.2.2. RPMI-1640

RPMI-1640 besi yeri de ticari olarak temin edilen hazır toz formundan talimatına uygun olarak hazırlanmıştır. Bu besi yerinin hazırlanmasında D-MEM besi yerinin hazırlanış aşmasındaki işlemler aynı şekilde uygulanmıştır.

3.1.1.3. Hücre Kültürü Süreçleri

Temin edilen hücre kültürleri çalışma emniyetinin sağlanması amacıyla öncelikle hücre saklayabilmek için D-MEM ve RPMI-1640 besi yerlerinde çoğaltılmışlardır. Tam konfluensi takiben hücreler pasajlanacağı zaman üretilen hücrelerin bir kısmı hücre dondurma prosedürüne uygun olarak dondurulmuşlardır. Kalan hücreler ile hücre çoğaltma süreçlerine devam edilmiştir. Hücre kültürü süreçleri kullanılan hücreye göre değişmekle birlikte, hücrelerin büyütülmesi, pasajlanması (subkültür işlemi), hücrelerin dondurulması ve saklanması aşamalarından geçirilmişlerdir. Hücre kültürüne ait tüm süreçler aseptik koşullarda ve hepa filtreli laminar kabin içerisinde kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.3.1. Hücre Kültüründe Hücrelerin Büyütülmesi

MRC-5 hücreleri 25 cm²'lik hücre flasksı içerisinde D-MEM besi yeri ile üretilmişlerdir (Şekil 3.3.). Flaskta kullanılan D-MEM, stok D-MEM besi yerine %10 FBS (Fetal Bovine Serum) eklendikten sonra kültür ortamına eklenmiştir. Her bir flaska 15 ml %10 FBS içeren besi yeri konulmuştur. Kullanılan flaskslar hava alış-verişine imkan sağlayan tipte filtre kapaklı olduğundan inkübasyonda hava geçişi için ilave tedbir alınmadan %5 CO₂ içeren atmosfer ortamında ve +37 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyona alınan hücreler ilk 24 saat süresince hücrelerin flask tabanına adhezyonlarının sağlanması için inkübatör içerisinde hareketsiz şekilde bekletilmişlerdir. Adhezyonun kontrolü için flaska hücre ekimini takip eden ikinci günün başında hücreler invert mikroskop altında farklı büyütmelerde kontrol edilmişlerdir. Adhezyonunu gerçekleştiren hücrelerin konfluensleri günlük olarak invert mikroskop ile takip edilmiştir. Hücreler konfluens gösterene kadar hücre üretimine devam edilmiştir. Bu aşamada hücre kültür ortamının pH'sı renk reaksiyonu takibi ile kontrol edilmiştir. Besi yeri içerisinde bulunan fenol red pH indikatörü olarak kullanılmıştır. Kullanılan indikatör alkali ortamda morumsu, asidik ortamda ise turuncu, sarımsı renk vermektedir. Besi yerindeki renk değişimleri gözlemlenirken hücre yoğunluğuna göre değişmekle birlikte yaklaşık her 2-3 günde bir ortamın besi yeri yenilenmiştir.

NCI-H209/An₁ hücreleri de MRC-5 hücreleri ile aynı şekilde 25 cm²'lik hücre flasksı içerisinde RPMI-1640 besi yeri içerisinde kültüre alınmışlardır. NCI-H209/An₁

süspanse hücre olduğu için hücrelerin adhezyonu beklenmeden üretime devam edilmiştir. Bu hücre hattı da belirli aralıklarla invert mikroskop altında gözlenmiş ve üzümlü salkımı tarzında hücre agregasyonları gözlemlendiğinde hücrelerin konfluens yaptıklarına karar verilmiştir. Besi yeri ortamının pH kontrolü, besi yeri ortamı ve inkübasyon koşulları MRC-5 hücreleri için uygulanan prosedüre göre devam ettirilmiştir.



Şekil 3.3. Hücre kültüründe kullanılan hücre kültür flaskları ve pleitler

3.1.1.3.2. Hücrelerin Pasajlanması

Konfluens gösteren hücreler büyüme ve çoğalma performanslarına göre belirli sürelerde pasajlanmışlardır. Subkültür işlemi MRC-5 ve NCI-H209/An₁ hücre hattı için iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.3.2.1.MRC-5 Hücre Kültürünün Pasajlanması

MRC-5 hücreleri kültür kabında tüm yüzeyi kapladıklarında (tam konfluens), hücrelere yer açmak ve hücrelerin üst üste binmelerini önlemek için pasajlama işlemine tabi tutulmuştur.

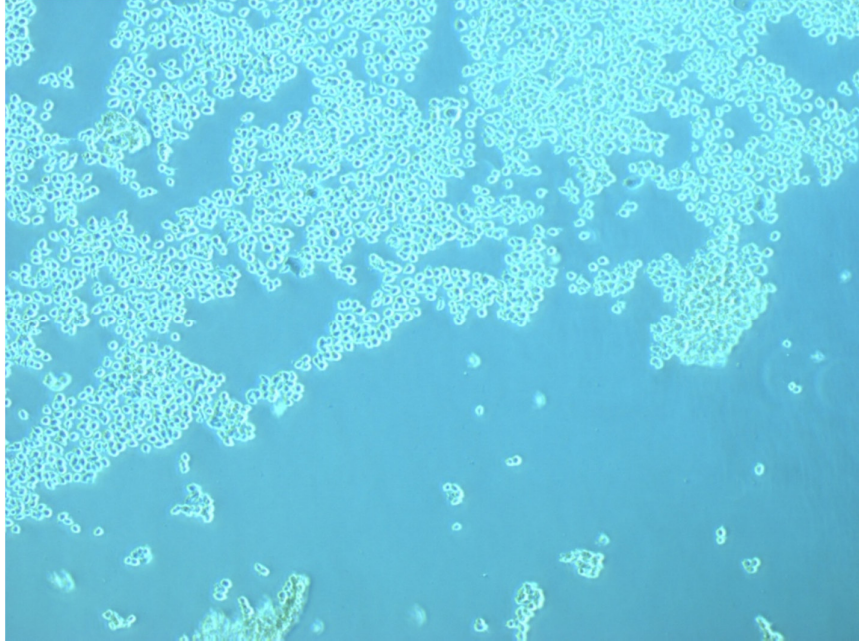
MRC-5 hücre hattı adhezyonla flask tabanına tutunduğu için pasajlama öncesinde hücrelerin flask tabanından ayrılması gerekmektedir (Şekil 3.4.). Bunun için öncelikle laminar kabin içerisinde ve aseptik koşullarda flask içerisindeki besi yeri flasktan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin flask tabanı ile olan bağlantısını kesmek için flask içerisine hücre yoğunluğuna göre değişmekle birlikte 1,5-2 ml Trypsin-EDTA eklenmiştir. Ortama katılan tripsinin adhezyon proteinlerini parçalayarak hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlaması için kültür kabı kabin içerisinde $+37^{\circ}\text{C}$ de yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. Trypsinizasyon işlemini kontrol için hücreler invert mikroskop altında görsel olarak kontrol edilerek adhezyonun kaldırıldığı teyit edilmiştir (Şekil 3.5.). Trypsinizasyon ile tamamı kültür tabanından kaldırılamayan hücreler cell scraper adı verilen ekipman yardımı ile kültür kabı tabanından nazikçe kazınmışlardır. Trypsinizasyonla kaldırılan hücrelerin yer aldığı flaska 5 ml taze besi yeri eklenilerek hücrelerin tripsinden etkilenmemesi sağlanmıştır.

Trypsinizasyondan sonra hücreler 1500 rpm de $+4^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 5 dakika soğutuculu santrifüjde santrifüje edilmiştir. Süpernatant santrifüj işlemi sonrasında uzaklaştırılarak santrifüj tüpüne 2 ml taze vasat eklenmiş ve hücre yoğunluğu Thoma lamı yardımı ile sayılmıştır. Hücre yoğunluğuna göre elde edilen hücreler yeni flasklara her bir kültür ortamına 1×10^6 hücre olacak şekilde aktarılmıştır. Bu şekilde elde edilen yeni kültür ortamı flasklarına da 15 ml %10 FBS içeren antibiyotik karışımı D-MEM besi yeri ilave edilerek %5 CO_2 içeren atmosfer ortamında ve $+37^{\circ}\text{C}$ de inkübasyonla hücre kültürüne devam edilmiştir.

Hücrelerin logaritmik büyüme gösterdikleri fazda pasajlama işlemi, hücre yoğunluğu ve büyüme hızının yüksek olması sebebiyle; 25 cm^2 'lik hücre flaskından 75 cm^2 'lik hücre flaskına olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Diğer hücre kültürü evrelerinde ise flask büyüklüğü değiştirilmeden pasajlama yapılmıştır.



Şekil 3.4. Monolayer halindeki MRC-5 hücresinin tripsin uygulanmadan önceki görseli



Şekil 3.5. Tripsin uygulanarak yerinden kaldırılmış MRC-5 hücreleri

3.1.1.3.2.2. NCI-H209 Hücre Kültürünün Pasajlanması

NCI-H209/An₁ hücre hattı içinde MRC-5 hücre hattında kullanılan hücre pasajlama işlemi prensiplerine uyulmuştur. Farklı olarak bu hücre hattı süspanse olduğu için tripsinizasyon işlemi yapılmadan pasajlama işlemlerine devam edilmiştir.

3.1.1.3.3. Hücrelerin Dondurulması ve Stoklanması

Hücre kültüründe elde edilen her iki hücre hattı da çalışma emniyeti ve hücre stoğu oluşturulması maksadı ile her hücre pasajında dondurularak -80°C kriyo sıcaklıkta muhafaza altına alınmıştır.

Hücre dondurma protokolünde krioprotektan olarak DMSO kullanılmıştır. Hücre dondurma protokolünde 5 birim dondurulacak hücre, 4 birim FBS ve 1 birim krioprotektan madde formülü kullanılmıştır. Karışım oranı dahilinde %10 DMSO'lu dondurulacak hücre içeriği krioviallerde -80°C de dondurulmaya bırakılmadan önce bir gece -20°C de bekletilerek donma şokunu mutedil geçirmeleri sağlanmıştır. Bu amaçla saatte 1°C lik sıcaklık düşüşü sağlayan koruyucu kap kullanılmıştır. -20°C 'ye sıcaklığı düşürülen hücreler hemen -80°C 'deki dondurucuya konularak hücre dondurma işlemi tamamlanmıştır.

3.1.2. Mebendazol

Abcam firması tarafından satılan ticari mebendazol etken maddesi kullanılmıştır. Kullanılan mebendazolün firma ticari kodu ab141246 olup, >%99 saflıkta temin edilmiştir.

3.1.3. Paklitaksel

Abcam firması tarafından satılan ticari paklitaksel etken maddesi kullanılmıştır. Kullanılan paklitakselin firma ticari kodu ab120143 olup, >%98 saflıkta temin edilmiştir.

3.1.4. Vinkristin

Abcam firması tarafından satılan ticari vinkristin sülfat etken maddesi kullanılmıştır. Kullanılan vikristin sülfatın firma ticari kodu ab120226 olup, >%96 saflıkta temin edilmiştir.

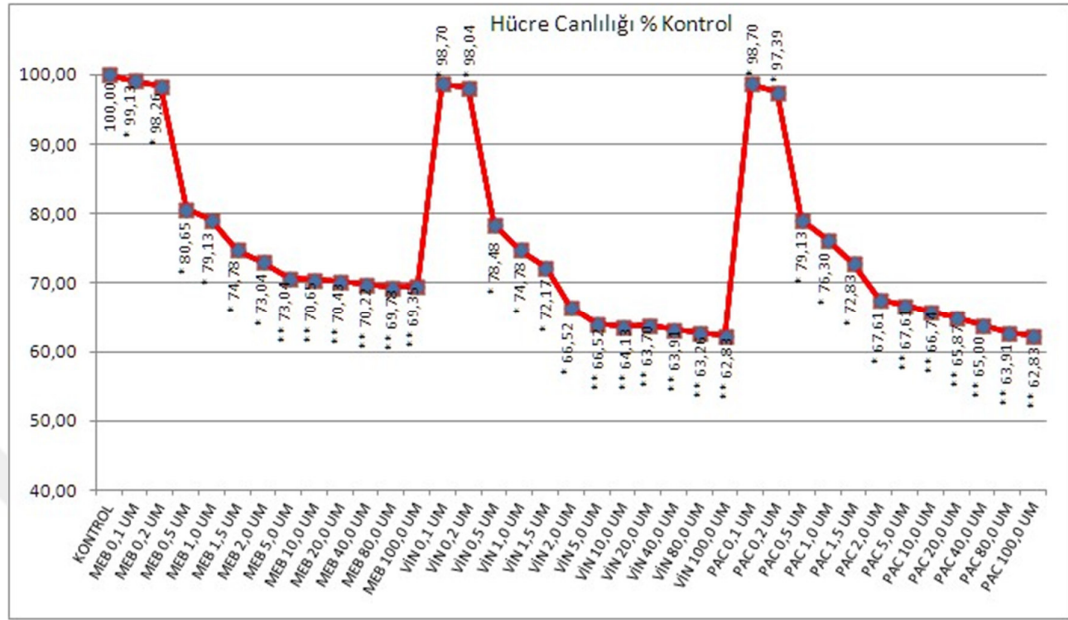
3.1.5. Deneylerde Kullanılan Hücre Sayılarının Optimizasyonu

İn-vitro ilaç denemeleri ve analizlerin yapılması 96 kuyucuklu kültür plağında gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu kültür plağında kuyucuk hacmi $200\ \mu\text{l}$ olduğundan

kısıtlı bu hacimde hücre yoğunluğu sebebiyle hücre ölümlerinin görülmesi muhtemeldir. Bu sebeple ilaç denemelerine geçilmeden önce 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğunda ilaç denemeleri için kullanılacak azami hücre konsantrasyonu sırasıyla; 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 2×10^4 , 3×10^4 adet hücre MTT deneyi ile hücre canlılıklarını kontrol etmek için test edilmişlerdir. 2×10^4 adet hücre yoğunluğunda 12 paralel denemenin tamamında hücrelerin hücre yoğunluğu sebebiyle öldükleri tespit edilmiştir. Bu analiz sonrasında devam eden çalışmalarda her bir kuyucuk için 2×10^4 adet hücre yoğunluğu kullanılmıştır.

3.1.6. Deneylerde Kullanılan Etken Madde Konsantrasyonlarının Optimizasyonu

İn-vitro koşullarda gerçekleştirilecek deneyler için 96 kuyucuklu hücre pleytinde kullanılacak hücre sayısı her bir kuyucuk için 20.000 hücre olarak optimize edildikten sonra MTT deney kiti yardımı ile kullanılan her 3 etken maddenin farklı dozları test edilmişlerdir. Bu amaçla mebendazolün, vinkristinin ve paklitakselin: 0,1 μM - 0,2 μM - 0,5 μM - 0,1 μM – 1,5 μM – 2 μM – 5 μM - 10 μM - 20 μM - 40 μM - 80 μM – 100 μM seri konsantrasyonları kuyucuklarda bulunan MRC-5 hücrelerine uygulanmıştır. 0,5 μM 'dan daha düşük ve 2 μM 'dan daha yüksek konsantrasyonların hücreler üzerinde sağkalım/ölüm etkilerinin değişmediği bu çalışma sonucunda anlaşılmıştır (Şekil 3.6.). *İn-vitro* denemelerde kullanılan kontrol gruplarına ise %0,1'lik DMSO uygulaması yapılmıştır.



Şekil 3.6. MRC-5 hücrelerinde ilaç yoğunluğu / hücre canlılığı görünümü (* $p < 0,05$
** $p > 0,05$)

Mebendazolün glioblastoma hücre hattında sitotoksitesinin değerlendirildiği bir çalışmada 0,3 μ M (87) , kemoterapiye dirençli meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada 0,05 μ M ile 2,5 μ M dozları arasında (90), melonoma hücrelerinde yapılan farklı bir çalışmada 0,5-1,9 μ M doz aralığında (31), bir başka çalışmada ise mebendazolün etkinliği 1-10 μ M dozları arasında test edilmiş ve 0,5-1 μ M dozlarının efektif olduğu (33), D17 hücre hattı üzerinde 0- 25 μ M dozları aralığında (63), fibroblast hücreleri üzerinde 1 μ M konsantrasyonda etkin olduğu (202), mitoz bölünmenin kesintiye uğradığı ve tubulin depolimerizasyonunun 0,5 μ M mebendazol konsantrasyonda sağlandığı (Sasaki et al., 2002), fibroblast hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada da mebendazol etkinliğinin 1 μ M konsantrasyonda olduğu bildirilmiştir (Tapas et al., 2002).

Yapılan bu test sonuçlarına ve mebendazolün literatür kaynaklı *in-vitro* hücre çalışmalarında elde edilen konsantrasyon aralığı bulgularına göre ilaç denemelerine her üç etken maddeninde aktif olarak etki gösterdikleri anlaşılan 0,5 μ M – 1 μ M - 1,5 μ M – 2 μ M konsantrasyonları ile devam edilmiştir.

3.1.7.MTT Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığı ve hücre sitotoksitesinin değerlendirilmesi için Biovision firmasına ait MTT Cell Proliferation Assay Kit (Katalog no: K299-1000) kullanılmıştır. Kolorimetrik esaslı olan bu kit yardımı ile daha önceden belirlenen hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu hücre pleytine alınan hücrelerdeki hücre canlılığı ve hücre ölümü test edilmiştir.

MTT deneyi; canlı hücrelerin metabolik faaliyetlerinin aktif olması sebebiyle MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) kimyasalını formazana indirgemeleri, ölü hücrelerin ise metabolik faaliyetleri ve mitokondriyal redüktaz enzimlerinin faal olmaması sebebiyle bu kimyasalı indirgeyememeleri esasına dayanmaktadır (Van Meerloo, Kaspers, & Cloos, 2011). MTT kimyasalı sarı renkli olup canlı hücrelerde mitokondriyal redüktaz enzimi ile morumsu renkli formazana dönüştüğünde oluşan mor rengin kullanılan deney kitine göre uygun dalga boyunda absorbansı ölçülerek hücrenin canlılığı ya da hücre ölümü oranı ile korrelasyonla ilişkilendirilmektedir.

Çalışmamızda uygulanan MTT testi kullanılan deney kitinin talimatına uygun olarak aşağıda maddeler halinde sunulan deney protokolüne göre yapılmıştır.

- 96 kuyucuklu hücre pleytine 200 µl besi yeri içerisinde bulunan 2×10^4 adet hücre sayılarak pleyte yerleştirilmiştir. (MRC-5 hücreleri için %10 FBS'li D-MEM ve NCI-H209 hücreleri için % 10FBS'li RPMI-1640 kullanılmıştır.)

- Pleyt 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 li ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

- İnkübasyonu takiben kuyucuklarda bulunan besi yeri uzaklaştırılmıştır.

- Her bir kuyucuğa taze 100 µl 2X besi yeri eklenmiştir.

- Gruplara göre ilaç denemesi yapılacak kuyucuklara ilaçlar ve kombinasyonları üç paraleli olacak şekilde önceden belirlenen 0,5 µM - 0,1 µM – 1,5 µM – 2 µM dozlarında 100 µl içerisinde verilerek kuyucuk hacmi yeniden 200 µl ye getirilmiştir.

- Etken madde uygulanan hücreler tekrar 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 'li ortamda 24 saat inkübasyona alınmışlardır.

- Etken madde ile muamele edilen inkübasyon süresini takiben hücre pleytinden besi yeri uzaklaştırılmıştır.

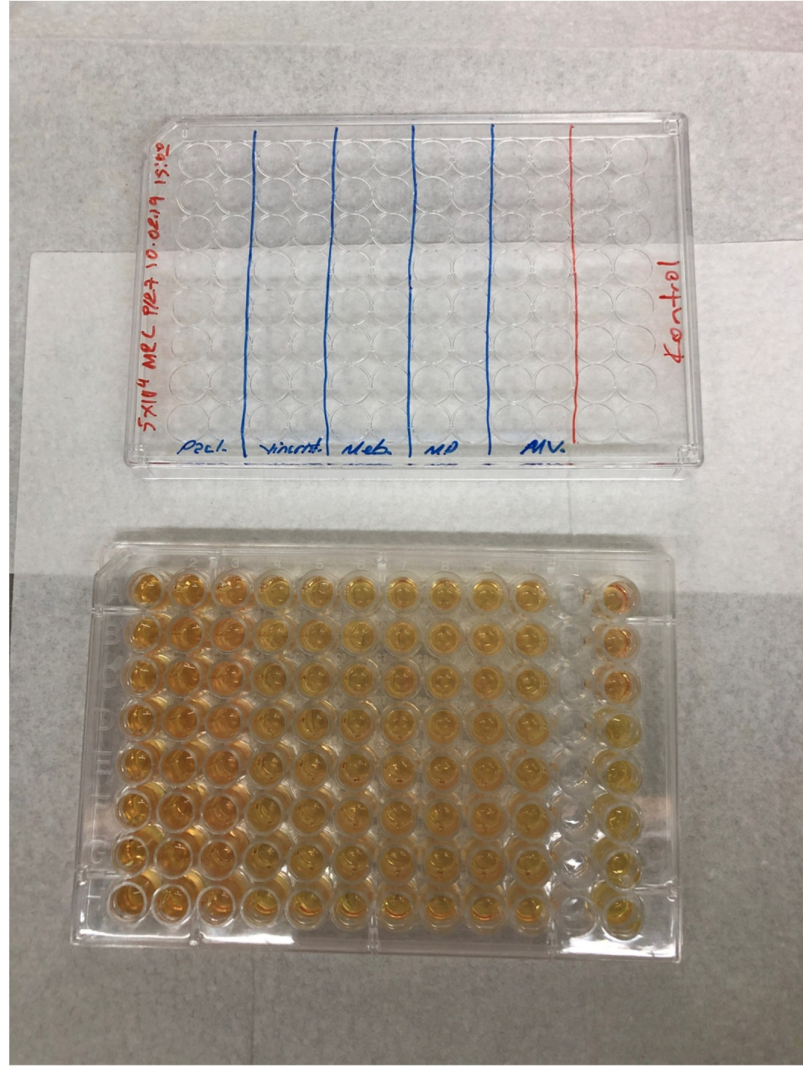
- Her bir kuyucuğa 50 µl serumsuz besi yeri ve 50 µl MTT ayracı eklenmiştir.

- MTT ayracı eklenmiş pleyttteki hücrelerin canlılık düzeylerine göre MTT kimyasalını indirgeyebilmeleri için pleyt son kez 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂’li ortamda 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.

- Son inkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 150 µl MTT solventi eklenmiş ve pleyt nazıkça hareket ettirilerek boya ve solventin birbirlerine karışması sağlanmıştır (Şekil 3.7.).

- MTT solventinin eklenmesini takip eden 15. dakikada pleyt 590 nm dalga boyunda gerçekleşen ışımının absorbans değerine göre okuma yapılarak deney sonlandırılmıştır (Şekil 3.8.). (Absorbans okumasında EPOCH elisa reader cihazı kullanılmıştır.)

- Kör okumadan elde edilen absorbans değeri tüm okumalardan çıkarıldıktan sonra $(\text{numune abs} / \text{kontrol abs}) \times 100$ formülü ile her bir gruba ait % hücre canlılığı oranı ve $100 - \% \text{ hücre canlılığı}$ formülü kullanılarak da % hücrel sitotoksosite oranı hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. MTT eklenmiş hücre pleytine ait görsel



Şekil 3.8. MTT eklenmiş hücre pleytine ait deney sonrası görseli

3.1.8.Kaspaz-3 Düzeylerinin Tespit Edilmesi

Kaspaz-3 düzeylerinin belirlenmesinde Biovision firmasınca üretilmiş olan kaspaz deney kitleri kullanıldılar. Spektrofotometrik temelli olan bu kitlerle kaspaz düzeyleri renk reaksiyonu esas alınarak tespit edilmiştir. Kaspaz deneyleri, kullanılan deney kitinin deney protokolüne uygun olarak yapılmış ve sonuçlar EPOCH elisa reader cihazı kullanılarak 400 nm dalga boyunda gerçekleşen ışımının absorbans değerine göre yapılan okuma ile tamamlanmıştır. Kullanılan deney prosedürü işlem basamakları şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1×10^6 adet hücre thoma lamı yardımıyla sayılarak deneye alınmışlardır.
- Alınan hücrelere 50 μ l soğuk lizis buffer eklenip, buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir.
- 10.000 x g'de 1 dakika santrifüje edilmişlerdir.
- Santrifüj sonrasında sitozolik ekstrakt olan süpernatant yeni bir tüpe alınıp buz üzerinde bekletilmiştir.

- Yeni tüpe alınan sitozolik ekstrakta 10 mM DTT içeren 2X reaksiyon bufferından 50 µl eklenmiştir.
- 5 µl 4 mM DEVD-*p*NA substratı eklenilerek 37 °C sıcaklıkta 2 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında 400 nm dalga boyunda eliza reader cihazında absorbens değerleri okunmuştur.
- Okunan absorbens değerlerinden kör okuma absorbanı düşüldükten sonra veriler kullanılmıştır.

3.1.9.Kaspaz-8 Düzeylerinin Tespit Edilmesi

Kaspaz-8 düzeylerinin belirlenmesinde Biovision firmasınca üretilmiş olan kaspaz deney kitleri kullanılmışlardır. Spektrofotometrik temelli olan bu kitlerle kaspaz düzeyleri renk reaksiyonu esas alınarak tespit edilmiştir. Kaspaz deneyleri, kullanılan deney kitinin deney protokolüne uygun olarak yapılmış ve sonuçlar EPOCH eliza reader cihazı kullanılarak 400 nm dalga boyunda gerçekleşen ışmanın absorbens değerine göre yapılan okuma ile tamamlanmıştır. Kullanılan deney prosedürü işlem basamakları şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1×10^6 adet hücre thoma lamı yardımıyla sayılarak deneye alınmışlardır.
- Alınan hücrelere 50 µl soğuk lizis buffer eklenip, buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir.
- 10.000 x g'de 1 dakika santrifüje edilmişlerdir.
- Santrifüj sonrasında sitozolik ekstrakt olan süpernatant yeni bir tüpe alınıp buz üzerinde bekletilmiştir.
- Yeni tüpe alınan sitozolik ekstrakta 10 mM DTT içeren 2X reaksiyon bufferından 50 µl eklenmiştir.
- 5 µl 4 mM IETD-*p*NA substratı eklenilerek 37 °C sıcaklıkta 2 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında 400 nm dalga boyunda eliza reader cihazında absorbens değerleri okunmuştur.

- Okunan absorbans değerlerinden kör okuma absorbansı düşüldükten sonra elde edilen veriler kullanılmıştır.

3.1.10. Kaspaz-9 Düzeylerinin Tespit Edilmesi

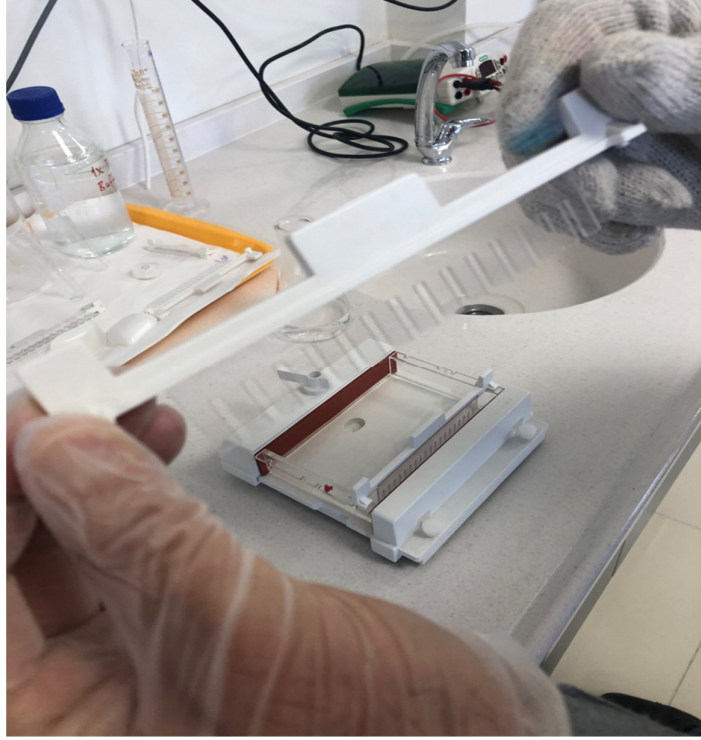
Kaspaz-9 düzeylerinin belirlenmesinde Biovision firmasınca üretilmiş olan kaspaz deney kitleri kullanıldı. Spektrofotometrik temelli olan bu kitle kaspaz düzeyleri renk reaksiyonu esas alınarak tespit edilmiştir. Kaspaz deneyleri, kullanılan deney kitinin deney protokolüne uygun olarak yapılmış ve sonuçlar EPOCH elisa reader cihazı kullanılarak 400 nm dalga boyunda gerçekleşen ışımının absorbans değerine göre yapılan okuma ile tamamlanmıştır. Kullanılan deney prosedürü işlem basamakları şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1×10^6 adet hücre thoma lamı yardımıyla sayılarak deneye alınmıştır.
- Alınan hücrelere 50 μ l soğuk lizis buffer eklenip, buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir.
- 10.000 x g'de 1 dakika santrifüje edilmişlerdir.
- Santrifüj sonrasında sitozolik ekstrakt olan süpernatant yeni bir tüpe alınıp buz üzerinde bekletilmiştir.
- Yeni tüpe alınan sitozolik ekstrakta 10 mM DTT içeren 2X reaksiyon bufferından 50 μ l eklenmiştir.
- 5 μ l 4 mM LEHD-pNA substratı eklenilerek 37 $^{\circ}$ C sıcaklıkta 2 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında 400 nm dalga boyunda eliza reader cihazında absorbans değerleri okunmuştur.
- Okunan absorbans değerlerinden kör okuma absorbansı düşüldükten sonra elde edilen veriler kullanılmıştır.

3.1.11. Apoptotik DNA Laddern Deneyi

Apoptotik DNA deneyi için Biovision firmasına ait K120-50 katalog numaralı deney kiti kullanılmıştır. Kullanılan deney kiti içeriğine uygun olarak aşağıda maddeler halinde gösterilen deney prosedürü uygulanmıştır.

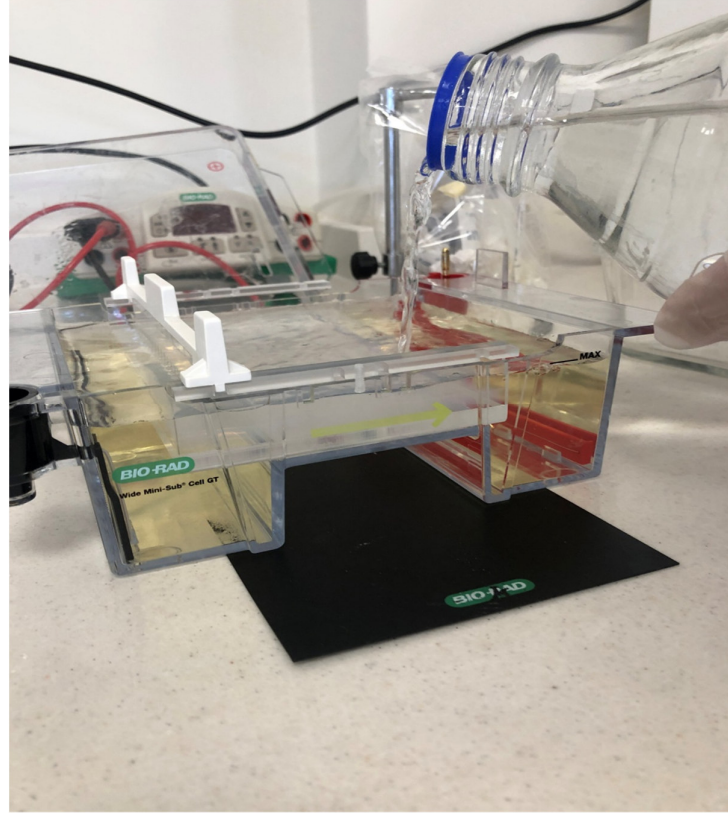
- Hücreler kültür ortamında büyütüldükten sonra ilaç uygulamaları yapılmıştır.
- İlaç uygulamalarını takiben hücre pelleti 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmışlardır.
- Tüp içerisindeki hücreler PBS ile yıkanmış ve 5 dakika boyunca 500 devirde santrifüje edilmişlerdir. Santrifüj sonrası süpernatant pipetaj ile uzaklaştırılmıştır.
- Hücre lizatı 35 µl kit içeriğinde bulunan TE lizis buffer ile pipet kullanılarak karıştırılmıştır.
- Karışıma 5 µl kit içeriğinde bulunan Enzim A solüsyonu eklenip karışım vorteks ile karıştırılmış ve 37 °C de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Karışıma 5 µl kit içeriğinde bulunan Enzim B solüsyonu eklenip karışım vorteks ile karıştırılmış ve 50 °C de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 5 µl Amonyum asetat solüsyonu eklenerek iyice karıştırılmıştır. Karışıma 50 µl izopropanol eklenerek -20 °C de 10 dakika bekletilmiştir.
- Numunedeki DNA'yı presipite etmek için tüp içeriği düşük devirde 10 dakika santrifüje alınmıştır.
- Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve DNA pelleti üzerine 0,5 ml etanol eklenerek tüp yıkanmıştır. Sonrasında etanol uzaklaştırılmış ve tüp oda sıcaklığında 10 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır.
- Tüp içeriğinde presipite edilmiş DNA'yı çözmek için 30 µl DNA süspansiyon bafır eklenmiştir.
- 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %1,2 lik agaroz jeline 15-30 µl DNA süspansiyonundan yükleme yapılmıştır.
- Jel üzerinde yeşil bant oluşana kadar jeldeki DNA içeriği 5 V/cm elektroforez gücünde elektrik akımına tabi tutulmuştur.
- Elektroforezi takiben etidyum bromür ile işaretli DNA parçalarını gözlemek için jel UV ışık altında izlenerek fotoğraflanmıştır.
- Elde edilen fotoğraflarda örnekler ait DNA bantlarının piksel olarak yoğunluğu image J programı yardımı ile sayısallaştırılarak ifade edilmiştir (204).



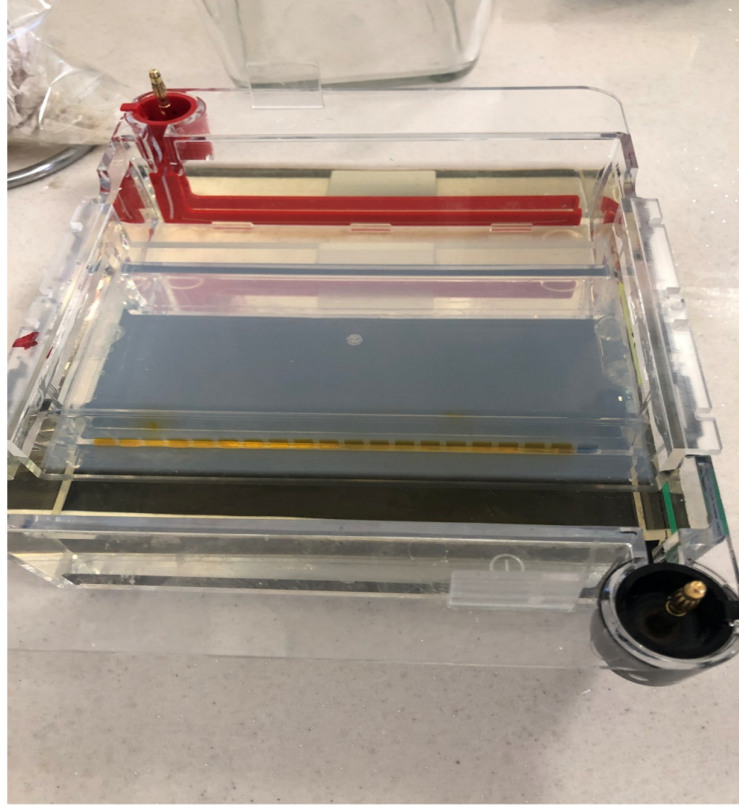
Şekil 3.9. Elektroferez tarağının hazırlanması ve elektrofereze yerleştirilmesi



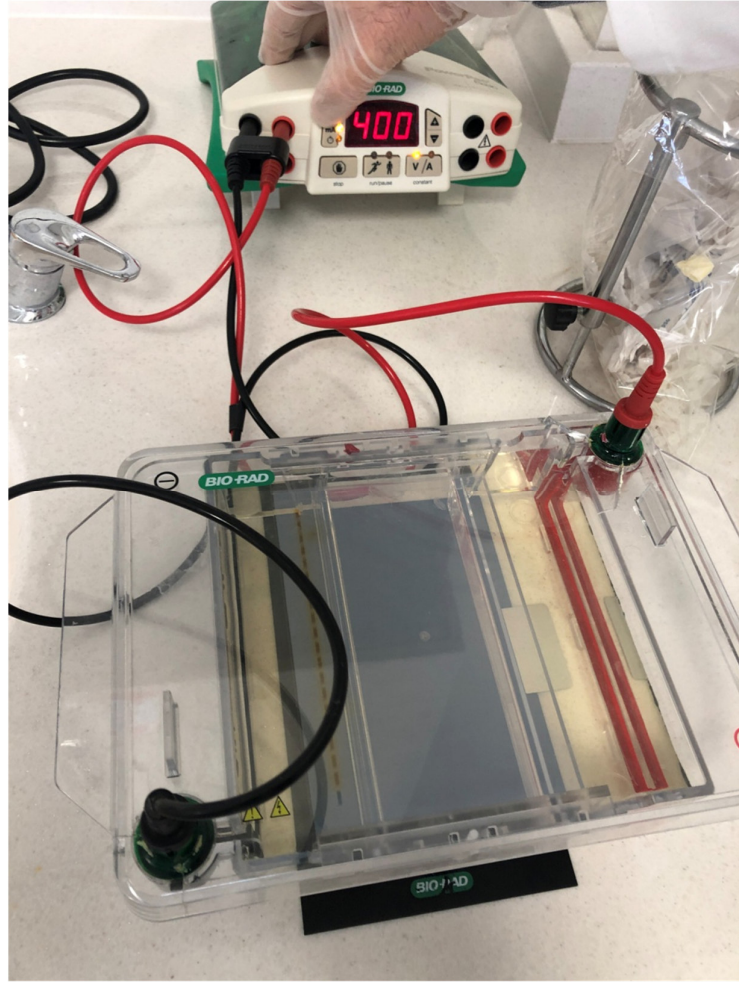
Şekil 3.10. Elektroferez tankına agaroz jel dökülmesi



Şekil 3.11. Donmuş jelin elektroferoz küvetine alınması ve TE Buffer eklenmesi



Şekil 3.12. Jel içerisindeki tarak boşluklarına yürütme solüsyonu ile boyanmış örneklerin verilmesi



Şekil 3.13. Elektroferez düzeneğinin güç kaynağına bağlanması

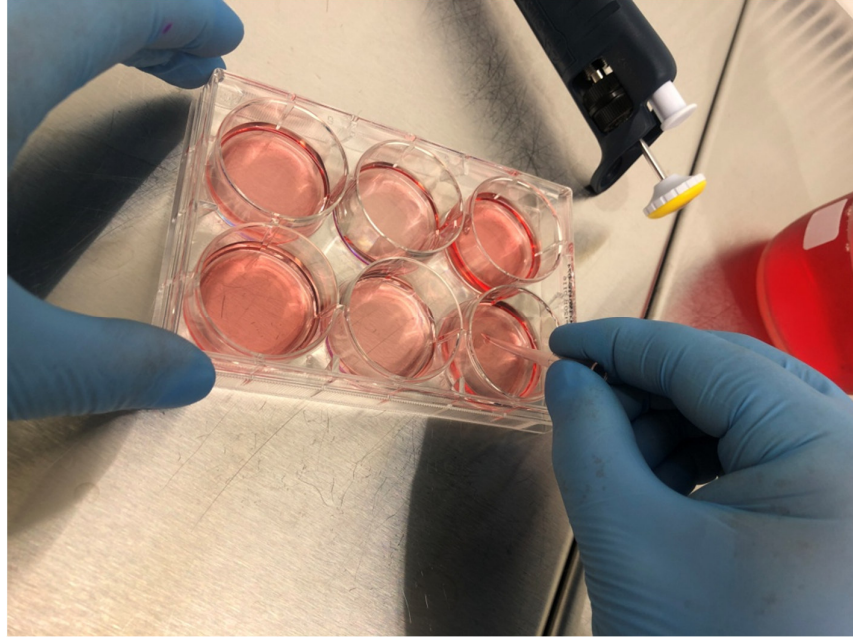
3.1.12. Wound Healing Deneyi

İn-vitro koşullarda hücre proliferasyonu ve hücre migrasyonunu değerlendirmek için wound healing (yara iyileşmesi ve hücre göçü) deneyi yapılmıştır. Wound healing deneyi prensipte tam konfluens (monolayer) hale getirilen hücre tabakasında ölçülebilen alanda mikro bir yara oluşturmak ve sonrasında hücrelerin bu alana olan migrasyonları ve proliferasyonları neticesinde yara alanının kapanması esasına dayanmaktadır (Keese, Wegener, Walker, & Giaever, 2004; Rodriguez, Wu, & Guan, 2005). Wound healing deneyi doğası gereği adhezyon göstermeyen hücrelerle yapılamadığından bu deney çalışmamızda sadece MRC-5 hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir. Deney şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

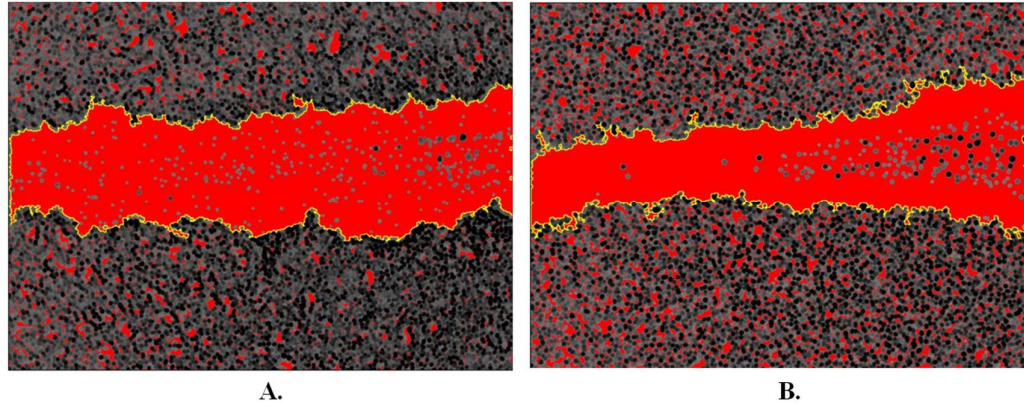
- MRC-5 hücre hattı D-MEM içeren %10 FBS'li vasatta tam konfluens gösterene kadar 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂'li inkübasyon ortamında inkübe edilmişlerdir.
- Hücreler tam konfluens gösterip monolayer haline gelince tripsinizasyon işlemine tabi tutularak bulundukları flask tabanından ayrılmışlardır.
- T25'lik flasktan alınan sağlıklı hücreler tripsinden arındırıldıktan sonra 6 kuyucuklu hücre pleytlerine her bir kuyucukta 1x10⁶ adet hücre yoğunluğu olacak şekilde transfer edilmişlerdir (Şekil 3.14).
- 6 kuyucuklu hücre pleytlerine hücreler ekildikten sonra 24 saat süresince D-MEM içeren % 10FBS li vasatta 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂'li inkübasyon ortamında inkübe edilmişlerdir.
- 24 saatin sonunda kültür ortamındaki vasattan kaynaklanan büyüme ve göç sinyallerini önlemek için serumsuz vasat kullanılarak hücrelerin vasatı değiştirilmiş ve ortam in-quiescence (hücre kültüründe hücrenin serumsuz vasatta tutularak büyüme hızının düşürülmesi, sakinleştirilmesi) hale getirilmiştir.
- 200 µl hacimli otomatik pipet ucu kullanılarak her bir kuyucuğun tabanından düz bir çizgi boyunca hafifçe bastırarak monolayer yaralanmıştır (Şekil 3.15).
- Yaralanma sonucunda hasar gören ve ortamda tutunamadan kalan hücrelerin uzaklaştırılması için pleyt kuyucukları serumsuz D-MEM ile yıkanmıştır.
- Pleyt kuyucuklarına tekrardan serumsuz D-MEM eklenmiş ve hücre monolayerindeki yaralanma düzeyini tespit için hücreler invert mikroskop altında 10X büyütme kullanılarak fotoğraflanmışlardır.
- Serumsuz vasatta yer alan hücrelerin üzerine deney gruplarına göre ilaçlar farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır.
- İlaç uygulanmasını takiben hücreler tekrardan 24 saat süresince 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂'li inkübasyon ortamında inkübe edilmişlerdir.
- Son inkübasyonun ardından hücreler ikinci kez invert mikroskop altında 10X büyütme kullanılarak fotoğraflanmışlardır.
- Image J programı yardımıyla her iki fotoğraftaki yaralı saha plot edilmiş ve plotlanan sahaların yüzey alanları piksel biriminden hesaplanmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.14. Wound healing deneyinde kullanılan 6 kuyucuklu hücre pleytleri



Şekil 3.15. Mikropipet ucu kullanılarak monolayerde hücre yaralanması oluşturulması



Şekil 3.16. Hücresel yara iyileşmesi fotosu (A. ilaç uygulaması öncesi oluşturulan hücre yarası, B. ilaç uygulaması sonrası hücre yarası, Kırmızı alanlar; hücre içermeyen yaralı saha, Sarı çizgi; yara sınırı, Siyah-gri alanlar; hücre monolayeri)

3.2.İN-VİVO DENEYLER

İn-vivo çalışmalar, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri yerel Etik Kurulu'nun 26.01.2017 tarih ve 09 nolu kararı çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinde yapılmıştır. Çalışmada 48 adet Balb-C fare kullanılmıştır. Fareler her grupta 8 hayvan olacak şekilde 6 gruba ayrılarak çalışma yürütülmüştür. Fareler 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyotta tutulmuş olup, yem ve su adlibitum olarak verilmiştir. Çalışma sonrasında kullanılan fareler genel anestezi altında (Ketamin/Ksilazin 200/10 mg/kg i.p.) servikal dislokasyonla sakrifiye edilmişlerdir.

Çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur;

Birinci grup	: Kontrol grubu
İkinci grup	: Vinkristin sülfat grubu
Üçüncü grup	: Paklitaksel grubu
Dördüncü grup	: Mebendazol grubu
Beşinci grup	: Vinkristin sülfat + Mebendazol grubu
Altıncı grup	: Paklitaksel + Mebendazol grubu

3.2.1. Ehrlich Asites Tümörü Oluşturulması

Ehrlich Asites tümörü Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ABD laboratuvarında oluşturulmuştur. Bu amaçla, kriovial içeriğinde bulunan Ehrlich tümörü hücreleri çözündürülerek canlılıkları Tripa Blue boyama ile kontrol edildikten sonra her bir fare için 2×10^6 adet hücre fareye intraperitoneal enjekte edilmiştir (Şekil 3.17). Enjeksiyon yapılan hayvanlar uygun koşullarda laboratuvarımıza nakledildikten sonra farelerde asites oluşuncaya kadar gözlenmişlerdir. İntraperitoneal enjeksiyonu takiben 10. günde farelerde asites oluşumu gözlenmiş (Şekil 3.18) ve bu hayvanların periton sıvıları aseptik koşullarda alınmıştır (Şekil 3.19).

Asites oluşumu gözlenen farelerin karın iç basıncı artışı ve solunum güçlüğü sebebiyle ölme ihtimallerine karşılık asitesli hayvanlardan çekilen asit sıvısından 0,2 ml sağlıklı farelere yeniden ip olarak verilerek asitesli stok hayvan oluşturma aşaması sürdürülmüştür.

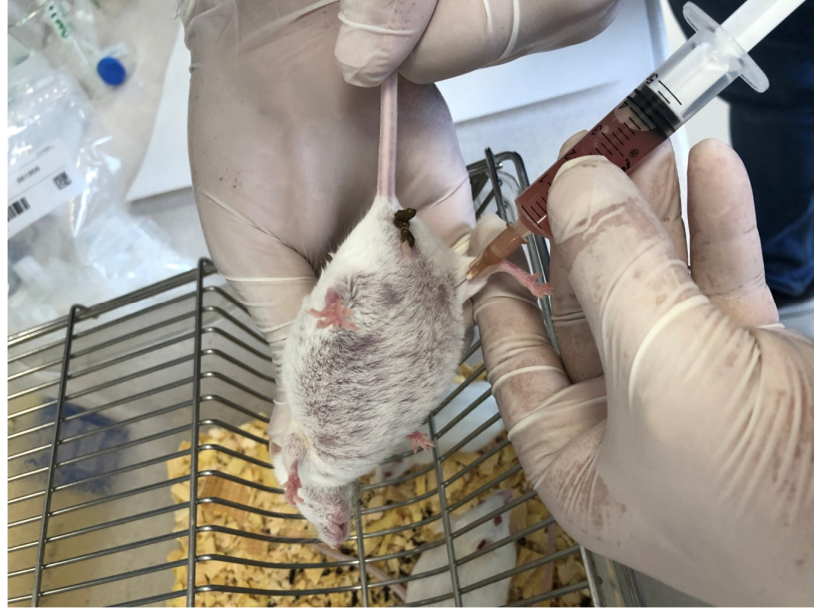
Hücreleri muhafaza etmek için, asites sıvısı içeriğinde yer alan Ehrlich tümörü hücrelerini asites sıvısından ayırmak için hücreler 5000 rpm'de 3 dakika santrifüje edilmişlerdir. Santrifüj işlemi sonrasında oluşan süpernatant atılmış ve ekarte edilen süpernatant kadar %10 DMSO içeren D-MEM eklenmiştir. Çalışma emniyeti ve hücre devamını sağlamak için elde edilen hücreler MRC-5 hücrelerinde kullanılan hücre dondurma prosedürüne uygun olarak dondurulmuş ve -80°C krio sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.17. Deney faresine ip enjeksiyonla EAT hücresi inokülasyonu yapılması



Şekil 3.18. EAT inokülasyonu sonrası asites gelişmiş EAT'li deney faresi



Şekil 3.19. Stok oluşturulmuş EAT'li deney faresinden asites sıvısıyla birlikte tümör hücrelerinin alınması

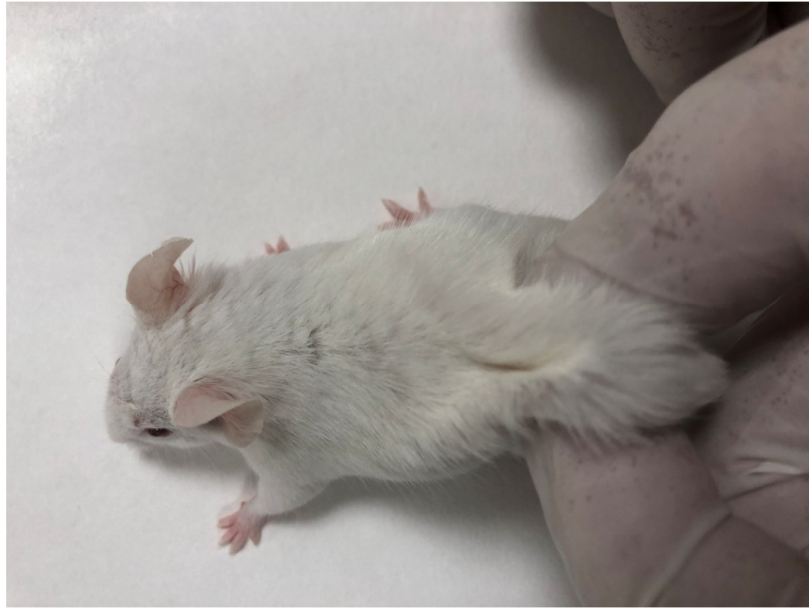
3.2.2.Solid Ehrlich Tümörü Oluşturulması

Denek hayvanın asites derecesine göre asites sıvısındaki Ehrlich tümörü hücresi değişkenlik gösterdiği için; deney farelerinden çekilen asites sıvısının fareden çekilmesini takiben katlı dilüsyonlarıyla thoma lamı yardımı ile hücre sayımı yapılmıştır. Solid kitle oluşturmak için her bir deney faresine 200 µl içerisinde 2×10^5 adet Ehrlich tümörü hücresi farenin sol dorsolateral bel bölgesine deri altı enjekte edilmiştir (Şekil 3.20).

Deri altı enjeksiyonu takip eden günlerde solid kitle oluşumu bakımından deney fareleri gözlemlenmiş ve 8-10. günler arasında solid Ehrlich Carcinoma oluşumu kaydedilmiştir (Şekil 3.21). SEC oluşumu bu günlerde tespit edilir edilmez oluşan SEC en uzun ve en kısa çapları wernier kaliperi yardımıyla ölçülerek kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.20. Deri altı EAT hücresi enjekte edilen deney faresinde gelişen SEC kitlesi



Şekil 3.21. EAT enjekte edilen SEC'li hayvanda palpe edilebilir kitlenin görünümü

3.2.3. SEC’li Deney Hayvanlarında İlaç Denemeleri ve Ölçümlerin Yapılması

Solid Ehrlich karsinoma kitlesi oluşturulmuş deney hayvanlarında ilaç uygulamalarına ilişkin, kullanılan deney hayvanı sayıları, oluşturulan gruplar, uygulanan ilaç dozları ve uygulama şekilleri Tablo 3.1.’de verilmiştir.

Fare meme karsinomu kullanılarak yapılan bir çalışmada vinkristinin fare dozunun 0,5 ile 1,0 mg/kg dozları arasında terapötik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Vaage, Donovan, Mayhew, Uster, & Woodle, 1993). Yine deney fareleri üzerinde vinkristin uygulanarak yapılan ayrı bir çalışmada toksisitenin minimal olduğu ve antikanser etkilerin devam ettirildiği doz olarak 0,5 mg/kg vinkristin dozu belirtilmiştir (Parthasarathi, Udupa, Umadevi, & Pillai, 1994). Vinkristinin farelerde trombositler üzerinde oluşturduğu etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada 0,2 mg/kg’dan 3.2 mg/kg farklı konsantrasyonlarda vinkristin uygulaması yapılmış ve terapötik dozun 0,4 mg/kg olması gerektiği ve artan dozlarla bu doz arasında oluşturulan etki bakımından farklılık bulunmadığının anlaşıldığı bildirilmiştir (Rak, 1972). Vinkristin farmakokinetiği ile ilgili bir araştırmada da vinkrsitin uygulanma dozu olarak tek bir doz olarak 0,5 mg/kg doz uygulamasına yer verilmiştir (Behan, Avramis, Yun, Louie, & Mittelman, 2010).

Vinkristinin fareler üzerindeki toksik dozları hakkında kesin bir değer bulunmamakla birlikte yapılan çalışmalarda farelerde vinkristinin LD50 dozu 2,5-2,8 mg/kg ve LD100 dozunun da 3,2-4.0 mg/kg olduğu yapılan farklı araştırmalarla ortaya konulmuştur (Allen, Newman, Woodle, Mayhew, & Uster, 1995; Kanter et al., 1994; Parthasarathi et al., 1994; Rak, 1972). Tüm bu bulgular ışığında vinkristin uygulama dozu çalışmamızda 0,5 mg/kg olarak kullanılmıştır.

Paklitaksel gibi toksisitesi yüksek antineoplasitik ajanların kemoterapide kullanılmasında uygulanacak olan doz temelde ilacın toksisitesi ile yakından ilgilidir. Bu sebeple bu tür antineoplasitik ajanlar ile yapılan klasik kanser kemoterapilerinde hastaya verilecek ilacın hasta tarafından maksimum tolere edilebilir dozu uygulanmaktadır (Sevko et al., 2012). Paklitakselin farelerde antikanser etkilerinin araştırıldığı ve prostat kanseri modelinin kullanıldığı bir çalışmada paklitakselin farklı dozları uygulanmış ve paklitakselin minimal etkinlik gösterdiği dozun 4 mg/kg olduğu, tedavi edici normal dozunun ise 20 mg/kg olduğu belirtilmiştir (He et al., 2011). Kim ve ark. (2001), tarafından da paklitakselin farelerde maksimum tolere edilebilir dozunun 20

mg/kg olduğu bildirilmiştir (Kim et al., 2001). Anjiyogenezin baskılanmasında paklitakselin etkinliğinin değerlendirildiği başka bir araştırmada da paklitaksel 5 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve farelerde günlük uygulamada maksimum tolere edilebilir dozun 6mg/kg olduğu ifade edilmiştir (Klauber, Parangi, Flynn, Hamel, & D'Amato, 1997). Paklitakselin haftalık uygulamada verilebilecek dozu, Galmarini ve ark. (2007), tarafından 30mg/kg olarak raporlanmıştır (Galmarini et al., 2007). Bu çalışmada oluşturulan SEC'li deney farelerine haftalık olarak 20 mg/kg paklitaksel intra peritoneal olarak verilmiştir. Kanser modeli oluşturulan deney farelerinin kullanıldığı bir başka çalışmada ise haftalık ip enjeksiyonlar halinde deney farelerine 3 hafta boyunca 1 mg/kg konsantrasyonda ip uygulama yapılmıştır (Sevko et al., 2013).

Çalışmamızda SEC oluşturulan deney farelerinde mebendazol oro-gastrik sonda kullanılarak gavaj olarak verilmiştir. Mebendazolün oral yola verildiğinde suda çözünürlüğü zayıf olması sebebiyle, emilimi ve biyoyararlanımı düşük olduğundan bitkisel yağlarla çözündürülmesi durumunda biyoyararlanımı artmaktadır. Mebendazolün oral biyoyararlanımını artırmak için yapılan çalışmalarda mebendazol sıklıkla PBS (Phosfat Buffer Solution) ve susam yağında çözündürülmektedir (Bai et al., 2011; K. Sawanyawisuth, T. Williamson, S. Wongkham, & G. J. Riggins, 2014). Farelerde mebendazolün oral dozu 5 mg/kg ile 50 mg/kg arasında uygulanabilmektedir (Bai et al., 2015; Heath, Christie, & Chevis, 1975; Terada, Kino, Akyol, & Sano, 1993). Mebendazolün 5 mg/kg konsantrasyonda uygulanması durumunda da terapötik etkilerin elde edildiği ancak ilaca direncin bu konsantrasyonda hızlıca geliştiği ancak 50 mg/kg konsantrasyondaki mebendazol dozuna karşı direnç gelişse dahi tedavi etkinliğinin sağlandığından dolayı (McCracken, 1978) çalışmalarımızda mebendazol dozu oral gavaj şeklinde ve günlük 50 mg/kg konsantrasyonda uygulanmıştır.

Tablo 3.1. İn-vivo çalışma grupları ve ilaç uygulamaları

Grup	Kullanılan denek cinsi ve sayısı	İn-vivo ilaç uygulaması
1	8 adet fare	Kontrol grubu, günlük peros yoldan 50 mg/kg konsantrasyonda serum fizyolojik uygulaması
2	8 adet fare	İntraperitoneal 0,5 mg/kg konsantrasyonda Vinkristin Sülfat 3 Hafta süresince haftada tek ip enjeksiyon
3	8 adet fare	İntraperitoneal 20 mg/kg konsantrasyonda Paklitaksel 3 Hafta süresince haftada tek ip enjeksiyon
4	8 adet fare	Peros yoldan 50 mg/kg konsantrasyondan Mebendazol 3 hafta boyunca günlük uygulama
5	8 adet fare	İntraperitoneal 0,5 mg/kg konsantrasyonda Vinkristin Sülfat. 3 Hafta süresince haftada tek ip enjeksiyon + Peros yoldan 50 mg/kg konsantrasyonda Mebendazol 3 hafta boyunca günlük uygulama
6	8 adet fare	İntra peritoneal 20 mg/kg konsantrasyonda Paklitaksel. 3 Hafta süresince haftada tek ip enjeksiyon + Peros yoldan 50 mg/kg konsantrasyonda Mebendazol 3 hfata boyunca günlük uygulama

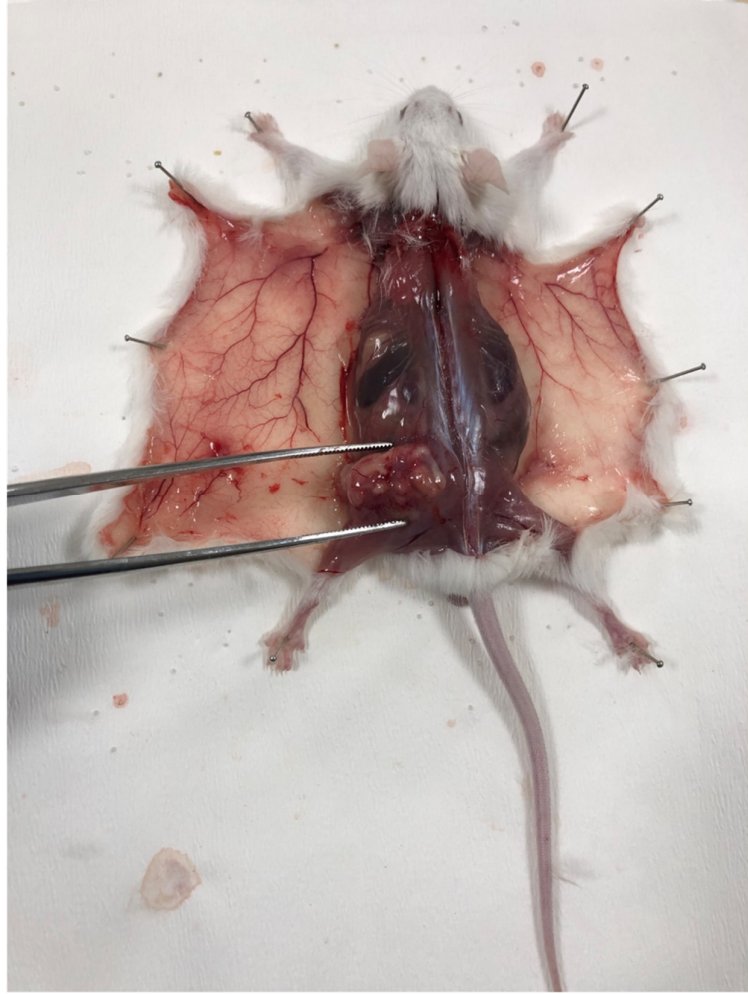
İlaç uygulamaları esnasında SEC kitlesinin hacmi wernier kaliperi yardımı ile ölçümlenmiştir (Şekil 3.22). Bu ölçümler elle palpe edilebilen SEC kitlesinin ölçülebilen en uzun çapı ve en kısa çapının milimetre (mm) biriminden tayin edilmesi

esasına göre yapılmıştır. Bu esasa göre; ölçülebilen en kısa çap “a”, ölçülebilen en uzun çap “b” olarak ifade edilmek suretiyle; dışarıdan yapılan bu ölçümlerle SEC kanserli doku izafi hacmi $\text{mm}^3 = (a^2 \times b)/2$ eşitliğine dayandırılarak sayısallaştırılmıştır (Doudican et al., 2013; Martarelli et al., 2008).

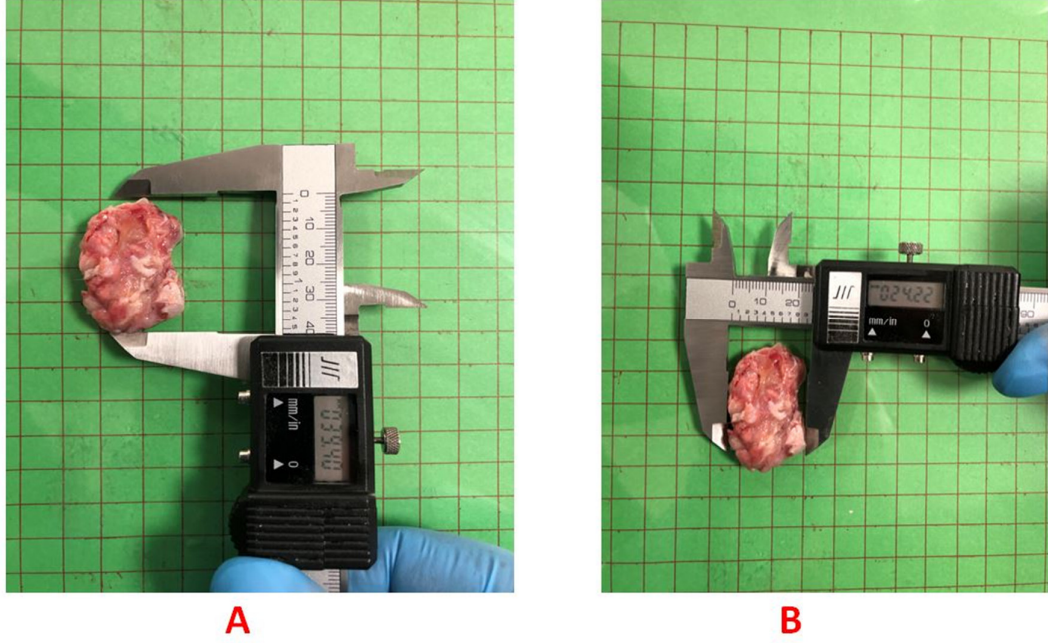


Şekil 3.22. SEC’li deney faresinin kanserli dokusunun wernier kaliper ile dıştan ölçümü

SEC kitlesi oluşturulan ve ilaç denemeleri tamamlanan deney fareleri çalışma sonunda anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmişlerdir. Sakrifiye edilen hayvanların öncelikle bel bölgesini kaplayan derileri ve deri altı dokuları uzaklaştırılarak Solid Ehrlich Carcinoma kitleleri cerrahi operasyonla çıkarılmışlardır (Şekil 3.23). Sağlıklı doku lehine olacak şekilde çıkarılan SEC kitleleri kanserli doku hacmini hesaplayarak sayısal veri haline dönüştürülmek için kaliper ile en kısa ve en uzun çapından ölçülmüştür (Şekil 3.24).



Şekil 3.23. SEC’li deney faresinden cerrahi operasyonla kanserli dokunun çıkarılması



Şekil 3.24. Deney faresinden çıkarılan SEC dokusunun ölçümü yapılabilen en uzun çapı (A) ve en kısa çapının (B) wernier kaliperi yardımıyla ölçülmesi

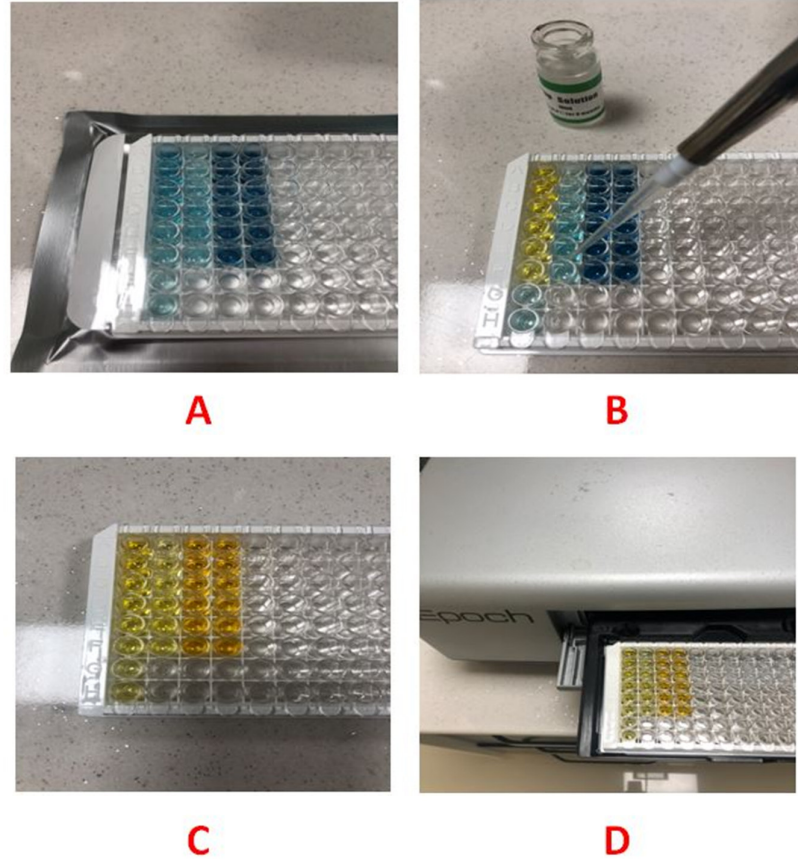
3.2.4. Kanserli Dokularda Doku Hemogloblin Düzeyinin Tayin Edilmesi

Kanserli deney farelerinden çıkarılan solid kitlelerdeki hemogloblin düzeylerini tespit etmek için doku hemogloblin deneyi yapılmıştır. ELISA metodu ile gerçekleştirilen bu deney için EIAaB firmasının ticari satışa sunulan ve katalog numarası M1402e olan fare doku hemogloblin eliza deney kiti kullanılmıştır. Deney prosedürü olarak kullanılan işlem basamakları maddeler halinde sırasıyla aşağıda verilmiştir.

- Denek farelerden operasyonla çıkarılan SEC kanserli dokular alınır alınmaz PBS ile yıkanarak yüzeylerindeki kandan temizlenmişlerdir.
- Yüzeysel kandan temizlenen dokular hassas terazi ile tartılmış ve her bir kanserli dokudan 1 gr ağırlığında doku kitlesi bisturi vasıtasıyla çıkarılmıştır.
- Kanserli dokudan çıkarılan birer gramlık kanserli kitleler yeniden PBS ile yıkama işleminden geçirilerek dokunun tüm yüzeyi bir kez daha kandan temizlenmiştir.
- Temizlenen dokular vida kapaklı viallere konulmuş ve üzerlerine 1 ml PBS eklenmiştir.

- PBS içerisinde yer alan doku parçaları doku homojenizatörü (Heidolph Comfort M Tissue Homogenisator) ile parçalanarak doku homojenatı elde edilmiştir.
- Elde edilen doku homojenatı 24 saat boyunca -20°C sıcaklıkta tutulmuştur.
- -20°C sıcaklıkta dondurulan doku homojenatı oda ısısında çözündürülmüş ve yeniden -20°C sıcaklıkta dondurulmuştur. Bu şekilde gerçekleştirilen 2 dondurma ve çözünme işlemi ile hücresel membranların parçalanması sağlanmıştır.
- 2 kez dondurulup çözülen doku homojenatı 5000 g'de 5 dakika santrifüje alınarak elde edilen süpernatant deneyde kullanılmıştır.
- Deney prosedürü kapsamında öncelikle deneyde kullanılan çözelti ve solüsyonlar hazırlanmıştır. Bu çerçevede yıkama tamponu, çalışma solüsyonu A, çalışma solüsyonu B ve standart olarak hemoglobin seri dilüsyonları hazırlanmıştır.
- Deney kiti içeriğinde yer alan ve tabanında hemoglobin antikoru bulunan 96 kuyucuklu elisa pleytinin her bir kuyucuğuna 100 μl hemoglobin seri dilüsyonlarından, doku homojenatlarından (3 paralel halinde) ve kör okuma için PBS eklenmiştir.
- Hazırlanan elisa pleyti pleyt sealer ile kaplanmış ve 37°C sıcaklıkta 2 saat inkübasyona alınmıştır.
- Inkübasyon sonrasında pleyt yıkama işlemi yapılmadan boşaltılmış ve her bir kuyucuğa önceden hazırlanan çalışma solüsyonu A (working detection reagent A) 100 μl eklenmiş ve yeniden pleyt sealer ile kaplanarak 37°C sıcaklıkta 1 saat inkübasyona alınmıştır.
- Her bir kuyucuk içeriği boşaltılmış ve 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben pleytin kuruması için pleyt ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde 1-2 dakika bekletilmiştir.
- Kurutma sonrasında pleyt yıkama işlemi yapılmadan boşaltılmış ve her bir kuyucuğa önceden hazırlanan çalışma solüsyonu B (working detection reagent B) 100 μl eklenmiş ve yeniden plet sealer ile kaplanarak 37°C sıcaklıkta 1 saat inkübasyona alınmıştır.

- Yeniden her bir kuyucuk içeriği boşaltılmış ve 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben pleytin kuruması için pleyt ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde 1-2 dakika bekletilmiştir.
- Her bir kuyucuğa 90 µl substrat solüsyonu eklenerek pleyt sealer ile pleytin yüzeyi kaplanmıştır. Bu aşamada pleytin ışık ile temasını engellemek için pleyt alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu şekilde pleyt 20 dakika süresince 37 °C de inkübatörde bekletilmiştir.
- Son inkübasyonu takiben kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiş ve pleyt nazıkçe çalkalanmıştır.
- Pleyt elisa reader cihazında (EPOCH elisa reader, yazılım GEN5.0) 450 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülerek okunmuştur (Şekil 3.25).
- Elde edilen absorbanslar seri dilüsyonları yapılan hemoglobin düzeylerinin absorbansları ile elde edilen standart konsantrasyon eğrisine göre ng/ml cinsinden hemoglobin konsantrasyonu olarak sonuçlandırılmıştır.
-



Şekil 3.25. Doku hemoglobin düzeyinin belirlenmesi (A: çalışma solüsyonları ve substrat eklenmiş plet, B: durdurma solüsyonunun eklenmesi, C: deney sonunda pletin görünümü, D: pletin elisa reader cihazı ile okutulması)

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Yapılan deneylerden elde edilen verilerin istatistiksel olarak irdelenmesi için IBM SPSS (Version 25) paket bilgisayar programı kullanılmıştır. MTT, apoptotik DNA analizleri ve kaspaz düzeylerinin analiz sonuçları tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) ile test edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde ise Games-Howell testi kullanılmıştır. Antemortem ve postmortem kanserli doku kitlesi hacmi analizlerinden elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilirken gruplar arasındaki farkı belirlemek için Tukey testi kullanılmıştır. Yara iyileşmesi ve doku hemoglobin deneylerinden elde edilen veriler tek örneklem t testi ile belirtilmişlerdir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi Games Howell testi dışındaki tüm analizlerde $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

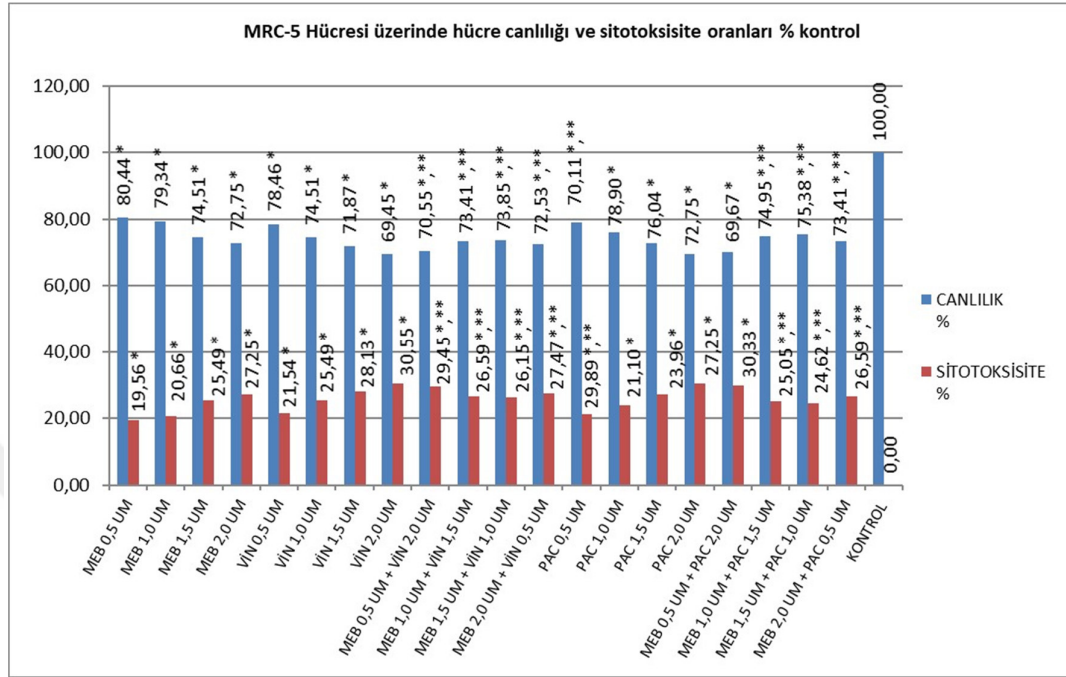
4. BULGULAR

4.1. İN VİTRO Bulgular

4.1.1. Hücre Canlılığı Bulguları

4.1.1.1. MRC-5 Hücresinde Hücre Canlılığı Düzeyleri

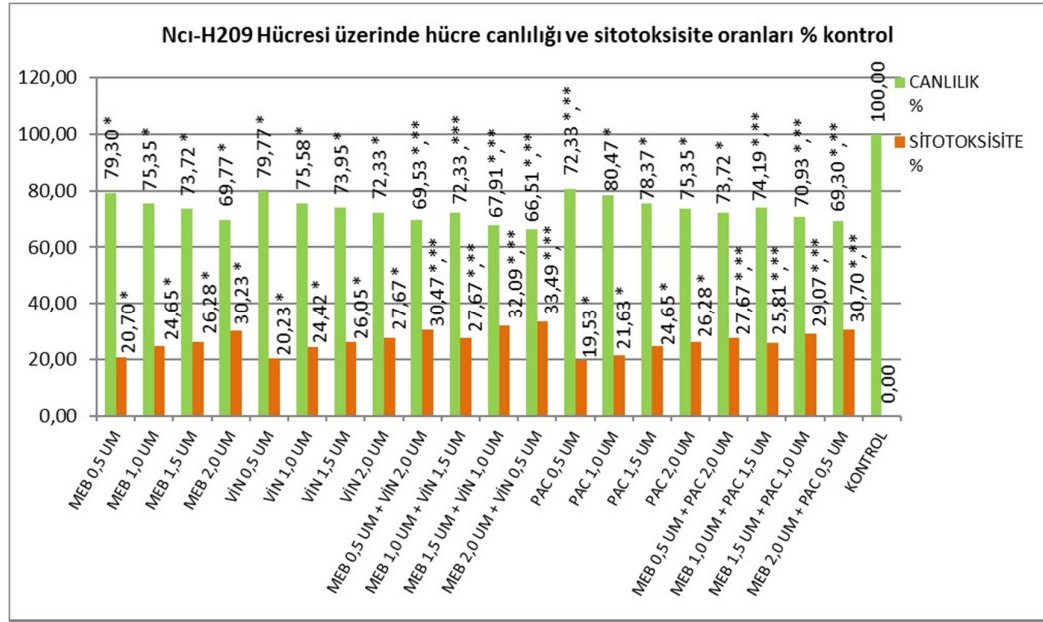
Sağlıklı akciğer fibroblast hücresi üzerinde denenen etken maddelerin sitotoksiteleri ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri her üç etken maddenin tek başlarına ve mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombinasyonları uygulanarak test edildi (Şekil 4.1.). MRC-5 hücresi üzerinde kontrol grubuna kıyasla en düşük oranı sitotoksosite 0,5 µM mebendazol konsantrasyonunda elde edilmiştir ($p<0,05$). En yüksek sitotoksosite oranı ise kontrol grubuna oranla %30,55 lik artışla 2,0 µM konsantrasyonda vinkristin uygulanan grupta kaydedildi ($p<0,05$). Mebendazolün paklitaksel ve vinkristin ile kombine uygulandığı gruplar içerisinde 1 µM mebendazol + 1,5 µM vinkristin kombinasyonu ile 1 µM mebendazol + 1,5 µM paklitaksel kombinasyonlarında grup içerisinde istatistiksel olarak anlamlı ve en fazla düşüş elde edilmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.1. MRC-5 hücresinde hücre canlılığı grafiği (*p<0,05 **p<0,001).

4.1.1.2. NCI-H209 Hücresinde Hücre Canlılığı Düzeyleri

NCI-H209 hücresi üzerinde denenen etken maddelerin sitotoksiteleri ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri her üç etken maddenin tek başlarına ve mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombinasyonları uygulanarak test edildi (Şekil 4.2.). NCI-H209 hücresi üzerinde ilaçların tek başlarına kullanılmaları durumunda, kontrol grubuna kıyasla en düşük sitotoksosite oranı 0,5 μ M vinkristin konsantrasyonunda elde edilmiştir (p<0,05). En yüksek sitotoksosite oranı ise kontrol grubuna oranla 2,0 μ M konsantrasyonda mebendazol uygulanan grupta kaydedildi (p<0,05). Mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda da sitotoksiste oranı istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir. Mebendazolün paklitaksel ve vinkristin ile kombine uygulandığı gruplar içerisinde 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin kombinasyonunda en yüksek sitotoksik değer ölçüldü. İlaç kombinasyonları arasında ise grup içerisinde istatistiksel olarak en anlamlı artış 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin (%13,26 artış) ve 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M paklitaksel (%11,16 artış) kombinasyonlarında ölçülmüştür (p<0,001).

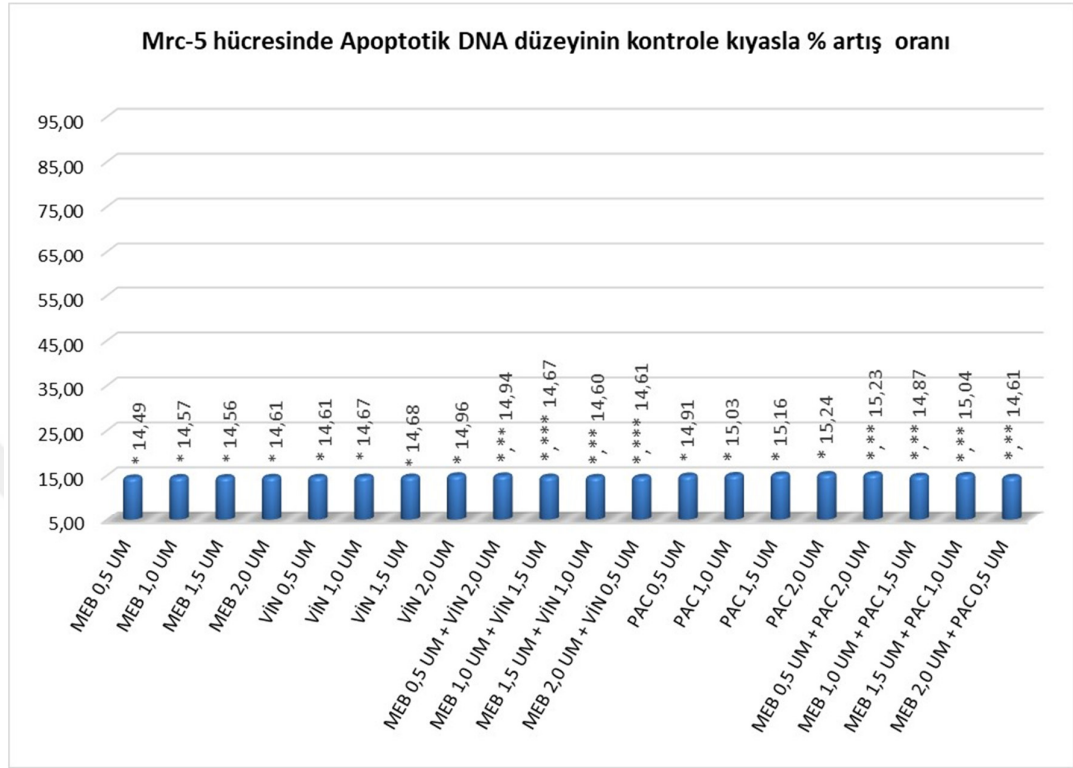


Şekil 4.2. NCI-H209 hücresinde hücre canlılığı grafiği (*p<0,05 **p<0,001).

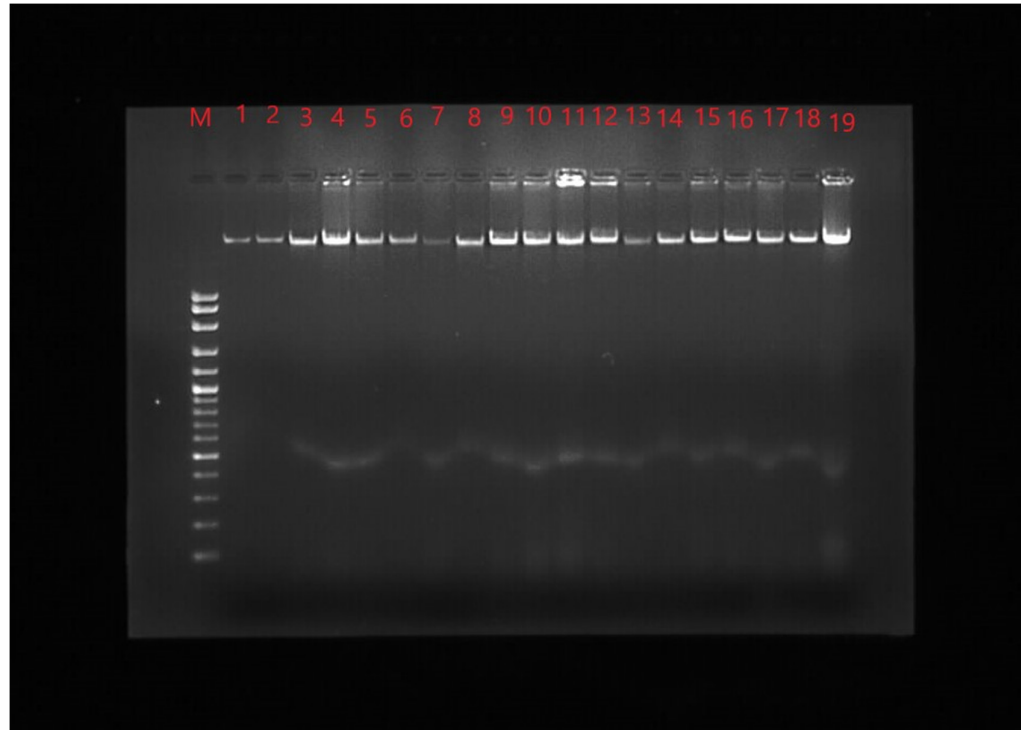
4.1.2. Apoptotik DNA Laddern Bulguları

4.1.2.1. MRC-5 Hücresinde Apoptotik DNA Laddern Bulguları

MRC-5 hücresi üzerinde apoptotik DNA düzeyi artışı kontrol grubuna oranla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.3.). İlaçların tek başlarına ve kombinasyonlar halinde uygulandığı tüm gruplarda kontrol grubuna oranla artış gözlenmiştir ($p<0,05$). İlaçların kombine edildiği grupların arasında 1,0 μ M mebendazol + 1,5 μ M vinkristin ve 2,0 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin gruplarındaki değişim, vinkristinin tek başına uygulandığı dozlarına göre istatistiksel olarak anlamsız olup ($p>0,05$), diğer gruplarda grup içerisindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Gruplar arasında sadece 1,5 μ M mebendazol + 1,0 μ M paklitaksel grubunda elde edilen apoptotik DNA düzeyi paklitakselin aynı dozda uygulandığı gruptan elde edilen değeri aşmıştır. İlaçların kombine olarak uygulandığı diğer gruplarda ise bu değerlerde artış kaydedilmemiştir.



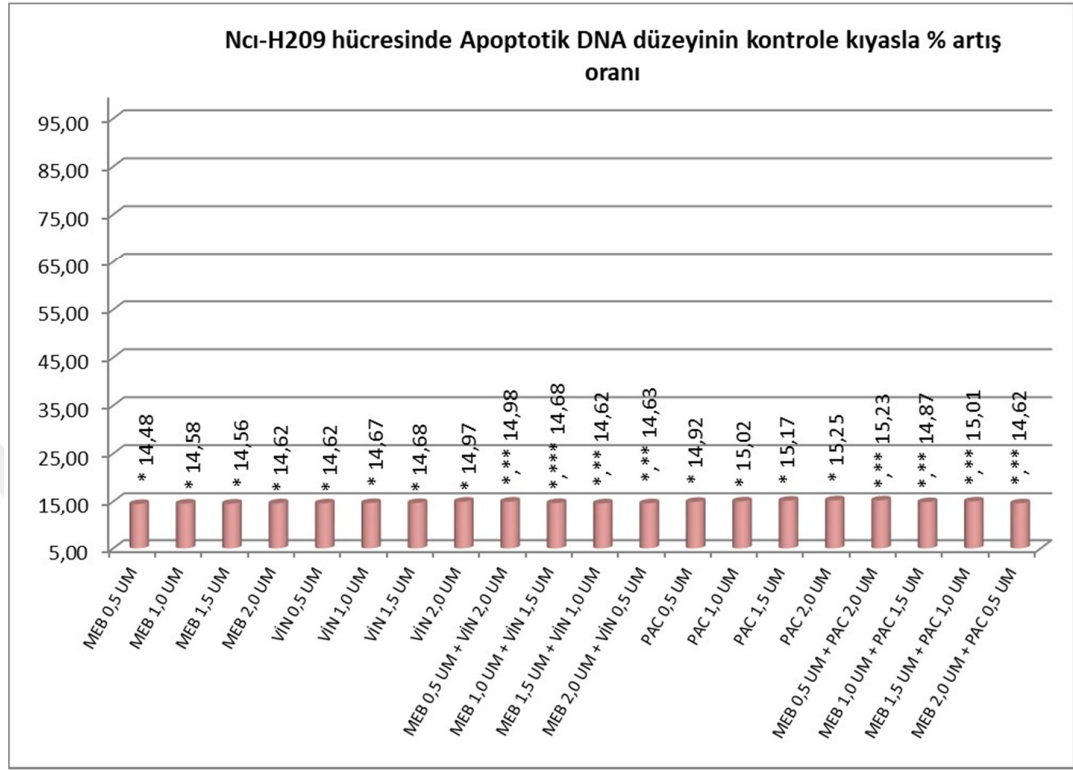
Şekil 4.3. MRC-5 hücresinde apoptotik DNA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla % artış oranı (* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p > 0,05$).



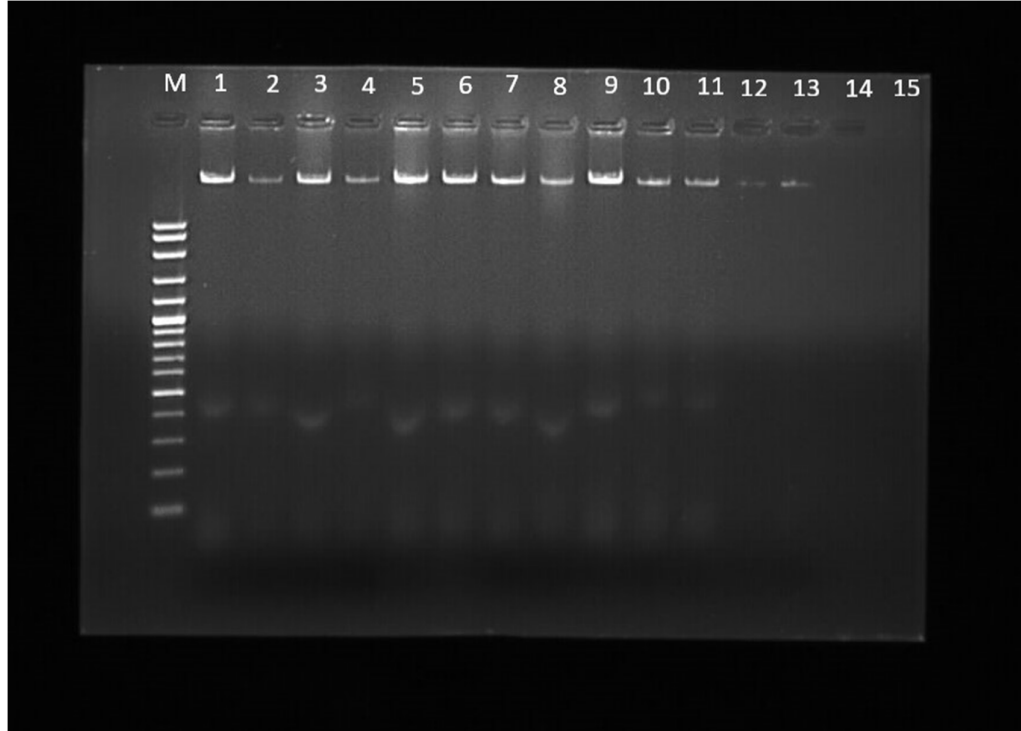
Şekil 4.4. MRC-5 hücresinde apoptotik DNA elektroforez görüntüsü

4.1.2.2. NCI-H209 Hücresinde Apoptotik DNA Laddern Bulguları

NCI-H209 hücresi üzerinde apoptotik DNA düzeyi artışı kontrol grubuna oranla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5.). İlaçların tek başlarına ve kombinasyonlar halinde uygulandığı tüm gruplarda kontrol grubuna oranla artış gözlenmiştir ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubuna oranla %15,25 lik artışla en yüksek artış oranı 2 μ M paklitaksel grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). Mebendazolün paklitaskel ile olan kombinasyonlarından elde edilen sonuçlardaki düzeylerin paklitakselin aynı dozlarının tek başına uygulandığı gruplara göre düşüş gösterdiği ve bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmıştır ($p<0,001$). Mebendazolün vinkristin ile kombine edildiği gruplarda apoptotik DNA düzeyinde vinkristinin aynı konsantrasyonda tek başına uygulandığı gruplara oranla gruplar arasında 0,5 μ M mebendazol + 2 μ M vinkristin, 2,0 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin gruplarında artış elde edilmiştir ($p<0,001$). 1,0 μ M mebendazol + 1,5 μ M vinkristin grubunda ise grup içerisindeki değişimler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).



Şekil 4. 5. NCI-H209 hücresinde apoptotik DNA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla % artış oranı (* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p > 0,05$).

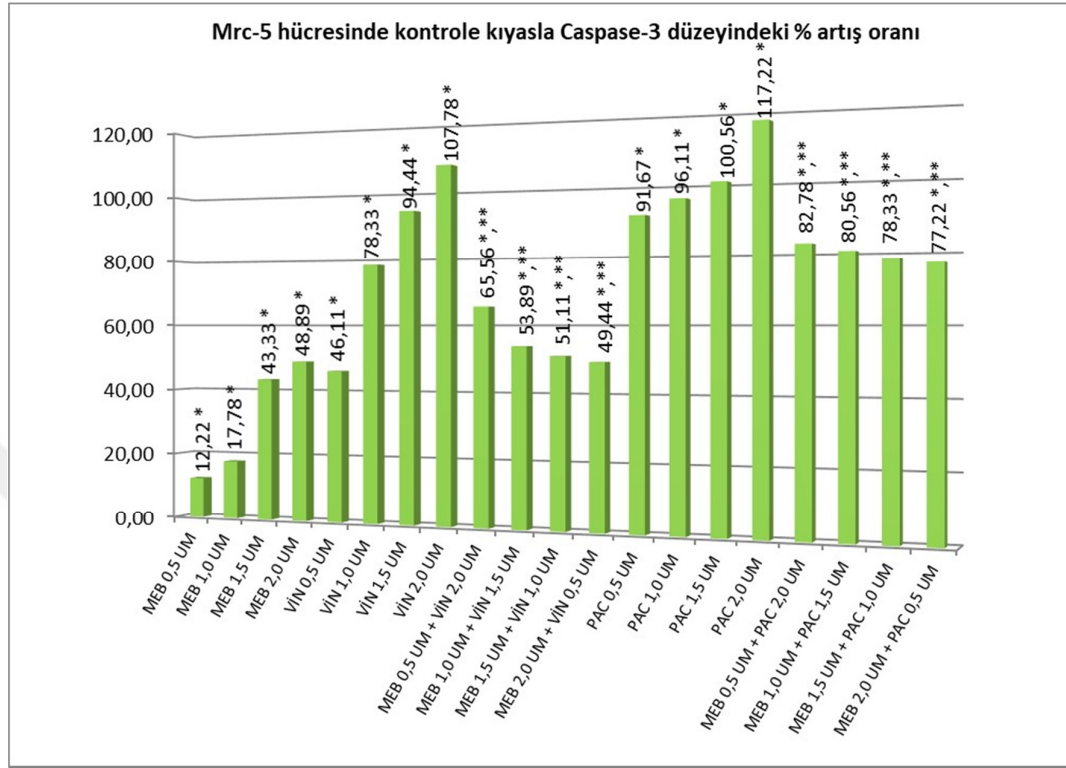


Şekil 4.6. NCI-H209 hücresinde apoptotik DNA elektroforez görüntüsü

4.1.3.Kaspaz (3-8-9) Düzeyi Bulguları

4.1.3.1. MRC-5 Hücresinde Kaspaz-3 Düzeyi Bulguları

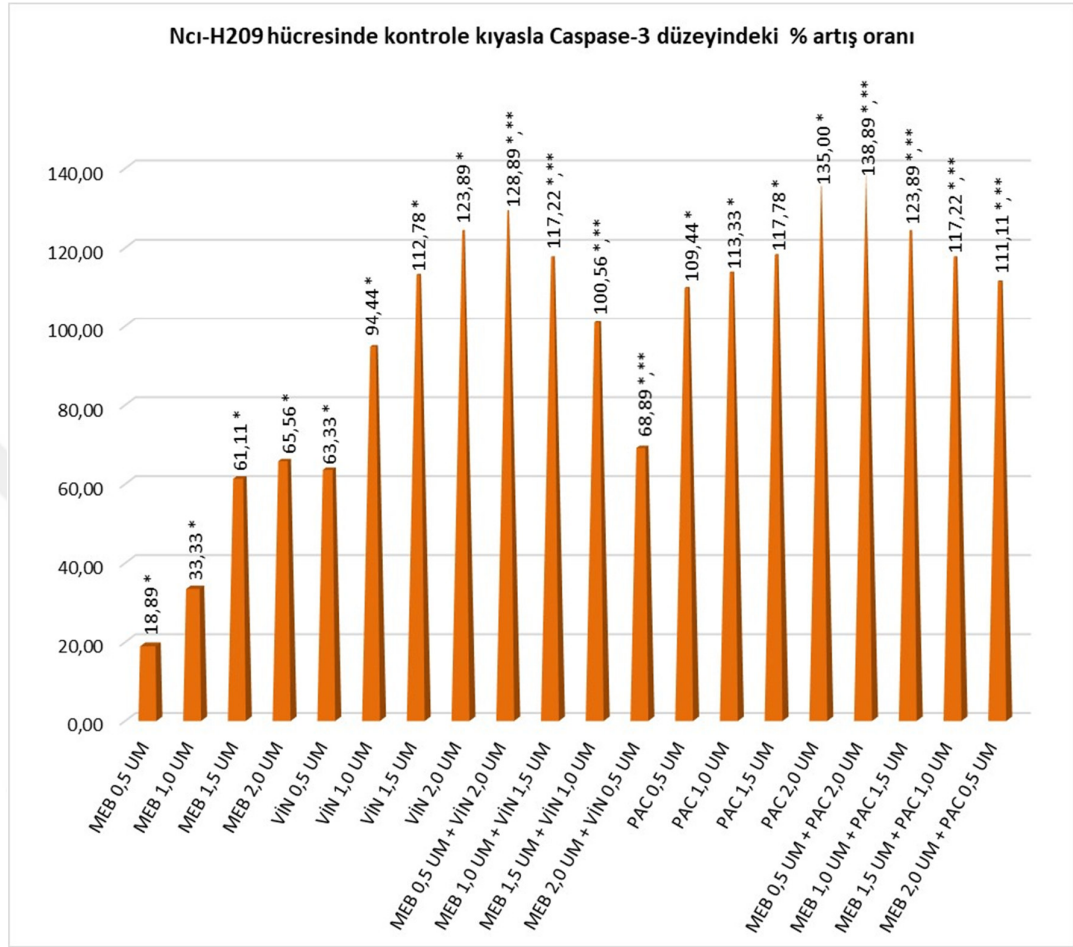
MRC-5 hücresi üzerinde kaspaz-3 düzeyi değişimleri kontrol grubuna oranla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.7.). Kontrol grubuyla kıyaslandığında tüm gruplarda kaspaz-3 düzeyi artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). İstatistiksel olarak kontrol grubuna kıyasla %117,22'lik artışla en yüksek artış oranı 2 μ M paklitaksel grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). İlaç kombinasyonları ile elde edilen kaspaz-3 düzeyleri incelendiğinde ise mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği tüm gruplarda ifade edilen kaspaz-3 düzeyinin paklitaksel ve vinkristinin tek başlarına uygulandıkları gruplardaki kaspaz-3 düzeylerine kıyasla azaldığı kaydedilmiştir ($p<0,001$). Vinkristin ve paklitakselin 2 μ M konsantrasyonlarına 0,5 μ M mebendazolün eklendiği kombinasyon gruplarında vinkristin ve paklitakselin tek başlarına uygulandıkları gruplarda ölçülen kaspaz-3 düzeylerine kıyasla, vinkristin + mebendazol grubunda %42,2 ve paklitaksel + mebendazol grubunda %34,4 oranında düşüş göstermesi dikkat çekicidir ($p<0,001$).



Şekil 4.7. MRC-5 Hücresinde kontrole kıyasla Kaspaz-3 düzeyinin % artış oranı (*p<0,05 **p<0,001).

4.1.3.2. NCI-H209 Hücresinde Kaspaz-3 Düzeyi Bulguları

Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde NCI-H209 hücrelerinde uygulanan tüm ilaç gruplarında kaspaz-3 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiştir (Şekil 4.8.). Gruplar arasında kontrole oranla en yüksek artış 2 μ M paklitaksel grubunda elde edilmiştir (p<0,05). MRC-5 hücresinde elde edilen kaspaz-3 düzeylerinin tam tersine vinkristin ve paklitakselin mebendazol ile kombine edildiği uygulama gruplarında kaspaz-3 düzeyleri tek başına vinkristin ve paklitaksel uygulanan gruplara nazaran yükselmiştir. 1,5 μ M mebendazol + 1 μ M vinkristin kombinasyonunda ve 1 μ M mebendazol + 1,5 μ M paklitaksel kombinasyonundaki artış vinkristinin ve paklitakselin tek başına uygulandığı gruplardan elde edilen en yüksek kaspaz-3 düzeyinden her iki grupta da %6,11 oranında fazla olup bu artış grup içerisinde istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür (p<0,001).

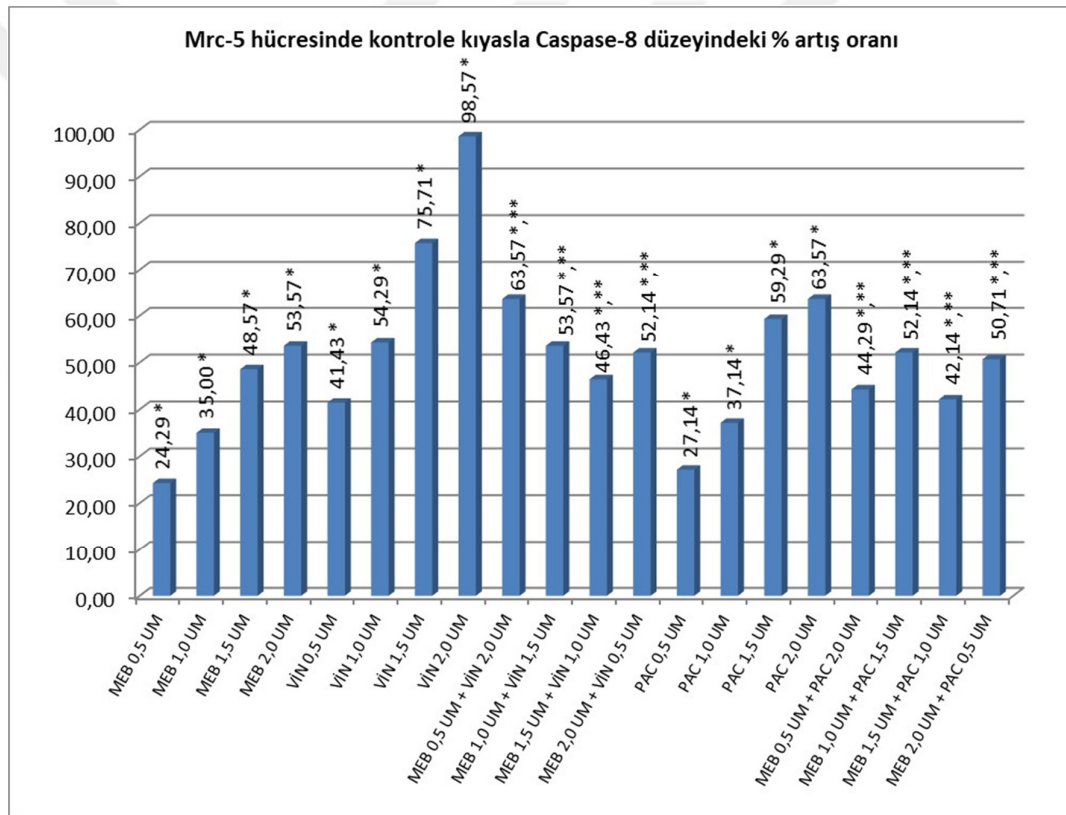


Şekil 4.8. NCI-H209 Hücresinde kontrole kıyasla Kaspaz-3 düzeyindeki % artış (*p<0,05 **p<0,001).

4.1.3.3. MRC-5 Hücresinde Kaspaz-8 Düzeyi Bulguları

MRC-5 hücresi üzerinde kaspaz-8 düzeyi değişimleri kontrol grubuna oranla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.9.). Kontrol grubuyla kıyaslandığında tüm gruplarda kaspaz-8 düzeyi artış oranının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). İstatistiksel olarak %98,57'lik artışla en yüksek artış oranı 2 μ M vinkristin grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). İlaç kombinasyonları ile elde edilen kaspaz-8 düzeyleri incelendiğinde ise mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği tüm gruplarda ölçülen kaspaz-8 düzeyinin paklitaksel ve vinkristinin tek başlarına uygulandıkları gruplardaki kaspaz-8 düzeylerine kıyasla düşüş gösterdiği kaydedilmiştir bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Mebendazolün vinkristin ile kombine edildiği gruplardan 0,5 μ M mebendazol + 2 μ M vinkristin ve 1 μ M

mebendazol + 1,5 2 μ M vinkristin kombinasyonlarında vinkristinin aynı konsantrasyonda tek başına uygulandığı gruplarda ölçülen kaspaz-8 düzeylerine kıyasla %35 ve %22,14 oranında düşüş gözlenmiştir. Mebendazolün paklitaksel ile kombine edildiği gruplardan 0,5 μ M mebendazol + 2 μ M paklitaksel ve 1 μ M mebendazol + 1,5 μ M paklitaksel kombinasyonlarında paklitakselin aynı konsantrasyonda tek başına uygulandığı gruplarda ölçülen kaspaz-8 düzeylerine kıyasla %19,29 ve %7,14 oranında düşüşler gözlenmiştir ($p<0,001$).

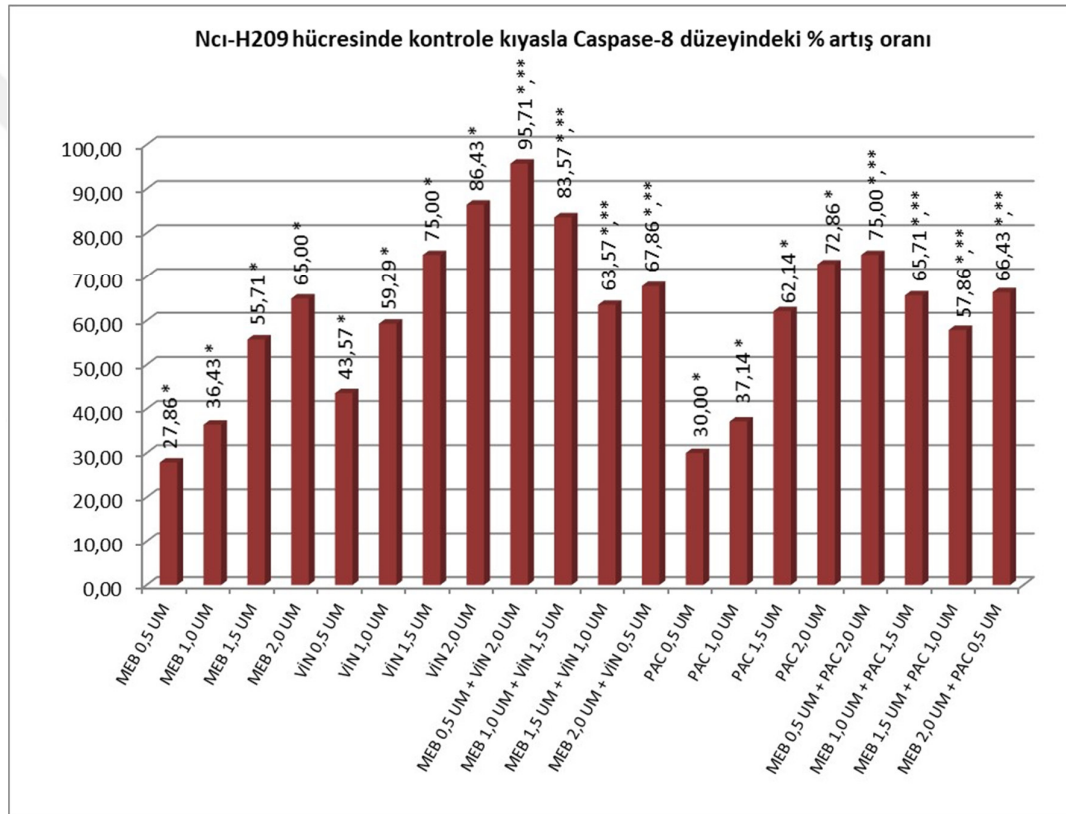


Şekil 4.9. MRC-5 Hücresinde kontrole kıyasla Kaspaz-8 düzeyindeki % artış oranı (* $p<0,05$ ** $p<0,001$).

4.1.3.4. NCI-H209 Hücresinde Kaspaz-8 Düzeyi Bulguları

Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde NCI-H209 hücrelerinde uygulanan tüm ilaç gruplarında kaspaz-8 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiştir (Şekil 4.10.). Gruplar arasında kontrole oranla en yüksek artış 2 μ M konsantrasyonda uygulanan vinkristin gurubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). MRC-5 hücresinde elde edilen kaspaz-8 düzeylerinin tam tersine vinkristin ve paklitakselin mebendazol ile kombine

edildiği tüm uygulama gruplarında kaspaz-8 düzeyleri tek başına vinkristin ve paklitaksel uygulanan gruplara nazaran yükselmiştir ($p<0,001$). İlaçların kombinasyon halinde uygulandığı deney grupları arasında ilaçların tek başlarına verildiği gruplara oranla en yüksek artışlar 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M paklitaksel (%36,43) kombinasyonundan ve 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin (%24,29) kombinasyonunun tatbik edildiği deney gruplarından elde edilmiştir.

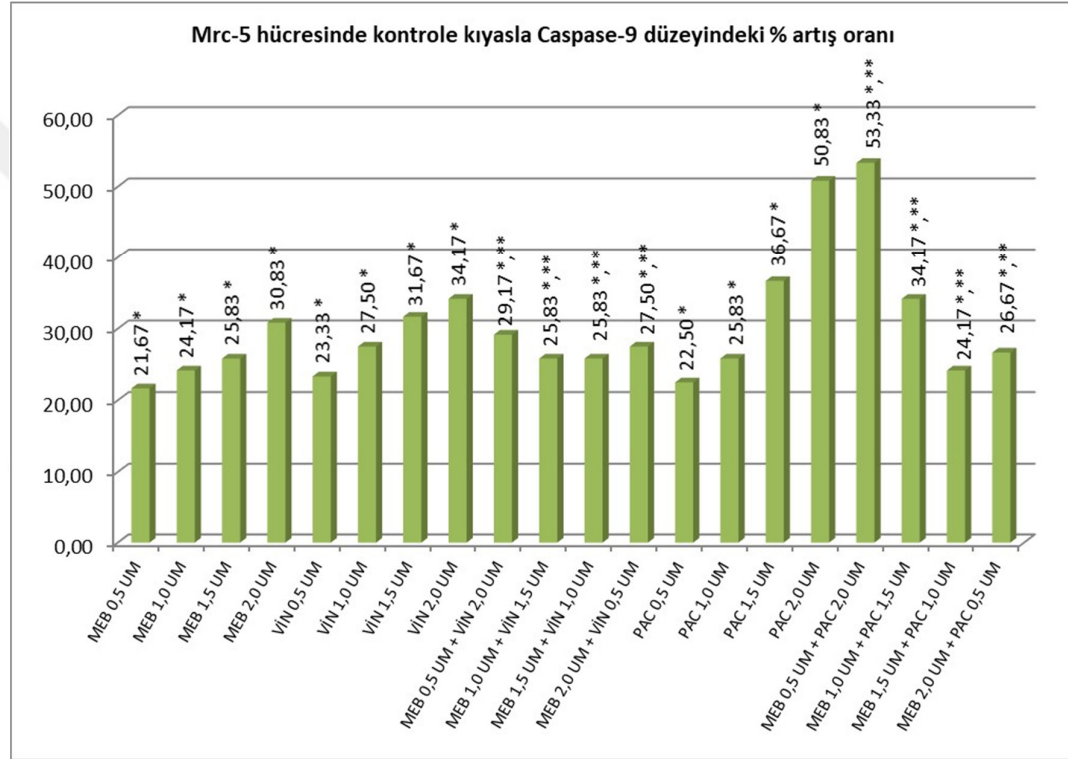


Şekil 4.10. NCI-H209 Hücresinde kontrole kıyasla Kaspaz-8 düzeyindeki % artış oranı (* $p<0,05$ ** $p<0,001$).

4.1.3.5. MRC-5 Hücresinde Kaspaz-9 Düzeyi Bulguları

MRC-5 hücresi üzerinde kaspaz-9 düzeyi değişimleri kontrol grubuna oranla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.11.). Kontrol grubuyla kıyaslandığında tüm gruplarda kaspaz-9 düzeyi artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). İstatistiksel olarak %50,83'lük artışla en yüksek artış oranı 2 μ M paklitaksel grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). İlaç kombinasyonları ile elde edilen kaspaz-9 düzeyleri incelendiğinde ise mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği

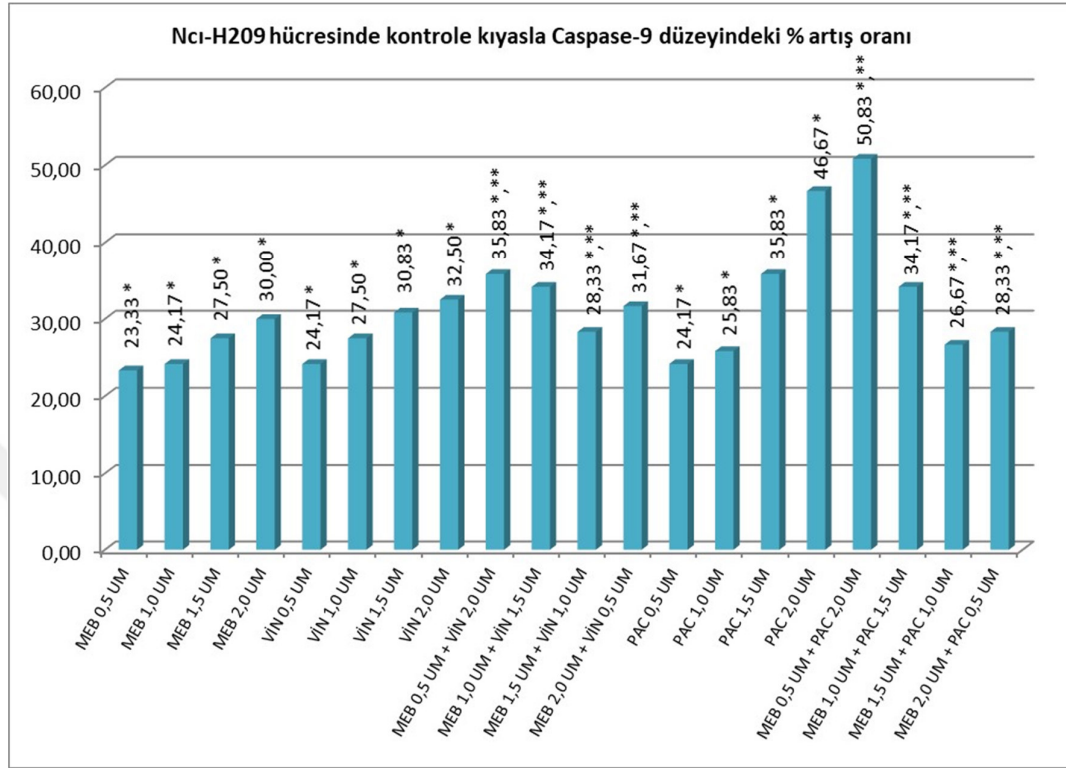
gruplarda elde edilen kaspaz-9 düzeylerinin 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin kombinasyonu dışında paklitaksel ve vinkristinin tek başlarına uygulandıkları gruplardaki kaspaz-9 düzeylerine kıyasla azaldığı kaydedilmiştir ($p<0,001$). Grup içerisinde en önemli azalma %5,83'lük azalma ile 1 μ M mebendazol + 1,5 μ M vinkristin kombinasyonunda elde edilmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.11. MRC-5 Hücresinde kontrole kıyasla Kaspaz-9 düzeyindeki % artış oranı (* $p<0,05$ ** $p<0,001$).

4.1.3.6. NCI-H209 Hücresinde Kaspaz-9 Düzeyi Bulguları

Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde NCI-H209 hücrelerinde uygulanan tüm ilaç gruplarında kaspaz-9 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiştir (Şekil 4.12.). Gruplar arasında kontrole oranla en yüksek artış %46,67'lik oranla 2 μ M paklitaksel grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin kombinasyonundaki artış vinkristinin aynı konsantrasyonda tek başına uygulandığı gruptan elde edilen kaspaz-9 düzeyinden %7,5 oranında fazla olup bu artışın grup içerisinde istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

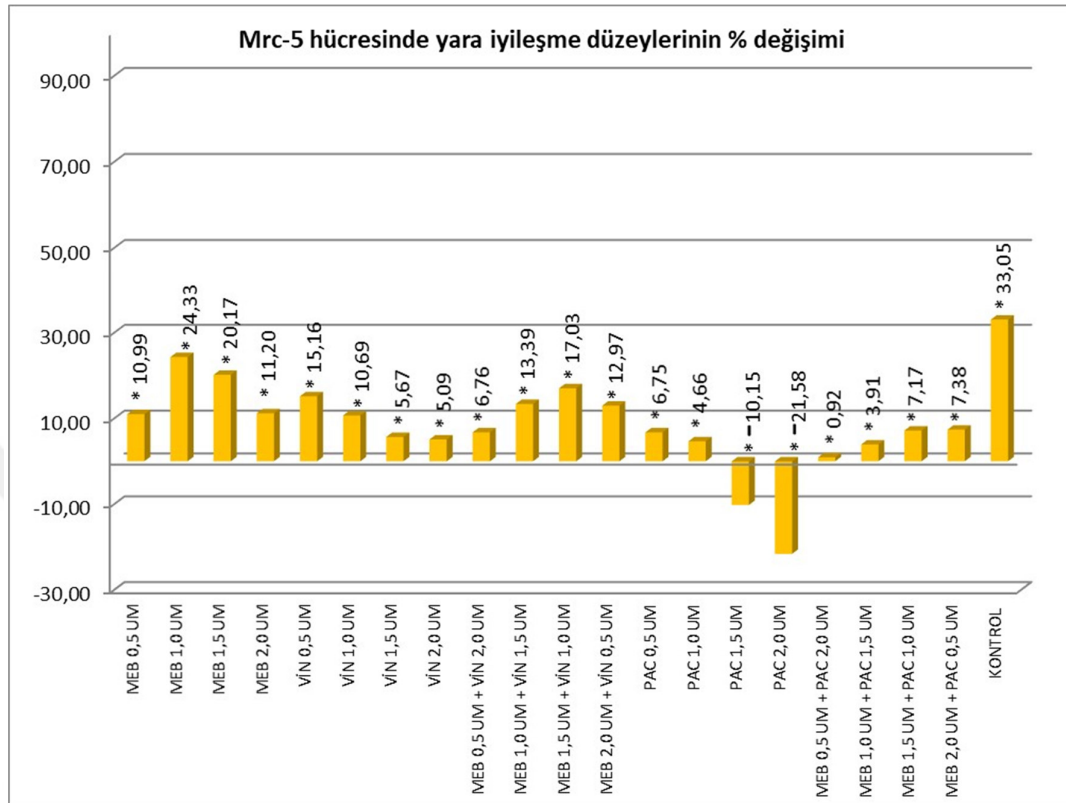


Şekil 4.12. NCI-H209 Hücresinde kontrole kıyasla Kaspaz-9 düzeyindeki % artış oranı (*p<0,05 **p<0,001).

4.1.4. Wound Healing Düzeyi Bulguları

4.1.4.1. MRC-5 Hücresinde Wound Healing Düzeyi Bulguları

MRC-5 hücresi ile yapılan hücresel yara iyileşme düzeylerine ait grafik şekil 4.13.'te gösterilmektedir. Deneye alınan tüm çalışma gruplarında yara iyileşme düzeyi kontrol grubuna kıyasla azalmış ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubunda oluşturulan hücresel yaranın 24 saat sonrasında kapanma oranı %33,05 olarak hesaplanmışken bu değere en yakın iyileşme hızı %24,33'lük oran ile 1 μ M mebendazol uygulanan gruptan elde edilmiştir ($p<0,05$). 1,5 μ M ve 2 μ M konsantrasyonda paklitaksel uygulanan gruplarda ise hücresel boyuttaki yara iyileşmesi negatif yönlü bir seyir göstererek yara açıklığının %10,15 ve %21,58 oranında arttığı izlenmiştir.



Şekil 4.13. MRC-5 hücresinde yara iyileşme düzeylerinin % değişimi (*p<0,05).

4.2. İN-VİVO Bulgular

4.2.1. SEC Tümör Hacmi Düzeyleri

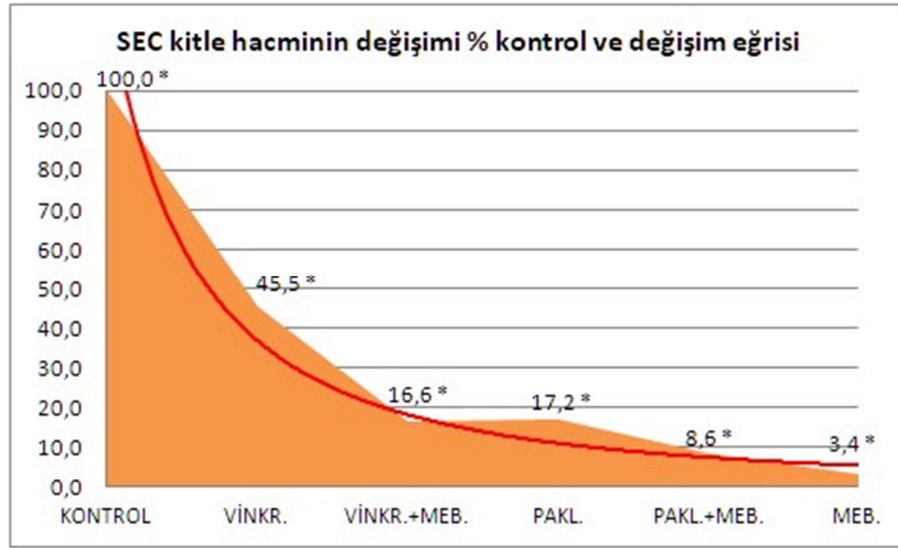
4.2.1.1. Antemortem SEC Tümör Hacmi Düzeyi

Deneye katılan deney fareleri SEC enjeksiyonunu takiben her 3 günde bir haricen wernier kaliperi ile kanserli kitlelerinin çaplarını tespit etmek için ölçüme tabi tutulmuşlardır. Günlere göre çalışma gruplarından elde edilen SEC tümör hacimleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. SEC’li deneklerin antemortem kanserli kitle hacimleri (mm³)

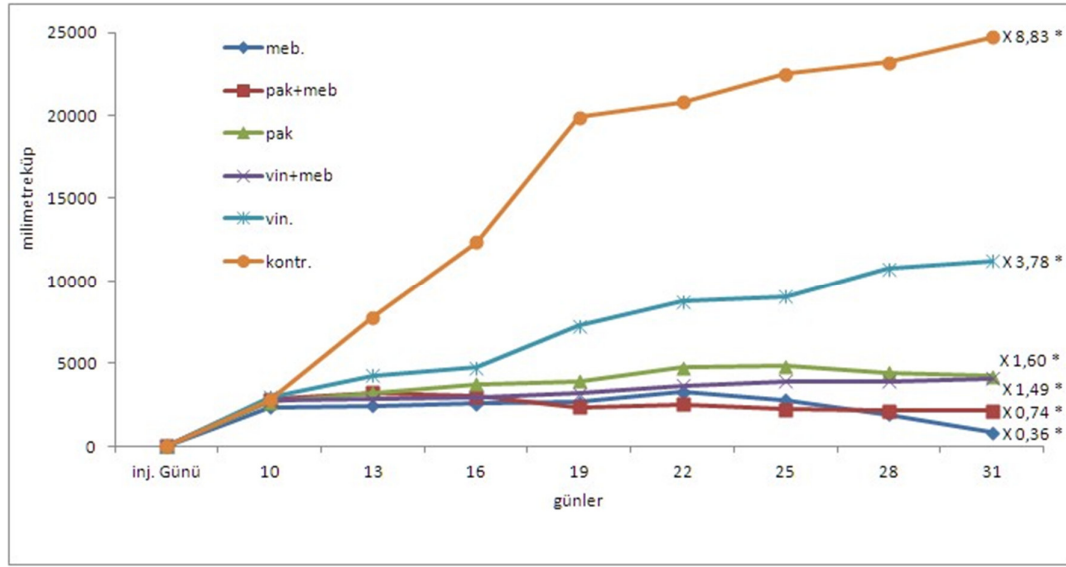
Enj. günü ve ilaçlar	10. gün	13.gün	16.gün	19.gün	22.gün	25.gün	28.gün	31.gün
KONT	2.798,3	7.790,0	12.345,0	19.878,0	20.786,0	22.509,0	23.200,0	24.703,2
VINKR	2.975,2	4.270,1	4.765,0	7.259,9	8.754,8	9.068,7	10.744,6	11.239,5
VINK.+MEB	2.754,7	2.852,4	2.910,0	3.187,7	3.665,3	3.943,0	3.920,6	4.098,3
PAKL	2.652,9	3.251,0	3.749,1	3.947,3	4.745,4	4.843,5	4.441,7	4.239,8
PAKL+MEB	2.859,0	3.230,0	2.998,0	2.345,1	2.540,5	2.225,9	2.131,2	2.126,6
MEB	2.348,3	2.458,1	2.583,9	2.650,1	3.254,6	2.808,5	1.938,1	837,9

Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde tüm deney gruplarında ölçülen SEC izafi hacmi % oran olarak düşüş göstermiş ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). İlaçların tek başlarına uygulandığı gruplarda kontrol grubuna kıyasla tümörlü doku hacminde en fazla gerileme mebendazol grubunda ölçülmüştür. Mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda vinkristin ve paklitakselin tek başlarına uygulandıkları gruplara oranla tümör hacminde anlamlı düşüş elde edilmiş olup, bu düşüş vinkristin mebendazol kombinasyonunda vinkristin grubuna oranla %28,9 iken paklitaksel mebendazol kombinasyonunda paklitaksel grubuna oranla %8,6 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. SEC kitle hacminin kontrol grubuna göre % olarak değişimi ve değişim eğrisi * $p < 0,05$.

SEC kitlesinin zaman içerisindeki hacim değişimi incelendiğinde SEC kitlesinin enjeksiyonundan elle palpe edilebilir düzeyde SEC kitlesinin oluştuğu 10. güne kadar tüm gruplarda tümör büyüme hızı benzer olup 10. günden sonra tümör kitlesinde gruplara göre farklılıklar oluşmuştur (Şekil 4.15.). Ortaya çıkan bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür ($p < 0,05$). Kontrol grubunda çalışma sonunda ölçülen SEC kitlesi 10. günde ölçülen kitle hacminin 8,83 katı iken bu oran vinkristin de 3,78 - vinkristin+mebendazol grubunda 1,49 - paklitaksel de 1,60 - paklitaksel+mebendazol grubunda 0,74 - mebendazolde ise 0,36 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. SEC'li farelerin antemortem kanserli kitle hacimlerinin zamana göre değişimi(*p<0,05)

4.2.1.2.Postmortem SEC Tümör Hacmi Düzeyi

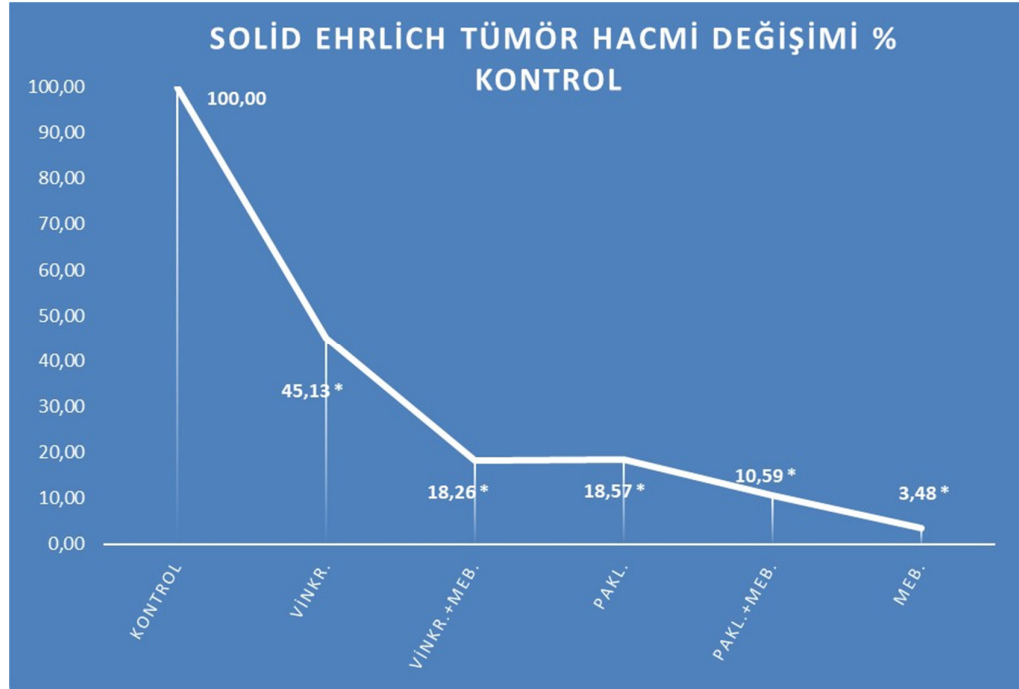
Çalışma sonunda gruplardan elde edilen ölçümlerin ortalamaları kullanılarak hesaplanan izafi SEC kitle hacmi Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Deney farelerinden çalışma sonunda çıkarılan SEC kitlerinin hacimleri (*p<0,05)

Gruplar	a çapı mm	b çapı mm	izafi kitle hacmi mm ³ (a ² x b)/2
Kontrol gurubu	34,00	44,30	25.605,40
Vinkristin gurubu	24,22	39,40	11.556,19*
Vinkristin+ mebendazol grubu	19,25	25,24	4.676,50*
Paklitaksel grubu	18,40	28,09	4.755,08*
Paklitaksel + mebendazol grubu	15,31	23,13	2.710,79*
Mebendazol gurubu	10,48	16,24	891,82*

Postmortem yapılan ölçümlerden hesaplanan SEC izafi tümör hacmi değişimi kontrol grubuna oranla % olarak Şekil 4.16.'da grafik halinde ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda azalmış olup bu azalma istatistiksel olarak anlamlı

görülmüştür ($p<0,05$). Gruplar arasında tümör hacmi regresyonunda en başarılı grup olarak mebendazol görülürken tek başına verilmesi halinde vinkristinin diğer gruplara oranla tümör hacmini daha az düşürdüğü izlenmiştir. Mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile yapılan kombinasyonlarında ise mebendazol + vinkristin kombinasyonunda vinkristinin tek başına uygulandığı grubuna göre %26,87 mebendazol + paklitaksel kombinasyonunda ise paklitakselin tek başına uygulandığı guruba göre % 7,98'lik azalma kaydedilmiştir ($p<0,05$). Çıkarılan SEC tümör kitleleri Şekil 4.17.de gösterilmektedir.



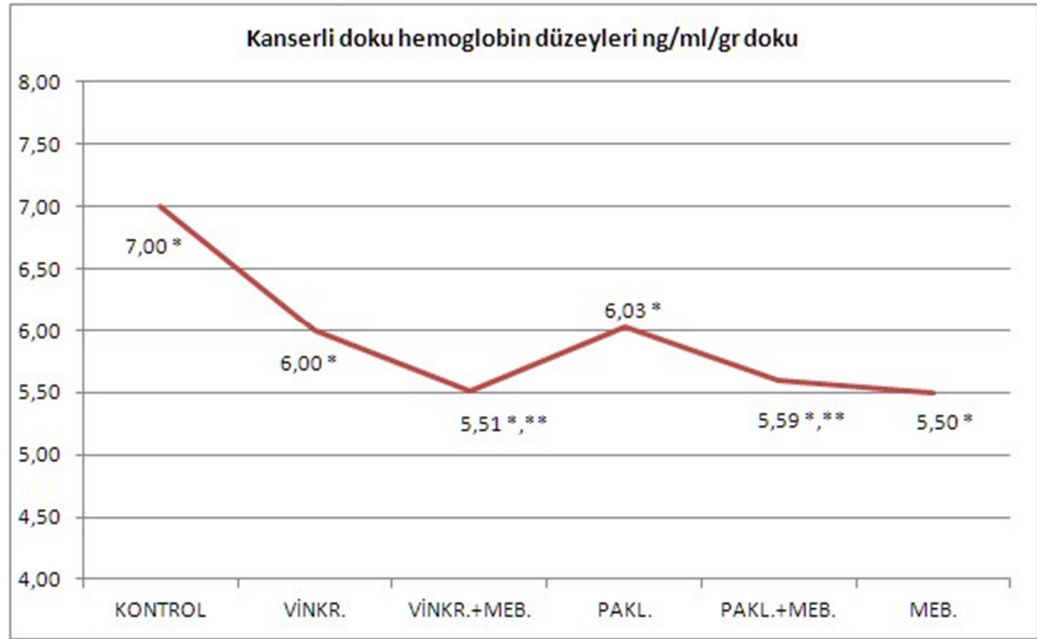
Şekil 4.16. Postmortem SEC kanserli doku hacminin kontrol grubuna göre % değişimi (* $p<0,05$)



Şekil 4.17. Deney hayvanlarından çıkarılan SEC kanserli dokuların karşılaştırılması

4.2.2. SEC Doku Hemogloblin Düzeyi

Kanserli dokulardaki hemogloblin düzeyleri Şekil 4.18.'de grafik halinde verilmiştir. Kontrol gurubu ile kıyaslandığında ilaç uygulanan tüm gruplarda doku hemogloblin düzeyi düşüş göstermiş olup bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). İlaçların kombine halde uygulandığı gruplarda ise hemogloblin düzeyleri arasında yakın sonuçlar elde edilmiş olup grup içerisindeki bu benzerliklerin istatistiksel olarak anlamsız olduğu anlaşılmıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.18. Kanserli doku hemoglobin düzeylerinin ilaçlara göre düzeyleri (ng/ml/gr doku * $p < 0,05$ ** $p > 0,05$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Bulguların Tartışılması

5.1.1. *In-vitro* Bulguların Tartışılması

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünya genelinde kanser en başta gelen ölüm sebepleri arasında yer almaktadır. 2018 yılında kanser vakalarına 18,1 milyon yeni vaka eklenmiş ve aynı yılda kanser kaynaklı ölümlerin sayısının 9,6 milyon kişi olduğu hesaplanmıştır (Bray et al., 2018). İnsanlarda ve hayvanlarda kanser tedavisinde kullanılan ilaçların ciddi yan etkilerinin olması ve pek çok kanser türünde halen istenilen tedavi başarısına ulaşılamaması, kanser ile mücadelede bilim insanlarını yeni stratejiler ve tedavi yolları bulmaya zorlamaktadır. Bu yeni stratejilerden biri de; “kanser harici tedavilerde kullanılan ve anti-kanser etkinliğinin de olması muhtemel ilaçların kanser tedavilerinde denenmesi” şeklinde açıklanan ve “repurposing oncology” olarak tanımlanan çalışmalardır (Doudican et al., 2013; Nygren et al., 2013; Pan Pantziarka et al., 2014).

Benzimidazol grubu ilaçlardan biri olan mebendazol uzun yıllardır insan ve hayvan sağlığında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Uzun zamandır antihelmintik bir ilaç olarak kullanılan mebendazolün ve diğer bazı benzimidazol türevi ilaçların antineoplastik ilaç olarak kullanılabileceğine dair son yıllarda yoğun çalışma ve araştırmalar yapılmaktadır (Pantziarka et al., 2014).

Benzimidazollerin anti-kanser etkileri ilk kez 1957 yılında Hirschberg ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Hirschberg et al., 1957). Ancak uzun yıllar süresince benzimidazollerin antikanser etkilerinin hücresel mekanizması izah edilememiştir. 1980’li yılların başlarında Holden ve ark. (1980), bazı benzimidazollerin mitozu durdurarak hücre büyümesini inhibe ettiğini ortaya çıkarmaları ile birlikte benzimidazollerin hücresel boyuttaki etki mekanizmasına açıklık getirilebilmiştir (Holden et al., 1980). Yapılan çalışmalarla benzimidazollerin mitoz üzerindeki baskılayıcı etkilerinin temelde mikrotubulin proteini ile ilgili olduğu günümüzde artık

netlik kazanmıştır. Hücre siklusuna spesifik bazı antikanser ilaçların da etkinliklerinin temelinde mikrotubulin proteini ve mitoz süreçleri ile ilgili değişimlerin yatması benzimidazollerin antikanser ilaçlar olarak kullanılması konusundaki ilgiyi açıklamaktadır.

Çalışmamızın *in-vitro* kısmında sağlıklı akciğer fibroblast hücresi (MRC-5) ve insan küçük hücreli akciğer kanser hücresi (NCI-H209) üzerinde mebendazol, vinkristin ve paklitaksel tek başlarına ve mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile oluşturulan kombinasyonları ile hücre canlılığı, sitotoksitesi, apoptoz ve hücre göçü parametreleri değerlendirilmek üzere gruplar halinde uygulanmıştır.

Hücre canlılığı ve sitotoksitesi düzeyleri çalışmamızda MTT deneyi ile ölçülmüştür. MRC-5 ve NCI-H209 hücreleri üzerinde mebendazol, vinkristin ve paklitakselin tek başlarına ve mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile oluşturulan kombinasyonları ile elde edilen hücre sitotoksitesi düzeyleri incelenmiştir. MRC-5 hücresi üzerinde kontrol grubuna kıyasla hücre sitotoksitesi 2,0 μ M konsantrasyonda vinkristin uygulanan grupta %30,55 , 2,0 μ M konsantrasyonda paklitaksel uygulanan grupta ise %30,33 oranında artış göstermiştir (Şekil 4.1.). Mebendazol uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna kıyasla hücre sitotoksitesi 0,5 μ M mebendazol konsantrasyonunda %19,56 , 2 μ M konsantrasyonda mebendazol uygulanan grupta ise %27,25 oranında artış göstermiştir. Mebendazol, vinkristin ve paklitakselin çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyonları olan 2 μ M dozları ile elde edilen sitotoksitesi artış oranları incelendiğinde sağlıklı hücre üzerinde en az sitotoksik etkinin mebendazol uygulanan grupta, en yüksek sitotoksitesi artış oranının ise vinkristin grubundan elde edildiği anlaşılmaktadır. Sağlıklı hücre üzerinde mebendazol-vinkristin ve mebendazol-paklitaksel kombinasyonları ile elde edilen sitotoksitesi oranı düşüşü mebendazol-vinkristin kombinasyonunda vinkristinin tek başına uygulandığı gruba oranla %1,54 düzeyinde gerilerken bu oran mebendazol-paklitaksel kombinasyonunda %2,2 olarak ölçülmüştür.

NCI-H209 hücresi üzerinde ilaçların tek başlarına kullanılmaları durumunda, kontrol grubuna kıyasla en düşük sitotoksitesi oranı 0,5 μ M vinkristin konsantrasyonunda elde edilmiştir ($p<0,05$). En yüksek sitotoksitesi oranı ise kontrol grubuna oranla 2,0 μ M konsantrasyonda mebendazol uygulanan grupta kaydedilmiştir ($p<0,05$). Mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda da sitotoksitesi oranı istatistiksel

olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir. Mebendazolün paklitaksel ve vinkristin ile kombine edilerek uygulandığı gruplar içerisinde 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin kombinasyonunda en yüksek sitotoksik değer ölçülmüştür. İlaç kombinasyonları arasında ise grup içerisinde istatistiksel olarak en anlamlı artış 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin (%13,26 artış) ve 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M paklitaksel (%11,16 artış) kombinasyonlarında ölçülmüştür ($p < 0,001$) (Şekil 4.2.).

MTT deneyleri neticesinde sağlıklı ve kanserli hücre hatları üzerinde elde edilen sonuçlar irdelendiğinde mebendazolün sağlıklı hücre hattında gruplar içerisinde en düşük sitotoksik etkili ilaç olduğu anlaşılrken, kanserli hücre hattında en yüksek sitotoksosite oranı artışı da mebendazol verilen gruptan elde edilmiştir. Ayrıca sitotoksosite sonuçları incelendiğinde mebendazolün sağlıklı hücre hattında vinkristin ve paklitaksel ile oluşturulan kombinasyonlarında sitotoksosite oranlarını vinkristin ve paklitakselin tek başına verildiği gruplara kıyasla düşürdüğü, kanserli hücre hattı üzerinde ise tam tersine mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edilmesi halinde vinkristin ve paklitakselin tek başlarına verildiği gruplara oranla hücre sitotoksitesini artırdığı gözlenmiştir. Mebendazol-vinkristin ve mebendazol-paklitaksel kombinasyonlarıyla ölçülen ve kontrol grubu ile kıyaslanan sitotoksosite oranlarındaki değişimin sağlıklı hücrede sitotoksositeyi azaltıcı, kanserli hücre üzerinde ise sitotoksositeyi artırıcı yönde değişmiş olması dikkat çekicidir. Ayrıca sağlıklı hücre üzerinde mebendazol-vinkristin ve mebendazol-paklitaksel kombinasyonları ile elde edilen sitotoksosite oranı düşüşü mebendazol-vinkristin kombinasyonunda vinkristinin tek başına uygulandığı gruba oranla %1,54 düzeyinde gerilerken bu oran mebendazol paklitaksel kombinasyonunda %2,2 olarak ölçülmüştür. Ancak kanserli hücre üzerinde mebendazol-vinkristin ve mebendazol-paklitaksel kombinasyonları ile elde edilen sitotoksosite oranı artışı mebendazol-vinkristin kombinasyonunda vinkristinin tek başına uygulandığı gruba oranla %13,26 düzeyinde artarken bu yükselme mebendazol-paklitaksel kombinasyonunda %11,16 olarak ölçülmüştür.

MTT deneyleri ile bulduğumuz sonuçlar literatür kaynakları ile de benzerlik arz etmektedir. Kemorezistant meme kanseri üzerinde gemitabisin ve mebendazol, albendazol kombinasyonu kullanılarak yapılan bir çalışmada; mebendazolün tek başına kullanımında dahi kanserli hücreler üzerinde gemitabisinden daha etkin sitotoksositeye ve antiproliferatif etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma ile mebendazolün

0,5 μ M konsantrasyonda kanserli hücre hattında hücre sitotoksitesini % 63,1 oranında artırdığı sonucuna varılmıştır (Coyne et al., 2018).

Çalışmamızda MTT deneylerinden elde edilen sonuçlar mebendazolün sağlıklı hücrede vinkristin ve paklitaksel ile kombine edilmesi halinde hücre sitotoksitesini azalttığını ve sağlıklı hücrede daha az zarar oluşturduğunu, kanserli hücrede ise vinkristin ve paklitaksel ile kombine edilerek uygulandığında hücre sitotoksitesini artırdığını ve böylelikle kanserli hücrede oluşturulan hücresel hasarı artırdığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda mebendazol, vinkristin ve paklitakselin MRC-5 ve NCI-H209 hücre hatları üzerinde yol açtıkları sitotoksite ve hücresel hasarın apoptoz yolu ile olup olmadığını irdelemek amacıyla her iki hücre hattı üzerinde apoptotik DNA düzeyleri test edilmişlerdir.

MRC-5 hücresi üzerinde apoptotik DNA düzeylerinde elde edilen sonuçlar kontrol grubuna oranla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.3.). İlaçların tek başlarına ve kombinasyonlar halinde uygulandığı tüm gruplarda kontrol grubuna oranla artış gözlenmiştir ($p<0,05$). İlaçların kombine edildiği gruplar arasında sadece 1,5 μ M mebendazol + 1,0 μ M paklitaksel grubunda elde edilen apoptotik DNA düzeyi paklitakselin aynı konsantrasyonda uygulandığı gruptan elde edilen değeri %0,01 gibi düşük bir oranla da olsa aşmıştır. İlaçların kombine olarak uygulandığı diğer gruplarda ise bu değerlerde artış kaydedilmemiştir.

NCI-H209 hücresi üzerinde apoptotik DNA düzeyi artışı kontrol grubuna oranla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5.). İlaçların tek başlarına ve kombinasyonlar halinde uygulandığı tüm gruplarda kontrol grubuna oranla artış gözlenmiştir ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubuna oranla %15,25 lik artışla en yüksek artış oranı 2 μ M paklitaksel grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). Mebendazolün paklitaksel ile olan kombinasyonlarından elde edilen sonuçlardaki düzeyler paklitakselin aynı dozlarının tek başına uygulandığı gruplara göre düşüş göstermiş ve bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmıştır ($p<0,001$). Mebendazolün vinkristin ile kombine edildiği gruplarda apoptotik DNA düzeyinde vinkristinin tek başına uygulandığı gruplara oranla grup içerisinde düşük düzeyli artış gözlenmiştir ($p<0,001$). 1,0 μ M mebendazol + 1,5 μ M vinkristin grubunda ise grup içerisindeki değişimler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$). Kanserli hücre hattı üzerinde mebendazol-vinkristin kombinasyonlarında apoptotik DNA düzeylerinde

vinkristinin tek başına verildiği gruplara kıyasla ciddi artışlar kaydedilmemiş olsa da en azından apoptotik DNA düzeylerinde düşme gözlenmemiştir. Ancak mebendazol-paklitaksel kombinasyonu uygulanan tüm gruplarda apoptotik DNA düzeyi paklitakselin tek başına uygulandığı tüm gruplara oranla düşüş göstermiştir.

Mebendazolün de aralarında bulunduğu 10 farklı benzimidazol türevi ilaç kemorezistant metastatik melanoma kanseri üzerinde denenmiş ve çalışmada kullanılan 10 benzimidazol türevi içerisinde öncelikle mebendazol olmak üzere albendazol, fenbendazol ve oksibendazol tubulin inhibisyonu yapıcı özellikleri bakımından etkin bulunmuşlardır. Doudican ve ark. (2008), tarafından yapılan bu çalışmada IC₅₀ 0,32 µM konsantrasyonda mebendazol uygulandığında kemorezistans melanoma hücrelerinde apoptoz artmasına karşın melanositlerde herhangi bir tesir görülmemiştir. Çalışma sonucunda kanserli hücrelerdeki apoptoz artışının mebendazolün mikrotubulin proteinini depolimerizasyonu sonucunda oluştuğu bildirilmiştir ((Doudican et al., 2008).

Mebendazolün küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücreleri üzerindeki anti-neoplastik etkilerini incelemek için Sasaki ve ark. (2002), tarafından yapılan bir çalışmada mebendazolün anti-kanser etkinliği hem *in-vitro* in-vivo çalışmalar ile izah edilmiştir (Sasaki et al., 2002). Bu çalışmada kanserli hücreler üzerinde mebendazolün tubulin proteini polimerizasyonunu bozması (tubulin depolimerizasyonu) sonucunda mitoz içciklerinin normal formasyonlarının bozulduğu ve kanserli hücrelerde mitozun inhibe edildiği *in-vitro* olarak gösterilmiştir. Mitoz bölünmenin inhibe edilmesi sebebiyle kanserli hücreler apoptoza uğrayarak hücre ölümü gerçekleşmiştir. Bu çalışmada mebendazolün *in-vivo* etkinliği bir anti-kanser ajanı olarak halen kanser tedavisinde kullanılmakta olan paklitaksel ile karşılaştırılmıştır. Oral olarak mebendazol verilen farelerde çok kuvvetli anti tümör etkiler ve kanserli hücrelerin metastazında inhibisyon tespit edilmiş ve bu esnada paklitaksel ile yapılan denemede gözlenen hiçbir yan etkinin gözlenmediği belirtilmiştir.

Kedi osteosarkoma hücreleri (DS 17) kullanılarak yapılan *in-vitro* bir çalışmada mebendazolün tubulin depolimerizasyonu yaptığı, kanser hücrelerini hücre siklusunda G2-M fazında durdurarak kanserli hücrelerde apoptoza yol açtığı ve mikrotübül inhibisyonu yaptığı belirtilmiştir. (Mary, 2013).

Sağlıklı ve kanserli hücreler üzerinde mebendazol, vinkristin, paklitaksel ve mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile oluşturulan kombinasyonları kontrol grubuna

kıyasla apoptotik DNA düzeyi bakımından karşılaştırıldıklarında her iki hücre hattında da apoptotik DNA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlemlenmiştir. Mebendazol-vinkristin kombinasyonu uygulanan gruplarda sağlıklı hücrede apoptotik DNA düzeyinin çok küçük düzeylerde dahi olsa düşüş göstermesi buna mukabil kanserli hücrede ise mebendazol-vinkristin kombinasyonlarının verildiği gruplarda büyük artışlar elde edilmese dahi ciddi düşüşlerin de kaydedilmemiş olması dikkat çekicidir. Laclette ve ark. (1980), tarafından ilk defa mebendazolün mikrotubulin proteini üzerindeki etkileri hücresel düzeyde açıklanmış ve mebendazolün kolşisin ve vinka alkaloidleri gibi mikrotubulin proteini üzerinde aynı bölgeye bağlandığı ve mikrotubulin polimerizasyonunu inhibe ettiği (mikrotubulin depolimerizatörü) bildirilmiştir (Laclette et al., 1980). Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara bakıldığında, mebendazolün vinkristin ile kombinasyonlarının daha etkin olmasının sebebi olarak mebendazolün de vinkristinin de mikrotubulin depolimerizatörü olarak etki etmeleri olarak ifade edilebiliriz. Bu sonuçların da belirtilen çalışmalara paralellik gösterdiğini görmekteyiz.

Kaspazlarla aktif hale gelen DNaz'lar apoptoz sürecinde çekirdekte kromatinin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler şeklinde 180-200 baz çiftleri ve katları halinde oligonükleotidlerine parçalanmasıyla hücrenin ölümüne yol açmaktadırlar (Balakumaran et al., 1996; Nagata et al., 2003). Çalışmamızda sağlıklı ve kanserli hücre hatlarının her ikisinde de apoptotik DNA düzeyinin artmış olması hücresel boyutta kaspaz düzeylerinde değişimler olduğuna işaret etmektedir. Apoptotik DNA düzeyindeki artışlara paralel olarak kaspaz düzeylerindeki değişimler de çalışmamızda *in-vitro* olarak irdelenmiştir. Şekil 4.7. de gösterildiği gibi sağlıklı hücre üzerinde denenen tüm gruplarda kaspaz-3 düzeyi artmıştır. Kontrol grubuna kıyasla %117,22'lik artışla en yüksek artış oranı 2 μ M paklitaksel grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). Mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği tüm gruplarda ifade edilen kaspaz-3 düzeyinin paklitaksel ve vinkristinin tek başlarına uygulandıkları gruplardaki kaspaz-3 düzeylerine kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir ($p<0,001$). Vinkristin ve paklitakselin 2 μ M konsantrasyonlarına 0,5 μ M mebendazolün eklendiği kombinasyon gruplarında vinkristin ve paklitakselin tek başlarına uygulandıkları gruplarda ölçülen kaspaz-3 düzeylerine kıyasla, mebendazol-vinkristin kombinasyonunda %42,2 ve mebendazol-paklitaksel kombinasyonunda %34,4 oranında azalma kaydedilmiştir ($p<0,001$). Mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine

edilmesi halinde kaspaz-3 düzeylerini anlamlı ve belirgin şekilde düşürmesi sağlıklı hücrede elde edilen sitotoksitenin azalması ile de uyumlu ve bağlantılı olduğu anlaşılmaktadır.

Kontrol grubuyla kıyaslandığında NCI-H209 hücrelerinde de tüm gruplarda kaspaz-3 düzeyleri yükselmiştir (Şekil 4.8.). Gruplar arasında kontrole oranla en yüksek artış 2 μ M paklitaksel grubunda elde edilmiştir($p<0,05$). MRC-5 hücresinde elde edilen kaspaz-3 düzeylerinin tam tersine vinkristin ve paklitakselin mebendazol ile kombine edildiği uygulama gruplarında kaspaz-3 düzeyleri tek başına vinkristin ve paklitaksel uygulanan gruplara nazaran yükselmiştir. Mebendazol-vinkristin ve mebendazol-paklitaksel kombinasyonlarından elde edilen en yüksek kaspaz-3 düzeyi her iki grupta da vinkristinin ve paklitakselin tek başlarına verildiği gruplara kıyasla %6,11 oranında artış göstermiştir ($p<0,001$).

Kaspaz-3 düzeylerindeki değişimin sağlıklı ve kanserli hücredeki oranları incelendiğinde sağlıklı hücrede mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda ilaçların tek başlarına uygulandıkları gruplara kıyasla sırasıyla %42,2 ve %34,4 oranında düşüş ölçülmüştür. Kanserli hücre hattında ise aynı gruplarda %6,11 lik artış oranı elde edilmiştir. Sağlıklı ve kanserli hücre hatlarından elde edilen bu değerleri dikkate alarak mebendazolün paklitaksel ve vinkristin ile kombine edilmesi halinde kanserli hücrede sitotoksitenin artışı sağlandığı, sağlıklı hücrede ise sitotoksitenin ve hücresel hasarın azaldığı anlaşılmaktadır. Ayrıca bu sonuçlar ışığında mebendazolün paklitaksel ve vinkristin ile kombine edilmesinin sağlıklı hücredeki hücresel hasarı azaltıcı etkisinin kanserli hücrede hücresel hasarı artırıcı etkisinden daha yüksek olduğunu da söyleyebiliriz.

Apoptotik süreçler ekstrinsik veya intrinsik yolak ile başlayan ve birbirini tetikleyen sinyallerle sürdürülen bir süreç olmakla birlikte bu sürecin son aşamasında apoptozu gerçekleştiren efektör kaspaz, kaspaz-3 olarak bilinmektedir (Namura et al., 1998). Martarelli ve ark (2008), tarafından yapılan bir çalışmada insan adrenokortikal karsinom kanser hücrelerinin doku invazyonu kabiliyetlerinin 0,085 μ M konsantrasyonda uygulanan mebendazol ile inhibe edildiğini göstermişlerdir. Çalışma sonucunda kanserli hücrelerdeki bu invazyon yeteneği kaybının hücrelerin kaspaz-9 ve kaspaz-3 artışı nedeniyle apoptoza uğramaları olarak bildirilmiştir (Martarelli et al., 2008). Skibinski ve ark. tarafından 7 farklı meningioma hücresi üzerinde 0,42 μ M

mebendazol uygulanmış ve sonuç olarak hücrelerde sitotoksitenin arttığı ve kaspaz-3 düzeylerinin yükseldiği belirtilmiştir (Skibinski, Williamson, & Riggins, 2018). Gastrik kanser hücresi üzerinde 0,5-1,0 μ M konsantrasyonda mebendazolün uygulandığı başka bir çalışmada da kaspaz-3 düzeyinin ve apoptozun %68 oranında artış gösterdiği bildirilmiştir (Pinto et al., 2019). Kolanjiokarsinoma kanser hücrelerine mebendazol 50 μ M konsantrasyona kadar farklı konsantrasyonda mebendazol uygulanmış ve 0,5 ile 1,0 μ M konsantrasyonda mebendazol verilen kanserli hücrelerde apoptoz indeksinin arttığı ve kaspaz-3 düzeyinin 2,05 kat arttığı ifade edilmiştir (Sawanyawisuth et al., 2014). Bizim çalışmamızda da sağlıklı ve kanserli hücre hatlarından elde edilen apoptoz düzeyi ve kaspaz-3 artış oranları incelendiğinde literatür kaynakları ile paralellik arz ettiği ve benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Literatür kaynakları ile çalışmamızdan elde edilen kaspaz-3 ve apoptoz düzeyleri arasındaki oransal farkların ise literatür kaynaklarında kullanılan kanser modelleri ile bu çalışmada kullandığımız kanser modeli arasındaki morfolojik ve hücresel farklılıklardan kaynaklandığı kanaatini taşımaktayız.

Apoptoz sürecinde kaspaz-3'ün aktifleşmesi ya kaspaz-8 aracılı ekstrinsik yolak ile ya da kaspaz-9 aracılı intrinsik yolak ile meydana gelmektedir (Mak, 2003). Şekil 4.7. ve şekil 4.8. de yer alan grafiklerden de anlaşıldığı üzere sağlıklı ve kanserli hücre hatlarının her ikisinde de değişim oranları farklı olmakla birlikte apoptoz düzeyinde ve kaspaz-3 düzeylerinde belirli oranlarda artışlar elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan her iki hücre hattında kaydedilen apoptoz artışının ve kaspaz-3 miktarındaki artışın ekstrinsik apoptoz yolağıyla mı yoksa intrinsik apoptoz yolağı ile mi cereyan ettiğini izah edebilmek için kaspaz-8 ve 9 düzeyleri incelenmiştir.

MRC-5 hücresi üzerinde kontrol grubuyla kıyaslandığında Şekil 4.9. da gösterildiği üzere tüm gruplarda kaspaz-8 düzeyinin artmış olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). %98,57'lik artışla en yüksek artış oranı 2 μ M vinkristin grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). Mebendazolün vinkristin ile kombine edildiği gruplarda vinkristinin aynı konsantrasyonda tek başına uygulandığı gruplarda ölçülen kaspaz-8 düzeylerine kıyasla %7,6 - 35 oranında düşüş gözlenmiştir. Mebendazolün paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda ise paklitakselin aynı konsantrasyonda tek başına uygulandığı gruplarda ölçülen kaspaz-8 düzeylerine kıyasla %7,14 - 19,29 oranında düşüşler gözlenmiştir ($p<0,001$). Sağlıklı hücrede elde edilen bu düşüşler hücre sitotoksitesi değerlerinin ve

apoptoz oranlarının sağlıklı hücre hattında mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda azalması ile paralellik göstermektedir.

Kanserli hücre hattında da kaspaz-8 düzeyleri sağlıklı hücre hattında olduğu gibi tüm gruplarda artış göstermiştir (Şekil 4.10.). Kontrole oranla en yüksek artış (%86,43) 2 μ M konsantrasyonda uygulanan vinkristin grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). Sağlıklı hücrenin aksine kanserli hücrede vinkristin ve paklitakselin mebendazol ile kombine edildiği tüm gruplarda kaspaz-8 düzeyleri tek başına vinkristin ve paklitaksel uygulanan gruplara nazaran yükselmiştir ($p<0,001$). İlaç kombinasyonu yapılan gruplar arasında ilaçların tek başlarına verildiği gruplara oranla en yüksek artışlar 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M paklitaksel (%36,43) kombinasyonundan ve 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin (%24,29) kombinasyonunun uygulandığı çalışma gruplarından elde edilmiştir. Kaspaz-8 düzeylerinin kanserli hücrede gösterdiği bu artışların kanserli hücrede elde edilen hücre sitotoksitesi ve apoptoz artışı ile yakından ilgisi ve bağlantısı olduğu kanaatini taşımaktayız.

Kaspaz-8 düzeylerindeki değişimi irdelemek için yapılan deneyler ve her iki hücre hattından da elde edilen sonuçlar incelendiğinde kaspaz-8 düzeyleri sağlıklı ve kanserli hücre hattının her ikisinde de kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Bununla birlikte mebendazolün, vinkristin ve paklitaksel ile kombine halde uygulanması durumunda sağlıklı hücrede vinkristin ve paklitakselin tek başına aynı dozda uygulandığı gruplara oranla kaspaz-8 düzeyinde vinkristin için %35, paklitaksel grubu için ise %19,29 oranında azalma elde edilmiştir. Sağlıklı hücrede ölçülen sitotoksite ve apoptoz düzeyindeki gerilemenin kaspaz-8 düzeyinin düşmesine bağlı olarak kaspaz-3 düzeyinin azalmasına, kaspaz-3 azalmasına bağlı olarak ise apoptotik DNA hasarının ve hücresel hasarın daha az oluşması şeklinde birbirleri ile bağıntılı olduklarını düşündürmektedir. Kanserli hücrede ise mebendazol-vinkristin ve mebendazol-paklitaksel gruplarında kaspaz-8 düzeyleri artış göstermiştir. Ancak kanserli hücrede elde edilen kaspaz-8 artış oranlarının mebendazol-vinkristin kombinasyonundaki artış oranı olan %24,29 ve mebendazol-paklitaksel kombinasyonunda elde edilen artış oranı olan %36,43 oranlarının, mebendazolün kanserli hücrede tek başına uygulandığında dahi en yüksek kaspaz-8 artışına sebep olduğu 2 μ M konsantrasyondaki etkisinden kaynaklı izafi bir artış olduğu anlaşılmaktadır. Bu sebeple mebendazolün en düşük, vinkristin ve paklitakselin ise en yüksek dozları ile oluşturulan kombinasyon gruplarında

elde edilen kaspaz-8 artış oranları daha anlamlıdır. Bu gruplardaki artış oranı ise mebendazol-vinkristin kombinasyonu için %9,29, mebendazol-paklitaksel kombinasyonu için ise %2,14 olarak ölçülmüştür. Tüm bu deney sonuçları göz önünde bulundurularak mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edilmesi ile sağlıklı hücre üzerinde kaspaz-8 düzeylerinin düşmesine ve kanserli hücre üzerinde ise kaspaz-8 seviyelerinin artmasına sebep olduğunu ifade edebiliriz. Ancak sağlıklı hücreden elde edilen kaspaz-8 düşüş oranının kanserli hücreden elde edilen kaspaz-8 artış oranından daha yüksek olması mebendazol-vinkristin ve mebendazol-paklitaksel kombinasyonun kanserli hücrede hücresel hasarı artırmakla birlikte sağlıklı hücreyi hücresel hasardan korumadaki etkinliğinin daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca sağlıklı ve kanserli hücrede elde edilen mebendazol-vinkristin kombinasyonu sonucunda elde edilen kaspaz-8 oranlarının düşüş veya artış oranlarının, mebendazol-paklitaksel kombinasyonlarından daha fazla olmasının hücresel temeli olarak mebendazol ve paklitakselin mikrotubulin yapısına aynı mekanizma ile etki etmeleri olarak açıklanabilir.

Sağlıklı hücrede kontrol grubuyla kıyaslandığında tüm gruplarda kaspaz-9 düzeyinin artmış olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). 2 μ M paklitaksel grubunda %50,83'lük artışla en yüksek artış oranı elde edilmiştir ($p<0,05$). İlaç kombinasyonları ile elde edilen kaspaz-9 düzeyleri incelendiğinde ise mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda elde edilen kaspaz-9 düzeylerinin 2 μ M mebendazol + 0,5 μ M vinkristin kombinasyonu dışında paklitaksel ve vinkristinin tek başlarına uygulandıkları gruplardaki kaspaz-9 düzeylerine kıyasla azaldığı kaydedilmiştir ($p<0,001$). Grup içerisinde en önemli azalma %5,83 ile 1 μ M mebendazol + 1,5 μ M vinkristin kombinasyonunda elde edilmiştir ($p<0,001$).

Yaptığımız çalışmada, kanserli hücrede de tüm gruplarda kaspaz-9 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiştir (Şekil 4.12.). Gruplar arasında kontrole oranla en yüksek artış %46,67'lik oranla 2 μ M paklitaksel grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$). İlaç kombinasyonları ile elde edilen kaspaz-9 düzeyleri incelendiğinde mebendazol-vinkristin kombinasyonu ile ölçülen kaspaz-9 düzeyinin vinkristinin tek başına uygulandığı gruba oranla %7,5 oranında arttığı, bu artışın mebendazol-paklitaksel kombinasyonunda %4,17 olduğu ölçülmüştür ($p<0,001$).

Hücre hatlarından elde edilen kaspaz-9 düzeyleri incelendiğinde her iki hücre hattında da kaspaz-9 düzeylerinin kontrol grubuna oranla arttığı anlaşılmaktadır. Sağlıklı hücre hattında ilaç kombinasyonları ile kaspaz-9 düzeylerinin ilaçların tek başlarına uygulandığı gruplara kıyasla düştüğü ve kanserli hücrelerde ise kaspaz-9 düzeylerinin ilaç kombinasyonları ile artış gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu durum kaspaz-8 ölçümlerinden elde edilen bulgularda da aynı şekilde cereyan etmiştir. Ancak kaspaz-8 düzeyleri ile kaspaz-9 düzeyleri karşılaştırıldığında; sağlıklı hücrede kaspaz-8 düzeyindeki azalma en fazla %35 olarak ölçülmüş iken bu düşüşün kaspaz-9 düzeyindeki oranı sadece %5,83 olarak ölçülmüştür. Kanserli hücrede ise ilaç kombinasyonları ile elde edilebilen artış kaspaz-8 düzeyinde vinkristinin mebendazolle kombinasyonunda %24,29, paklitakselin mebendazolle kombinasyonunda artış %36,43 oranında ölçülmüşken, kaspaz-9 düzeyleri tüm kombinasyonlar içerisinde en fazla %7,5 oranında yükselmiştir. Aynı hücre hatları ve aynı ilaç grupları kullanılarak yapılan bu deneyler sonucunda elde edilen kaspaz-8 ve kaspaz-9 sonuçlarını birbirleri ile mukayese ettiğimizde; mebendazolün tek başına uygulandığı gruplar ile mebendazolün vinkristin ve paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda sağlıklı hücrede elde edilen kaspaz düşüşü ve kanserli hücrede ölçülen kaspaz düzeyi artışının kaspaz-8 ölçümlerinde her iki yönde de kaspaz-9'a oranla daha belirgin olduğunu ifade edebiliriz. Kaspaz-8 düzeyindeki baskın değişimler ise çalışmamızda kullanılan hücre hatları üzerinde etki gösteren ilaçlar ve ilaç kombinasyonlarının apoptoz sürecini başlatmada ekstrinsik apoptoz yolağında daha etkin oldukları kanaatini taşımaktadır.

Hücresel boyutta yara iyileşmesi deneyi (wound healing assay) hücrenin sitotoksik ajanlara karşı verdiği cevabın, hücre proliferasyonunun ve hücre migrasyonunun düzeyinin belirlenmesinde kullanılan bir analiz metodudur (Yarrow, Perlman, Westwood, & Mitchison, 2004). Kanserli dokuları oluşturan kanser hücrelerinin de yeni kan damarları oluşturmaları, metastaz öncesinde sağlıklı dokuya penetrasyonu için invaze olması ve uzak dokulara metastazı gibi neoplastik süreçler hücresel düzeyde wound healing deneyi ile incelenebilmektedir (Maini, McElwain, & Leavesley, 2004).

Çalışmamızda mebendazolün tek başına ve vinkristin ve paklitaksel ile oluşturulan kombinasyonlarıyla wound healing deneyi yapılmıştır. MRC-5 hücresi ile yapılan hücresel yara iyileşme düzeyleri Şekil 4.13. te gösterilmiştir. Deneye katılan tüm gruplarda yara iyileşme düzeyi kontrol grubuna kıyasla azalmıştır ($p<0,05$). İlaç

uygulanmayan kontrol grubunda oluşturulan hücresel yaranın 24 saat sonrasında kapanma oranı %33,05 olarak hesaplanmışken bu değere en yakın iyileşme hızı %24,33 lük oran ile 1 μ M mebendazol uygulanan gruptan elde edilmiştir ($p<0,05$). 1,5 μ M ve 2 μ M konsantrasyonda paklitaksel uygulanan gruplarda ise hücresel boyuttaki yara iyileşmesi negatif yönlü bir seyir göstererek yara açıklığının %10,15 ve %21,58 oranında arttığı, başka bir deyişle de yara iyileşme hızının gerilediği izlenmiştir. Deney sonucunda mebendazolün paklitaksel ve vinkristin ile olan kombinasyonlarında paklitaksel ve vinkristinin tek başına uygulandığı gruba nazaran yara iyileşme hızının mebendazol-paklitaksel kombinasyonunda %14,06, mebendazol-vinkristin grubunda ise %7,71 oranında arttığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre her ne kadar mebendazol-paklitaksel kombinasyonunun, paklitakselin tek başına uygulandığı gruba oranla yara iyileşme hızını artırdığı şeklinde anlaşılmakta ve istatistiksel olarak anlamlı olsa da sadece paklitakselin şiddetli sitotoksik etkilerini baskılaması ile sonuçlandığını ifade edebiliriz. Çünkü deney sonucunda mebendazol-vinkristin kombinasyonunun kontrol grubuna göre yara iyileşme düzeyi %17,03 iken mebendazol-paklitaksel kombinasyonun yara iyileşme düzeyi kontrole göre en fazla %7,38 olarak ölçülmüştür.

Mukhopadhyay ve ark. (2002), tarafından akciğer kanser hücresi zenograftları kullanılarak kanserli hücrelerin metastaz yetenekleri *in-vivo* olarak test edilmiş ve sonuçta oral mebendazol uygulanan farelerdeki metastazın kontrol grubuna oranla 5 kat daha düşük seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada *in-vivo* olarak neovaskülarisasyon düzeyi de test edilmiş ve mebendazol uygulanan gruptaki deneklerde apoptoza uğrayan endotel hücreleri sebebiyle anjiyogenezin baskılandığı tespit edilmiştir (Tapas et al., 2002).

Çalışmamızda kullandığımız kanserli hücre hattı süspanse kültür ortamında üretilen bir hücre hattı olması sebebiyle yara iyileşme deneyi sadece sağlıklı hücre kullanılarak yapılmıştır. Sağlıklı hücre hattından elde edilen yara iyileşmesi sonuçları incelendiğinde ise mebendazolün ve paklitaksel ile vinkristinin mebendazolle oluşturulan kombinasyonlarının sağlıklı hücredeki migrasyon ve proliferasyon yeteneklerini rehabilite ettiğini düşünmekteyiz. Bu iyileşmenin ise literatür kaynakları ve çalışmamızda *in-vitro* olarak yapılan diğer deney sonuçları göz önünde bulundurularak; sağlıklı hücrelerde mebendazol ve mebendazol-vinkristin, mebendazol-paklitaksel kombinasyonlarının kaspaz-8 düzeyini azaltmalarına bağlı olarak apoptoz düzeyinin

düşmesine ve azalan apoptoz düzeyi paralelinde de hücresel boyutta daha az DNA hasarı oluşmasına ve sitotoksistenin düşmesine yol açtığı kanaatine ulaşabiliriz.

5.1.2. *In-vivo* Bulguların Tartışılması

Çalışmamızın *in-vivo* deneyleri SEC tümör kitlesinin antemortem ve postmortem kitle hacmindeki değişimler ve kanserli dokulardaki doku hemoglobin düzeyindeki değişimlerin incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

SEC tümör kitlesinin antemortem ölçüm sonuçları Şekil 4.14.'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde tüm deney gruplarında ölçülen SEC izafi hacmi % oran olarak düşüş göstermiş, ilaçların tek başına uygulandığı gruplarda ise tümörlü doku hacminde en fazla gerileme mebendazol grubunda ölçülmüştür. İlaç kombinasyonlarından elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise, kanserli kitlenin hacmindeki azalma vinkristin-mebendazol kombinasyonunda vinkristin grubuna oranla %28,9 iken paklitaksel mebendazol kombinasyonunda paklitaksel grubuna oranla %8,6 olarak hesaplanmıştır. Kanserli kitlenin büyüme hızı 10. güne kadar tüm gruplarda benzer olup 10. günden sonra tümör kitlesinde gruplara göre farklılıklar oluşmuştur (Şekil 4.15.). Kontrol grubunda çalışma sonunda ölçülen SEC kitlesi 10. günde ölçülen kitle hacminin 8,83 katı iken bu oran vinkristin de 3,78, vinkristin+mebendazol grubunda 1,49, paklitaksel de 1,60, paklitaksel+mebendazol grubunda 0,74 , mebendazolde ise 0,36 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar irdelendiğinde; mebendazol-vinkristin kombinasyonundan elde edilen kitle hacmi azalış oranının vinkristinin tek başına uygulandığı gruba göre %28,9 , mebendazol-paklitaksel kombinasyonundan elde edilen kitle hacmi azalış oranının ise paklitakselin tek başına uygulandığı gruba göre %8,6 oranında azaldığı anlaşılmaktadır. Mebendazolün vinkristin ile kombinasyonunun paklitaksel ile mebendazol kombinasyonuna oranla kanserli kitle hacmini daha çok küçültmesi *in-vitro* bulgularla paralellik arz etmektedir. Şekil 4.16.'da ifade edildiği üzere postmortem kanserli kitle hacimlerindeki değişimlerin de antemortem ölçümler ile paralel ve uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

Nicole ve ark. (2013), tarafından mebendazolün anti-apoptotik faktörler üzerindeki *in-vivo* etkinliği ve bu etkinliğin bir anti-kanser ajanı olarak kullanılan temozolomid ile mukayesesi için atimik fareler kullanılarak insan melanoma xenograftları ile bir hayvan modelleme çalışması yapılmıştır. Çalışmaya katılan farelere insan melanoma

zenograftlarının verilmesini takiben deneklerin tamamında 3-5 mm tümör geliştikten sonra, günlük oral 1 mg mebendazol verilen grup, günlük oral 2 mg mebendazol verilen grup ve 5 gün boyunca günlük intraperitoneal 100 mg/kg temozolomid verilen grup olmak üzere gruplar oluşturulmuştur (Doudican et al., 2013). Kontrol grubuna oranla 1 mg konsantrasyonda mebendazol uygulanan farelerde tümör kitlesinde %83, 2 mg konsantrasyonda mebendazol uygulanan farelerde ise tümör kitlesinde %77'lik bir küçülme tespit edilmiştir. Temozolomid uygulanan grupta da aynı sonuçlar ortaya çıkmış olmakla birlikte bu çalışma ile insan melanoma kanser hücrelerinde temozolomid ile elde edilebilecek tümör regresyonunun herhangi bir yan etki ile karşılaşmadan daha düşük konsantrasyonlarda mebendazol ile elde edilebileceği gösterilmiştir (Doudican et al., 2013). Çalışmamızın *in-vitro* kısmında mebendazolün kanserli doku hacmindeki %96,6'lık küçülmenin bu literatür kaynağı ile uyum arz ettiğini söyleyebiliriz. Mebendazol uygulanması sonucunda kanserli doku hacminin küçülme oranlarının literatür ile yapmış olduğumuz çalışma arasında birebir aynı oranda olmayışı deneklerin ve kanser modelinin farklılığından kaynaklandığını görüşünü taşımaktayız.

Başka bir araştırmada ise, iki farklı adenokortikal kanser hücre hattı ve 3 farklı normal fibroblast hücre hattına (H295R, SW-13 ve WI-38) farklı konsantrasyonlarda mebendazol aynı anda uygulanmış ve adrenokortikal karsinoma hücre kültürlerinde, 0,23 μ M konsantrasyonda mebendazol hücre bölünmesi ve büyümesini inhibe ederken, normal fibroblast hücre kültürlerinde 0,27 μ M konsantrasyonda herhangi bir etki gözlenmemiştir. Her iki hücre hattında uygulanan mebendazol konsantrasyonları mebendazolün IC50 dozu olarak hesaplanmıştır. *İn-vivo* denemede ise 1 μ M konsantrasyonda mebendazol uygulanan deneklerde yaklaşık 20 günde tüm tümör hücrelerinin öldüğü gözlenmiştir. Araştırmacılar bu çalışmalarında *in-vitro* ve *in-vivo* koşullarda mebendazolün kanserli hücrelerde apoptozu indüklediğini, *in-vitro* olarak kanserli hücrelerin invazyon ve migrasyon yeteneklerini inhibe ettiğini ve *in-vivo* koşullarda metastazın engellendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaları ile araştırmacılar, temelde mebendazolün kanserli hücrelerde oluşturduğu tubulin depolimerizasyonu sonucunda hücre bölünmesinin engellenmesi ve hücre siklusunda mitoz aşaması sekteye uğrayan hücrelerin apoptoz yoluyla ölmelerine dayandırmışlardır (Martarelli et al., 2008). Martarelli ve ark. (2008), tarafından yapılan bu çalışmada 20. günde tüm kanserli hücrelerin tamamen öldürüldüğüne dair bulgulara yer verilmiş olup, bizim

çalışmalarımızda da çalışmanın sonlandırıldığı 31. günde mebendazol uygulanan gruptaki kanserli doku hacminin, kanserli deneklere ilaç uygulanmaya başlandığı 10. gündeki başlangıç hacimlerinden bile küçülmesi ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızın *in-vivo* bulgular kısmında laboratuvar ve teknik alt yapı göz önünde bulundurularak anjiyogenez direkt olarak izlenememiştir. Doku anjiyogenezi hakkında doku hemoglobin düzeyleri incelenerek anjiyogenez hakkında indirekt bilgi edinme yolu uygulanmıştır. İlaç uygulanan tüm gruplarda doku hemoglobin düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında, tüm gruplarda düşüş göstermekle birlikte, %21,43'lük azalma ile mebendazol grubunda ölçülmüştür (Şekil 4.18.). İlaçların kombine halde uygulandığı gruplarda ise hemoglobin düzeyleri arasında yakın sonuçlar elde edilmiş olup grup içerisindeki bu benzerliklerin istatistiksel olarak anlamsız olduğu anlaşılmıştır ($p>0,05$).

Mide kanser hücreleri kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise mebendazol, klasik anti-neoplastik ajanlar ile anti-kanser etkileri bakımından mukayese edilmiştir. Bu çalışmada 3 farklı tip (gastrik tip adenokarsinoma hücresi ACP-01, Diffuz tip gastrik adenokarsinoma hücresi ve ACP-03 İntestinal tip kanser hücresi) gastrik kanser hücre kullanılmış ve her üç gastrik kanser hücresi üzerinde mebendazolün anti-proliferatif etkileri bulunduğu gösterilmekle birlikte; diffuz tip gastroadenokarsinoma hücreleri üzerinde mebendazolün IC50 0,39 μ M konsantrasyonda oluşturduğu anti-proliferatif etkiyi, 5-FU (5-Flouro Urasil) IC50 19,71 μ M , oksaliptatin IC50 8,85 μ M , gemsitabin IC50 7,45 μ M , irinotesan IC50 29,83 μ M , paklitaksel IC50 2,43 μ M , sisplatin IC50 15,82 μ M ve doksorubisin IC50 0,82 μ M konsantrasyonda ancak oluşturabilmişlerdir. Ayrıca, mebendazolün 0,1 - 0,5 - 1,0 μ M konsantrasyonlarında ACP-01 kanser hücrelerinde mikrotübül yapısını bozduğu ve kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonunu engellediği belirtilmiştir (McKellar & Scott, 1990). McKaller ve Scott (1990), tarafından yapılan bu çalışmada mebendazol ile elde edilen etkinlik paklitaksel grubunda mebendazolün 6 katı konsantrasyonda ancak elde edilebilmiştir. Bizim çalışmamızın *in-vitro* kısmından elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda mebendazolün 0,5 μ M konsantrasyonda uygulandığında tüm gruplarda etkinliğinin olduğu gözlenmiştir. İlaç kombinasyonlarının uygulandığı gruplardan elde edilen bulgular incelendiğinde ise en belirgin ve anlamlı artışlar 0,5 μ M mebendazol ve 2,0 μ M vinkristin veya 2,0 μ M paklitaksel içeren kombinasyonları ile elde edilmiştir. Bu bulgulardan hareketle düşük konsantrasyonlarda mebendazolün vinkristin ve paklitaksel

ile kombine edilerek paklitaksel ve vinkristinin yüksek dozlarındaki etkinlik seviyelerinin elde edilebileceği ve böylelikle vinkristin ve paklitakselin ciddi yan etkilerinin azaltılabileceği görüşündeyiz.

Mukhopadhyay ve ark. (2002), tarafından yapılan bir çalışmada insan akciğer kanseri hücreleri üzerinde mebendazolün anti-kanser etkinliği *in-vitro* ve *in-vivo* olarak denenmiştir. Bu çalışma sonucunda mebendazolün doz ve zamana bağlı olarak IC50 0,16 μ M konsantrasyonda mikrotübül inhibisyonu yapması sebebiyle kanserli hücrelerde hücre bölünmesini, hücre siklusunun G2/M geçiş fazında durdurduğu ve hücre bölünmesini tamamlayamayan kanser hücrelerinin apoptoza uğradığı *in-vitro* olarak gösterilmiştir. Daha da önemlisi bu çalışmada mebendazol 1 μ M konsantrasyonda; kanserli hücrelerde mikrotubulin inhibisyonu yaptığı dozun yaklaşık 6 katı yüksek bir konsantrasyonda dahi insan umbilikal ven endoteli hücrelerinde (HUVECs) ve insan fibroblast hücrelerinde (W138) herhangi bir yan etki göstermemiş olmasıdır (Tapas et al., 2002). Bizim çalışmamızdan elde edilen bulgular incelendiğinde de bu literatür kaynağı ile çalışmamız sonuçlarının paralellik gösterdiğini ifade edebiliriz. Çalışmalarımızdan elde edilen bulgulara göre mebendazolün tek başına veya vinkristin/paklitakselle olan kombinasyonlarının uygulandığı gruplarda *in-vitro* olarak sağlıklı hücre hattında sitotoksitesite oranı, kaspaz-3 düzeyi, kaspaz-8 düzeyi, kaspaz-9 düzeyi, apoptotik DNA düzeylerinin farklı oranlarda da olsa düşüş göstermesi ve yara iyileşme hızının artışına paralel hücre proliferasyon ve migrasyon hızının artmış olması ile mebendazolün sağlıklı hücre hattı üzerinde koruyucu etkilerinin bulunduğunu ifade edebiliriz. Ayrıca *in-vivo* bulgularımız sonucunda da mebendazolün yalnız ve vinkristin/paklitaksel ile kombine edilerek uygulandığı tüm gruplarda antemortem ve postmortem ölçümlerle SEC tümör kitlesinin ciddi biçimde baskılandığı ve küçüldüğü gözlenmiştir. Ayrıca, çalışmamızın *in-vivo* kısmında mebendazol uygulanan hiçbir grupta deney esnasında ölüm görülmezken, vinkristin ve paklitakselin yalnız uygulandığı gruplarda vinkristin grubunda 2, paklitaksel grubunda 3 olmak üzere 5 adet deney faresi ölmüş ve çalışma deney farelerinin yerine yenilerinin eklenmesi ile emniyetle sürdürülmüştür. Bu *in-vivo* bulgularda mebendazolün sağlıklı hücre ve dokular üzerinde koruyucu bir etkinlik gösterdiğini ve kanserli dokulara seçkin ve spesifik bir şekilde etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Mebendazolün beyin dokusunda yeterli konsantrasyonlara ulaşabilmesi sebebiyle santral sinir sisteminin parazitik hastalıklarının tedavisinde de yaygın olarak güvenli bir şekilde kullanılan bir antiparaziter olduğu için, mebendazolün beyin tümörlerinde de kullanılıp kullanılamayacağı Ren-Yuan ve ark. (2011), tarafından araştırılmıştır. Glioblastoma multiforme gibi porgnozu gayet kötü olan bir beyin tümöründe mebendazolün anti-neoplastik etkileri *in-vitro* ve *in-vivo* olarak denenmiştir. Bu çalışmada mebendazolün IC50 0,1 - 0,3 μ M doz aralığında Glioblastoma multiforme kanser hücre hattında tubulin polimerizasyonunu azalttığı ve bunun sonucunda kanser hücre hattında sitotoksik etkiyle hücre ölümüne sebep olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca Glioblastoma multiforme kanser hücre zenograftlarıyla fare modellemesi yapılarak *in-vivo* deneme yapılmış ve kontrol grubuna oranla oral mebendazol uygulanan deneklerin hayatta kalma oranının %63 oranında arttığı bildirilmiştir (Bai et al., 2011). Ren-Yuan ve ark. (2011), tarafından elde edilen bu sonuçlarla bizim çalışmalarımızdan elde edilen sonuçlar birbirleri ile örtüşmektedir. Bizim çalışmamızın *in-vivo* kısmında hayatta kalım oranı ölçülmemiştir ancak mebendazol uygulanan tüm deneklerde en az %81,74 en fazla ise %96,52 oranında SEC kanserli kitlenin hacminin gerilediği görülmüştür (Şekil 4.16).

Mebendazolün klinik öncesi çalışmalarının yanı sıra kanser tedavisinde yeni tedavi protokolleri oluşturmak üzere klinik denemeleri de devam etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan John Hopkins Üniversitesi Çocuk Hastalıkları Merkezi'nde progresif pediatrik beyin tümörlerinde mebendazolün tek başına ve standart radyokemoterapiye ek olarak uygulandığı 2 klinik deneme bulunmaktadır. Her iki çalışmada faz 1 klinik deneme evresinde olup devam etmektedirler (Medicine, 2020). Yine Amerika Birleşik Devletleri'nde New York Cohen Çocuk Hastalıkları Tıp Merkezi'nde sürdürülen klinik denemede de beyinlerinde Glioblastoma bulunan kanserli hastalar üzerinde mebendazol ile tedavi denemeleri sürdürülmektedir (Pantziarka et al., 2014). Ayrıca İngiltere'de kanser metabolizmasının araştırıldığı bir klinik denemede faz 2 çalışma basamağına gelen mebendazol klinik denemeleri sürdürülmektedir (Register, 2020). İsveç'te yer alan Uppsala Üniversitesinde ise mebendazolün ilerlemiş gastrointestinal kanserlerde kullanımına ilişkin doz ve farmakokinetik çalışmalarında faz 2 evresine gelinmiş olup bu çalışma da halen devam etmektedir. Mısır'da bulunan Tanta Üniversitesinde 4. evre kolorektal kanserli hastalar üzerinde mebendazolün faz 2 klinik denemeleri sürdürülmektedir (Guerini et al., 2019).

5.2. Sonuç

Çalışmalarımızdan elde edilen *in-vitro/in-vivo* bulgular ve literatür kaynaklarından edinilen bilgiler ışığında mebendazolün kanserli hücreler ve dokular üzerinde apoptoz indükleyici etkilerinin bulunduğunu, hücresel boyutta bu etkilerinin vinka alkaloidlerinde olduğu gibi mebendazolün mikrotubulin proteinini depolimerize etmesi ve bu sebeple mitoz bölünmenin ve hücre siklusunun bloke olması ile hücrenin apoptoza sürüklenmesi şeklinde olabileceği kanaatini taşımaktayız. Mebendazol ile hücre siklusu ve mitoz bölünmesi hasar gören hücrelerin apoptoz aracılığı ile ölümleri ve ölen hücrelerde apoptotik DNA parçacıklarının gösterilmiş olması ile desteklenmektedir. Bunun yanı sıra çalışmamızın *in-vitro* kısmında mebendazol ve mebendazolün vinkrsitin/paklitaksel ile kombinasyonlarının uygulandığı tüm gruplarda hücre sitotoksitesinin artmış olmasının da temelde artan apoptoz düzeyi ve hasar gören mikrotubulin ve hücre siklusu baskılanması ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Sağlıklı hücreler üzerinde gerçekleştirilen deneylerden ise kanserli hücrelerden elde edilen bulguların tam tersi verilerin alınmış olması ve alınan sonuçların literatür kaynakları paralelinde olması sebebiyle, mebendazolün sağlıklı hücrelerde koruyucu etki gösterdiği kanaatini taşımaktayız.

Sonuç olarak; mebendazolün anti-kanser ilaç olarak kullanılabilecek potansiyelde olduğunu, tek başına anti-kanser ilaç olarak kullanılmasa dahi vinkristin veya paklitaksel ile kombinasyonlarının kanser tedavisinde kullanılması halinde vinkristin ve paklitakselin yan etkilerinin azalırken, tedavide farmakolojik etkinliklerinin artacağı kanaatindeyiz. Ancak bu konuda daha detaylı ve farklı kanser türlerini de kapsayan yeni çalışmaların yapılmasının yerinde ve faydalı olacağı görüşündeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Adrain, C., & Martin, S. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *J Trends in biochemical sciences*, 2001; 26(6), 390-397.
- Aggeler, J., Kapp, L. N., Tseng, S. C., & Werb, Z. Regulation of protein secretion in Chinese hamster ovary cells by cell cycle position and cell density: Plasminogen activator, procollagen and fibronectin. *J Experimental cell research*, 1982; 139(2), 275-283.
- Ahmed, H., Chatterjee, B., & Debnath, A. Interaction and in vivo growth inhibition of Ehrlich ascites tumor cells by jacalin. *Journal of Biosciences*, 1988; 13(4), 419-424.
- Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2008; 9(4), 309.
- Allan, L. A., & Clarke, P. R. Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Molecular cell*, 2007; 26(2), 301-310.
- Allen, T. M., Newman, M. S., Woodle, M. C., Mayhew, E., & Uster, P. S. Pharmacokinetics and anti-tumor activity of vincristine encapsulated in sterically stabilized liposomes. *International journal of cancer*, 1995; 62(2), 199-204.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996; 87(2), 171.
- Ammann, R. W., Hoffmann, A. F., Grimm, F., & Johannes, E. Long-term mebendazole therapy may be parasitocidal in alveolar echinococcosis. *Journal of Hepatology*, 1998; 29, 994-998.
- Amos, L. A., & Löwe, J. How Taxol® stabilises microtubule structure. *Chemistry biology*, 1999; 6(3), R65-R69.

- Argyriou, A., Polychronopoulos, P., Koutras, A., Xiros, N., Petsas, T., Argyriou, K., . . . Chroni, E. Clinical and electrophysiological features of peripheral neuropathy induced by administration of cisplatin plus paclitaxel-based chemotherapy. *European journal of cancer care*, 2007; 16(3), 231-237.
- Argyriou, A. A., Kyritsis, A. P., Makatsoris, T., & Kalofonos, H. P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adults: a comprehensive update of the literature. *Cancer Manag Res*, 2014; 6, 135-147. doi:10.2147/CMAR.S44261
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F., & Youle, R. J. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *The EMBO journal*, 2003; 22(17), 4385-4399.
- Avramis, I. A., Kwock, R., & Avramis, V. I. Taxotere and vincristine inhibit the secretion of the angiogenesis inducing vascular endothelial growth factor (VEGF) by wild-type and drug-resistant human leukemia T-cell lines. *Anticancer research*, 2001; 21(4A), 2281-2286.
- Bai, R.-Y., Staedtke, V., Wanjiku, T., Rudek, M. A., Joshi, A., Gallia, G. L., & Riggins, G. J. Brain penetration and efficacy of different mebendazole polymorphs in a mouse brain tumor model. *Clinical Cancer Research*, 2015; 21(15), 3462-3470.
- Bai, R. Y., Staedtke, V., Aprhys, C. M., Gallia, G. L., & Riggins, G. J. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol*, 2011; 13(9), 974-982. doi:10.1093/neuonc/nor077
- Baicu, S. C., & Taylor, M. J. Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency. *Cryobiology*, 2002; 45(1), 33-48.
- Baillif, R. N. The solid phase of the Ehrlich ascites tumor in mice. *Cancer research*, 1954; 14(8), 554-558.
- Balakumaran, A., Campbell, G. A., & Moslen, M. T. Calcium Channel Blockers Induce Thymic Apoptosis in Vivo in Rats. *Toxicology applied pharmacology*, 1996; 139(1), 122-127.
- Barker, H., Smyth, R., Weissbach, H., Toohey, J., Ladd, J., & Volcani, B. Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing benzimidazole or 5, 6-dimethylbenzimidazole. *Journal of Biological Chemistry*, 1960; 235(2), 480-488.

- Behan, J. W., Avramis, V. I., Yun, J. P., Louie, S. G., & Mittelman, S. D. Diet-induced obesity alters vincristine pharmacokinetics in blood and tissues of mice. *Pharmacological research*, 2010; 61(5), 385-390.
- Bekthi & Pirotte Cimetidine increases serum mebendazole concentrations. *Br. J. clin. Pharmac.*, 1987; 24, 390-392.
- Bellamy, C. O. p53 and apoptosis. *British medical bulletin*, 1997; 53(3), 522-538.
- Bellamy, C. O., Malcolmson, R. D., Harrison, D. J., & Wyllie, A. H. *Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis*. Paper presented at the Seminars in cancer biology. 1995
- Below, J., & M Das, J. Vincristine. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2019
- Blagosklonny, M. V., & Fojo, T. Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *International journal of cancer*, 1999; 83(2), 151-156.
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B., & Cidlowski, J. A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in cell biology*, 1995;5(1), 21-26. doi:10.1016/s0962-8924(00)88932-1
- Braithwaite, P., Roberts, M., Allan, R., & Watson, T. J. B. j. o. c. p. Clinical pharmacokinetics of high dose mebendazole in patients treated for cystic hydatid disease. *European journal of clinical pharmacology*, 1982; 22(2), 161-169.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2018; 68(6), 394-424.
- Butler, M., & Christie, A. Adaptation of mammalian cells to non-ammoniagenic media. *Cytotechnology*, 1994; 15(1-3), 87-94.
- Cabadak, H. Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2008; 9(3), 51-61.
- Campbell, W. Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitology Today*, 1990; 6(4), 130-133.
- Cancer. (2020, 03.01.2020). Retrieved from https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Carry, P. J., Prescott, D. M., & Ogilvie, G. K. Resistance to Ehrlich ascites tumor in a strain of dystrophic mice. *Cancer research*, 1979; 39(6 Part 1), 2139-2140.

- Catalogue), A. A. T. a. C. (2020). ATCC Cell Lines. Retrieved from [https://www.lgcstandardsatcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx\(E.T. 11.01.2020\)](https://www.lgcstandardsatcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx(E.T. 11.01.2020))
- Cavaletti, G., Bogliun, G., Marzorati, L., Zincone, A., Marzola, M., Colombo, N., & Tredici, G. Peripheral neurotoxicity of taxol in patients previously treated with cisplatin. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 1995;75(5), 1141-1150.
- Chandrashekara, K. Basic Concept of Biotechnology. In D. K.N.Chandrashekara & D. A. Yakkaladevi (Eds.), (1 ed., Vol. 6, pp. 239-321). Solapur-413005: Lulu. com. 2015
- Chao, S. K., Wang, Y., Verdier-Pinard, P., Yang, C.-P. H., Liu, L., Rodriguez-Gabin, A., . . . Horwitz, S. B. Characterization of a human β V-tubulin antibody and expression of this isotype in normal and malignant human tissue. *Cytoskeleton*, 2012; 69(8), 566-576. doi:10.1002/cm.21043
- Chen, L., & Watkins, J. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1970; 225(5234), 734-735.
- Chiba, Y., Kohri, N., Iseki, K., & Miyazaki, K. Improvement of Dissolution and Bioavailability for Mebendazole, an Agent for Human Echinococosis by Preparing Solid Dispersion with Polyethylen Glycol. *Chem. Pharm. Bull.*, 1991; 39(8), 2158-2160.
- Chu, S., Badar, S., Morris, D. L., & Pourgholami, M. H. Potent Inhibition of Tubulin Polymerisation and Proliferation of Paclitaxel-resistant 1A9PTX22 Human Ovarian Cancer Cells by Albendazole. *Anticancer research*, 2009; 29, 3791-3796.
- Clément, M.-J., Rathinasamy, K., Adadj, E., Toma, F., Curmi, P. A., & Panda, D. Benomyl and colchicine synergistically inhibit cell proliferation and mitosis: evidence of distinct binding sites for these agents in tubulin. *Biochemistry*, 2008; 47(49), 13016-13025.
- Cohen, J. J. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest*, 1993;103(2), 99S-101S.
- Cory, S., & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2002; 2(9), 647.

- Coyne, C. P., Jones, T., & Bear, R. Gemcitabine-(C4-amide)-[anti-HER2/neu] Anti-Neoplastic Cytotoxicity in Dual Combination with Mebendazole against Chemotherapeutic-Resistant Mammary Adenocarcinoma. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*, 2018; 02(02). doi:10.4172/2324-9110.1000109
- Culture Practice. (2020). Retrieved from [https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/reproducibility/scientific-background/everyday-culture-practice/\(E.T.09.01.2020\)](https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/reproducibility/scientific-background/everyday-culture-practice/(E.T.09.01.2020))
- Cummings, M., & Winterford, C. Walker N1. *Am J Surg Pathol*, 21(1), 88-101.
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell*, 2004; 116(2), 205-219.
- Dawson, M., Allan, R., & Watson, T. The pharmacokinetics and bioavailability of mebendazole in man: a pilot study using [3H]-mebendazole. *British journal of clinical pharmacology*, 1982; 14(3), 453-455.
- Dawson, M., & Watson, T. The effect of dose form on the bioavailability of mebendazole in man. *British journal of clinical pharmacology*, 1985; 19(1), 87-90.
- Dayan, A. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta tropica*, 2003; 86(2-3), 141-159.
- Dennison, J. B., Kulanthaivel, P., Barbuch, R. J., Renbarger, J. L., Ehlhardt, W. J., & Hall, S. D. Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug metabolism disposition*, 2006; 34(8), 1317-1327.
- Deva, S., & Jameson, M. (). Histamine type 2 receptor antagonists as adjuvant treatment for resected colorectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012; (8). 16-22.
- DeVita, V. T., & Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*, 2008; 68(21), 8643-8653.
- Doudican, N., Rodriguez, A., Osman, I., & Orlow, S. J. Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. *Mol Cancer Res*, 2008; 6(8), 1308-1315. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2159
- Doudican, N. A., Byron, S. A., Pollock, P. M., & Orlow, S. J. XIAP downregulation accompanies mebendazole growth inhibition in melanoma xenografts. *Anticancer Drugs*, 2013;24(2), 181-188. doi:10.1097/CAD.0b013e32835a43f1

- Drugbank. (2020a). Mebendazole. Retrieved from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00643> (E.T. 06.01.2020)
- Drugbank. (2020b, 2020). Paclitaxel. Retrieved from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01229> (E.T. 08.01.2020)
- Drugbank. (2020c, 2020). Vinkristine. Retrieved from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00541> (E.T. 06.01.2020)
- Düwel, D. Fenbendazole. II. Biological properties and activity. *Pesticide Science*, 1977; 8(5), 550-555.
- Earle, W. R., Nettleship, A., Schilling, E. L., Stark, T. H., Straus, N. R., Brown, M. F., & Shelton, E. Production of malignancy in vitro. V. Results of injections of cultures into mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 1943;4(2), 213-227.
- Eastman, A. *Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonucleases in apoptosis*. Paper presented at the Seminars in cancer biology. 1995
- Edward, C., & Katzung, B. Kanser Kemoterapisi. In *Temel ve Klinik Farmakoloji* (pp. 952). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2014
- Edward Chu, A. C. S. (). Kanser Kemoterapisi (Z. Yazıcı, Trans.). In B. G. Katzung (Ed.), *Basic&Clinical Pharmacolgy* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2012a; 12. ed., Vol. 54, pp. 951-952.
- Edward Chu, A. C. S. *Kanser Kemoterpisi* (Z. Yazıcı, Trans. 12. ed. Vol. 54). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2012b
- English, D. P., Roque, D. M., & Santin, A. D. Class III b-tubulin overexpression in gynecologic tumors: implications for the choice of microtubule targeted agents? *Expert review of anticancer therapy*, 2013; 13(1), 63-74. doi:10.1586/era.12.158
- Erdemoğlu, N., & Şener, B. The antitumor effects of the taxane class compounds. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2000; 29(1), 77-90.
- Fan, T.-J., Han, L.-H., Cong, R.-S., & Liang, J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2005; 37(11), 719-727.
- Figueroa-Masot, X. A., Hetman, M., Higgins, M. J., Kokot, N., & Xia, Z. Taxol induces apoptosis in cortical neurons by a mechanism independent of Bcl-2 phosphorylation. *Journal of Neuroscience*, 2001; 21(13), 4657-4667.

- Fossella, F. V., Lee, J. S., Murphy, W. K., Lippman, S. M., Calayag, M., Pang, A., Benner, S. Phase II study of docetaxel for recurrent or metastatic non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology*, 1994;12(6), 1238-1244.
- Freshney, R. I. Basic principles of cell culture. *Culture of cells for tissue engineering*, 2006; 11-14.
- Galmarini, C. M., Bouchet, B. P., Falette, N., Vila, L., Lamblot, C., Audouyoud, C., Puisieux, A. Weekly administration of paclitaxel induces long-term aneugenicity in nude mice. *Cancer biology therapy*, 2007; 6(3), 377-382.
- Gao, P., Dang, C. V., & Watson, J. Unexpected antitumorigenic effect of fenbendazole when combined with supplementary vitamins. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2008; 47(6), 37-40.
- Garcia-Rodriguez, J. J., de la Torre-Iglesias, P. M., Vegas-Sanchez, M. C., Torrado-Duran, S., Bolas-Fernandez, F., & Torrado-Santiago, S. Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: improved anthelmintic activity. *Int J Pharm*, 2011; 403(1-2), 23-28. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.002
- Gary, A. T., Kerl, M. E., Wiedmeyer, C. E., Turnquist, S. E., & Cohn, L. A. Bone marrow hypoplasia associated with fenbendazole administration in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 2004; 40(3), 224-229.
- Gey, M., Ireland, C., & Pittman, S. Resistance to apoptotic cell death in a drug resistant T cell leukaemia cell line. *Leukemia*, 1996; 10(3), 447-455.
- Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 2006; 27(19), 3675-3683.
- Guerini, A. E., Triggiani, L., Maddalo, M., Bonù, M. L., Frassine, F., Baiguini, A., Pasinetti, N. Mebendazole as a candidate for drug repurposing in oncology: an extensive review of current literature. *Cancers*, 2019; 11(9), 1284.
- Gupta, M., Mazumder, U. K., Kumar, R. S., Sivakumar, T., & Vamsi, M. L. M. Antitumor activity and antioxidant status of Caesalpinia bonducella against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Journal of Pharmacological*, 2004; 94(2), 177-184.
- Güleş, Ö., & Ülker, E. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008; 19(2), 73-78.
- Habib, N., & Aboulwafa, O. M. Potential alkylating agents derived from benzimidazole and benzothiazole. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1982; 71(9), 991-993.

- Harrison, R. G., Greenman, M., Mall, F. P., & Jackson, C. Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, 1907; 1(5), 116-128.
- Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 1965; 37(3), 614-636.
- Hayot, C., Farinelle, S., De Decker, R., Decaestecker, C., Darro, F., Kiss, R., & Van Damme, M. In vitro pharmacological characterizations of the anti-angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton. *International journal of oncology*, 2002; 21(2), 417-425.
- He, Q., Li, J., Yin, W., Song, Z., Zhang, Z., Yi, T., Wang, Z. Low-dose paclitaxel enhances the anti-tumor efficacy of GM-CSF surface-modified whole-tumor-cell vaccine in mouse model of prostate cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011; 60(5), 715-730.
- Heath, D., Christie, M. J., & Chevis, R. The lethal effect of mebendazole on secondary Echinococcus granulosus, cysticerci of Taenia pisiformis and tetrathyridia of Mesocostoides corti. *Parasitology Today*, 1975; 70(2), 273-285.
- Henry, W. I., Dubois, J., & Quick, Q. A. The microtubule inhibiting agent epothilone B antagonizes glioma cell motility associated with reorganization of the actin-binding protein α -actinin 4. *Oncology reports*, 2011; 25(3), 887-893.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Sasada, M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *Journal of experimental medicine*, 1998; 187(4), 587-600.
- Hirschberg, E., Gellhorn, A., & Gump, W. S. Laboratory evaluation of a new nitrogen mustard, 2-[di-(2-chloroethyl) aminomethyl] benzimidazole, and of other 2-chloroethyl compounds. *Cancer research*, 1957; 17(9), 904-910.
- Holden, H. E., Crider, P. A., & Wahrenburg, M. G. Mitotic arrest by benzimidazole analogs in human lymphocyte cultures. *Environmental mutagenesis*, 1980; 2(1), 67-73.
- Horwitz, S. B. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 1994; 5, S3-6.

- Ibrahim, E.-S. A., Omar, A.-M. M., & Khalil, M. Novel potential anticancer agents derived from benzimidazole. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1980; 69(11), 1348-1350.
- Information., N. C. f. B. (2020, 12.01.2020). Mebendazole (Compound). Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4030#section=Therapeutic-Uses>(E.T. 06.01.2020)
- Institute, N. H. G. R. (2020). Cell Cycle. Retrieved from <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle>(E.T. 06.01.2020)
- Ito, T., Deng, X., Carr, B., & May, W. S. Bcl-2 Phosphorylation Required for Anti-apoptosis Function. *The Journal Of Biological Chemistry*, 1997; 272, 11671-11673.
- Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V. C., Lill, J. R., & Ashkenazi, A. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell*, 2009; 137(4), 721-735.
- Jochems, C. E., Van Der Valk, J. B., Stafleu, F. R., & Baumans, V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Alternatives to Laboratory Animals*, 2002; 30(2), 219-227.
- Jordan, M. A., & Kamath, K. How do microtubule-targeted drugs work? An overview. *Current cancer drug targets*, 2007; 7(8), 730-742.
- Jordan, M. A., Thrower, D., & Wilson, L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer research*, 1991; 51(8), 2212-2222.
- Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H., & Wilson, L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer research*, 1996; 56(4), 816-825.
- Jordan, M. A., & Wilson, L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current opinion in cell biology*, 1998; 10(1), 123-130.
- Joseph, M. M., Aravind, S., George, S. K., Pillai, K. R., Mini, S., & Sreelekha, T. Antitumor activity of galactoxyloglucan-gold nanoparticles against murine ascites and solid carcinoma. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2014; 116, 219-227.
- Kanter, P. M., Klaich, G. M., Bullard, G. A., King, J. M., Bally, M. B., & Mayer, L. D. Liposome encapsulated vincristine: preclinical toxicologic and pharmacologic

- comparison with free vincristine and empty liposomes in mice, rats and dogs. *Anti-cancer drugs*, 1994; 5(5), 579-590.
- Karra, N., Cohen, R., Berlin, M., Dinavitser, N., Koren, G., & Berkovitch, M. Safety of mebendazole use during lactation: A case series report. *Drugs in R*, 2016; 16(3), 251-254.
- Katiyar, S., Gordon, V., McLaughlin, G., & Edlind, T. J. A. a. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. *Antimicrobial agents chemotherapy*, 1994; 38(9), 2086-2090.
- Katsetos, C. D., Herman, M. M., & Mörk, S. J. Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell motility and the cytoskeleton*, 2003; 55(2), 77-96. doi:10.1002/cm.10116
- Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature reviews. Cancer*, 2010; 10(3), 194-204. doi:10.1038/nrc2803
- Keese, C. R., Wegener, J., Walker, S. R., & Giaever, I. Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004; 101(6), 1554-1559.
- Kelly, K., Crowley, J., Bunn Jr, P. A., Presant, C. A., Grevstad, P. K., Moinpour, C. M., Moore, D. F. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *Journal of clinical oncology*, 2001; 19(13), 3210-3218.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 1972; 26(4), 239-257. doi:10.1038/bjc.1972.33
- Kim, S. C., Kim, D. W., Shim, Y. H., Bang, J. S., Oh, H. S., Kim, S. W., & Seo, M. H. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 2001; 72(1-3), 191-202.
- Klauber, N., Parangi, S., Flynn, E., Hamel, E., & D'Amato, R. J. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer research*, 1997; 57(1), 81-86.
- Koçaklı, Z., Akıllıoğlu, K., & Doğan, A. Isolation and Culture of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2015; 24(3), 390-401.

- Kuwana, T., Smith, J. J., Muzio, M., Dixit, V., Newmeyer, D. D., & Kornbluth, S. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273(26), 16589-16594.
- Laclette, J., Guerra, G., & Zetina, C. Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. *Biochemical biophysical research communications*, 1980; 92(2), 417-423.
- Laken, H. A., & Leonard, M. W. Understanding and modulating apoptosis in industrial cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001; 12(2), 175-179.
- Laryea, D., Gullbo, J., Isaksson, A., Larsson, R., & Nygren, P. Characterization of the cytotoxic properties of the benzimidazole fungicides, benomyl and carbendazim, in human tumour cell lines and primary cultures of patient tumour cells. *Anti-cancer drugs*, 2010; 21(1), 33-42.
- Lazebnik, Y. A., Medvedeva, N. D., & Zenin, V. V. Reversible G2 block in the cell cycle of Ehrlich ascites carcinoma cells. *Experimental cell research*, 1991; 195(1), 247-254.
- Lee, W.-L., Shiau, J.-Y., & Shyur, L.-F. (). Taxol, camptothecin and beyond for cancer therapy. In *Advances in Botanical Research* 2012; Vol. 62, pp. 133-178: Elsevier.
- Lester, K. A. *Primary cell cultures from Cod (Gadus morhua) and Atlantic Halibut (Hippoglossus hippoglossus)*. (Phd Master of Philosophy), Strirling University, 2007
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.-j., & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998; 94(4), 491-501.
- Liu, C. S., Zhang, H. B., Jiang, B., Yao, J. M., Tao, Y., Xue, J., & Wen, A. D. Enhanced bioavailability and cysticidal effect of three mebendazole-oil preparations in mice infected with secondary cysts of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res*, 2012; 111(3), 1205-1211. doi:10.1007/s00436-012-2954-2
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 1997; 89(2), 175-184.
- LiwerTox. 2020. In U. S. N. L. O. Medicine (Ed.). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547885/> (E.T. 06.01.2020)

- Ioannou, Y. A., & Chen, F. W. Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis. *Nucleic acids research*, 1996; 24(5), 992-993.
- M, D., & TR, W. The effect of dose form on the bioavailability of mebendazole in man. *Br. J. clin. Pharmac.*, 1985; 19, 87-90.
- Maini, P. K., McElwain, S., & Leavesley, D. Travelling waves in a wound healing assay. *Applied Mathematics Letters* 2004; (17), 575-580.
- Mak, T. The E. Donnall Thomas lecture apoptosis: "Tis death that makes life live". *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2003; 9(8), 483-488.
- Mandel, E. M., Lewinski, U., & Djaldetti, M. Vincristine-induced myocardial infarction. *Cancer*, 1975; 36(6), 1979-1982.
- Martarelli, D., Pompei, P., Baldi, C., & Mazzoni, G. Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2008; 61(5), 809-817. doi:10.1007/s00280-007-0538-0
- Marupudi, N. I., Han, J. E., Li, K. W., Renard, V. M., Tyler, B. M., & Brem, H.). Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert opinion on drug safety*, 2007; 6(5), 609-621.
- Mary, S. J. *in vitro anti-cancer effects of benzimidazoles on the canine osteosarcoma d17 cell line*. (Master of Science Master Of Science), University of Illinois, Champaign. 2013
- Mastropaolo, D., Camerman, A., Luo, Y., Brayer, G. D., & Camerman, N. Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995; 92(15), 6920-6924.
- McCracken, R. O. Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *The Journal of parasitology*, 1978; 214-219.
- McKellar, Q., & Scott, E. The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of veterinary pharmacology*, 1990; 13(3), 223-247.
- McNally, F. J. Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle. *Current opinion in cell biology*, 1996; 8(1), 23-29.
- Medicine, U. S. N. L. o. (2020, 11.01.2020). A Phase I Study of Mebendazole for the Treatment of Pediatric Gliomas. Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01837862> (E.T. 16.01.2020)

- Messaritakis, J., Psychou, P., Nicolaidou, P., Karpathios, T., Syriopoulou, B., Fretzayas, A., Matsaniotis, N. High mebendazole doses in pulmonary and hepatic hydatid disease. *Archives of disease in childhood*, 1991; 66(4), 532-533.
- Miele, M., Mumot, A. M., Zappa, A., Romano, P., & Ottaggio, L. Hazel and other sources of paclitaxel and related compounds. *Phytochemistry reviews*, 2012; 11(2-3), 211-225.
- Mohammad, R. M., Diwakaran, H., Maki, A., Emara, M. A., Pettit, G. R., Redman, B., & Al-Katib, A. Bryostatin 1 induces apoptosis and augments inhibitory effects of vincristine in human diffuse large cell lymphoma. *Leukemia research*, 1995; 19(9), 667-673.
- Mollinedo, F., & Gajate, C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2003; 8(5), 413-450. doi:10.1023/a:1025513106330
- Mora, E., Smith, E. M. L., Donohoe, C., & Hertz, D. L. Vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric cancer patients. *American journal of cancer research*, 2016; 6(11), 2416-2430.
- Morgan, U., Reynoldson, J., Thompson, R. J. A. a., & chemotherapy. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. *Antimicrobial agents*, 1993; 37(2), 328-331.
- Mukhopadhyay, T., Sasaki, J.-i., Ramesh, R., & Roth, J. A. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, 2002; 8(9), 2963-2969.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., & Fukuyama, H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell death and differentiation*, 2003; 10(1), 108-116. doi:10.1038/sj.cdd.4401161
- Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., Moskowitz, M. A. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*, 1998; 18(10), 3659-3668.
- Nema, R., & Khare, S. An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Advances in Bioscience Biotechnology*, 2012; 3(3), 219.
- Nogales, E. Structural insights into microtubule function. *Annual review of biophysics biomolecular structure*, 2001; 30(1), 397-420.

- Nygren, P., Fryknas, M., Agerup, B., & Larsson, R. Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013; *139*(12), 2133-2140. doi:10.1007/s00432-013-1539-5
- Organisation, W. H. *Drugs used in parasitic diseases* (Second Edition ed.): WHO. 1995
- Organisation, W. H. 1995, 2020. WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Parasitic Diseases - Second Edition. *Mebendazole*. Retrieved from <https://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2922e/3.2.3.html> (E.T. 15.01.2020)
- Oyeleye, O., Ola, S., & Omitogun, O. Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Biotechnology Molecular Biology Reviews*, 2016; *11*(2), 6-16.
- Ozaslan, M., Karagoz, I. D., Kilic, I. H., & Guldur, M. E. Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 2011; *10*(13), 2375-2378.
- Panchagnula, R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998; *172*(1-2), 1-15.
- Pantziarka, P., Bouche, G., Meheus, L., Sukhatme, V., & Sukhatme, V. P. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-mebendazole as an anti-cancer agent. *ecancermedicalscience*, 2014; *8*, 443. doi:10.3332/ecancer.2014.443
- Pantziarka, P., Bouche, G., Meheus, L., Sukhatme, V., & Sukhatme, V. P. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—mebendazole as an anti-cancer agent. *ecancermedicalscience*, 2014; *8*, 21-27.
- Parthasarathi, G., Udupa, N., Umadevi, P., & Pillai, G. Niosome encapsulated of vincristine sulfate: improved anticancer activity with reduced toxicity in mice. *Journal of drug targeting*, 1994; *2*(2), 173-182.
- Patt, H. M., & Straube, R. L. Measurement and nature of ascites tumor growth. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1956; *63*(5), 728-737.
- Pınarbaşı, E. Apoptosis (Programlı Hücre Ölümü). In T. B (Ed.), *Moleküler Biyoloji*. Ankara: Nobel Yayın. 2007; 423-468.
- Pinto, L. C., Mesquita, F. P., Soares, B. M., da Silva, E. L., Puty, B., de Oliveira, E. H. C., Montenegro, R. C. Mebendazole induces apoptosis via C-MYC inactivation in malignant ascites cell line (AGP01). *Toxicology in Vitro*, 2019; *60*, 305-312.
- Pombinho, A. R., Laizé, V., Molha, D. M., Marques, S. M., & Cancela, M. L. Development of two bone-derived cell lines from the marine teleost *Sparus aurata*; evidence for extracellular matrix mineralization and cell-type-specific

- expression of matrix Gla protein and osteocalcin. *Cell tissue research*, 2004; 315(3), 393-406.
- Poole, C. A., Reilly, H. C., & Flint, M. H. The adverse effects of HEPES, TES, and BES zwitterion buffers on the ultrastructure of cultured chick embryo epiphyseal chondrocytes. *In Vitro*, 1982; 18(9), 755-765.
- Postma, T., Vermorken, J., Liefing, A., Pinedo, H., & Heimans, J. Paclitaxel-induced neuropathy. *Annals of Oncology*, 1995; 6(5), 489-494.
- Priyabrat, S., Nanda, P., Nayak, S., & Mishra, S. Basic techniques and limitations in establishing cell culture: a mini review. *Advances in Animal Veterinary Sciences*, 2014; 2(4S), 1-10.
- Products, M. 2001. *Mebendazole*. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/mebendazole-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf(E.T. 17.01.2020)
- Putt, K. S., Chen, G. W., Pearson, J. M., Sandhorst, J. S., Hoagland, M. S., Kwon, J.-T., Cho, M.-H. Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy. *Nature chemical biology*, 2006; 2(10), 543.
- Rahmani, R., & Zhou, X. J. Pharmacokinetics and metabolism of vinca alkaloids. *Cancer surveys*, 1993; 17, 269-281.
- Rak, K. Effect of vincristine on platelet production in mice. *British journal of haematology*, 1972; 22(5), 617-624.
- Register, E.C.T. 2020. Clinical trials for mebendazole. Retrieved from <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=mebendazole>(E.T. 06.01.2020)
- Reute, S., Jensen, B., Buttenschoen, K., Kratzer, W., & Kern, P. Bendimidazole trethment of alveollar echinecococosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 46, 451-456.
- Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Salvesen, G. S. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, 2001; 104(5), 791-800.
- Rodriguez-Caabeiro, F., Criado-Fornelio, A., Jimenez-Gonzalez, A., Guzman, L., Igual, A., Perez, A., & Pujol, M. J. C. Experimental chemotherapy and toxicity in mice of three mebendazole polymorphic forms. *Chemotherapy*, 1987; 33(4), 266-271.

- Rodriguez, L. G., Wu, X., & Guan, J.-L. Wound-healing assay. In *Cell Migration*: Springer. 2005; 23-29
- Rowinsky, E., Eisenhauer, E., Chaudhry, V., Arbuck, S., & Donehower, R. C. *Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol)*. Paper presented at the Seminars in oncology. 1993
- S, E. Apoptosis A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 2007; 35(4), 495-516.
- Sakai, M., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M., Ribeiro, A., Quinteiro-Filho, W., Rone, M., Palermo-Neto, J. Translocator protein (18 kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells in vivo. *European journal of pharmacology*, 2010; 626(2-3), 131-138.
- Sanchez, S., Sallovitz, J., Savio, E., Mckellar, Q., & Lanusse, C. Comparative availability of two oral dosage forms of albendazole in dogs. *The Veterinary Journal*, 2000; 160(2), 153-156.
- Sasaki, J.-i., Ramesh, R., Chada, S., Gomyo, Y., Roth, J. A., & Mukhopadhyay, T. The Anthelmintic Drug Mebendazole Induces Mitotic Arrest and Apoptosis by Depolymerizing Tubulin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2002; 1, 1201-1209.
- Saunders, C., & Limbird, L. E. Disruption of microtubules reveals two independent apical targeting mechanisms for G-protein-coupled receptors in polarized renal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1997; 272(30), 19035-19045.
- Sawanyawisuth, K., Williamson, T., Wongkham, S., & Riggins, G. J. Effect of the antiparasitic drug mebendazole on cholangiocarcinoma growth. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*, 2014a; 45(6), 1264.
- Sawanyawisuth, K., Williamson, T., Wongkham, S., & Riggins, G.J.J.C.C.R. Effect of the antiparasitic drug mebendazole on cholangiocarcinoma growth. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*, 2014b; 45(6), 1264.
- Schiff, P. B., Fant, J., & Horwitz, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature Reviews Cancer*, 1979; 277(5698), 665.
- Schiff, P. B., & Horwitz, S. B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980; 77(3), 1561-1565.
- Schwartzman, R. A., & Cidlowski, J. A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine reviews*, 1993; 14(2), 133-151.

- Scuteri, A., Nicolini, G., Miloso, M., Bossi, M., Cavaletti, G., Windebank, A. J., & Tredici, G. Paclitaxel toxicity in post-mitotic dorsal root ganglion (DRG) cells. *Anticancer research*, 2006; 26(2A), 1065-1070.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., & Dvorak, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983; 219(4587), 983-985.
- Sevko, A., Kremer, V., Falk, C., Umansky, L., Shurin, M. R., Shurin, G. V., & Umansky, V. Application of paclitaxel in low non-cytotoxic doses supports vaccination with melanoma antigens in normal mice. *Journal of immunotoxicology*, 2012; 9(3), 275-281.
- Sevko, A., Michels, T., Vrohlings, M., Umansky, L., Beckhove, P., Kato, M., . . . Umansky, V. Antitumor effect of paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. *The Journal of Immunology*, 2013; 190(5), 2464-2471.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2000; 1(1), 72.
- Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, 2002; 9(3), 459-470.
- Siems, W. G., Grune, T., Schmidt, H., Tikhonov, Y. V., & Pimenov, A. M. Purine Nucleotide Levels in Host Tissue of Ehrlich Ascites Tumor-bearing Mice in Different Growth Phases of the Tumor. *Cancer research*, 1993; 53(21), 5143-5147.
- Silverman, J. A., & Deitcher, S. R. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2013; 71(3), 555-564. doi:10.1007/s00280-012-2042-4
- Singla, A. K., Garg, A., & Aggarwal, D. Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002; 235(1-2), 179-192.
- Sips, J., Beijnen, J., Bult, A., & Nooijen, W. Pharmacology, bio-analysis and pharmacokinetics of the vinca alkaloids and semi-synthetic derivatives. *Anticancer research*, 1992; 12(5), 1699-1715.
- Skibinski, C. G., Williamson, T., & Riggins, G. J. Mebendazole and radiation in combination increase survival through anticancer mechanisms in an intracranial

- rodent model of malignant meningioma. *Journal of neuro-oncology*, 2018; 140(3), 529-538.
- Skog, S., He, Q., & Tribukait, B. Lack of correlation between thymidine kinase activity and changes of DNA synthesis with tumour age: an in vivo study in Ehrlich ascites tumour. *Cell Proliferation*, 1990; 23(6), 603-617.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Alnemri, E. S. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology*, 1999; 144(2), 281-292.
- Soengas, M. S., & Lowe, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 2003; 22(20), 3138-3151. doi:10.1038/sj.onc.1206454
- Spagnuolo, P. A., Hu, J., Hurren, R., Wang, X., Gronda, M., Sukhai, M. A., Schimmer, A. D. The antihelminthic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Blood*, 2010; 115(23), 4824-4833. doi:10.1182/blood-2009-09-243055
- Srivastava, R. K., Mi, Q.-S., Hardwick, J. M., & Longo, D. L. Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999; 96(7), 3775-3780.
- Stennicke, H. R., Jürgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Bredesen, D. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273(42), 27084-27090.
- Stoker, M. Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. *Nature Reviews Cancer*, 1973; 246(5430), 200.
- Subiza, J. L., Vinuela, J. E., Rodriguez, R., Gil, J., Figueredo, M. A., & de la Concha, E. G. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. *International journal of cancer*, 1989; 44(2), 307-314.
- Tapas, M., Ji-ichiro, S., Ramesh, R., & Roth, J. A. Mebendazole Elicits a Potent Antitumor Effect on Human Cancer Cell Lines Both in Vitro and in Vivo1. *Clinical Cancer Research*, 2002; 8, 2963-2969.
- Tchernev, G., & Orfanos, C. Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma

is associated with worse patient prognosis: preliminary findings. *Journal of cutaneous pathology*, 2007; 34(3), 247-256.

Tekeli, Y. *Monensinin Cıvcıvlerde ve Cıvciv Karaciğer Doku Kültürü Hücrelerinde Hepatotoksik Etkileri*. (Phd. Dr.), Erciyes Üniversitesi, Kayseri. 2018

Terada, M., Kino, H., Akyol, C., & Sano, M. Effects of mebendazole on *Angiostrongylus costaricensis* in mice, with special reference to the timing of treatment. *Parasitology research*, 1993; 79(6), 441-443.

Terwogt, J. M., Nuijen, B., Huinink, W. T. B., & Beijnen, J. Alternative formulations of paclitaxel. *Cancer treatment reviews*, 1997; 23(2), 87-95.

Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 267(5203), 1456-1462.

Tsubaki, M., Takeda, T., Matsumoto, M., Kato, N., Yasuhara, S., Koumoto, Y.-I., . . . Nishida, S. Tamoxifen suppresses paclitaxel-, vincristine-, and bortezomib-induced neuropathy via inhibition of the protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Tumour biology* 2018; 40(10), 1010428318808670-1010428318808670. doi:10.1177/1010428318808670

U.S. National Library of Medicine, P. 2020. Mebendazole. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mebendazole> (E.T. 17.01.2020)

V., K. Neoplazi. In *Robins Temel Patoloji* (9 ed., Vol. 5, pp. 161-190). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2013.

Vaage, J., Donovan, D., Mayhew, E., Uster, P., & Woodle, M. Therapy of mouse mammary carcinomas with vincristine and doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *International journal of cancer*, 1993; 54(6), 959-964.

Van den Bossche, H., Rochette, F., & Hörig, C. (). Mebendazole and related anthelmintics. In *Advances in Pharmacology*: Elsevier. 1982; 19: 67-128

Van Meerloo, J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture*, Springer. 2011; 237-245

Vaux, D. L., & Flavell, R. A. Apoptosis genes and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 2000; 12(6), 719-724.

Vermeulen, K., & Berneman, Z. vanBockstaele DR. *Cell cycle and apoptosis*. *Cell Prolif*, 2003; 36(1), 165-175.

- Wade, R. H. On and around microtubules: an overview. *Molecular biotechnology*, 2009; 43(2), 177-191. doi:10.1007/s12033-009-9193-5
- Walsh, J. G., Cullen, S. P., Sheridan, C., Lüthi, A. U., Gerner, C., & Martin, S. J. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008; 105(35), 12815-12819.
- Weaver, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 2014; 25(18), 2677-2681.
- Wei, G., Chun, Z., & Fengquan, D. Paclitaxel-induced apoptosis in osteosarcoma cell line U2-OS. *Chin Med J*, 2002; 115(12), 1796-1801.
- Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature Reviews Cancer*, 1980; 284(5756), 555-556.
- Yamada, K. M., & Olden, K. Fibronectins—adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature Reviews Cancer*, 1978; 275(5677), 179.
- Yang, C. H., & Horwitz, S. B. Taxol((R)): The First Microtubule Stabilizing Agent. *Int J Mol Sci*, 2017; 18(8). doi:10.3390/ijms18081733
- Yao, T., & Asayama, Y. Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine biology*, 2017; 16(2), 99-117.
- Yarrow, J. C., Perlman, Z. E., Westwood, N. J., & Mitchison, T. J. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC biotechnology*, 2004; 4(1), 21.
- Yvon, A.-M. C., Wadsworth, P., & Jordan, M. A. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Molecular biology of the cell*, 1999; 10(4), 947-959.
- Zhang, J. H., & Xu, M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell research*, 2000; 10(3), 205-211. doi:10.1038/sj.cr.7290049
- Zhuang, L., Lee, C. S., Scolyer, R. A., McCarthy, S. W., Zhang, X. D., Thompson, J. F., & Hersey, P. Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Modern pathology*, 2007; 20(4), 416.
- Zigler, J., Lepe-Zuniga, J., Vistica, B., & Gery, I. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, 1985; 21(5), 282-287.

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

02.02.2017

Sayı : 65202830-050.04.04-20
Konu : Etik Kurul Kararı.

Sayın

Prof. Dr.Haki KARA
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji ABD.

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 02.02.2017 tarihinde Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Prof. Dr.Haki KARA'nın yürütücülüğünü yapmış olduğu ve yardımcıları Doktora Öğrencisi. Mahmut ŞAHİN'in 26.01.2017 tarih ve 09 sayılı "Mebendazolün Kanserli Hücrelerde Apoptozis İndükleyici ve Tubulin İnhibisyonu Yapıcı Etkileri Bakımından, Paclitaxel ve Vincristin ile Karşılaştırılması." isimli Doktora Tezi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Eray BULUT
Üye

Prof. Dr. Mustafa TURAN
Üye

(İzini)
Prof. Dr. Zübeyda Akın POLAT
Üye

Prof. Dr. İhsan HUBERDOĞU
Üye

Doç. Dr. Bülent SARAC
Üye

(İzini)
Yrd.Doç.Dr.M. Önder KARAYIGIT
Üye

Yrd.Doç.Dr.Erhan YÜKSEL
Üye

Yrd.Doç.Dr.Hakan İSİDAN
Üye

Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN
Üye - Başkanvekili

Özcan KARATAŞ
Sivil Üye

(Katılmadı)
Hilmi GÜL
Sivil Üye

Prof. Dr. Haki KARA
Başkan

(Katılmadı)

Tez

ORIGINALITY REPORT

6%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	docplayer.biz.tr Internet	377 words — 2%
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet	314 words — 1%
3	dergipark.ulakbim.gov.tr Internet	268 words — 1%
4	www.abbs.info Internet	65 words — < 1%
5	acikarsiv.ankara.edu.tr Internet	35 words — < 1%
6	www.ejmanager.com Internet	31 words — < 1%
7	istanbulsaglik.gov.tr Internet	28 words — < 1%
8	Laine Celestino Pinto, Bruno Moreira Soares, João de Jesus Viana Pinheiro, Gregory J. Riggins et al. "The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model", Toxicology in Vitro, 2015 Crossref	27 words — < 1%
9	nexusacademicpublishers.com Internet	26 words — < 1%
10	openaccess.inonu.edu.tr:8080 Internet	25 words — < 1%

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mahmut ŞAHİN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 07 Ağustos 1979, SİVAS

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 505 446 55 79

Fax:

email: mahmutvet@gmail.com

Yazışma Adresi: Kümbet Mah. 27. Sok. Göktürk Sitesi A Blok No:11/10
Merkez/SİVAS

EĞİTİM

Derece Kurum Mezuniyet Tarihi

Lisans Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ 2003

Lise Gökhöyük Ziraat Meslek Lisesi, Amasya 1998

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	/ Kurum	/ Görev
2000-2004	/ Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Elazığ	/ Teknisyen
2004-2007	/ Pervari İlçe Tarım Müdürlüğü, Siirt	/ Veteriner Hekim
2007-2009	/ Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Sivas	/ Veteriner Hekim
2009-	/ TKDK Sivas İl Koordinatörlüğü, Sivas	/ Uzman

YABANCI DİL

İngilizce