T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İlker DIBIRDIK

ANKAFERD BLOODSTOPPER KANAMA DURDURUCUNUN *İN VİTRO* KOLON KANSERİ HÜCRELERİNİN ÇOĞALMALARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Büşra DİLER ZENGİNER

Referans no: 10102130

EDİRNE-2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İlker DIBIRDIK

ANKAFERD BLOODSTOPPER KANAMA DURDURUCUNUN *İN VİTRO* KOLON KANSERİ HÜCRELERİNİN ÇOĞALMALARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Büşra DİLER ZENGİNER

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2016/64

Tez no:

EDİRNE-2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. İlker DIBIRDIK danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Büşra DİLER ZENGİNER tarafından tez başlığı "Ankaferd BloodStopper Kanama Durdurucunun *İn Vitro* Kolon Kanseri Hücrelerinin Çoğalmaları Üzerine Olan Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 16/05/2017 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Erol Çakır
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Prof. Dr. İlker DIBIRDIK
ÜYE

İmza
Doç. Dr. Savaş GÜZEL
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Akademik yaşamıma başladığım ilk günden bu güne, bilime bakış açısı ile kendisinden çok şey öğrendiğim çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, değerli öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN, Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK, Prof. Dr. Hakan ERBAŞ, Yrd. Doç. Dr. Eray ÖZGÜN ve Öğr. Gör. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN'e, arkadaşlarım Aycan ÜNAL ve Araş. Gör. Çiğdem FİDAN'a, bu süreçte her zaman yanımda bulunan aileme, beni tanıdığı ilk günden bu yana her zaman beni destekleyen ve hep yanımda olan sevgili eşim Uğur ZENGİNER'e ve çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **KOLON KANSERİ** 3
- **KOLON KANSERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI** 6
- **KOLON KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI** 8
- **HÜCRE DÖNGÜSÜ** 10
- **APOPTOZİS** 11
- **DOĞAL ÜRÜNLERİN TEDAVİDE KULLANIMI** 16
- **ANKAFERD BLOODSTOPPER** 19
- **İLAÇLARIN KOMBİNE KULLANIMI** 25

GEREÇ VE YÖNTEMLER 28

BULGULAR 37

TARTIŞMA 78

SONUÇLAR 88

ÖZET 90

SUMMARY 92

KAYNAKLAR 94

ŞEKİLLER LİSTESİ 106

ÖZGEÇMİŞ 112

SİMGE VE KISALTMALAR

5-FU : 5-Florourasil

ABS : Ankaferd Blood Stopper

Apaf-1 : Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

APC : Adenomatöz polipozis coli

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 : B-Cell Lymphoma 2

cDNA : Komplementer deoksiribonükleik asit

COX : Siklooksijenaz enzimi

CI : Kombinasyon İndeksi

DCC : Deleted in Colorectal Cancer

FAP : Familyal adenomatöz polipozis

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Media

EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

DISC : Ölüm indükleyici sinyal kompleksi

dTMP : Deoksitimidin monofosfat

dUMP : Deoksiuridin monofosfat

Dvl : Dishelleved protein

EGFR : Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü

FADD : Fas ilişkili ölüm bölgesi

FBS : Fetal Sığır Serumu

FdUMP : 5-Floro deoksiüridin monofosfat

FOLFOX : Lökoverin + 5-Florourasil + Oxaliplatin kombinasyonu

HNPCC : Herediter Non-Polipozis Kolorektal Kanser

HT-29 : İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı

LD50 : Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu

MMR **:** Yanlış eşleşme tamir geni

MTT **:** 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide

PCR **:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TNFR-1 **:** Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1

TRADD **:** TNFR1-ilişkili ölüm bölgesi

GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanserler, başta ABD olmak üzere, Avrupa ve diğer Batılı ülkelerde kanserle ilişkili morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden biridir (1). Dünyada ortalama yıllık 500.000 kişinin ölümüne neden olan kolorektal kanser, bütün kanser türleri içerisinde en sık görülen 3. kanser türüdür (2).

Kolon kanseri gelişimi, pek çok faktörle ilişkili olan çok basamaklı bir süreçtir (3). Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonlarındaki kayıplar, azalmış apoptozis ve aşırı hücre proliferasyonu, kolon kanseri gelişimine yol açan değişiklikler olarak kabul edilmektedir (4).

Kolon kanseri için öngörülen tedavi, cerrahi rezeksiyonu takiben uygulanan adjuvan kemoterapidir. Kemoterapide 5-Florourasil (5-FU), İrinotekan, Oxaliplatin ve Cetuximab kullanılmaktadır (2). Ancak belirli bir süre sonra meydana gelen ilaç dirençleri ve bu ilaçların yüksek dozlarda ciddi toksik etki oluşturması, araştırmacıları doğal kaynaklardan ilaç elde etmeye yöneltmiştir.

Standardize edilmiş bitki ekstraklarının karışımı olan ABS, klinikte hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır. ABS'nin içeriğinde; *Glycyrrhiza glabra* (meyan), *Alpinia officinarum* (havlıcan), *Thymus vulgaris* (kekik), *Vitis vinifera* (koruk), *Urtica dioica* (ısırgan) bulunmaktadır. İçeriğinde bulunan bitkilerin; endotelyum, kan hücreleri, anjiogenez ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri mevcuttur (5). Yapılan çeşitli çalışmalarda, ABS'nin kolon kanseri de dahil olmak üzere bir çok kanser türünde potansiyel bir anti-kanser ajan özelliği gösterdiği bildirilmiştir (6-8).

Bu çalışmada amaç; HT-29 insan kolon adenokarsinom hücre hattında ABS'nin kolon kanser hücreleri üzerindeki fonksiyonel etkisini incelemek ve ABS'nin konvansiyonel kemoterapötikler olan 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab ile kombinasyonunun kolon kanseri

hücrelerindeki olası additif/sinerjik etkilerini ve apoptotik etkisini araştırmak ve bu etkiyi biyokimyasal apoptozis yolağının en önemli elemanlarından olan p53, bax, bcl-2, sitokrom c, apaf-1 ve kaspaz-3'ün gen ifade düzeyleri açısından değerlendirmektir.

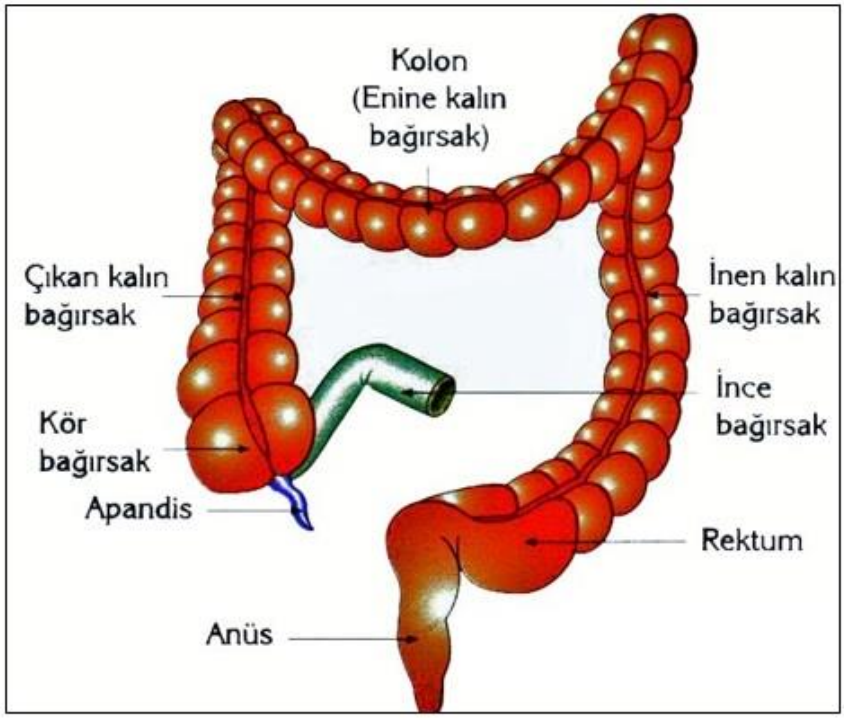
Yaptığımız bu araştırmanın güncel tedavi yöntemlerine yeni ufuklar açabileceğini ve daha ileri çalışmalara temel olabileceğini düşünmekteyiz.

GENEL BİLGİLER

KOLON KANSERİ

Kolonun Anatomisi

Ortalama uzunluğu 150 cm'yi bulan kalın bağırsak, ileum bitiminden anüse kadar uzanır. Kalın bağırsak; çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşmaktadır (Şekil 1) (9).



Şekil 1. Kalın bağırsağın başlıca bölümleri (10)

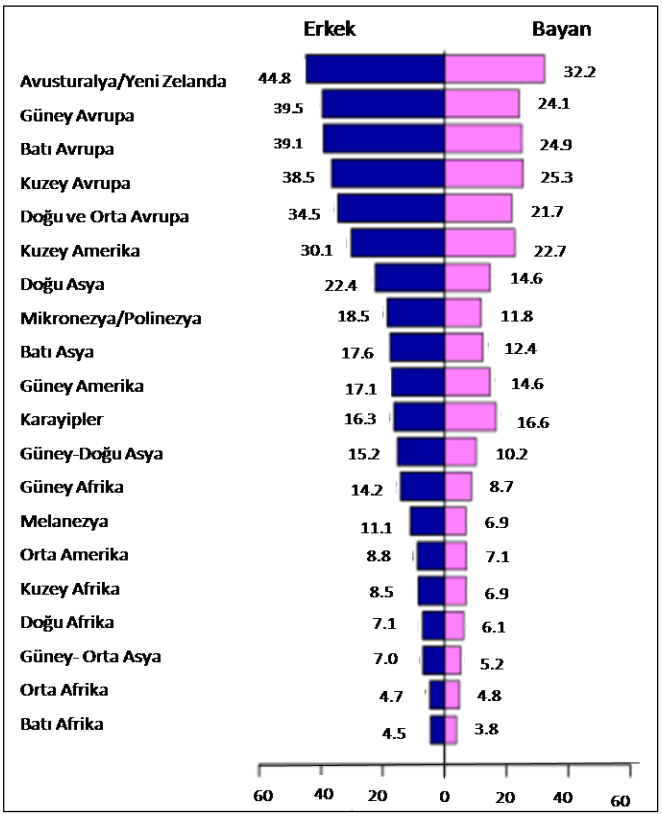
Kalın bağırsağı oluşturan bölümlerin uzunlukları şu şekildedir; kolonun ilk kısmını oluşturan çekumun uzunluğu 6 cm, genişliği ise 8 cm'dir. Çıkan kolon 15-20 cm, transvers kolon 50 cm, inen kolon 25 cm, sigmoid kolon ortalama 40 cm uzunluğundadır. Kalın bağırsağın son parçası olup anüsle son bulan rektum ise, ortalama 12 cm uzunluğundadır (9).

Kalın bağırsağın başlıca görevleri; emilim, salgılama, depolama, taşımadır (10). Kolon; su, klorür, sodyum, laktoz ve sakkaroz emilimi yapmakla birlikte, mikrofloral metabolizma ile alınan gıdaların yıkılması, semisolid maddelerin depo işlevini görmesi ve feçesi rektum ve anüse doğru ilerletmekle görevlidir (11).

Kolon Epidemiyolojisi

Kolon kanseri vakaları gün geçtikçe artış göstermektedir. Her yıl, dünya üzerinde 1 milyondan fazla insana kolon kanseri teşhisi konulmaktadır. İstatistiksel olarak bakıldığında, kolon kanserinin kanserler arasında görülme sıklığı açısından 3. sırada olduğu, kansere bağlı ölümler arasında ise 4. sırayı aldığı görülmektedir (12).

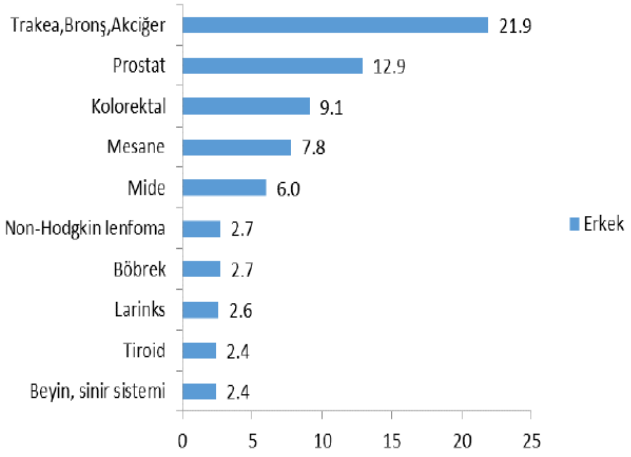
GLOBOCAN 2012 verilerine göre kolorektal kanser, Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa, Kuzey Amerika başta olmak üzere, tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir (Şekil 2) (13).



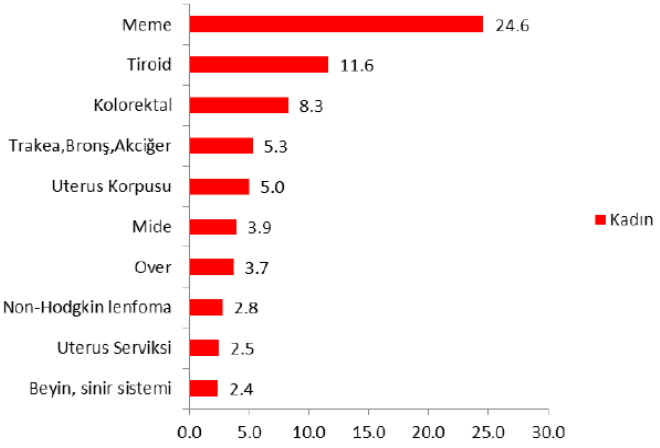
Şekil 2. Dünyada kolon kanseri görülme sıklıkları (13)

Kolon kanseri, sanayileşmenin gelişmiş olduğu batılı ülkelerde hızlı bir artış göstermektedir. GLOBOCAN 2012 istatistiksel verilerine göre (13), kolon kanserinin Avrupa ve Amerika'da yaygın olduğu, Asya ve Afrika'da ise daha düşük insidansa sahip olduğu görülmektedir. 2016 yılı için, Amerika Birleşik Devletleri'nde 134.490 yeni kolon kanseri vakası teşhisi konulacağı ve 49.190 kişinin ise kolon kanserinden öleceği tahmin edilmektedir (14).

Ülkemizde ise kolorektal kanser, 2013 yılı T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı verilerine göre, erkeklerde akciğer ve prostat kanseri, kadınlarda ise meme ve tiroit kanserinden sonra 3. sırada yer almaktadır. 2013 yılı Sağlık Bakanlığı kanser kayıt verilerine göre, tüm kanserler içerisindeki kolorektal kanser görülme oranı erkeklerde %9.1, kadınlarda ise %8.3 olduğu görülmektedir (Şekil 3,4) (15).



Şekil 3. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (15)



Şekil 4. Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (15)

KOLON KANSERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

Kolon kanseri, normal bir dokuda büyümeyi denetleyen moleküler mekanizmaların bozulmasına neden olan genetik mutasyonların birikimi sonucu ortaya çıkmaktadır (8). Kolorektal karsinogenezin ilk aşamasında, hücre büyümesi ve apoptozis arasındaki dengeyi etkileyen ve histopatolojik olarak tespit edilemeyen oldukça hassas olaylar gerçekleşmektedir. Normal bir epitel hücresinin neoplazik sürece girmesi için, bir takım genetik değişiklikler meydana gelmelidir. Bu genetik değişimler, iki mekanizma ile incelenmektedir (16).

a. Birinci yoldaki genetik değişimler: Çoğu kolon kanserinde 5. kromozom üzerinde APC geni delesyonu, K-ras proto-onkogeninin nokta mutasyonu, DCC geninin kaybı ve 17. kromozom üzerindeki p53 geninin kaybı veya mutasyonu gözlenmektedir (Şekil 5).
b. İkinci yoldaki genetik değişimler: DNA mismatch tamir genlerinin (MMR) mutasyona uğraması sonucu oluşan DNA replikasyon hataları vardır. hMSH2, hMLH1 gibi MMR genlerinde oluşan bozukluklar ise, mikrosatellit dengesizliğe sebep olur (17).

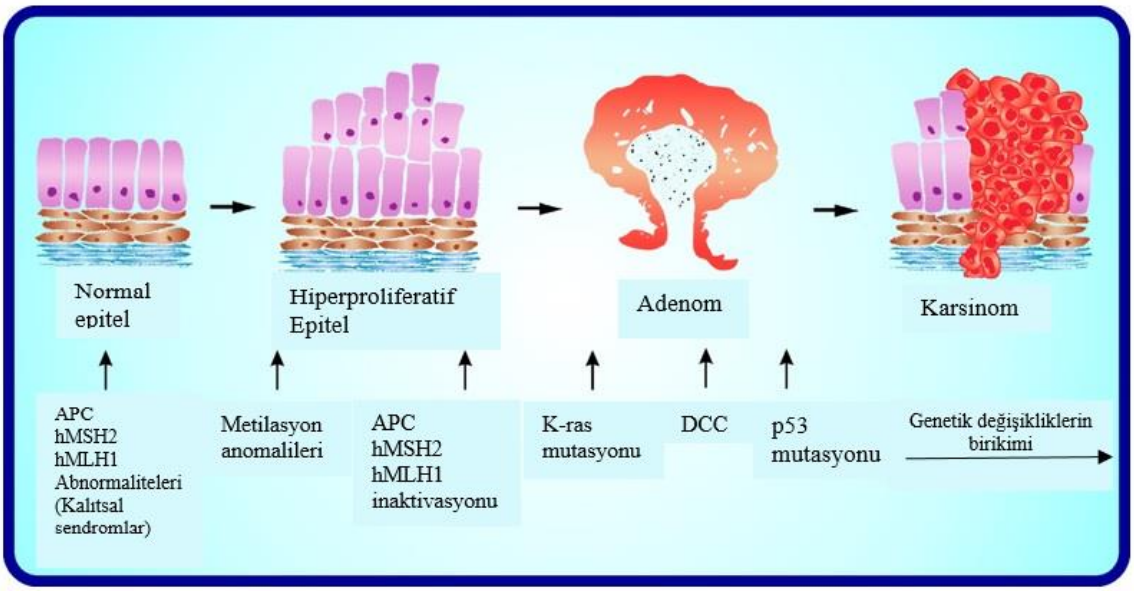
Tümör baskılayıcı genler, her iki allel geninde mutasyon meydana gelmesi sonucu aktivitelerini kaybetmektedir. Birinci yolda, tümör baskılayıcı bir gen olan APC geninin inaktivasyonu ile adenom-karsinom süreci başlar (16).

Ardından K-ras geninde mutasyon gerçekleşmektedir. K-ras geni, kolon kanseri patogenezinde rol alan bir proto-onkogendir. 12. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir. Plazma membranının içinden efektör moleküllere sinyal iletimini sağlayan, intrensek GTP-az aktivitesine sahip bir protein kodlar (18).

Hücre büyümesini ve bölünmesini uyaran herhangi bir dış uyarı ile K-ras geni, GTP'ye bağlanır ve aktif hale geçerek uyarıyı hücre içi ileti yollarına aktararak hücre büyüme ve bölünmesinde fizyolojik rol oynar. K-ras mutasyonu ile GTP-az aktivitesi ortadan kalkar ve hücre proliferasyonu düzensizleşir (19). Kolon kanserlerinin %50'sinde, Ras gen mutasyonlarına rastlanmaktadır (20).

Bir sonraki aşama, DCC geni mutasyonudur. Adenomların gelişiminde DCC mutasyonları geç dönemde saptanmaktadır. DCC geni, 18. kromozomun kısa kolunda (18q21) bulunmaktadır. DCC geni (18q), hücre-hücre adezyonunu ve hücre matriks ilişkisini düzenler. DCC mutasyonları, kolorektal kanserlerin %70'inde saptanmaktadır ve varlığı prognozu olumsuz yönde etkilemektedir (21,22).

Son olarak ise, bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün kaybı meydana gelir. p53 geni 17. kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. p53 geni, hasarlı DNA'nın tamirini başlatır ve tamiri mümkün olmayan hücreleri ise apoptoza yönlendirir (23).



Şekil 5. Genetik değişikliklerin birikimi (24)

p53 geni mutasyona uğradığında, apoptozisi başlatma görevini yerine getirememekte ve bu da çeşitli tipte tümörlerin gelişmesine neden olmaktadır. Kolorektal kanserlerin %75'inde, p53 geni mutasyona uğramıştır. Kolorektal adenomlarda nadiren görülmektedir ve bu nedenle p53 geni, mutasyonunun kolorektal karsinogenezin geç döneminde ortaya çıktığını düşündürmektedir (1).

İkinci yolda da mutasyonların birikimi söz konusudur ancak, mutasyonların gerçekleştiği genler farklıdır. Bu yolla gelişen kolon kanserlerinde başlangıç noktası, DNA mismatch tamir genlerinin mutasyona uğraması ve bunun sonucunda DNA tamirinde aksaklıkların meydana gelmesidir (25). Çoğunlukla hMSH2 (%40-50) ve hMLH1(%20-30) genlerinde mutasyon görülmektedir (26).

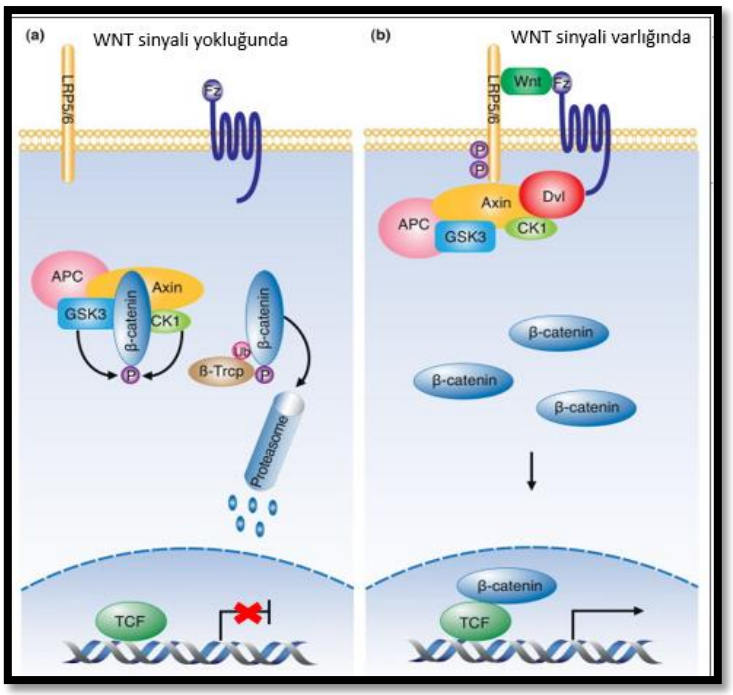
MMR genlerinde ortaya çıkan mutasyonlar, DNA'nın yapısında bulunan mikrosatellitlerde değişikliklere yol açarlar. Bu tabloya mikrosatellit instabilite denir. Böyle bir genomik kararsızlık, kolon karsinogenezinde önemli rol oynamaktadır. Mikrosatellitlerin replikasyon hatalarına yatkın olması ve kritik öneme sahip genlerde giderek çok sayıda mutasyona sebep olması sonucunda malign fenotip ortaya çıkmaktadır (23).

KOLON KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Kalıtsal Sendromlar

Familyal adenomatöz polipozis (FAP): FAP, otozomal dominant geçişli kalıtsal bir hastalıktır ve kalıtsal kolorektal kanserlerin %1'ini oluşturur. FAP, 5. kromozomun uzun kolu üzerinde (5q21) bulunan, adenomatöz polipozis coli (APC) geninin mutasyonu sonucu meydana gelmektedir (27).

APC, wnt/β-katenin sinyal yolunda rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir (28). Üç farklı wnt sinyal yolağı vardır (29) ve bunlardan wnt/β-katenin kanser gelişiminde rol oynamaktadır (Şekil 6).



Şekil 6. Wnt/β-katenin sinyal yolağı (30)

Wnt/β-katenin sinyal mekanizması aktif olduğu zaman, wnt hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine (Fz ve LRP5/6) bağlanmaktadır (31). Dishelleved (Dvl) proteini ve LRP5/6 reseptörünün hücre içi kısmı fosforillenir (32). Fosforillenme reaksiyonları ve hücre zarından sitoplazmaya aktarılan sinyalin hedefi yıkıcı komplekstir (33). β-katenin'in yıkımına neden olan bu kompleks, wnt sinyalinin başlamasıyla inaktif hale gelir ve β-katenin'i fosforileyemez (34). Fosforillenemeyen β-katenin, sitoplazmada birikir. Biriken β katenin, çekirdekte transkripsiyon faktör ailesinden TCF/LEF ile bağlanır ve hedef genlerin

ekspresyonunu uyarır. β katenin-TCF/LEF sistemi tarafından aktive edilen genlerden bazılarına, siklin D_1, c-myc gibi hücre siklusunu düzenleyen genler örnek olarak verilebilir (35).

Sinyal mekanizması inaktif olduğu zaman ise, wnt proteini reseptörüne bağlanamaz ve bu nedenle Dvl proteini ve LRP5/6 reseptörünün hücre içi kısmı fosforillenemez. Fosforillenme reaksiyonları etkisiyle dağılan yıkıcı kompleks, aktif durumda kalır (34,36,37).

APC-GSK3β-CK1-Axin'den oluşan kompleks, β katenin'in proteozom tarafından tanınmasını sağlar ve yıkımına yol açar. β katenin proteini yıkılmış olduğundan, çekirdeğe giremez ve bu şekilde, wnt/β-katenin sinyal yolunun hedeflediği genlerin transkripsiyonu gerçekleşmemiş olur (38).

Herediter non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC): HNPCC, Lynch sendromu olarak da bilinir ve tüm kalıtsal kanserlerin %4-5'ini oluşturur (39). Otozomal dominant olarak geçiş gösterir. HNPCC'deki genetik kusur, MMR genleri olarak bilinen MSH2, MLH1, PSM2 ve MSH6 genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir (28).

HNPCC'deki tümörler, mikrosatellit instabilite gösterir. Mikrosatellitler, genom boyunca tekrarlanan, kısa nükleotit bölgeleridir. Hatalı eşleşme tamir genlerindeki mutasyonlar, mikrosatellitlerde değişiklere yol açar. Bu duruma, mikrosatellit kararsızlığı denir. Bu kararsızlık, kolon karsinogenezinde önemli bir mekanizmadır. MSI hassas genlerde gittikçe fazla mutasyona yol açar ve sonuç olarak malign fenotip ortaya çıkmış olur (23).

HNPCC tanısı Amsterdam II kriterleriyle belirlenmiştir. Bunlar:

- Ailede en az 3 bireyde HNPCC ile ilişkili kanser saptanmalıdır.
- Bu üç kişiden birisi, diğer iki kişinin 1. derecede akrabası olmalıdır.
- Art arda en az iki nesilde görülmüş olmalıdır.
- Bu fertlerden en az birinde 50 yaşından önce kolorektal kanser gelişmelidir.
- Ailesel adenomatöz polipozis hariç tutulmalıdır.
- Kolorektal kanser tanısı patolojik incelemeyle doğrulanmalıdır (40).

Sporadik Sendromlar

Sporadik kanser tipinde, ailedeki kanserler kalıtımsal olmayan nedenler yüzünden ortaya çıkar. Sporadik kanserlerde, normal epitel hücresinden adenom oluşması ve ardından adenom-karsinom sürecinin başlaması yaklaşık olarak 10 yılı almaktadır. Kalıtsal kanserlerde ise, bu

süreç daha kısa sürmektedir (1). Sporadik kolon kanserlerinin %80'inde, APC geni mutasyona uğramıştır (22).

HÜCRE DÖNGÜSÜ

Hücre döngüsü, hücrelerin gelişimi ve çoğalmaları için programlanmıştır (41). Normalde hücreler uyaranlara bağlı olarak sadece gereken durumlarda bölünmektedir, ancak bu durum kanserli hücrelerde farklıdır. Kanserli hücrelerde oluşan mutasyonların sonucu, sağlıklı hücrelerde görülen kontrollü büyüme süreci kaybolmuştur (42). Kanser hücrelerinde çoğunlukla hücre döngüsünün kontrol edilmesini etkileyen genetik kusurlar vardır (43).

Hücre döngüsü dört aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 7).

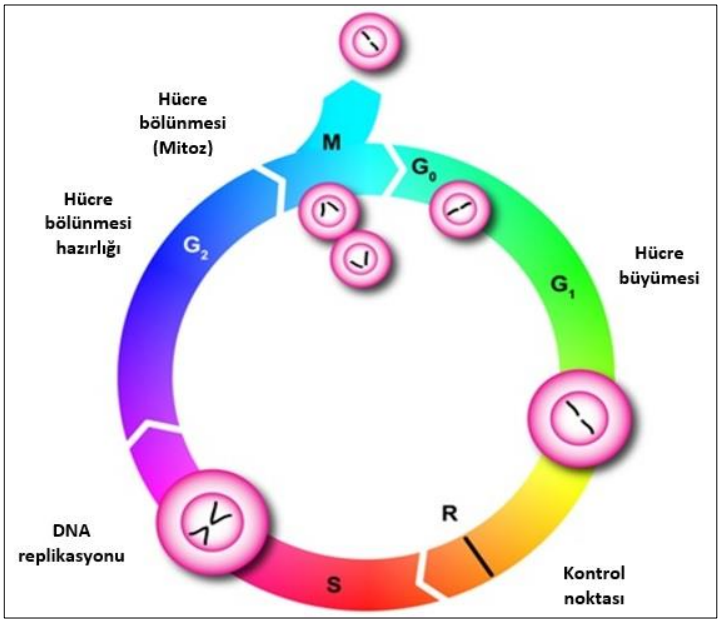
G_0 evresi: İstirahat fazıdır. Hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece, hücre siklusunun aktif fazlarına girmezler ve G_0 fazında beklerler (44).

G_1 evresi: DNA replikasyonu için gerekli hazırlıkların yapıldığı evredir. RNA ve protein sentezi olur.

S evresi: Bu evre sentez evresidir. DNA replikasyonu gerçekleşir ve DNA miktarı iki katına çıkar.

G_2 evresi: Bu evrede RNA ve protein sentezi gerçekleşir, hücre büyümeye devam eder. Hücre mitoza hazırlanır.

M evresi: Bu evrede hücre bölünür ve aynı genetik materyale sahip iki yeni hücre meydana gelir.



Şekil 7. Hücre döngüsü (45)

Hücre döngüsünde, G_1/S, G_2/M ve M noktalarında kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktalarında, hücrenin döngüye devam edip etmeyeceğine karar verilir (46). Hücrenin G_1 fazından S fazına geçebilmesi için, DNA'nın hasarsız olması gerekmektedir. Eğer DNA hasarlı ise, hasar onarılana dek hücre G_1/S kontrol noktasında durur. Hasar onarılamayacak durumda olduğunda ise, kontrol noktasındaki bu durma süresi p53'ün girmesi ile uzatılmaktadır (43).

İnsanda kanserlerde en sık p53 geni mutasyonlarına rastlanmıştır. p53, bir hücrede DNA hasarı olduğunda, hücre döngüsünü inhibe eder ve hücreye DNA onarımı için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemediğinde ise, hücre apoptozise gider (46). p53 geninin mutasyona uğraması sonucu DNA onarımı gerçekleşememekte ve hasarlı hücreler çoğalarak tümör dokusu oluşturmaktadır (47).

APOPTOZİS

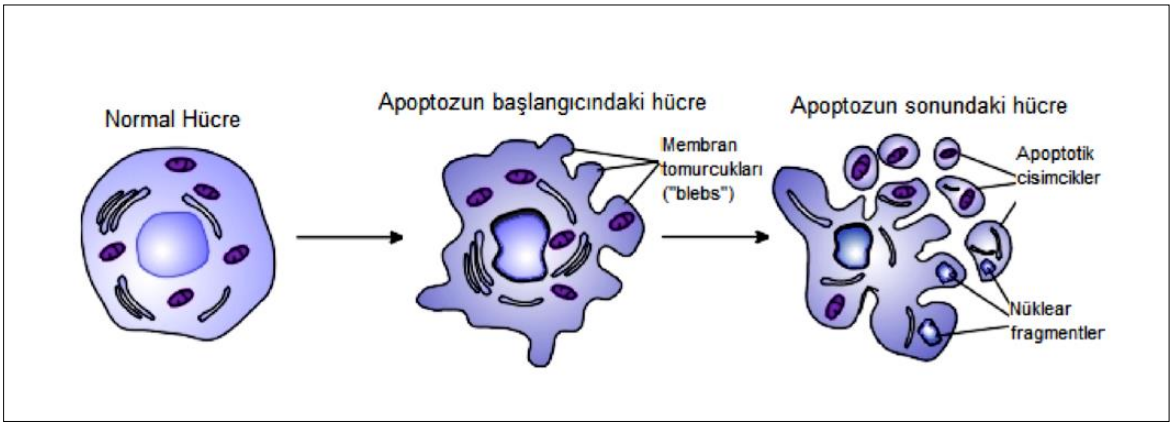
Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır. Apoptozis, organizmada biyolojik görevini tamamlamış ya da hasar görmüş hücrelerin yok edilmesinde görev alır. Çok hücreli organizmalarda, hücre çoğalması (proliferasyon) ve hücre ölümü (apoptozis) arasında daima bir denge vardır. Bu denge, doku homeostazisi sağlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu dengenin bozulması, birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Aynı zamanda azalmış apoptozisin ve artmış proliferasyonun kanser gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (48).

Apoptozis terimi, ilk defa Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında kullanılmıştır ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (49).

Apoptozisin Aşamaları

Apoptozis, enerjiye (ATP) bağımlı fizyolojik bir süreçtir (50). Apoptozis, belirli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilir. Bunlar; hücre büzülmesi, DNA'nın fragmentlerine ayrılması ve membranın tomurcuklanmasıdır (51). Apoptozise giden bir hücrede meydana gelen değişiklikler, şu şekilde gerçekleşmektedir. Öncelikle hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, yüzeyindeki organellerini kaybeder. Hacimlerinde azalma olur ve hücre büzülür. Daha sonra, hücre membranında kabarcık şeklinde yapılar oluşmasıyla membran tomurcuklanması oluşur ve son olarak hücre apoptotik cisim denilen sitoplazma ile çevrili kromatin parçalarından oluşan yapılara parçalanır. Apoptotik hücreler, makrofajlar

tarafından tanınır ve fagosite edilir (Şekil 8). Apoptotik cisimlerin makrofajlar tarafından tanınması, hücre membranındaki bazı değişikliklerle olur. Normal bir hücrede plazma membranının iç yüzeyinde bulunan fosfotidilserin, apoptozise uğrayacak hücrelerde membranın dış yaprağına göç etmişlerdir. Fagositik hücrelerin reseptörleri, fosfotidilserin ile bağlanarak fagositozu uyarır (48).



Şekil 8. Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler (52)

Apoptozis'in Düzenlenmesi

Apoptozis'in düzenlenmesinde; kalsiyum, bcl-2 ailesi, p53, kaspazlar, sitokrom-c ve mitokondri rol oynamaktadır.

Bcl-2 ailesi, iki gruptan oluşur. Birbirine zıt etkilere sahip bu gruplar, apoptozisi düzenlemede önemli role sahiptir. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, diğeri ise anti-apoptotiktir. Bu üyeler Tablo 1'de gösterilmiştir (53).

Tablo 1: Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler (53)

Anti-apoptotik Proteinler	Pro-apoptotik Proteinler
Bcl-2	Bax
Bcl-xL	Bak
Mcl-1	Bad
	Bcl-xS
	Bid
	Puma
	Noxa

Bcl-2 gen ailesi: Pro-apoptotik gruplar apoptozisi indükleyici özellik taşırken, anti-apoptotik grup apoptozisi baskılayıcı özellik taşır. Pro-apoptotik olanlar mitokondriden

sitokrom c'nin salınmasını indükler, anti-apoptotik olanlar ise mitokondriden sitokrom c salınımını engellerler (54). Hücrelerin apoptoza eğilimi, anti-apoptotik ve pro-apoptotik gruplar arasındaki dengeye bağlıdır. Pro-apoptotik proteinler fazla olduğunda, hücre apoptozise eğilimlidir, anti-apoptotik proteinler fazla olduğunda hücre apoptozise daha az eğilimlidir (53).

p53 geni: p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda hasar onarılabilecek düzeyde ise, hücre siklusunu G_1 fazında durdurarak S fazına geçmesini engeller ve hücreye DNA hasarını tamir için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemeyecek kadar büyük olduğunda ise, p53 hücreyi apoptoza göndererek hücrenin ölümünü sağlar. p53'ün apoptozisi indüklemesi, Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi ve bax'ın ekspresyonunu artırması yoluyla gerçekleşir. Bax'ın miktarının artması, hücreyi apoptoza götürür (55).

Kaspazlar: Kaspazlar, Sistein Aspartat Spesifik Proteaz olarak tanımlanan bir protein ailesidir. Aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Kaspazlar, ilk sentezlendiklerinde zimojen halde bulunurlar. Apoptozis indüklendikten sonra, aktif kaspaz formuna dönüşürler. Kaspazlar üçe ayrılırlar (Tablo 2) (56).

Tablo 2. Kaspazlar (56)

	Kaspaz
Başlatıcı kaspazlar	2, 8, 9, 10
Efektör (Hedef) kaspazlar	3, 6, 7
İnflamatuar kaspazlar	1, 4, 5

Başlatıcı kaspazlar, ölüm reseptör yolağı ve mitokondriyal bütünlük yolağı adlı iki ana sinyal yolağı tarafından aktive edilir. Hücrenin apoptotik uyarıyı almasıyla aktive olan başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazları aktive ederler. Efektör kaspazlar ise, kendisi ile ilişkili proteinleri parçalarlar ve böylece apoptotik hücrede görülen morfolojik değişimleri meydana getirirler (56).

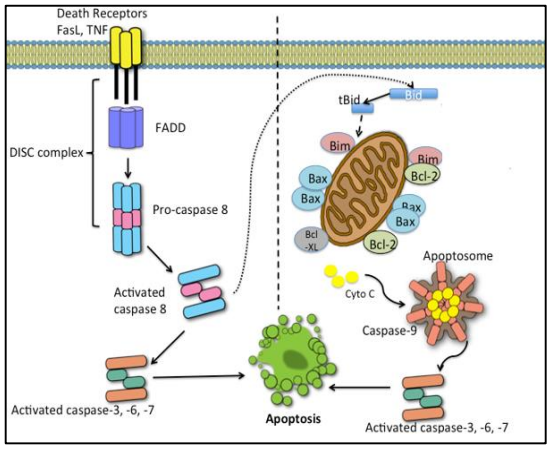
Sitokrom c: Mitokondri iç membranında bulunan sitokrom c, elektron transport zincirinin bir üyesidir. Sitokrom c'nin mitokondri membranından sitoplazmaya salınımı Bcl-2 ailesine ait proteinler tarafından denetlenmektedir. Sitokrom c'nin mitokondriden

sitoplazmaya salınımı, apotozisi aktive eder ve bu apoptotik süreçte geri dönüşü olmayan bir yola girildiği anlamına gelir. Sitokrom c, sitoplazmaya salındıktan sonra apoptoz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve pro-kaspaz–9 ile apoptozom kompleksini oluşturur. Prokaspaz-9, aktif kaspaz 9'a dönüşür. Aktive olan kaspaz-9, diğer kaspazları kaskad şeklinde aktifleştirir ve hücreyi ölüme götürür (54).

Apaf-1: Memelilerde mitokondri aracılıklı apoptoziste kaspaz kaskadının başlaması için kaspaz-9'un aktivasyonuna ihtiyaç vardır. Kaspaz-9'un aktivasyonu ise, apaf-1 tarafından gerçekleştirilir (57). Apaf-1, sitokrom c ve prokaspaz-9 ile birleşir ve apoptozom kompleksini oluşturur. Prokaspaz-9, aktif kaspaz-9'a dönüşür. Aktive olan kaspaz-9, diğer kaspazları kaskad şeklinde aktive eder ve apoptoz meydana gelir (54).

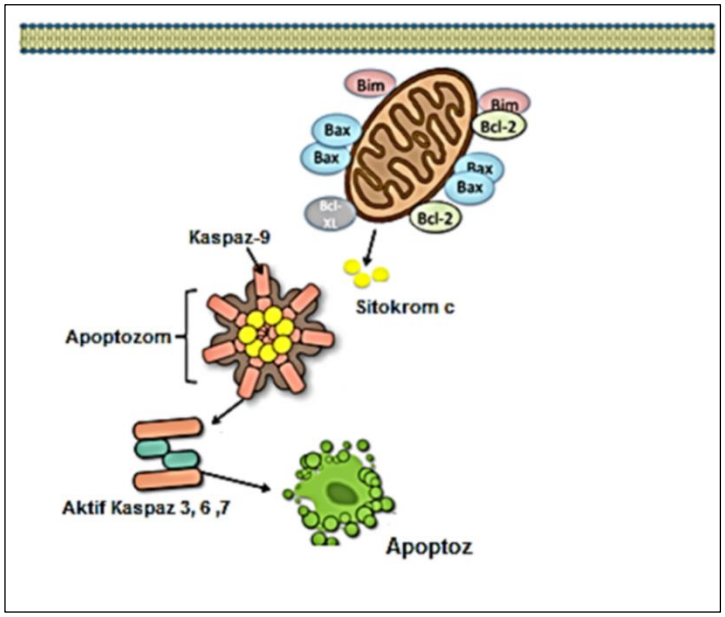
Apoptozis Mekanizması

Ölüm reseptörleri yolağı: Ölüm reseptörleri yolu olarak bilinen bu yol, hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve TNFR-1'e kendi ligandlarının bağlanmasıyla aktifleşir (Şekil 9). Ligandların bağlanmasıyla ölüm uyarısı alınmış olur. Reseptörlerin aktive olmasından sonra, Fas reseptörü kendi ölüm bölgesi FADD ile TNF reseptörü ise TRADD ile etkileşime girer (58). FADD'ın kendisinde ve prokaspaz-8'de bulunan ölüm efektör alanı aracılığıyla FADD prokaspaz-8'e bağlanır. Bu bağlanma sonucunda, ölüm uyarıcı kompleks (DISC) oluşur. DISC'teki prokaspaz-8 oto katalizle aktifleşerek, aktif kaspaz-8'i oluşturur. Aktif kaspaz-8, iki yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Ya doğrudan kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek aktif formu olan tBid'i oluşturur ve dolaylı olarak instrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Aktifleşen kaspazlar hücreyi ölüme götürür (59).



Şekil 9. Ölüm reseptörleri yolağı (60)

Mitokondriyal Yolak: Reseptör aracılı olmayan bir yolak olan mitokondriyal yolak (Şekil 10); oksidatif stres, DNA hasarı, hipoksi, toksinler, radyasyon, büyüme faktörü eksikliği gibi nedenler tarafından programlı hücre ölümünü uyarmaktadır. Bu uyarılar, mitokondri membranının geçirgenliğinin bozulmasına yol açar (61). Membranın geçirgenliğinin bozulması, mitokondri membranının porlarından sitoplazmaya sitokrom c salınmasına neden olur (62). Mitokondri membranından salınan sitokrom c, apaf-1'e bağlanır ve ardından ATP'ye bağlanmasıyla apoptozom kompleksi oluşur. Prokaspaz-9, bu komplekse bağlanır ve aktif kaspaz-9'a dönüşür. Aktive olan kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, diğer kaspazları kaskad şeklinde aktive etmeye devam eder ve böylece hücre ölümü gerçekleşmiş olur.



Şekil 10. Mitokondriyal yolak (60)

Mitokondriyal yolağın kontrolü, Bcl-2 ailesine ait anti-apoptotik ve apoptotik proteinlerin dengesine bağlıdır. Apoptotik proteinler, membranlarda kanallar oluşturma özelliğine sahiptir. Anti-apoptotik proteinler ise, membranlarda kanal oluşumu üzerinde zıt etkiye sahiptir (54).

Anti-apoptotik ve apoptotik proteinlerin mitokondri üzerindeki etkisiyle ya sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı gerçekleşir ve apoptozis başlar ya da sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı engellenerek apoptozis baskılanır (63).

DOĞAL ÜRÜNLERİN TEDAVİDE KULLANIMI

Bitki, mantar ve mikroorganizma kaynaklı doğal ürünlerin tedavide ve hastalıkları önlemede kullanımı uzun bir geçmişe dayanmaktadır (64). Kimyasal sentez ile ilaç eldesinde çok büyük bilimsel ve teknolojik gelişmeler kaydedilmesine rağmen, doğal ürünlerden elde edilen ilaçlar, ilaç keşiflerine çok büyük katkı sağlamaktadır (65).

2009 yılından itibaren piyasadaki ilaçlar incelendiğinde bu ilaçların yarıdan fazlasının doğal kaynaklardan elde edildiği görülmektedir. Bitki, mikroorganizma ve deniz organizmaları gibi doğal kaynaklardan elde edilen ya da izole edilen bu maddelerden, semi sentez yoluyla geliştirilen ilaçlar, kemoterapotik ajanların önemli bir yüzdesini oluşturur (66). Dünyada onaylanan ve kullanılan kemoterapötik ilaçlar ve kaynakları incelendiğinde, bu ilaçların %60'ının doğal ürünlerden elde edildiği görülmektedir (65).

Tablo 3, şu anda klinik uygulamada kullanılan ve doğal ürünlerden elde edilen ajanlardan birkaçını göstermektedir (65).

Tablo 3. Doğal ürünlerden geliştirilen ilaçlar (65)

İlaç	Medikal kullanımı	Etki mekanizması	Kaynağı
Aspirin	Analjezik, antiinflamatuar, antipiretik	COX'un inhibisyonu	Bitki
Kafein	Uyarıcı	Adenozin Reseptör Antagonisti	Bitki
Kodein	Analjezik, antitusif	Opioid reseptör antagonisti	Bitki
Digoksin	Atrial fibrilasyon ve kronik kalp yetmezliği	Na^+/K^+ATPaz'ın inhibisyonu	Bitki
Eugenol	Diş ağrısı	Duyu sinirlerinin uyarımını azaltır.	Bitki
Morfin	Analjezik	Opioid reseptör antagonisti	Bitki
Pilokarpin	Glokom	Muskarinik reseptör antagonisti	Bitki
Kinin	Malarya Profilaksisi	Malarya parazitinde protein sentezi inhibisyonu	Bitki
Taksol	Antikanser ajan	Antimitotik ajan	Bitki

Tablo 3. (Devam) Doğal ürünlerden geliştirilen ilaçlar (65)

Siklosporin A	İmmünosüpresan	T lenfositlerin klonal proliferasyonunun inhibisyonu	Mikroorganizma
Penisilin	Antibiyotik	Peptidoglikan hücre duvarının sentezinin inhibisyonu	Mikroorganizma
Tetrasiklin	Antibiyotik	Ribozomun 30 S'lik alt ünitesine bağlanarak protein sentezi inhibisyonu	Mikroorganizma
Aurantoside	Mantar önleyici	Tubulin polimerizasyonunun inhibisyonu	Deniz organizmaları
Spongistatin	Mantar önleyici	Tubulin polimerizasyonunun inhibisyonu	Deniz organizmaları
Manoalide	Analjezik, anti-inflamatuar	Fosfolipaz A_2 inhibisyonu	Deniz organizmaları

Bitki Kökenli Ajanlar

Günümüzde, çeşitli bitkisel kaynaklı bileşikler kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Tablo 4). En önemli örneklerden biri, Madagaskar yağmur ormanlarında bulunan ve *Catharanthus roseus*'dan elde edilen vinca alkaloid ailesidir. Vinca alkaloid ailesinden olan Vinkristin, Hodgkin hastalığı ve bazı lösemi türlerinin tedavisinde artan bir başarı göstermiştir. Vinkristin, mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ederek etki göstermektedir.

Bir başka örnek ise, oldukça aktif bir ajan olan ve doğal üründen elde edilen etopositttir. Etoposit, bir başka doğal üründen elde edilen bleomisin ve sisplatin ile kombine edildiğinde, testis tümörü tedavisinde yüksek iyileşme oranı göstermiştir (65). Etoposit, *Podophyllum peltatum* ve *Podophyllum emodi* bitkilerinden elde edilen epipodofilotoksin'dir. Etoposit; akciğer kanseri, non-Hodgkin's lenfoma, lösemiler, yumuşak doku sarkomu ve nöroblastoma gibi hastalıklarda, kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır (61). Etoposit, bir topoizomeraz II inhibitörüdür. Topoizomeraz II'ye bağlanır ve DNA'nın zincirleri üzerinde kırıklar oluşturur (67).

Taksan sınıfı bileşikler olan paklitaksel ve dosetaksel; meme, ovaryum ve diğer kanser türlerine karşı belirgin anti-tümör aktivitesi gösterirler (65). Paklitaksel, 1971 yılında ABD'de yetişen *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan izole edilmiştir. Yarı-sentetik analogu olan dosetaksel, *Taxus baccata*'nın yapraklarından elde edilmiştir. Paklitaksel ve onun yarı sentetik analogu olan dosetaksel etkilerini, hücredeki mikrotübüllerin toplanmasını artırarak ve mikrotübülleri stabilize ederek göstermektedir (68).

Yine kamptotesin türevleri olan irinotekan ve topotekan ilaçları, sırasıyla kolorektal kanser ve ovaryum kanserine karşı belirgin anti-tümör aktivitesi gösterirler. Kamptotesinler, *Camptotheca acumimata* ağacından izole edilen bir alkaloittir. Kamptotesinler, DNA topoizomeraz I enzimini inhibe ederek etkilerini gösterirler (65). Başlıca bitkisel kemoterapötik ilaçlar ve elde edildiği kaynaklar, Tablo 4'te belirtilmiştir (69).

Tablo 4. Başlıca bitkisel kemoterapötik ilaçlar ve elde edildiği bitkiler

İlaç sınıfı	Bu sınıftan ilaçlar	Kaynak bitki
Vinca alkaloitleri	Vinblastin, vinkristin (ve semisentetik türevleri vindesin, vinorelbin)	*Vinca rosea (Catharanthus roseus)*
Taksanlar	Paklitaksel (ve semisentetik türevi dosetaksel)	*Taxus brevifolia*
Kamptotesinler	Semisentetik kamptotesin türevleri topotekan, irinotekan	*Camptotheca acuminata*
Epipodofilotoksinler	Semisentetik podofilotoksin türevleri etoposid ve teniposid	*Podophyllum peltatum*

Mikroorganizma Kökenli Ajanlar

Doğal ürünlerden kemoterapotik ajanların eldesinde, bitkilerin yanısıra mikroorganizmalarda önemli bir drog kaynağı olarak görülmüştür (Tablo 5). Aktinomisin, bleomisin, daktinomisin, mitomisin ve antrasiklin türevleri olan doksorubisin, daunorubisin, epirubisin, idarubisin gibi mikroorganizma kökenli kemoterapötik ilaçlar, günümüzde en etkili anti-tümör ilaçlar arasında bulunmaktadır (65,69).

Tablo 5. Mikroorganizma kökenli kemoterapötik ajanlar ve elde edildiği mikroorganizmalar (69)

İlaç sınıfı	Bu sınıftan ilaçlar	Kaynak mikroorganizma
Antrasiklin antibiyotikler	Daunorubisin, doksorubisin (ve semisentetik türevleri epirubisin, idarubisin)	*Streptomyces peucetius*
Glikopeptit antibiyotikler	Bleomisin A2 ve B2	*Streptomyces verticillus*
Polipeptit antibiyotikler	Daktinomisin	*Streptomyces parvulus*
Mitosanlar	Mitomisin	*Streptomyces caespitosus*

Klinikte kullanılan bu kemoterapötik ilaçlar, *Streptomyces* bakterilerinin çeşitli türlerinden elde edilmiştir. 1940 yılında, ilk mikroorganizma kökenli kemoterapötik ajan olan aktinomisin serisi ilaçlar izole edilmiştir. Aktinomisin D, bu gruptaki en önemli ajan olup, koryokarsinoma ve çocukluk çağı solid tümörleri tedavisinde etkilidir (70).

Antrasiklinler, klinikte en yaygın kullanılan anti-tümör antibiyotikler arasındadır. Antitümör aktivitelerini, topoizomeraz II enzimini inhibe ederek gösterirler (65). Lenfoma, lösemi, meme kanseri ve birçok kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadır (70).

Deniz Organizmalarından Elde Edilen Kemoterapötik Ajanlar

Deniz canlıları, doğal ürünler ve bileşikler elde edilmesi açısından oldukça zengin bir kaynaktır (65). Bu sebeple denizler, yeni ilaç olmaya aday moleküllerin keşifleri için araştırılmaktadır ve elde edilen bu maddeler antikanser, antiviral, antibakteriyel aktiveleri açısından incelenmektedir (69).

Son 30 yıldır deniz organizmalarından 3000 den fazla yeni madde elde edilmiştir ve bu durum, denizlerin yeni maddeler elde etme açısından devasa bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (65).

Sitarabin ve onun türevi olan gemsitabin, deniz organizmalarından elde edilen bir kemoterapötik ajan olup, *Cryptotheca crypta* adı verilen bir deniz süngerinden elde edilmiştir. Sitarabin, lenfoma ve lösemi tedavisinde kulanılmaktadır. Gemsitabin ise; meme, mesane, akciğer ve pankreas kanserlerine ait solid tümörlere karşı, anlamlı bir anti-tümör etki göstermektedir (69).

Günümüzde deniz organizmalarından elde edilen ilaç olmaya aday moleküller kullanılarak yeni kemoterapötik ajanlar elde etmek amacıyla, çeşitli faz araştırmaları ve klinik araştırmalar yapılmaktadır (69).

ANKAFERD BLOOD STOPPER®

Bitkisel bir ekstrakt olan ABS Türk hekimliğinde hemostatik ajan olarak kullanılır (5). ABS'nin içeriğinde *Glycyrrhiza glabra* (meyan), *Alpinia officinarum* (havlıcan), *Thymus vulgaris* (kekik), *Vitis vinifera* (koruk), *Urtica dioica* (ısırgan) bulunmaktadır (5).

Ankaferd Blood Stopper'ın Bileşenleri

Isırgan otu (*Urtica Dioica*): Ilıman iklim bölgelerinde yetişen ve yabani bir ot olan ısırgan otu, *Urticaceae* familyasına aittir. Bitki, yakıcı tüylerle kaplıdır ve bu tüylerde çeşitli kimyasallar bulunmaktadır. Bu yakıcı özelliği, yapısındaki histamin, formik asit, kolin ve serotoninden kaynaklanmaktadır (71).

Isırgan otunun yapısında, çok sayıda kimyasal madde bulunmaktadır. Bunlar; karetenoidler, flavonoidler, klorofil, lesitin, steroller, mineraller, taninler, aminoasitler, aglutinindir (72).

Isırgan otu, pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Isırgan otunun; antimikrobiyal (73,74), analjezik ve ağrı kesici (75), antinflamatuar (76), antibakteriyel (77), diüretik (78), hipotansif ve antidiyabetik (79,80), kardiyovasküler (81), ve antiromatizmal (82) özelliklerini bildiren araştırmalar mevcuttur.

Yapılan çalışmalarda; benign prostat hiperplazisi tedavisinde ısırgan otunun çok etkili olduğu (83), başka bir çalışmada ise vasküler endotelde nitrik oksit üretimini arttırarak damarlarda vazodilatasyona neden olduğu bildirilmiştir (81).

Havlıcan *(Alpinia officinarum*): Havlıcan, *Zingiberaceae* ailesine ait çok yıllık bir bitkidir (84). Çin'de geleneksel tedavi yöntemi olarak karın ağrısını hafifletmek, şişkinliği azaltmak, kan dolaşımını hızlandırmak ve soğuk algınlığı tedavisinde kullanılır. Bitkinin rizom kısmı, tıbbi olarak kullanılır. Bu bitkiden çok sayıda kimyasal bileşen elde edilmiştir**.** İki temel bileşeni, diarilheptanoidler ve galangindir. *Alpinia officinarum* ve temel bileşenleri antioksidan, anti-platelet, anti-proliferatif, anti-emetik, anti-hepatotoksik ve anti-inflamatuar etkilere sahiptir (85).

Yapılan çalışmalar; *Alpinia officinarum* ekstraktının ve temel bileşenlerinin, karaciğer, akciğer, nöroblastoma ve meme kanseri gibi çok sayıda kanser hattında anti-kanser etkisinin olduğunu göstermektedir (86).

Meyan (*Glycyrrhiza glabra):* Meyanın kökü ve rizomu yüzyıllardır tedavi amaçlı kullanılmaktadır (87). Bu bitki bronşit, alerji, soğuk algınlığı, boğaz ağrısı ve tüberküloz gibi solunum yolu hastalıkları, reflü, gastrit, cilt hastalıkları ve karaciğer hastalıklarında yatıştırıcı ve koruyucu olarak kullanılmaktadır (88).

Meyan kökünün ana maddeleri; triterpen saponinler, çoğunlukla glycyrrhizin (%2–9), glycyrrhizic asitin kalsiyum ve potasyum tuzlarıdır. *Glycyrrhiza glabra*'da bulunan diğer

bileşenler ise; triterpen saponinler olan glabranin A, glabranin B, glycyrrhetol, glabrolide, isoglabrolide, izoflavon olan formononetin, glabrone, neoliquiritin, hispaglabridin A ve B, kumarin olan herniarin, umbelliferone, triterpen sterol olan onocerin, h-amyrin, stigmasterol'dur (89).

Glycyrrhiza glabra, antasid, antiülser, antiinflamatuar, balgam söktürücü, diüretik, anti-piretik, antimikrobiyal, anksiyolitik, anti-konvülsan ve hafıza güçlendirici etkilere sahiptir (89).

*Glycyrrhiza glabra'*nın ana maddesi glycyrrhizin; anti-viral, anti-inflamatuar ve antioksidan etkilere sahiptir (87). Yapılan bir çalışmada, *Glycyrrhiza glabra* ekstraktının anti-anjiogenik ve anti-tümör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. *Glycyrrhiza glabra* ekstraktının *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda Ehrlich asit tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve anjiogenezi uyaran vasküler endotelyal büyüme faktörünü inhibe ederek, anti-tümöral etki gösterdiği bildirilmiştir (88).

Kekik (*Thymus vulgaris*): *Thymus vulgaris, Lamiaceae* familyasına ait bir tıbbi bitkidir. Aromatik ve tıbbi özellikleri, kekiğin dünya çapında ünlü bir bitki olmasına neden olmuştur (90). Kekik türleri; güçlü antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antioksidan özellik göstermektedirler (91). *Thymus vulgaris* ekstraktı; geleneksel olarak antiastmatik, bronkodilatör, antitüssif, antispazmodik etkilerinden dolayı kullanılmaktadır (92).

Kekik bitkisinin ana bileşiği, karvakrol ve timoldür (93). Kekikte bulunan ana kimyasallar, uçucu yağlar (borneol, karvakrol, linalool ve timol), tanin, saponin ve triterpenik asitlerdir (94). *Thymus vulgaris*, polifenol ve flavonoid içeriğinden dolayı, antioksidan ve serbest radikal parçalayıcı özelliği vardır (95).

Yapılan *in vitro* bir çalışmada, *Thymus vulgaris* uçucu yağının PC-3, A-549 ve MCF-7 kanser hatlarında güçlü bir sitotoksisite gösterdiği bildirilmiştir (96). Bir başka *in vitro* çalışmada, *Thymus vulgaris* uçucu yağının skuamöz hücreli baş-boyun kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (97).

Koruk (*Vitis vinifera*): *Vitis vinifera,* dünyada ekim yapılan alan ve ekonomik değeri açısından ele alındığında en temel meyvelerden biri olduğu görülmektedir (98) ve dünyada yaklaşık 60 milyon ton üzüm üretimi yapıldığı tahmin edilmektedir (99).

Üzüm diğer meyvelerle kıyaslandığında en fazla çeşide sahip olan meyve türlerinden biri olup, 15.000'in üzerinde çeşidi bulunduğu tahmin edilmektedir (100). Bitkinin içeriğini;

tanenler, flavonoidler, meyve asitleri, non-flavonoidler ve fenil akrilik asit türevleri oluşturmaktadır (101). Üzüm çekirdeği; (+)-kateşinler, (-)-epikateşin ve (-)-epikateşin-3-O-gallat gibi monomerik fenolik bileşikler ve dimerik, trimerik ve tetramerik prosiyanidin açısından zengindir (102) ve bu bileşikler anti-mutajenik ve anti-viral ajan özelliği göstermektedirler (103). Üzümdeki fenolik bileşiklerin, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu *in vitro* olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (104).

Yapılan bir çalışmada, üzüm ekstraktının güçlü bir antioksidan etki gösterdiği ve reaktif oksijen türleri ile indüklenen DNA hasarını önlediği gösterilmiştir (105,106). Başka bir çalışmada, üzüm ekstraktının skuamöz hücreli baş-boyun kanseri hücre hattında sitotoksisite gösterdiği (107) ve hayvan modellerinde tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (108).

Üzüm ekstraktının bu koruyucu özelliği için, çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar; hücre sinyallerini ve hücre siklusu regulatörlerini düzenleyerek apoptozisi indüklemesiyle (109), hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan topoizomeraz I enziminin inhibisyonuyla (105) ya da anjiogenezin inhibisyonuyla (110) gerçekleşmektedir. Ayrıca, üzüm ekstraktının kardiyovasküler hastalıkları önlediği (111), antimikrobiyal (102), antihipertansif (112) ve anti-ülser (113) aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Ankaferd Blood Stopper Ürününün Formları

Ürün; tampon, sprey ve ampül olmak üzere 3 farklı farmasötik formda bulunur(114).

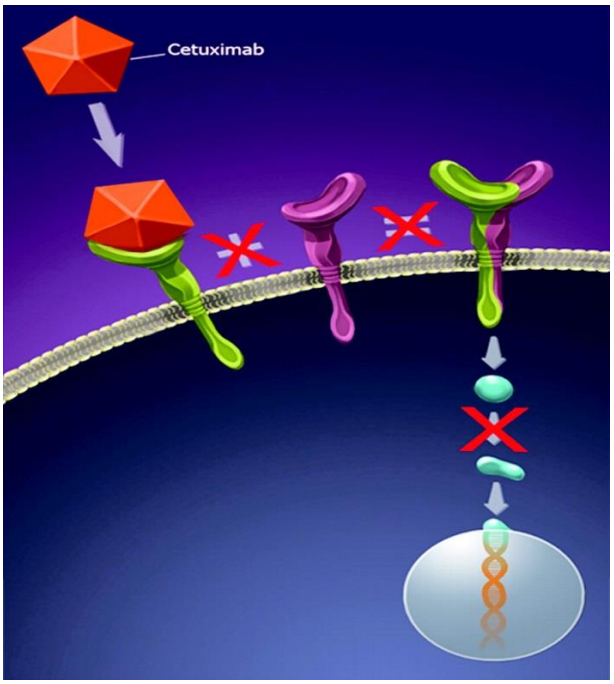
Tablo 6. Ampül formunda Ankaferd Blood Stopper®içerikleri ([1]kurutulmuş kök ekstresi, [2]kurutulmuş yaprak ekstresi, [3]kurutulmuş ot ekstresi)

Etken madde adı	**Ampül (2 ml)** **Etken madde miktarı (mg)**
Urtica Dioica[1]	0.12
Vitis vinifera[2]	0.16
Glycyrrhiza glabra[2]	0.18
Alpinia officinarum[2]	0.14
Thymus vulgaris[3]	0.10

Cetuximab (Erbitux®)

Cetuximab, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)'nün ligand bağlayıcı bölgesini hedef alan kimerik, IgG_1 monoklonal bir antikordur. Cetuximab etkisini hem EGFR antagonisti olarak ve hem de antikor bağımlı hücresel sitotoksisite yoluyla göstermektedir (115).

Baş, boyun ve kolorektal kanser başta olmak üzere çoğu kanser türünde artmış EGFR etkisi vardır. Cetuximab, EGFR'ne diğer ligandların bağlanmasını önleyerek reseptör-bağımlı yolakları bloke eder (116). Bu da hücre siklusunun durması, apoptozisin uyarılması, anjiogenezin inhibisyonu, metastazın inhibisyonu, EGFR'nün sayısının hücre yüzeyinde azalması ve kemoradyoterapiye hassasiyeti arttırma gibi antitümöral etkilerin ortaya çıkmasını sağlar (116). Şekil 11'de Cetuximab'ın EGFR sinyal kaskadına etkisi gösterilmektedir.



Şekil 11. Cetuximab EGFR sinyal kaskadına etkisi (116)

Preklinik çalışmalar, Cetuximab'ın diğer sitotoksik ajanlarla birlikte kullanıldığında sinerjistik etki gösterdiğini ve tümör gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir (117). Bu tür etkileri, Topotekanla (118) ve en önemlisi İrinotekanla (119) kombine kullanıldığında göstermektedir.

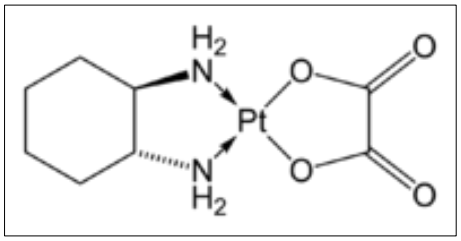
Bilhassa, Cetuximab-İrinotekan kombinasyonunun tümör gelişiminin tek bir ajanla kontrol edilemediği İrinotekan-dirençli DLD-1 ve HT-29 xenograftlarında, tümör gelişimini inhibe ettiği görülmüştür.

Yapılan histolojik incelemelerde, Cetuximab ve İrinotekan kombinasyonunun tümör nekrozunu artırdığı, tümör hücresi proliferasyonunu azalttığı, tümör hücresinde apoptozisi artırdığı ve tümörün damarlanmasını azalttığı gözlenmektedir (115).

Oxaliplatin

Oxaliplatin (trans-L-1,2-diamino siklohekzanoksalatoplatinyum) (Şekil 12), metastatik kolon kanseri tedavisinde güçlü bir anti-tümöral etki gösteren üçüncü nesil platin bileşiğidir (120). Oxaliplatin, platin sınıfının bir diğer üyesi olan Sisplatinden daha güçlü bir etkiye sahiptir (121).

Oxaliplatin; DNA molekülleri içinde ve DNA molekülleri arasında çapraz bağlar oluşturararak, DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu inhibe eder (122). Preklinik çalışmalar, Oxaliplatin'in 5-FU ile kombinasyonunun, sinerjistik etkileşim gösterdiğini bildirmektedir (123).



Şekil 12. Oxaliplatinin moleküler yapısı (124)

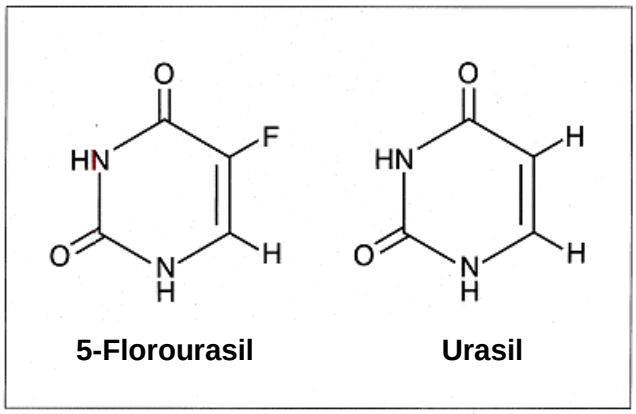
Yapılan faz III klinik çalışmaları, Oxaliplatin/5-FU/Lökoverin kombinasyonunun kolorektal kanser tedavisinde güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (123) ve bu kombinasyon FOLFOX olarak adlandırılmaktadır (125).

5-Florourasil

5-FU, günümüzde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarından biridir. 1957 yılından beri kolon kanserinin tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır ve aynı zamanda meme, baş ve boyun kanseri tedavisinde de kullanılmaktadır (126).

5-FU, urasilin analogudur (Şekil 13). Urasilin C-5 pozisyonundaki hidrojen atomunun yerine, flor atomunun gelmesiyle sentezlenmiştir (127). 5-FU, hücre içine urasilin kullandığı transport mekanizmasını kullanarak girer (123). Hücre içinde, 5-FU aktif metabolitlerine dönüştürülür (127). Bu aktif metabolitlerden biri olan floro-deoksiuridin-monofosfat

(FdUMP), timidilat sentaz enzimine stabil bir şekilde bağlanarak, normal substratı olan deoksiuridin monofosfatın (dUMP) enzime bağlanmasını engeller (126).



Şekil 13. 5-Florourasil ve urasilin moleküler yapısı (128)

Timidilat sentaz, dUMP'nin deoksitimidin monofosfat'a (dTMP) dönüşümünü katalizleyen enzimdir. FdUMP'ın timidilat sentaza bağlanması, enzimin fonksiyonunu inhibe eder ve dTMP sentezi durur. Dolayısıyla da DNA sentezi yapılamaz hale gelir (129).

5-FU, diğer kemoterapotik ajanlarla kombine edildiğinde etkisini arttırmaktadır. Kolon kanseri tedavisinde 5-FU tek başına kullanıldığında; tedaviye yanıt oranı %10-15 iken, İrinotekan ya da Oxaliplatin gibi kemoterapotik ajanlarla ile kombine edildiğinde, kolorektal kanser tedavisine yanıt oranı %40-50'e çıkmaktadır (127).

İLAÇLARIN KOMBİNE KULLANIMI

Kanser başta olmak üzere, diğer hastalıkların tedavisinde iki ya da daha fazla ilacın kombine olarak kullanımı yaygındır (130). İlaçların kombine şekilde kullanımlarının nedeni, tek bir ilaçla tedaviden istenilen, etkin bir sonuç alınamamasıdır (131).

İlaçların kombine kullanımındaki amaç; sinerjistik terapötik etki elde etmek, ilacın toksisitesini ve kullanılan ilacın dozunu azaltmak ve ilaç direncini en aza indirmektir (130). Toksik etkileri farklı olan ve farklı mekanizmalarla etki gösteren ilaçları kombine ederek, daha güçlü etki göstermelerini sağlamaktır (131). Böylelikle ilaçların artırılmış sitotoksik etkileri tümörü kontrol altına almayı kolaylaştırırken, aynı zamanda hastanın daha düşük dozla tedavi edilmesi ve ilacın toksik etkilerinin azaltılması sağlanmaktadır (131).

Sinerjizm, bir ilacın etkisinin diğer bir ilaçla kullanıldığında artmasıdır. Bir başka deyişle sinerjistik etki; iki ilacın kombine etkisinin, tek başlarına gösterecekleri etkinin toplamından fazla olması şeklinde tanımlanır (132). Antagonistik etki iki ilacın kombine

etkisinin, ilaçların tek başlarına gösterdikleri etkinin toplamından az olması, additif etki ise iki ilacın kombine etkisinin tek başına gösterdikleri etkiye eşit olması olarak tanımlanır (132).

Sinerjistik Ve Antagonistik Etkinin Belirlenmesi

Günümüzde iki ilaç kombinasyonunun etkisinin kantitatif değerlendirmesinde, Chou ve Talalay tarafından önerilen ve yaygın olarak kullanılan medyan-efekt eşitliği kullanılmaktadır (133). Medyan-efekt eşitliği, kütle korunumu kanunundan türetilmiştir. Bu eşitlik; biyokimya ve biyofizikteki Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch ve Scatchard eşitliklerini kapsamaktadır. Chou ve Talalay kombinasyon indeksi (CI) teoremiyle de ilaç kombinasyonunun kantitatif değerlendirmesini yapmaktadır.

Medyan-efekt eşitliği ilacın dozu ile ilacın etkisi, sitotoksisitesi arasında en basit şekilde ilişki kurulabilmesini sağlamaktadır (130). Denklem şu şekildedir:

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m}\right)^m$$

D: İlacın dozu (konsantrasyonu)

D_m: Medyan-efekt doz (ilacın gücünü/potansiyelini gösteren doz)

f_a: Doz tarafından etkilenen bölüm/fraksiyon

f_u: Doz tarafından etkilenmeyen bölüm/fraksiyon($1-f_a=f_u$).

m: Doz-etki eğrisinin şeklini/keskinliğini veren katsayı (m=1 ise eğri hiperbolik, m>1 ise sigmoidal, m<1 ise eğri düz sigmoidaldır).

1983 yılında Chou ve Talalay tarafından tanıtılan ve sinerjizm ve antagonizmi kantitatif olarak veren CI ise şu şekilde hesaplanır (130):

$$CI = \frac{(D_1)}{(D_x)_1} + \frac{(D_2)}{(D_x)_2} = \frac{(D_1)}{\left((D_m)_1 \left[\left[\frac{f_a}{1-f_a}\right]\right]\right]^{1/m_1}} + \frac{(D_2)}{\left((D_m)_2 \left[\left[\frac{f_a}{1-f_a}\right]\right]\right]^{1/m_2}}$$

Buradaki D_1 ve D_2 sırasıyla 1. ilacın ve 2. ilacın dozlarıdır. Paydadaki $(D_X)_1$, D_1'in tek başına sistemin %x'ini inhibe eden konsantrasyonudur.$(D_X)_2$, D_2'in tek başına sistemin %x'ini inhibe eden konsantrasyonudur.

İlaçların sinerjistik, antagonistik ve additif etkileri, CI aralığına bağlı olarak belirlenmiştir. CI<1 olması sinerjizmi, CI=1 olması additif etkiyi, CI>1 olması ise antagonistik etkiyi belirtmektedir.

Kombinasyon indeksi, CompuSyn 1.0 programı tarafından hesaplanmaktadır. Program, ilaçların kombinasyonlarının verilerini analiz edip kombinasyon indeksini otomatik olarak hesaplamaktadır (130).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi laboratuarında gerçekleştirildi.

GEREÇLER

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve cihazlar Tablo 7. ve Tablo 8.'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	**Üretici Firma**
5-Florourasil	Sandoz
Ankaferd Kanama Durdurucu (ABS)	Ankaferd İlaç A.Ş.
Cetuximab	MERCK
Dimetil sülfoksit (DMSO)	MERCK
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium1X)	MULTICELL (319-020-CL)
EMEM (Minimum Essential Medium Eagle's 1X)	MULTICELL (320-026-CL)
Fetal Bovine Serum	Capricorn Scientific
Ham's F12 Medium, 1X	MULTICELL (319-010-CL)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
L-Glutamin	MULTICELL (609-065-E2)
MTT	Biomatik (A-3338-56)
Oxaliplatin	Actavis

Tablo 7. (Devamı) Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	**Üretici Firma**
Penisilin-Streptomisin	Wisent Bioproducts
Phosphate buffered saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific
PureLink RNA Mini Kit	Life Technologies
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Tripsin-EDTA	MULTICELL (352-542-EL)

Tablo 8. Deneylerde kullanılan alet ve malzemeler

Cihaz	**Üretici Firma**
24 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakaları	Nest Biotechnology
96 Well Thermal Cycler	Thermo Scientific, ABD
384 kuyucuklu PCR array plate	Applied Biosystems
CO_2'li inkübatör	Panasonic, Japonya
Hücre üreme flaskları, 25 cm^2 ve 75 cm^2	Corning, ABD
Inverted Mikroskop	Nikon, Japonya
Laminar Hava Akımlı Steril Çalışma Kabini	SafeFast Elite, İtalya
Soğutmalı Santrifüj	Hermle, Almanya
Mikroplaka ELISA okuyucu	Thermo Scientific, ABD
NanoDrop	Optizen Nano-Q
Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik)	Eppendorf
Tali image cytometer	İnvitrogen
The QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR cihazı	Thermo Fisher Scientific, Türkiye
Vorteks	Wisemix

YÖNTEMLER

Kolon Kanseri Hücre Hattı (HT29)

Çalışmamızda kullanılan hücreler, ATCC (Amerikan Tissue Culture Collection)'den sağlanmıştır (ATCC kodu: HTB-38).

Çalışma İlaçları Ve Hazırlanması

Çalışmamızda; 5-FU ve Oxaliplatin ve Cetuximab ilaçları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Onkoloji bölümünden temin edilmiştir. ABS ise, Ankaferd İlaç A.Ş.'den temin edildi.

5-FU için 1000 µM'lık, Oxaliplatin ve Cetuximab için ise 2000 µg/ml'lık stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltilerden, çalışma çözeltileri hazırlandı.

5-FU'nun deneyimizde kullanılacak konsantrasyonları, en yüksek doz 50 µM olacak şekilde toplamda 10 farklı konsantrasyonu hazırlandı. Oxaliplatin'in en yüksek doz 100 µg/ml olacak şekilde, Cetuximab'ın en yüksek dozu 10 µg/ml olacak şekilde, farklı konsantrasyonları hazırlandı. ABS'nin konsantrasyonları ise, 90, 72, 54, 36, 18, 9, 4.5, 2, 1 µl olacak şekilde, toplamda 9 farklı doz olarak hazırlandı.

Hücre Kültürü Teknikleri

Hücre hattının açılması: -150ºC' de uzun süre saklanmış olan hücreler, 37ºC'de çözünene kadar bekletildi. Çözünen hücre süspansiyonuna %5 FBS içeren besiyeri eklendi ve sonra flaska konularak 37ºC'de ve %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 5-6 saat inkübasyonun sonunda, hücrenin besiyeri değiştirildi.

Hücrelerin çoğaltılması: Çalışmada kullanılan kolon kanseri hücre hattı HT-29, DMEM, EMEM, Ham's F12, %5 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren kültür ortamında, 37°C'de ve %5 CO_2'li inkübatörde kültüre edildi. Hücrelerin üremesi, her 2 günde bir inverted mikroskopta incelendi. Konfluent olan hücrelerden pasaj yapılarak, hücrelerin çoğaltılması sağlandı.

Hücrelerin pasajlanması: Flask içerisinde yaklaşık %70'i konfluente ulaşan hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı. 75 cm^2'lik flaskın içerisine, %0.05'lik tripsinden 6 ml eklendi. Flasklar, 37°C'de ve %5 CO_2 içeren inkübatöre konuldu. İnkübatörde 5-6 dakika bekletilerek, hücrelerin kontrollü şekilde kalkmaları sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler, pipet yardımıyla 15 ml'lik tüpe alındı.

Tüpler, 1200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı. Altta kalan kısmın üzerine bir miktar besiyeri konuldu ve iyice pipetaj yapılarak flasklara eklendi. Ardından flasklar inkübatöre konuldu.

Hücrelerin dondurulması ve saklanması: Flaskın içerisindeki hücrelere tripsin konularak, hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkması sağlandı. Kalktığı gözlenen hücreler 15 ml'lik tüplere alınıp, 1200 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak, altta kalan kısmın üzerine %5 FBS içeren besiyeri konuldu. İyice pipetetaj yapıldıktan sonra, hücre süspansiyonu %5 DMSO içeren cryo tüplere konuldu ve tüpler -150°C'de saklandı.

İlaçların Uygulanması

Hücrelerin 96 kuyucuklu plakalara ekimi yapıldı ve bu plakalar hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat inkübatörde bekletildi. 24 saat inkübatörde bekletilen 96 kuyucuklu plakalara, planlanan konsantrasyonlardaki 5-FU, Oxaliplatin, Cetuximab ve ABS, toplam 200 µl volüm içinde olacak şekilde uygulandı. 24 saat inkübasyonun ardından, plakalardan ilaçlı besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve plakalara taze besiyeri eklendi. 72 saat inkübasyon sonrasında hücre proliferasyonu ve sitotoksisitesi, kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT ile değerlendirildi.

MTT deneyi sonucunda; ABS, 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab kemoterapötiklerinin LD_{50} değerleri hesaplandı.

Elde edilen LD_{50} değerlerine göre, ilaç etkileşim çalışmaları yapıldı. İlaç etkileşim çalışmaları için; ABS ve diğer kemoterapötiklerin bire bir 4, 2, 1, 1/2, 1/4 ve 1/8 LD_{50} konsantrasyonlarının kombinasyonunundan elde edilen değerler üzerinde, sinerjistik ve antagonistik etkiler değerlendirildi.

MTT Yöntemi

Hücre canlılığı, kolorimetrik bir test olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol–2-il)-difenil tetrazolium bromid] yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde, MTT boyası canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalizlenen bir tepkimeyle mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da, hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmektedir (134).

MTT çalışma çözeltisi, 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. İnkübasyonun sonunda, MTT çalışma çözeltisinden her bir kuyucuğa 20 µl MTT çalışma solüsyonu eklendi ve 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda MTT solüsyonu boşaltılıp, dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Daha sonra 492 nm'de, mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüm yapıldı.

Tali Görüntü Tabanlı Sitometre ile Apoptoz Tayini

Normal hücrelerin hücre zarının iç kısmında, membran lipidlerinden olan fosfotidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse, hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfotidilserin, hücre zarının dış kısmına transloke olur. Bu yer değiştirme, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken evrelerinde meydana gelir. Annexin V, fosfotidilserine bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretlenerek, apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. İkinci bir boya olarak ise, propidyum iyodid (PI) kullanılmaktadır. PI, canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırmaktadır (135).

Annexin V ve PI boyalarının bu özellikleri kullanılarak, hücrelerin canlı, ölü ve apoptotik durumları belirlenebilmektedir. Bunun için kullandığımız Tali Apoptosis Kit-Annexin V Alexa Flour 488 ve Propidium Iodide kit ile boyanan apoptotik hücreler yeşil floresan, ölü hücreler kırmızı floresan vermekte ve sayıları belirlenmektedir. Canlı hücreler ise, çok az floresan gösterirler veya hiç floresan göstermezler.

Tali testi için, HT-29 kolon kanseri hücreleri 25 cm^2'lik flasklara ekildi. Kullanılan kitte belirlenen protokole göre, aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. Uygulama süresinin bitiminde hücreler tripsinle muamele edilip, flaskın tabanından uzaklaştırıldı.
2. Tripsinli hücreler, ependorf tüplere alınarak 700 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonunda üstteki süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Üstteki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, 200 µl 1X'lik Annexin Binding Buffer ve 10 µl Annexin V Alexa Flour eklenerek vortekslendi ve 20 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
4. 750 g'de 2 dk santrifüj edildi ve üstte kalan kısım uzaklaştırıldı.
5. 100 µl 1X Annexin Binding Buffer eklendi.
6. Ardından bu karışıma 1 µl PI eklenerek, karışım karanlık ortamda 5 dk inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonrasında tüpler içerisindeki karışımdan 25 µl alınarak, Tali için hazırlanan özel lamlara pipetlendi ve Tali apoptoz analiz programı ile sonuçlar görüntülendi.

RNA izolasyonu

Hücreler flasklardan, 24'lük plakalara aktarıldı. 24 saat inkübasyonun ardından, plakalardan ilaçlı besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve plakalara taze besiyeri eklendi. 72 saat

inkübasyon sonrasında, kuyucuklardaki besiyeri çekildi. Hücrelerin plakalardan kaldırılması işlemi, lysis tamponu (lysis tamponu+β-merkaptoetanol) ile yapıldı. 24'lük plakalardaki hücrelere lysis tamponu eklendi ve hücreler kaldırıldıktan sonra tüplere konuldu.

Çalışmada; kontrol grubu ve kullandığımız ilaçlar olan 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab'ın ABS ile kombinasyonları olacak şekilde 4 grup uygulandı.

Kültüre edilmiş hücrelerden RNA eldesi, PureLink® RNA Mini Kit kullanılarak yapıldı. İşlem, kit üreticisi firmanın kullanım kılavuzunda gösterdiği aşağıdaki basamaklar izlenerek yapıldı.

1. Hücrelerin kaldırılması işlemi, lysis tamponu (lysis tamponu+β-merkaptoetanol) ile yapıldı. Hücreler kaldırıldıktan sonra tüplere konuldu.
2. Ardından (1:1) oranında, %70'lik etanol konuldu.
3. İyice vortekslendi.
4. Karışım filtreli tüpe alındı.
5. Oda sıcaklığında 12000 g'de 20 sn santrifüjlendi.
6. Filtreli kısım başka bir tüpe alındı.
7. 700 µl yıkama tamponu I (Wash buffer I) eklendi.
8. Oda sıcaklığında, 12000 g'de 15 sn santrifüj edildi.
9. Filtreli kısım başka bir tüpe alındı.
10. Filtrenin üzerine, 500 µl yıkama tamponu II (Wash buffer II) eklendi.
11. Oda sıcaklığında, 12000 g'de 15 sn santrifüj edildi.
12. Alttaki kısım döküldü ve filtrenin üzerine tekrardan 500 µl yıkama tamponu II (Wash buffer II) eklendi.
13. Oda sıcaklığında 12000 g'de 2.30 dk santrifüjlendi.
14. Filtreli kısım 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alındı.
15. 50 µl RNAaz free water eklendi.
16. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
17. Oda sıcaklığında maksimum hızda 2 dakika santrifüjlendi.
18. Filtre çıkarılarak atıldı ve elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı nanodrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü ve sonuçlar ng/µl cinsinden bulundu.
19. Ardından, RT-PCR'da kullanılana kadar -80°C'de saklandı.

cDNA sentezi

Primer olarak random hekzamerler kullanılarak, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları aşağıda belirtilmiştir (Tablo 9).

Her bir örnek için;

10 mikrolitre RNA+H_2O

10 mikrolitre cDNA mix olmak üzere, toplamda 20 µl karışım hazırlandı.

Tablo 9. cDNA mix için hazırlanması gereken maddeler

cDNA mix	
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTPmix	0,8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
Nükleaz free su	4,2 µl

Her bir örnek için 0.2 ml'lik PCR tüplerine RNA + H_2O (10 µl) ve cDNA mix (10 µl) eklendi ve pipetaj yapıldı. Her bir örneğin final hacimleri 20 µl'ye tamamlandı. Tüpler Thermal Cycler'a yerleştirildi ve ardından hazırlanan cDNA reaksiyonu aşağıdaki programa göre çalıştırıldı (Tablo 10).

Tablo 10. Thermal Cycler cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Primer Bağlanması	25^oC	10 dakika	1
Ters transkripsiyon	37 ^oC	120 dakika	1
İnaktivasyon	85 ^oC	5 dakika	1
Soğutma	4^oC	-	1

Elde edilen cDNA örnekleri, RT-PCR'da kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

RT-PCR protokolü

Hazırlanan cDNA'larla birlikte, gen ekspresyon analizi için yeni bir karışım hazırlandı (Tablo 11). Bu karışım son hacim 13 µl olacak şekilde, 384 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Apoptoz ile ilgili 6 genin ekspresyonu çalışıldı (Tablo 12). House keeping gen olarak, GAPDH kullanıldı.

Tablo 11. RT PCR karışımında bulunan maddeler

SYBR Green PCR Master Mix	7 µl
cDNA	2 µl
RNAaz-free water	3 µl
Primer	F: 0,5 µl R: 0,5 µl
Toplam	**13 µl**

Tablo 12. Çalışmada kullanılan primerler

Primer adı	**Forward Primer**	**Reverse Primer**
p53	5′-CACGAGCGCTGCTCAGATAGC-3′	5′-ACAGGCACAAACACGCACAAA-3′
Sitokrom c	5′-AGTGGCTAGAGTGGTCATTCATTTACA-3′	5′-TCATGATCTGAATTCTGGTGTATGAGA-3′
Apaf-1	5′-GATATGGAATGTCTCAGATGGCC-3′	5′-GGTCTGTGAGGACTCCCCA-3′
Bax	5′-TTCATCCAGGATCGAGCAGA-3′	5′-GCAAAGTAGAAGGCAACG-3′
Bcl-2	5′- ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA -3′	5′- ACAGTTCCACAAAGGCATCC-3′
Kaspaz-3	5′-GGTATTGAGACAGACAGTGG-3′	5′- CATGGGATCTGTTTCTTTGC-3′

Toplam 13 µl RT-PCR reaksiyonu, aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

50.0 ºC'de 2 dk , 95.0 ºC'de 10 dk (1 Döngü)
95.0 ºC'de 15 sn, 60 ºC 'de 1 dk (40 Döngü)

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri JMP istatistik programı kullanılarak yapıldı. Deneylerde elde edilen sonuçlar, ortalama ± SD olarak ifade edildi.

Kullanılan uygulamalara ait LD_{50} değerleri, ilaçların ferdi MTT değerlerinden Probit analizi ile elde edildi. Deneylerde kullanılan ilaçların antagonistik ve sinerjistik etkileri, CompuSyn (version 1.0) programı kullanılarak incelendi.

CompuSyn programına göre, iki molekülün kombine etkilerini değerlendirmek için dikkate alınacak CI değerleri aşağıdaki gibidir (Tablo 13).

Tablo 13. CI değerleri değerlendirme tablosu

CI değerleri	Kombine sitotoksik etki
0.1<	Çok kuvvetli sinerjizm
0.1 – 0.3	Kuvvetli sinerjizm
0.3- 0.7	Sinerjizm
0.7-0.9	Hafif sinerjistik etki
0.9- 1.1	Additif etki
>1.1	Antagonizm

MTT deney sonuçlarından elde edilen verilerde gruplar arası farkın anlamlılığını değerlendirmede Student's t testi kullanıldı.

RT-PCR gen ifadesi çalışmaları sonucu elde edilen veriler ise, Tukey-HSD testi kullanarak kıyaslandı. Sonuçlar, en az 3 paralel çalışmanın ortalaması ± standart hata olarak ifade edildi ve istatistiksel olarak anlamlılık değeri $p<0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

HT-29 HÜCRE HATTINDA ABS, 5-FU, OXALIPLATIN VE CETUXIMAB'IN LD_{50} DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI

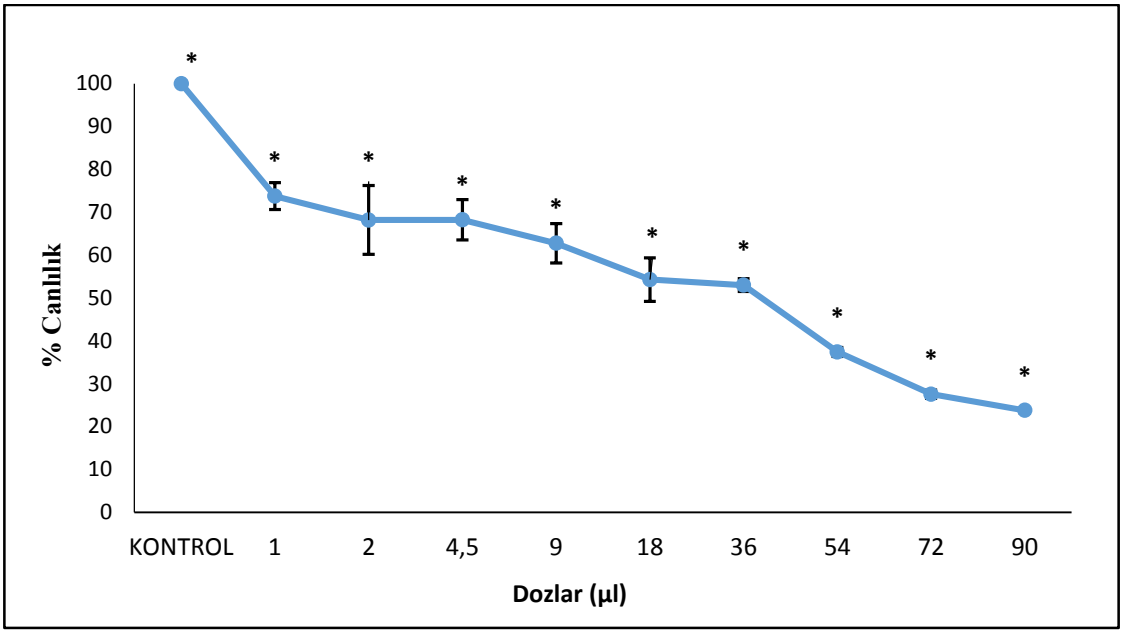
Ankaferd Blood Stopper (ABS)

ABS konsantrasyonları; 90, 72, 54, 36, 18, 9, 4.5, 2 ve 1 µl olacak şekilde, toplamda 9 farklı doz olarak hücrelere uygulandı. 24 saat inkübasyonun ardından, 96 kuyucuklu plakalardan ilaçlı besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve plakalara taze besiyeri eklendi. 72 saat inkübasyon sonrasında hücre proliferasyonu ve sitotoksisitesi, MTT metodu ile değerlendirildi.

Çalışma kapsamında ABS uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve ABS'nin HT-29 hücre serisi üzerinde LD_{50} değeri, 27 µl olarak saptandı (Şekil 14).

HT-29 hücre hattında ABS'nin 90 µL dozunda; sırasıyla %23, 72 µL'de %27, 54 µL'de %37, 36 µL'de %53, 18 µL'de %54, 9 µL'de %62, 4.5 µL'de %68, 2 µL'de %68 ve 1 µL dozunda %73 oranında canlılık gözlendi.

HT-29 hücre serisinde farklı konsantrasyonlar ile uygulanan ABS, 72 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$). Yapılan çalışmada, 72 saatlik uygulama sonrasında en yüksek canlı hücre oranı 1 µl uygulama konsantrasyonunda %73.78±3.10 olarak belirlenirken, 90 µl ABS konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin %23.80±0.64'ü canlı kaldı.



Şekil 14. HT-29 hücre hattında 1-90 µl doz aralıklarında ABS uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *p<0.0001 kontrole göre)

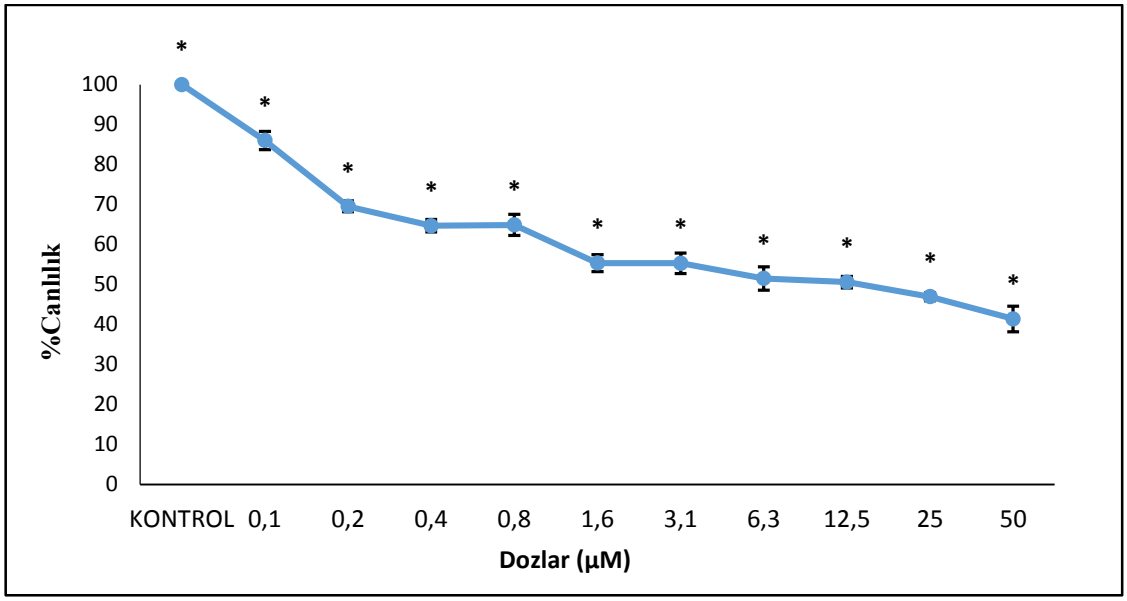
5-Florourasil

5-Florourasil; en yüksek doz 50 µM olacak şekilde, yarı yarıya seyreltme yapılarak toplamda 10 farklı doz olarak hücrelere uygulandı. 24 saat inkübasyonun ardından, 96 kuyucuklu plakalardan ilaçlı besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve plakalara taze besiyeri eklendi. 72 saat inkübasyon sonrasında hücre sitotoksisitesi, MTT metodu ile değerlendirildi.

Çalışma kapsamında 5-FU uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve 5-FU ilacının HT-29 hücre serisi üzerinde LD_{50} değeri, 9.6 µM olarak saptandı (Şekil 15).

HT-29 hücre hattında 5-FU'nun 50 µM konsantrasyonda; sırasıyla %41, 25 µM'da %46, 12.5 µM'da %50, 6.3 µM'da %51, 3.1 µM'da %55, 1.6 µM'da % 55, 0.8 µM'da % 64, 0.4 µM'da % 64, 0.2 µM'da % 69, 0.1 µM'da %86 oranında canlılık gözlendi

HT-29 hücre hattında farklı konsantrasyonlar ile uygulanan 5-FU, 72 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$). Yapılan çalışmada 72 saatlik uygulama sonrasında en yüksek canlı hücre oranı 0.1 µM uygulama konsantrasyonunda %86.01±2.25 olarak belirlenirken, 50 µM 5-FU konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin %41.38±3.18'i canlı kaldı.



Şekil 15. HT-29 hücre hattında 0,1-50 µM doz aralıklarında 5-FU uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *p<0.0001 kontrole göre)

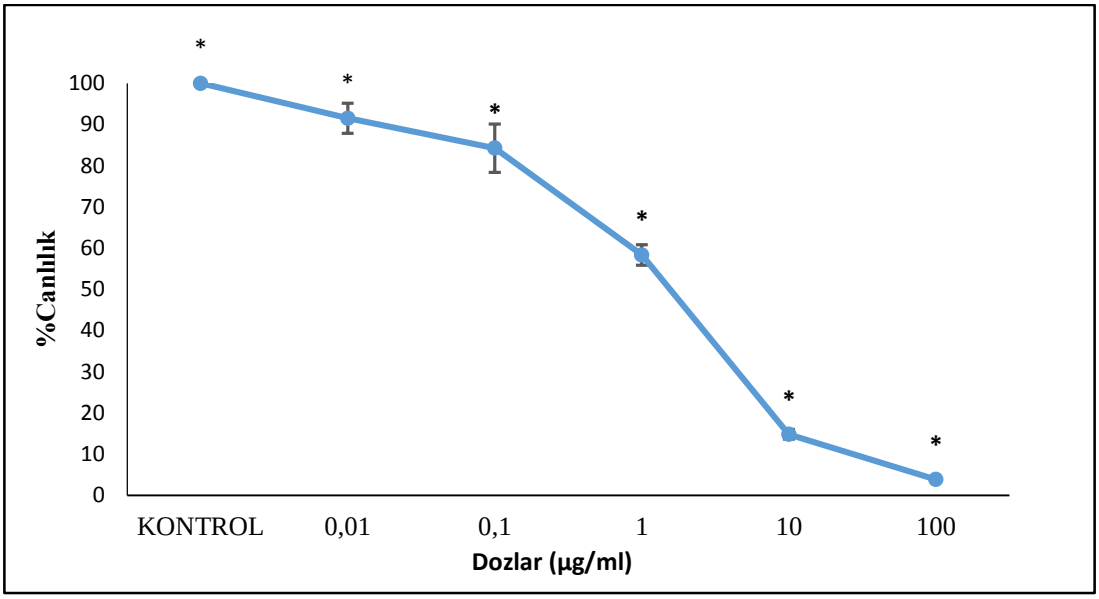
Oxaliplatin

Oxaliplatin konsantrasyonları; 100 µg/ml en yüksek doz olacak şekilde, 1/10 oranında seyreltme yapılarak toplamda 5 farklı doz olarak hücrelere uygulandı. 96 kuyucuklu plakalardan ilaçlı besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve plakalara taze besiyeri eklendi. 72 saat inkübasyon sonrasında hücre proliferasyonu ve sitotoksisitesi, MTT metodu ile değerlendirildi.

Çalışma kapsamında Oxaliplatin uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Oxaliplatin ilacının HT-29 hücre serisi üzerinde LD_{50} değeri, 1 µM olarak saptandı (Şekil 16).

HT-29 hücre hattında Oxaliplatin'in 100 µg/ml konsantrasyonda; sırasıyla %3.88, 10 µg/ml'de %14.83, 1 µg/ml'de %58.37, 0.1 µg/ml'de %84.27, 0.01 µg/ml'de %91.54 oranında canlılık gözlendi.

HT-29 hücre serisinde farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Oxaliplatin, 72 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$). Yapılan çalışmada, 72 saatlik uygulama sonrasında en yüksek canlı hücre oranı 0.01 µg/ml uygulama konsantrasyonunda %91.54±3.64 olarak belirlenirken, 100 µg/ml Oxaliplatin konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin %3.88±0.39'i canlı kaldı.



Şekil 16. HT-29 hücre hattında 0,01-100 µg/ml doz aralıklarında Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *p<0.0001 kontrole göre)

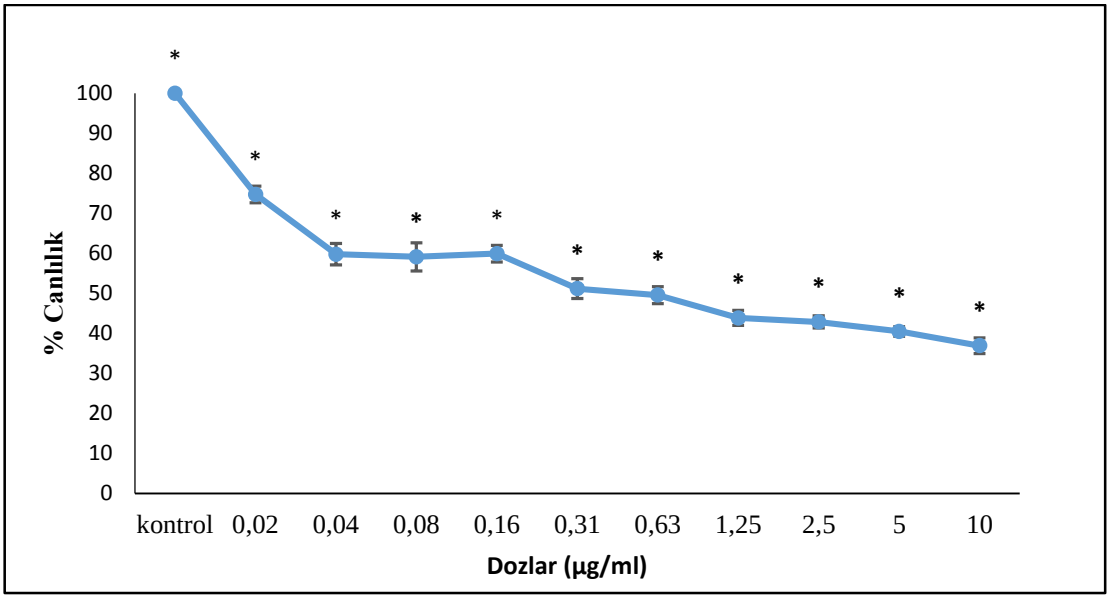
Cetuximab

Cetuximab, en yüksek doz 10 µg/ml olacak şekilde, yarı yarıya seyreltme yapılarak toplamda 10 farklı doz olarak hücrelere uygulandı. 24 saat inkübasyonun ardından, 96 kuyucuklu plakalardan ilaçlı besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve plakalara taze besiyeri eklendi. 72 saat inkübasyon sonrasında hücre sitotoksisitesi, MTT metodu ile değerlendirildi.

Çalışma kapsamında Cetuximab uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Cetuximab ilacının HT-29 hücre serisi üzerinde LD_{50} değeri, 0.59 µg/ml olarak saptandı (Şekil 17).

HT-29 hücre hattında Cetuximab 10 µg/ml konsantrasyonda; sırasıyla %36.94, 5 µg/ml'de %40.51, 2.5 µg/ml'de %42.88, 1.25 µg/ml'de %43.89, 0.63 µg/ml'de %49.61, 0.31 µg/ml'de % 51.21, 0.16 µg/ml'de % 59.95, 0.08 µg/ml'de % 59.16, 0.04 µg/ml'de % 59.82, 0.02 µg/ml'de %74.76 oranında canlılık gözlendi.

HT-29 hücre serisinde farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Cetuximab 72 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü (p<0.0001). Yapılan çalışmada, 72 saatlik uygulama sonrasında en yüksek canlı hücre oranı 0.02 µg/ml uygulama konsantrasyonunda %74.76±2.07 olarak belirlenirken, 10 µg/ml Cetuximab konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin %36.94±1.96'i canlı kaldı.



Şekil 17. HT-29 hücre hattında 0,02-10 µg/ml doz aralıklarında Cetuximab uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *p<0.0001 kontrole göre)

ABS İle Kemoterapötik İlaçların Kombinasyonu

5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab'ın ABS ile kombinasyonunun sitotoksisite analizleri gerçekleştirildi. Sitotoksisite analizinde; 5-FU, Oxaliplatin, Cetuximab ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi.

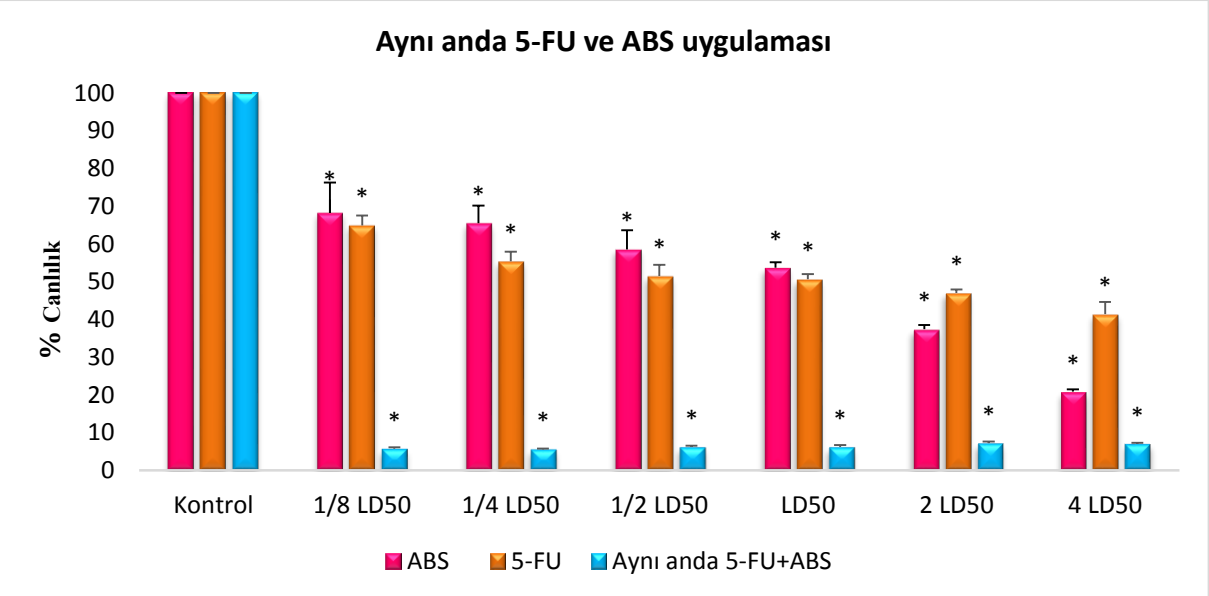
ABS'nin kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonu, 3 şekilde gerçekleştirildi. Birincisinde; ABS ve ilaçlar aynı anda uygulanarak, etkileşimleri incelendi. İkincisinde, kuyucuklara önce ABS uygulandı 24 saat inkübasyonun ardından kemoterapötik ilaç uygulanarak ilaçların etkileşimleri incelendi. Üçüncüsünde ise kuyucuklara önce kemoterapötik ilaç 24 saat inkübasyonun ardından ABS uygulanarak etkileşimleri incelendi. İlaçlarla 24 saat inkübasyonun ardından, 96 kuyucuklu plakalardan ilaçlı besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve plakalara taze besiyeri eklendi. 72 saat inkübasyon sonrasında hücre sitotoksisitesi, MTT metodu ile değerlendirildi. Elde edilen veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı.

ABS ile kemoterapötik ilaçların aynı anda kombinasyonları

5-Florourasil'in ABS ile aynı anda uygulanması: Daha önceki çalışmalarda LD_{50} değerleri belirlenen 5-FU ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 LD_{50}

konsantrasyonları kombine edildi. HT-29 hücre serisine aynı anda uygulanan ABS ve 5-FU kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$).

Şekil 18 incelendiğinde; 1/8 LD_{50}'ye denk gelen 3.38 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %68 ve 1.2 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %65 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %5.7 olarak saptandı. 1/4 LD_{50}'ye denk gelen 6.75 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %65 ve 2.4 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %55 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %5.5 olarak saptandı. 1/2 LD_{50}'ye denk gelen 13.5 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %58 ve 4.9 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %51 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %6 olarak saptandı. LD_{50}'ye denk gelen 27 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %53 ve 9.6 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %50 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %6 olarak saptandı. 2 LD_{50}'ye denk gelen 54 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %37 ve 19.1 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %46 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %7.2 olarak saptandı. 4 LD_{50}'ye denk gelen 108 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %20 ve 38.26 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %41 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %7 olarak saptandı. Kombinasyonların saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı (Tablo 14).



Şekil 18. HT-29 hücre hattında ABS ve 5-FU'nun aynı anda uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *$p<0.0001$ kontrole göre)

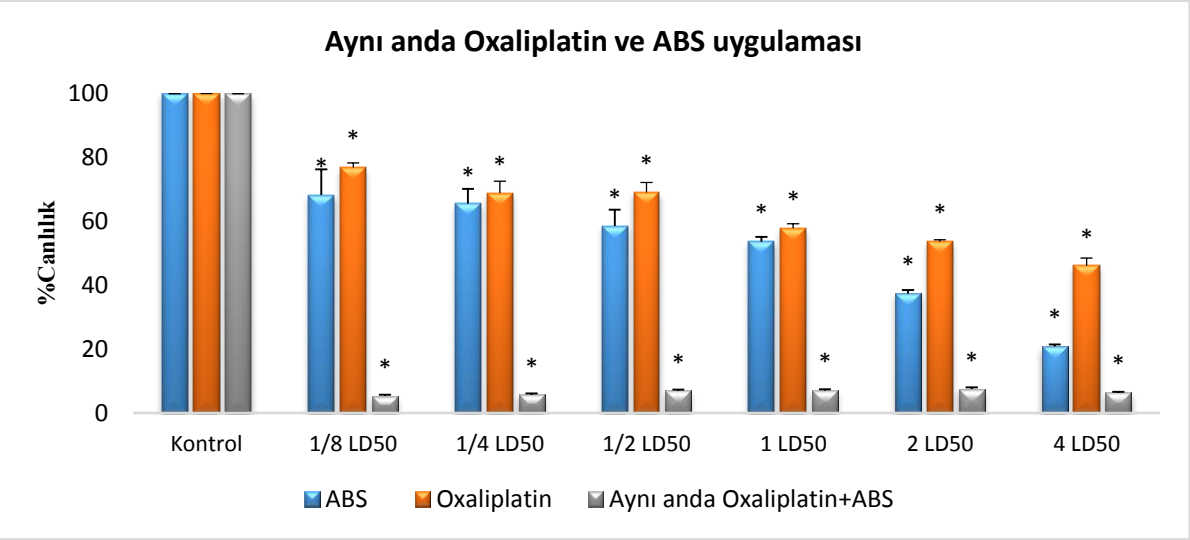
Tablo 14. ABS ve 5-FU'nun aynı anda uygulamasının CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI	Yorum
1/8 LD_{50}: ABS (3.38 µl) + 5-FU (1.2 µM)	0.0014	Çok kuvvetli sinerjizm
1/4 LD_{50}: ABS (6.75 µl) + 5-FU (2.4 µM)	0.0027	Çok kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (13.5 µl) + 5-FU (4.8 µM)	0.00655	Çok kuvvetli sinerjizm
LD_{50}: ABS (27 µl) + 5-FU (9.6 µM)	0.01312	Çok kuvvetli sinerjizm
2 LD_{50}: ABS (54 µl) + 5-FU (19.13 µM)	0.03487	Çok kuvvetli sinerjizm
4 LD_{50}: ABS (108 µl) + 5-FU (38.26 µM)	0.06738	Çok kuvvetli sinerjizm

Oxaliplatin'in ABS ile aynı anda uygulanması: Daha önceki çalışmalarda LD_{50} değerleri belirlenen Oxaliplatin ve ABS'nin, bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4,1/8 LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi.

HT-29 hücre serisine aynı anda uygulanan ABS ve Oxaliplatin kombinasyonları 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$).

Şekil 19 incelendiğinde; 1/8 LD_{50}'ye denk gelen 3.38 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %68 ve 0.125 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %76 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %5.3 olarak saptandı. 1/4 LD_{50}'ye denk gelen 6.75 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %65 ve 0.25 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %68 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %5.7 olarak saptandı. 1/2 LD_{50}'ye denk gelen 13.5µl ABS'nin hücre canlılık oranı %58 ve 0.5 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %69 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %6.9 olarak saptandı. LD_{50}'ye denk gelen 27 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %53 ve 1 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %57 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %6.9 olarak saptandı. 2 LD_{50}'ye denk gelen 54 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %37 ve 2 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %53 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %7.5 olarak saptandı. 4 LD_{50}'ye denk gelen 108 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %20 ve 4 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %46 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %6.5 olarak saptandı.



Şekil 19. HT-29 hücre hattında ABS ve Oxaliplatin'in aynı anda uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *p<0.0001 kontrole göre)

Değişik oranlarda kombinasyonların HT-29 hücre hattında 72 saat muamele edilmesi sonucu saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı (Tablo 15).

Tablo 15. ABS ve Oxaliplatin'in aynı anda uygulamasının CI değerleri

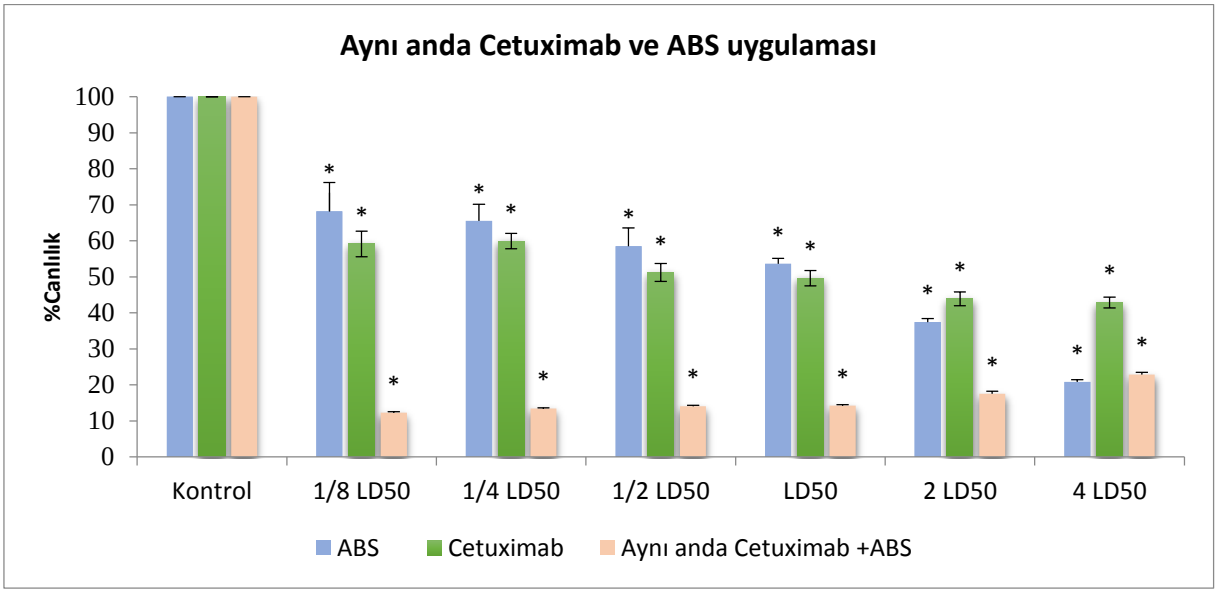
İlaç Konsantrasyonları	CI	Yorum
1/8 LD_{50}: ABS (3.38 µl) + Oxaliplatin (0.125 µg/ml)	0.001	Çok kuvvetli sinerjizm
1/4 LD_{50}: ABS (6.75 µl) + Oxaliplatin (0.25 µg/ml)	0.003	Çok kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (13.5 µl) + Oxaliplatin (0.5 µg/ml)	0.009	Çok kuvvetli sinerjizm
LD_{50}: ABS (27 µl) + Oxaliplatin (1 µg/ml)	0.017	Çok kuvvetli sinerjizm
2 LD_{50}: ABS (54 µl) + Oxaliplatin (2 µg/ml)	0.040	Çok kuvvetli sinerjizm
4 LD_{50}: ABS (108 µl) + Oxaliplatin (4 µg/ml)	0.059	Çok kuvvetli sinerjizm

Cetuximab'ın ABS ile aynı anda uygulanması

Daha önceki çalışmalarda LD_{50} değerleri belirlenen Cetuximab ve ABS'nin, bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi.

HT-29 hücre serisine aynı anda uygulanan ABS ve Cetuximab kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü (p<0.0001).

Şekil 20 incelendiğinde; 1/8 LD_{50}'ye denk gelen 3.38 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %68 ve 0.07 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %59 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %12 olarak saptandı. 1/4 LD_{50}'ye denk gelen 6.75 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %65 ve 0.14 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %59 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %13.5 olarak saptandı. 1/2 LD_{50}'ye denk gelen 13.5 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %58 ve 0.29 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %51 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %14 olarak saptandı. LD_{50}'ye denk gelen 27 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %53 ve 0.59 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın 5-FU'nun hücre canlılık oranı %49 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %14 olarak saptandı. 2 LD_{50}'ye denk gelen 54 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %37 ve 1.18 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %43 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %17.5 olarak saptandı. 4 LD_{50}'ye denk gelen 108 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %20 ve 2.36 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %42 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %22.9 olarak saptandı.



Şekil 20. HT-29 hücre hattında ABS ve Cetuximab'ın aynı anda uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *p<0.0001 kontrole göre)

Değişik oranlarda kombinasyonların HT-29 hücre hattında 72 saat muamele edilmesi sonucu saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı (Tablo 16).

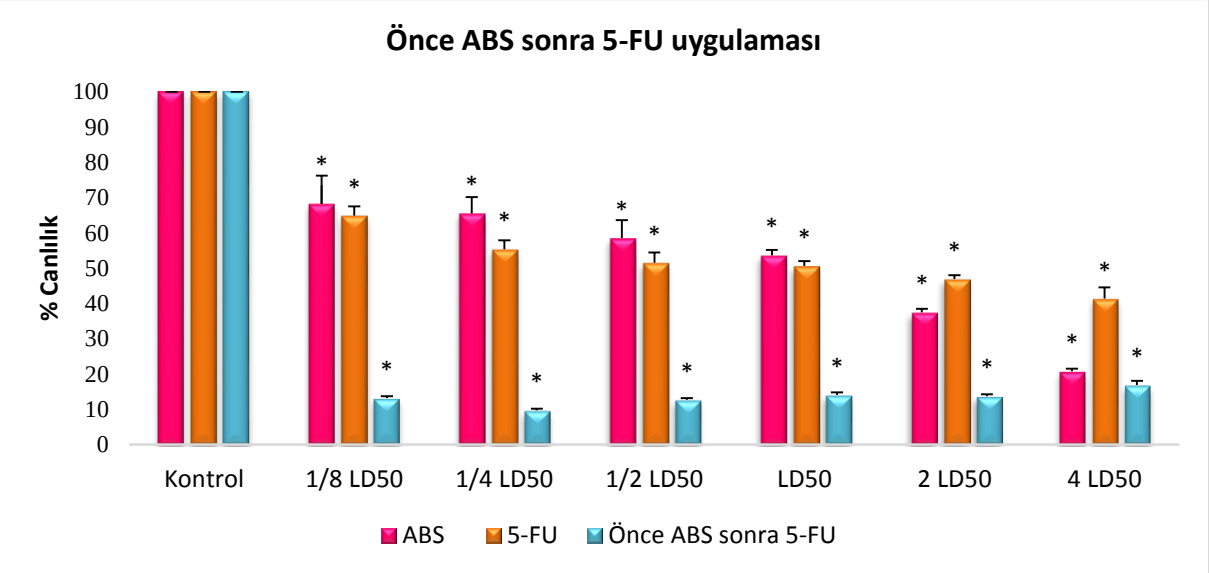
Tablo 16. ABS ve 5-FU'nun aynı anda uygulamasının CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI	Yorum
1/8 LD_{50}: ABS (3.38 µl) + Cetuximab (0.07 µg/ml)	0.006	Çok kuvvetli sinerjizm
1/4 LD_{50}: ABS (6.75 µl) + Cetuximab (0.14 µg/ml)	0.014	Çok kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (13.5 µl) + Cetuximab (0.29 µg/ml)	0.032	Çok kuvvetli sinerjizm
LD_{50}: ABS (27 µl) + Cetuximab (0.59 µg/ml)	0.065	Çok kuvvetli sinerjizm
2 LD_{50}: ABS (54 µl) + Cetuximab (1.18 µg/ml)	0.199	Sinerjizm
4 LD_{50}: ABS (108 µl) + Cetuximab (2.36 µg/ml)	0.719	Hafif sinerjistik etki

Kombinasyonların önce ABS sonra kemoterapötik ilaç olacak şekilde uygulanması

Önce ABS sonra 5-Florourasil uygulaması: Daha önceki çalışmalarda LD_{50} değerleri belirlenen 5-FU ve ABS'nin, bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi.

HT-29 hücre serisine aynı anda uygulanan ABS ve 5-FU kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$).



Şekil 21. HT-29 hücre hattında önce ABS sonra 5-FU uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *$p<0.0001$ kontrole göre)

Şekil 21 incelendiğinde; 1/8 LD_{50}'ye denk gelen 3.38 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %68 ve 1.2 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %65 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %13.2 olarak saptandı. 1/4 LD_{50}'ye denk gelen 6.75 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %65 ve 2.4 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %55 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %9.7 olarak saptandı. 1/2 LD_{50}'ye denk gelen 13.5 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %58 ve 4.9 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %51 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %12.7 olarak saptandı. LD_{50}'ye denk gelen 27 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %53 ve 9.6 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %50 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %14 olarak saptandı. 2 LD_{50}'ye denk gelen 54 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %37 ve 19.1 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %46 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %13.7 olarak saptandı. 4 LD_{50}'ye denk gelen 108 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %20 ve 38.26 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %41 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %16.9 olarak saptandı.

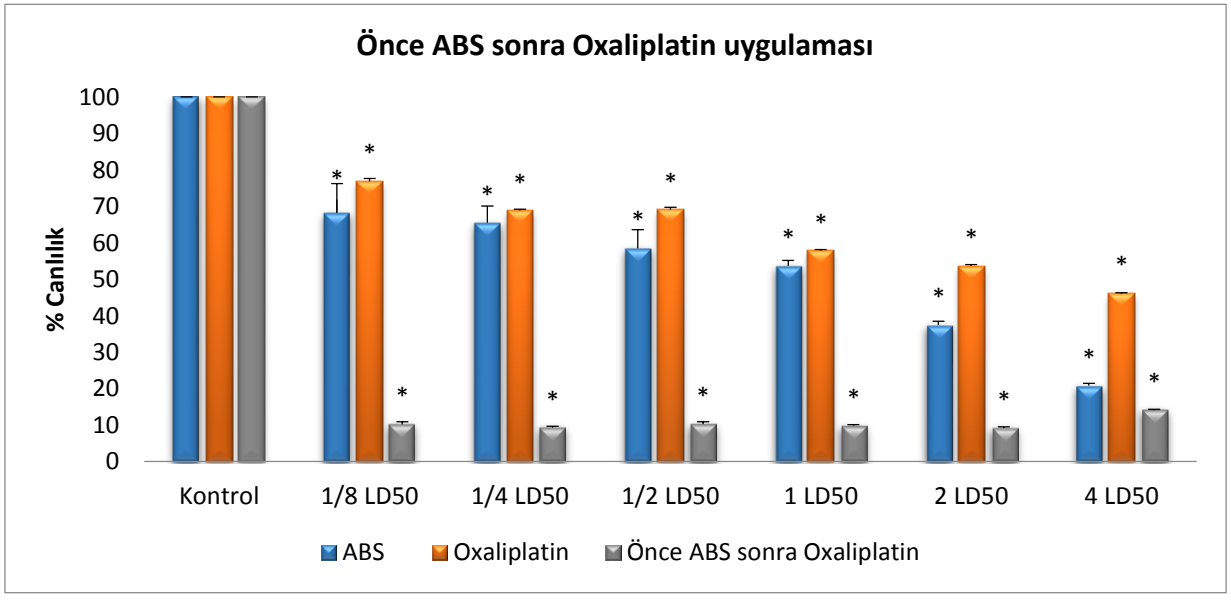
Değişik oranlarda kombinasyonların HT-29 hücre hattında 72 saat muamele edilmesi sonucu saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı (Tablo 17).

Tablo 17. Önce ABS ve sonra 5-FU'nun uygulamasının CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI	Yorum
1/8 LD_{50}: ABS (3.38 µl) + 5-FU (1.2 µM)	0.007	Çok kuvvetli sinerjizm
1/4 LD_{50}: ABS (6.75 µl) + 5-FU (2.4 µM)	0.007	Çok kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS(13.5 µl) + 5-FU (4.8 µM)	0.026	Çok kuvvetli sinerjizm
LD_{50}: ABS (27 µl) + 5-FU (9.6 µM)	0.064	Çok kuvvetli sinerjizm
2 LD_{50}: ABS (54 µl) + 5-FU (19.13 µM)	0.121	Kuvvetli sinerjizm
4 LD_{50}: ABS (108 µl) + 5-FU (38.26 µM)	0.371	Sinerjizm

Önce ABS sonra Oxaliplatin uygulaması: Daha önceki çalışmalarda LD_{50} değerleri belirlenen Oxaliplatin ve ABS'nin, bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi. HT-29 hücre serisine aynı anda uygulanan ABS ve Oxaliplatin kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$).

Şekil 22 incelendiğinde; 1/8 LD_{50}'ye denk gelen 3.38 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %68 ve 0.125 µg/ml konsantrasyondaOxaliplatin'in hücre canlılık oranı %76 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %10 olarak saptandı. 1/4 LD_{50}'ye denk gelen 6.75 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %65 ve 0.25 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %68 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %9 olarak saptandı. 1/2 LD_{50}'ye denk gelen 13.5 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %58 ve 0.5 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %69 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %10 olarak saptandı. LD_{50}'ye denk gelen 27 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %53 ve 1 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %57 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %9.8 olarak saptandı. 2 LD_{50}'ye denk gelen 54 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %37 ve 2 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %53 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı % 9 olarak saptandı. 4 LD_{50}'ye denk gelen 108 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %20 ve 4 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %46 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %14 olarak saptandı. Değişik oranlarda kombinasyonların HT-29 hücre hattında 72 saat muamele edilmesi sonucu saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı (Tablo 18).



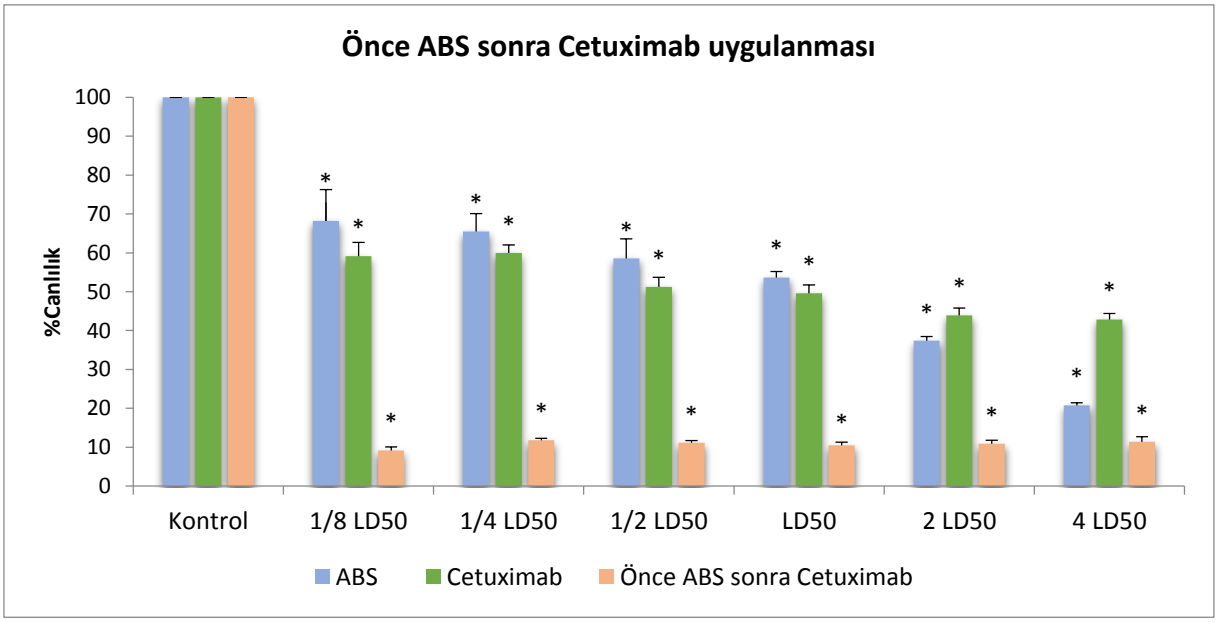
Şekil 22. HT-29 hücre hattında önce ABS sonra Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *p<0.0001 kontrole göre)

Tablo 18. Önce ABS ve sonra Oxaliplatin uygulamasının CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI	Yorum
1/8 LD_{50}: ABS (3.38 µl) + Oxaliplatin (0.125 µg/ml)	0.004	Çok kuvvetli sinerjizm
1/4 LD_{50}: ABS (6.75 µl) + Oxaliplatin (0.25 µg/ml)	0.007	Çok kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (13.5 µl) + Oxaliplatin (0.5 µg/ml)	0.018	Çok kuvvetli sinerjizm
LD_{50}: ABS (27 µl) + Oxaliplatin (1 µg/ml)	0.032	Çok kuvvetli sinerjizm
2 LD_{50}: ABS (54 µl) + Oxaliplatin (2 µg/ml)	0.056	Çok kuvvetli sinerjizm
4 LD_{50}: ABS (108 µl) + Oxaliplatin (4 µg/ml)	0.269	Kuvvetli sinerjizm

Önce ABS sonra Cetuximab uygulaması: Daha önceki çalışmalarda LD_{50} değerleri belirlenen Cetuximab ve ABS'nin, bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi.

HT-29 hücre serisine aynı anda uygulanan ABS ve Cetuximab kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$).



Şekil 23. HT-29 hücre hattında önce ABS sonra Cetuximab uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *$p<0.0001$ kontrole göre)

Şekil 23 incelendiğinde; 1/8 LD_{50}'ye denk gelen 3.38 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %68 ve 0.07 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %59 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %9 olarak saptandı. 1/4 LD_{50}'ye denk gelen 6.75 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %65.5 ve 0.14 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %59 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %11.8 olarak saptandı. 1/2 LD_{50}'ye denk gelen 13.5 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %58 ve 0.29 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %51 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %11 olarak saptandı. LD_{50}'ye denk gelen 27 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %53 ve 0.59 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın 5-FU'nun hücre canlılık oranı %49 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %10.5 olarak saptandı. 2 LD_{50}'ye denk gelen 54 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %37 ve 1.18 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %43 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %11 olarak saptandı. 4 LD_{50}'ye denk gelen 108 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %20 ve 2.36 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %42 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %11.4 olarak saptandı.

Değişik oranlarda kombinasyonların HT-29 hücre hattında 72 saat muamele edilmesi sonucu saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı (Tablo 19).

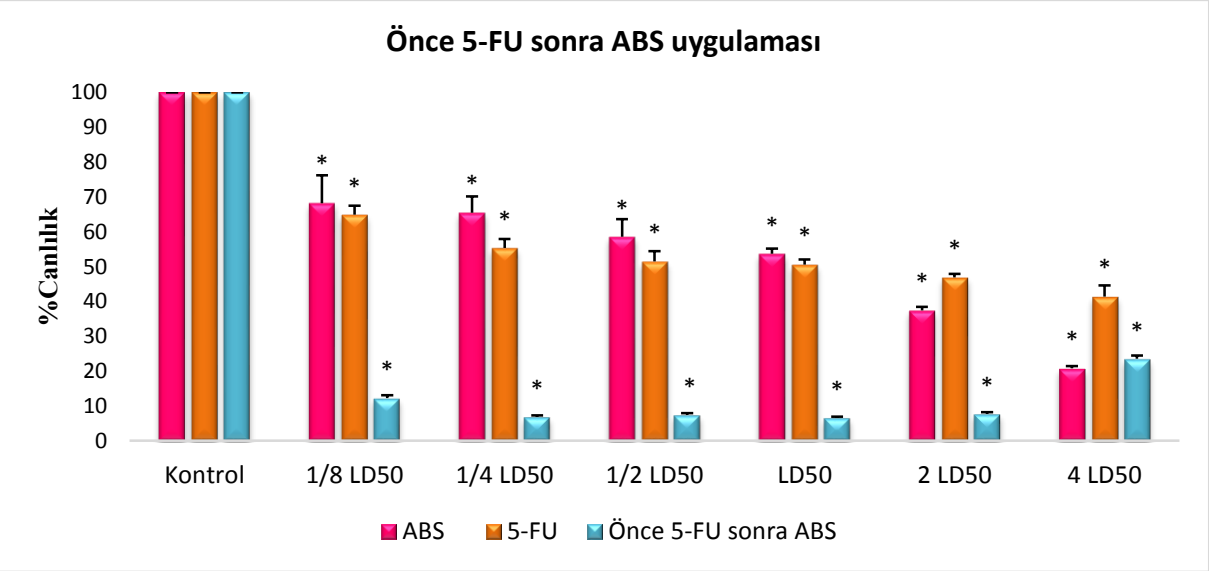
Tablo 19. Önce ABS ve sonra Cetuximab uygulamasının CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI	Yorum
1/8 LD_{50}: ABS (3.38 µl) + Cetuximab (0.07 µg/ml)	0.003	Çok kuvvetli sinerjizm
1/4 LD_{50}: ABS (6.75 µl) + Cetuximab (0.14 µg/ml)	0.01	Çok kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (13.5 µl) + Cetuximab (0.29 µg/ml)	0.019	Çok kuvvetli sinerjizm
LD_{50}: ABS (27 µl) + Cetuximab (0.59 µg/ml)	0.036	Çok kuvvetli sinerjizm
2 LD_{50}: ABS (54 µl) + Cetuximab (1.18 µg/ml)	0.076	Çok kuvvetli sinerjizm
4 LD_{50}: ABS (108 µl) + Cetuximab (2.36 µg/ml)	0.168	Kuvvetli sinerjizm

Kombinasyonların Önce Kemoterapötik İlaç Sonra ABS Olacak Şekilde Uygulanması

Önce 5-Florourasil sonra ABS uygulaması: Daha önceki çalışmalarda LD_{50} değerleri belirlenen 5-FU ve ABS'nin, bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi.

HT-29 hücre serisine aynı anda uygulanan ABS ve 5-FU kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$) (Şekil 24).



Şekil 24. HT-29 hücre hattında önce 5-Florourasil sonra ABS uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *$p<0.001$ kontrole göre)

Şekil 24 incelendiğinde; 1/8 LD_{50}'ye denk gelen 3.38 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %68 ve 1.2 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %65 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %12 olarak saptandı. 1/4 LD_{50}'ye denk gelen 6.75 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %65 ve 2.4 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %55 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %6.8 olarak saptandı. 1/2 LD_{50}'ye denk gelen 13.5 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %58 ve 4.9 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %51 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %7 olarak saptandı. LD_{50}'ye denk gelen 27 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %53 ve 9.6 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %50 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %6.6 olarak saptandı. 2 LD_{50}'ye denk gelen 54 µl ABS'nin hücre canlılık

oranı %37 ve 19.1 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %46 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %7.7 olarak saptandı. 4 LD_{50}'ye denk gelen 108 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %20 ve 38.26 µM konsantrasyonda 5-FU'nun hücre canlılık oranı %41 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %23.5 olarak saptandı. Saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı (Tablo 20).

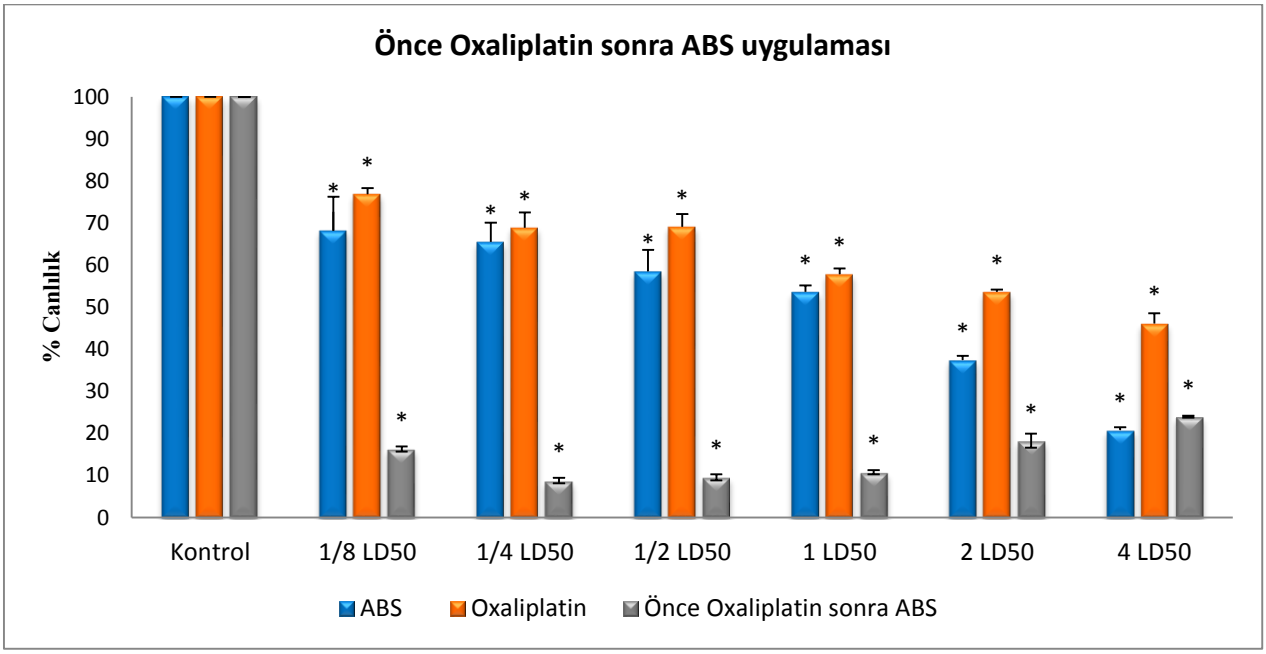
Tablo 20. Önce 5-FU ve sonra ABS uygulamasının CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI	Yorum
1/8 LD_{50}: ABS (3.38 µl) + 5-FU (1.2 µM)	0.006	Çok kuvvetli sinerjizm
1/4 LD_{50}: ABS (6.75 µl) + 5-FU (2.4 µM)	0.004	Çok kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (13.5 µl) + 5-FU (4.8 µM)	0.009	Çok kuvvetli sinerjizm
LD_{50}: ABS (27 µl) + 5-FU (9.6 µM)	0.015	Çok kuvvetli sinerjizm
2 LD_{50}: ABS (54 µl) + 5-FU (19.13 µM)	0.039	Çok kuvvetli sinerjizm
4 LD_{50}: ABS (108 µl) + 5-FU (38.26 µM)	0.775	Hafif sinerjistik etki

Önce Oxaliplatin sonra ABS uygulaması: Daha önceki çalışmalarda LD_{50} değerleri belirlenen Oxaliplatin ve ABS'nin, bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi.

HT-29 hücre serisine aynı anda uygulanan ABS ve Oxaliplatin kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$). Şekil 25'e bakıldığında 1/8 LD_{50}'ye denk gelen 3.38 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %68 ve 0.125 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %76 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %16 olarak saptandı. 1/4 LD_{50}'ye denk gelen 6.75 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %65 ve 0.25 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %68 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %8.8 olarak saptandı. 1/2 LD_{50}'ye denk gelen 13.5 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %58 ve 0.5µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %69 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %9.6 olarak saptandı. LD_{50}'ye denk gelen 27 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %53 ve 1 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %57 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %10.7 olarak saptandı. 2 LD_{50}'ye denk gelen 54 µl

ABS'nin hücre canlılık oranı %37 ve 2 µg/ml konsantrasyondan Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %53 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı % 18 olarak saptandı. 4 LD_{50}'ye denk gelen 108 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %20 ve 4 µg/ml konsantrasyonda Oxaliplatin'in hücre canlılık oranı %46 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %24 olarak saptandı. Saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı (Tablo 21).



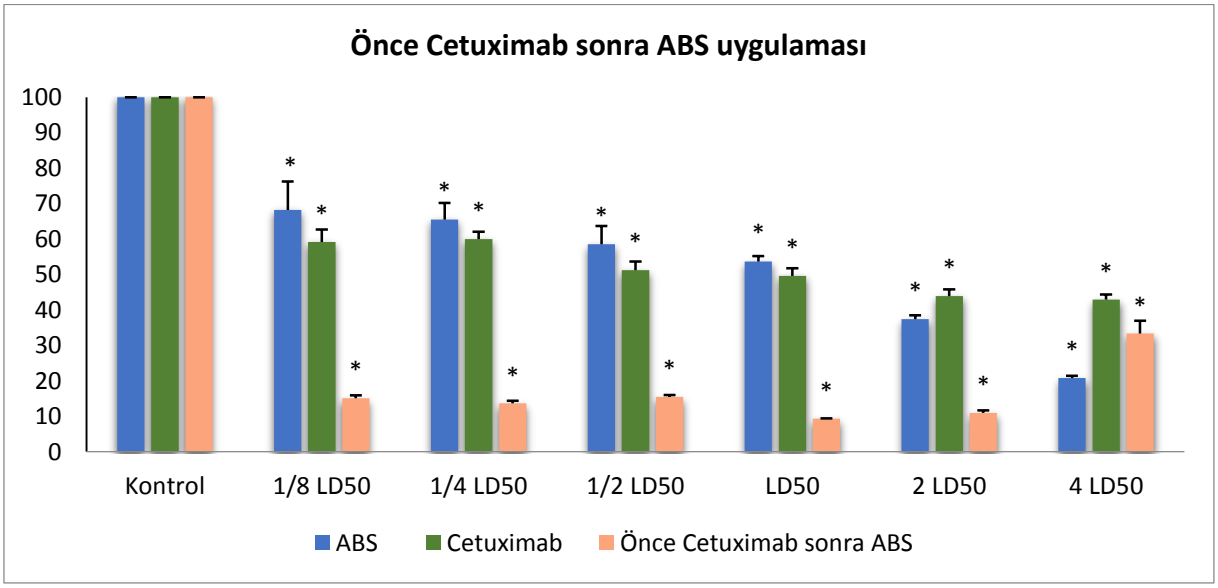
Şekil 25. HT-29 hücre hattında önce Oxaliplatin sonra ABS'nin uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *p<0.0001 kontrole göre)

Tablo 21. Önce Oxaliplatin ve sonra ABS uygulamasının CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI	Yorum
1/8 LD_{50}: ABS (3.38 µl) + Oxaliplatin (0.125 µg/ml)	0.011	Çok kuvvetli sinerjizm
1/4 LD_{50}: ABS (6.75 µl) + Oxaliplatin (0.25 µg/ml)	0.006	Çok kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (13.5 µl) + Oxaliplatin (0.5 µg/ml)	0.015	Çok kuvvetli sinerjizm
LD_{50}: ABS (27 µl) + Oxaliplatin (1µg/ml)	0.039	Çok kuvvetli sinerjizm
2 LD_{50}: ABS (54 µl) + Oxaliplatin (2µg/ml)	0.230	Kuvvetli sinerjizm
4 LD_{50}: ABS (108 µl) + Oxaliplatin (4µg/ml)	0.846	Hafif sinerjistik etki

Önce Cetuximab sonra ABS uygulaması: Daha önceki çalışmalarda LD_{50} değerleri belirlenen Cetuximab ve ABS'nin, bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi. HT-29 hücre serisine aynı anda uygulanan ABS ve Cetuximab kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü ($p<0.0001$).

Şekil 26 incelendiğinde; 1/8 LD_{50}'ye denk gelen 3.38 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %68 ve 0.07 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %59 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %9 olarak saptandı. 1/4 LD_{50}'ye denk gelen 6.75 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %65 ve 0.14 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %59 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %11.7 olarak saptandı. 1/2 LD_{50}'ye denk gelen 13.5 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %58 ve 0.29 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %51 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %11 olarak saptandı. LD_{50}'ye denk gelen 27 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %53 ve 0.59 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %49 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %10.5 olarak saptandı. 2 LD_{50}'ye denk gelen 54 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %37 ve 1.18 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %43 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %10.8 olarak saptandı. 4 LD_{50}'ye denk gelen 108 µl ABS'nin hücre canlılık oranı %20 ve 2.36 µg/ml konsantrasyonda Cetuximab'ın hücre canlılık oranı %42 olurken, bu dozların kombinasyonu sonucu canlılık oranı %11 olarak saptandı.



Şekil 26. HT-29 hücre hattında önce Cetuximab sonra ABS uygulamasının hücre canlılığına etkisi (± standart hata *$p<0.0001$ kontrole göre)

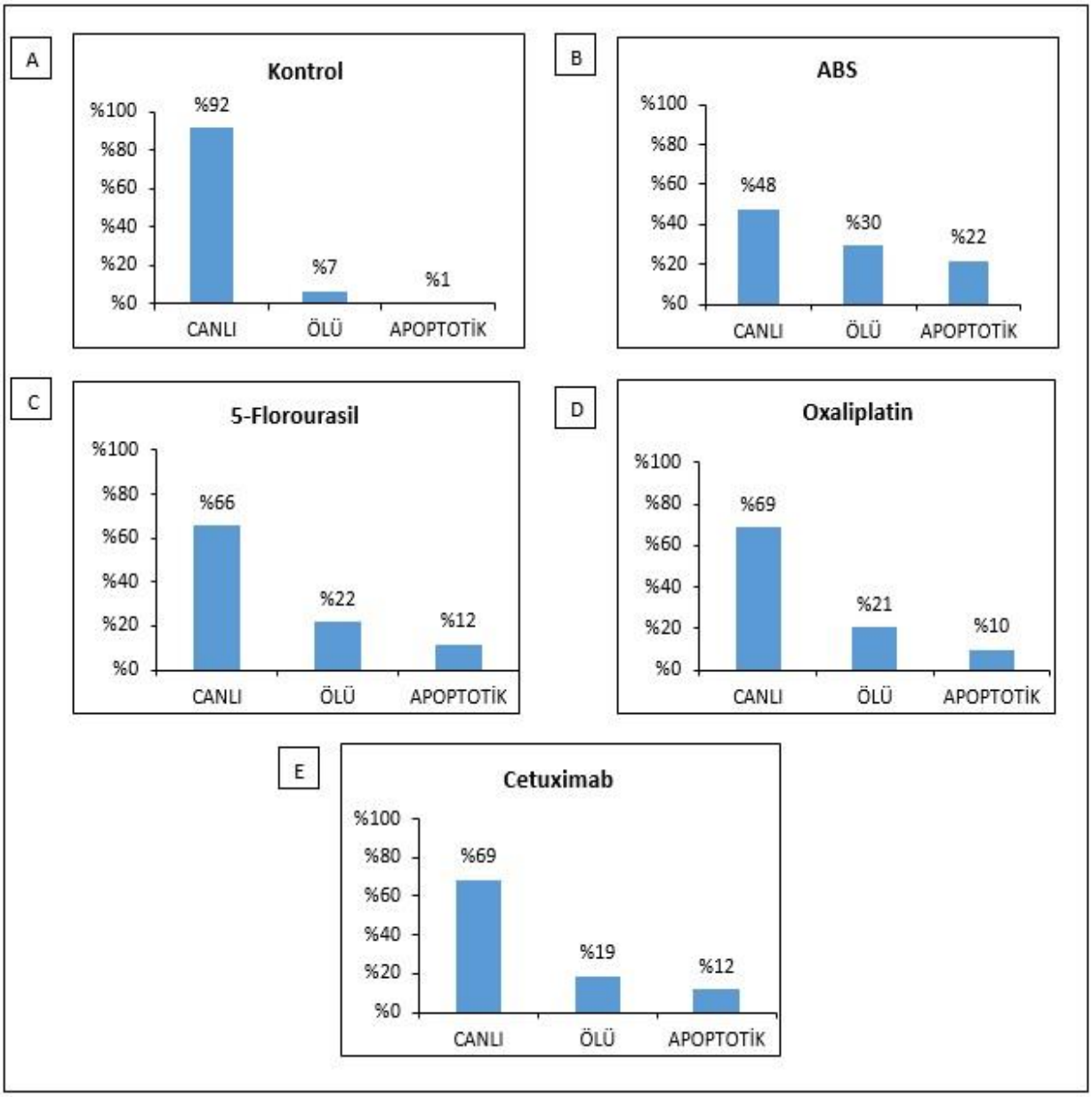
Değişik oranlarda kombinasyonların HT-29 hücre hattında 72 saat muamele edilmesi sonucu saptanan sitotoksisite yüzdeleri, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı (Tablo 22).

Tablo 22. Önce Cetuximab ve sonra ABS uygulamasının CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI	Yorum
1/8 LD_{50}: ABS (3.38 µl) + Cetuximab (0.07 µg/ml)	0.019	Çok kuvvetli sinerjizm
1/4 LD_{50}: ABS (6.75 µl) + Cetuximab (0.14 µg/ml)	0.014	Çok kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (13.5 µl) + Cetuximab (0.29 µg/ml)	0.038	Çok kuvvetli sinerjizm
LD_{50}: ABS (27 µl) + Cetuximab (0.59 µg/ml)	0.029	Çok kuvvetli sinerjizm
2 LD_{50}: ABS (54 µl) + Cetuximab (1.18 µg/ml)	0.077	Çok kuvvetli sinerjizm
4 LD_{50}: ABS (108 µl) + Cetuximab (2.36 µg/ml)	1.922	Antagonizm

HT-29 Hücre Hattında Tek Olarak Uygulanan ABS, 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab'ın Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HT-29 hücrelerinde kontrol ve madde uygulaması yapılan gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, PI floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları Şekil 27 ve Şekil 28'da verilmiştir.



Şekil 27. HT-29 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi A:Kontrol, B:ABS, C:5-Florourasil, D:Oxaliplatin, E:Cetuximab Uygulaması.

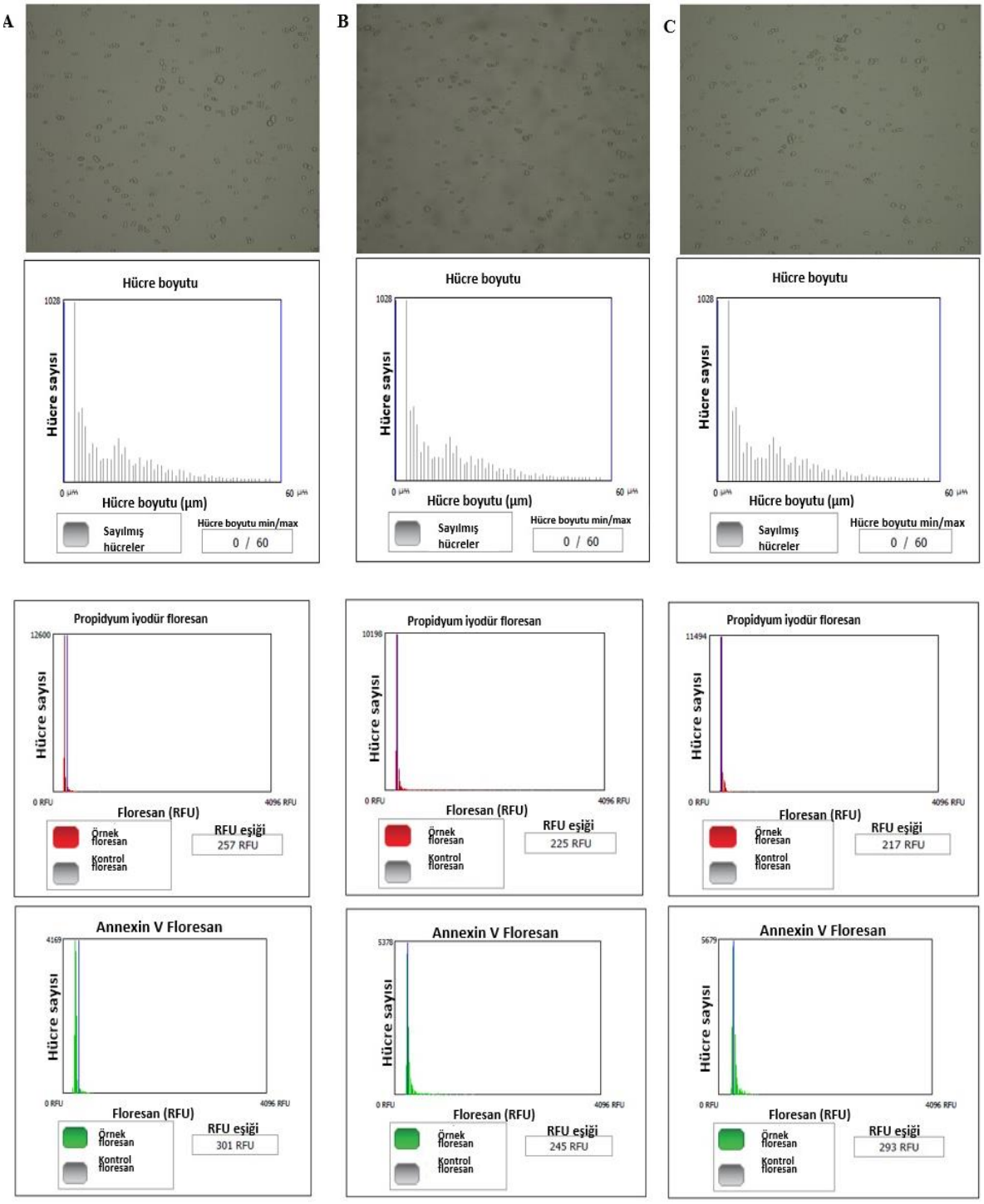
Şekil 27A'da görüldüğü gibi, kontrol grubunda %92 oranında canlı, %7 ölü ve %1apoptotik hücre olduğu saptanmıştır.

Şekil 27B'de görüldüğü gibi, kontrol grubunda %1 olan apoptotik hücre oranının ABS uygulaması ile %22'ye yükseldiği, ölü hücre oranının ise %30 oranında olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda %92 olan canlılık oranının ABS uygulaması ile %48'e düştüğü saptanmıştır.

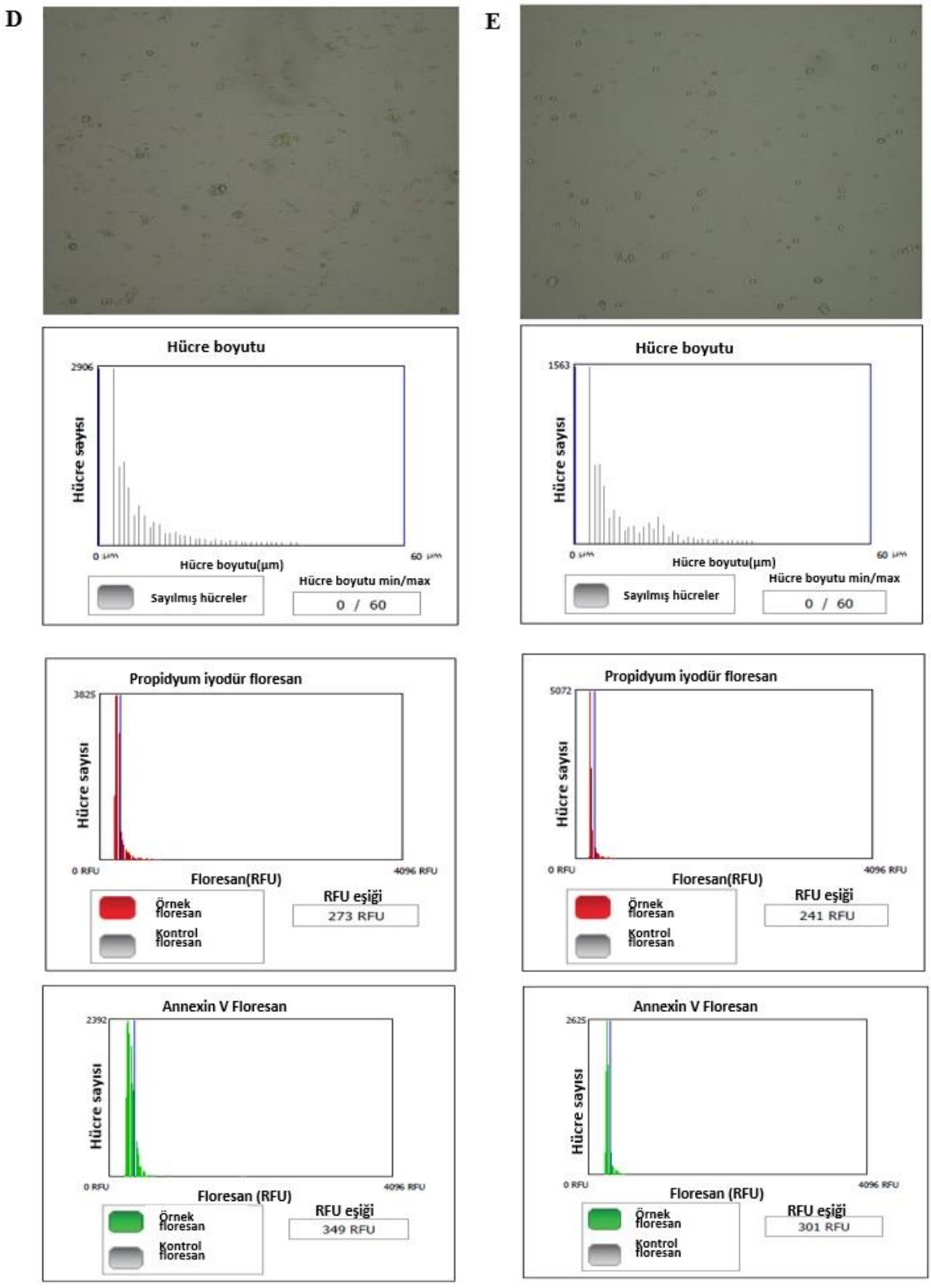
Şekil 27C'de görüldüğü gibi, kontrol grubunda %1 olan apoptotik hücre oranının 5-FU uygulaması ile %12'ye yükseldiği, ölü hücre oranının ise %22 oranında olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda %92 olan canlılık oranının, 5-FU uygulaması ile %66'ya düştüğü saptanmıştır.

Şekil 27D'de görüldüğü gibi, kontrol grubunda %1 olan apoptotik hücre oranının Oxaliplatin uygulaması ile %10'ye yükseldiği, ölü hücre oranının ise %21 oranında olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda %92 olan canlılık oranının, Oxaliplatin uygulaması ile %69'a düştüğü saptanmıştır.

Şekil 27E'de görüldüğü gibi, kontrol grubunda %1 olan apoptotik hücre oranının Cetuximab uygulaması ile %12'ye yükseldiği, ölü hücre oranının ise %19 oranında olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda %92 olan canlılık oranının, Oxaliplatin uygulaması ile %69'a düştüğü saptanmıştır.



Şekil 28. HT-29 Hücre Hattında, madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları. A:Kontrol, B: ABS, C: 5-Florourasil Uygulaması

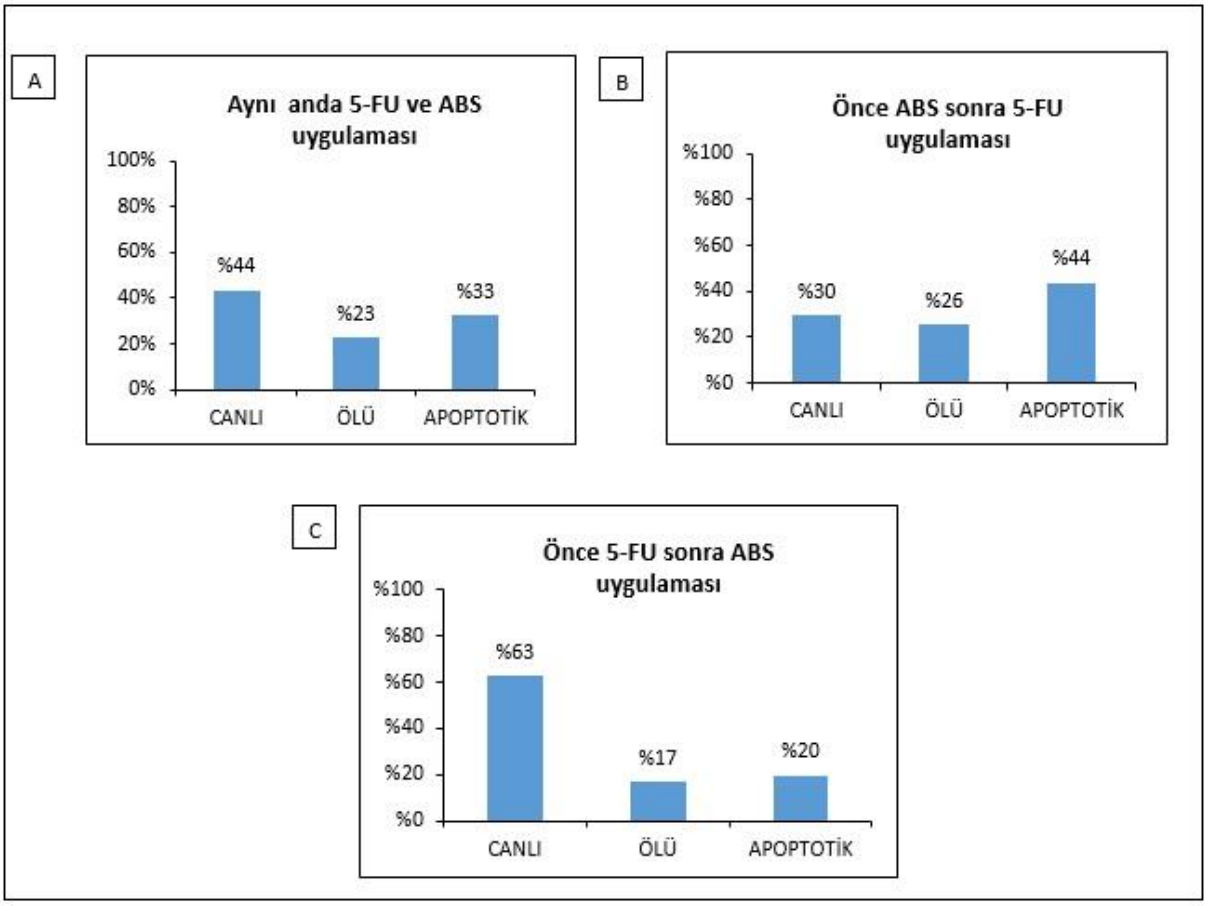


Şekil 28. (Devamı) HT-29 Hücre Hattında, madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları. C:Oxaliplatin, D: Cetuximab Uygulaması

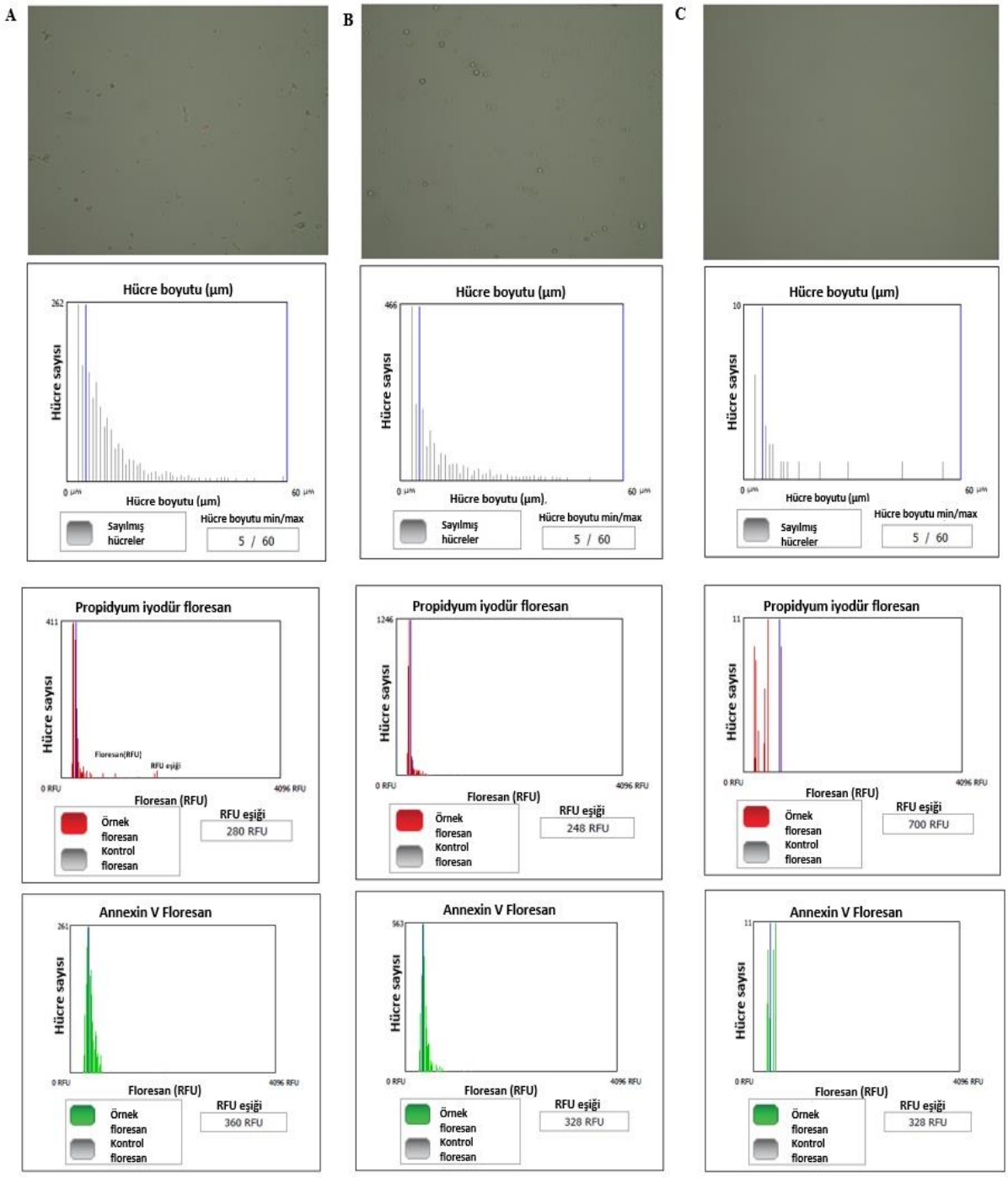
HT-29 Hücre Hattında ABS ile 5-Florourasil Kombinasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HT-29 hücrelerinde ABS'nin 5-FU ile aynı anda, önce ve sonra kombine uygulamasının yapıldığı gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, PI floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları Şekil 29 ve Şekil 30'da verilmiştir.

HT-29 hücrelerinde aynı anda ABS ve 5-FU uygulaması yapılan hücrelerde; canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı sırası ile %44, %23,%33 olarak belirlenmiştir (Şekil 29A). Önce ABS sonra 5-FU uygulaması yapılan hücrelerde canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı sırası ile %30, %26, %44 olarak belirlenmiştir(Şekil 29B). Önce 5-FU sonra ABS uygulaması yapılan hücrelerde canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı sırası ile %63, %17, %20 olarak belirlenmiştir(Şekil 29C). ABS'nin 5-FU ile kombine tedavisinde, kontrol grubunda %92 olan canlılık oranının %30'a düştüğü ve yine kontrol grubunda %1 olan apoptotik hücre oranının %44'e çıktığı, önce ABS sonra 5-FU kombinasyonunun daha etkin sonuç verdiği saptanmıştır.



Şekil 29. HT-29 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi A: Aynı anda 5-FU ve ABS, B:Önce ABS sonra 5-FU, C:Önce 5-FU sonra ABS

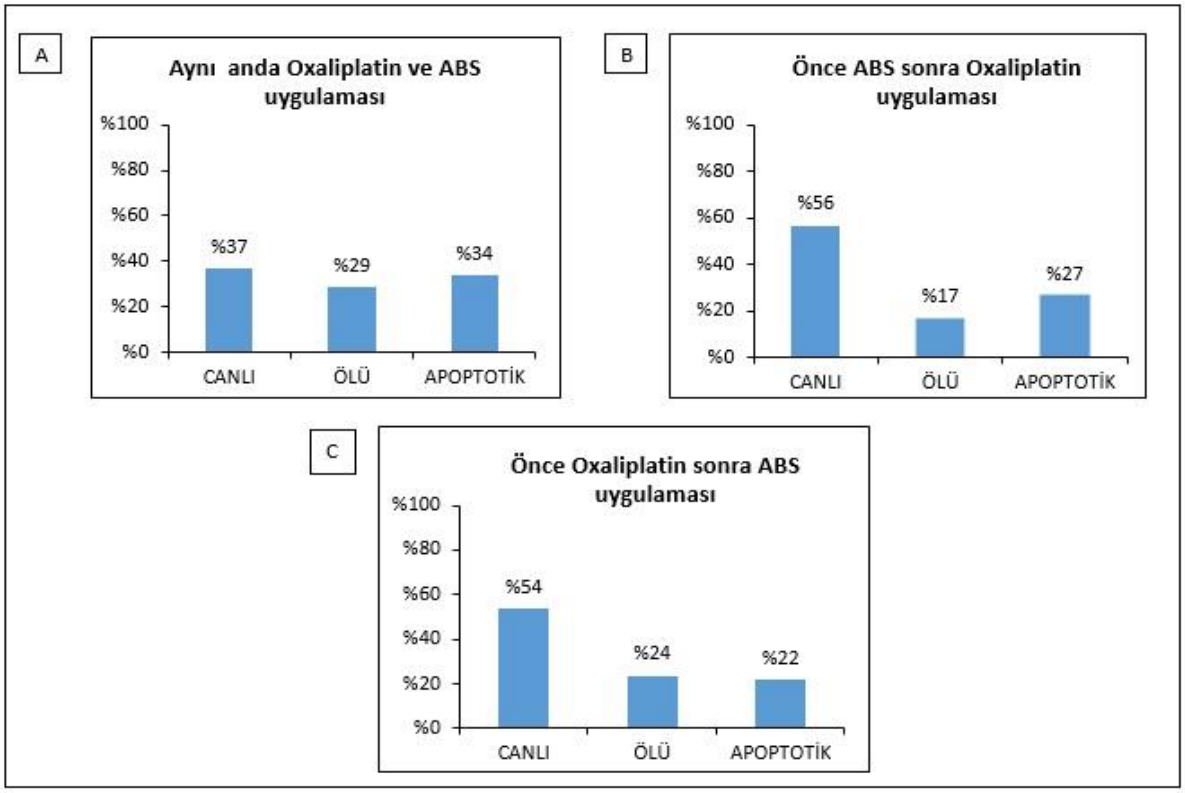


Şekil 30. HT-29 Hücre Hattında, madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları. A: Aynı anda 5-FU ve ABS, B: Önce ABS sonra 5-FU, C:Önce 5-FU sonra ABS

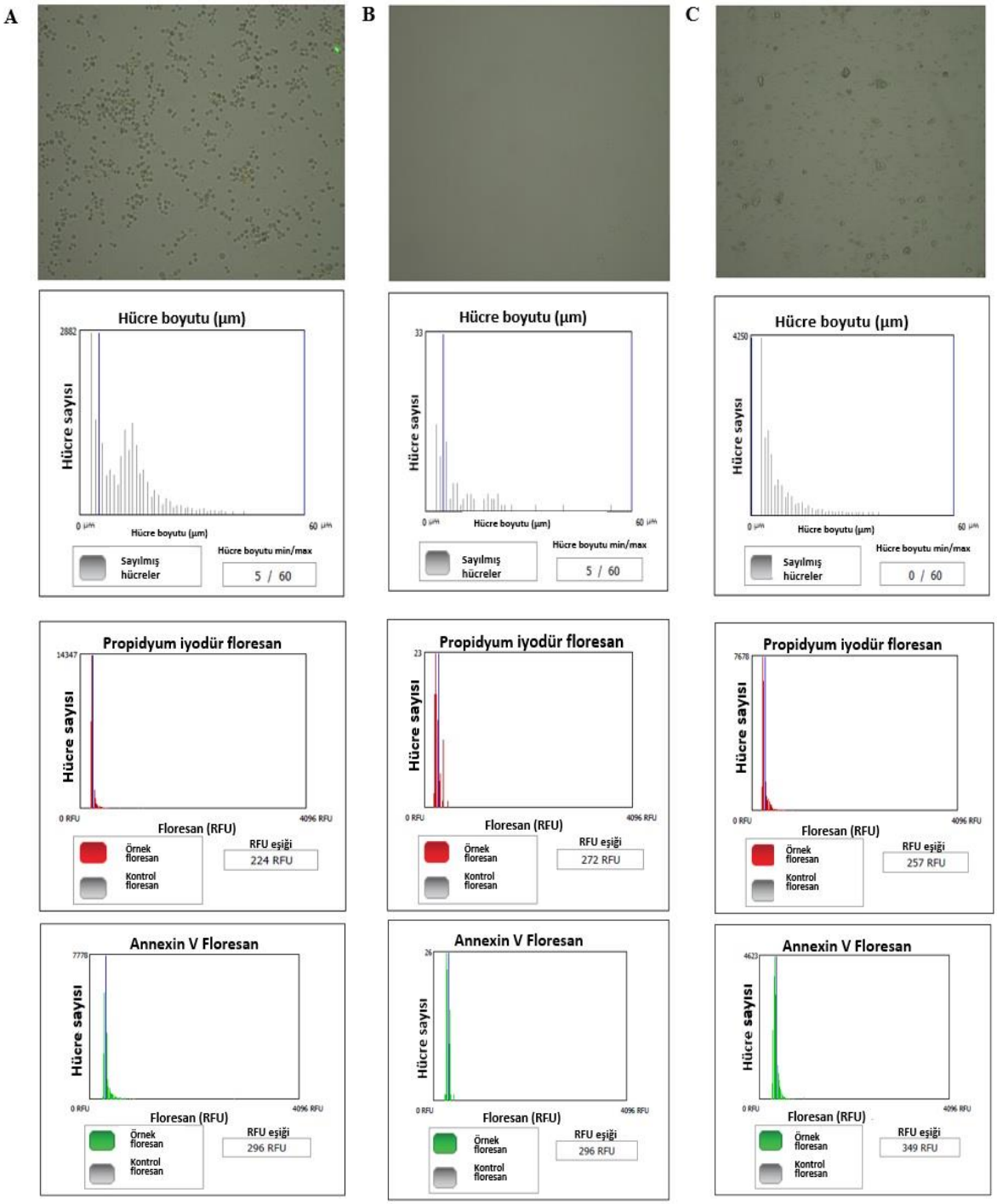
HT-29 Hücre Hattında ABS ile Oxaliplatin Kombinasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HT-29 hücrelerinde ABS'nin Oxaliplatin ile aynı anda, önce ve sonra kombine uygulamasının yapıldığı gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, PI floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları Şekil 31 ve Şekil 32'de verilmiştir.

HT-29 hücrelerinde aynı anda ABS ve Oxaliplatin uygulaması yapılan hücrelerde; canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı sırası ile %37, %29, %34 olarak belirlenmiştir (Şekil 31A). Önce ABS sonra Oxaliplatin uygulaması yapılan hücrelerde canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı sırası ile %57, %17, %27 olarak belirlenmiştir(Şekil 31B). Önce Oxaliplatin sonra ABS uygulaması yapılan hücrelerde; canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı sırası ile %54, %24, %22 olarak belirlenmiştir (Şekil 31C). ABS'nin Oxaliplatin ile kombine tedavisinde kontrol grubunda %92 olan canlılık oranının %37'a düştüğü ve yine kontrol grubunda %1 olan apoptotik hücre oranının %34'e çıktığı, aynı anda ABS ve Oxaliplatin kombine uygulamasının daha etkin sonuç verdiği saptanmıştır.



Şekil 31. HT-29 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Aynı anda Oxaliplatin ve ABS, B: Önce ABS sonra Oxaliplatin, C:Önce Oxaliplatin sonra ABS

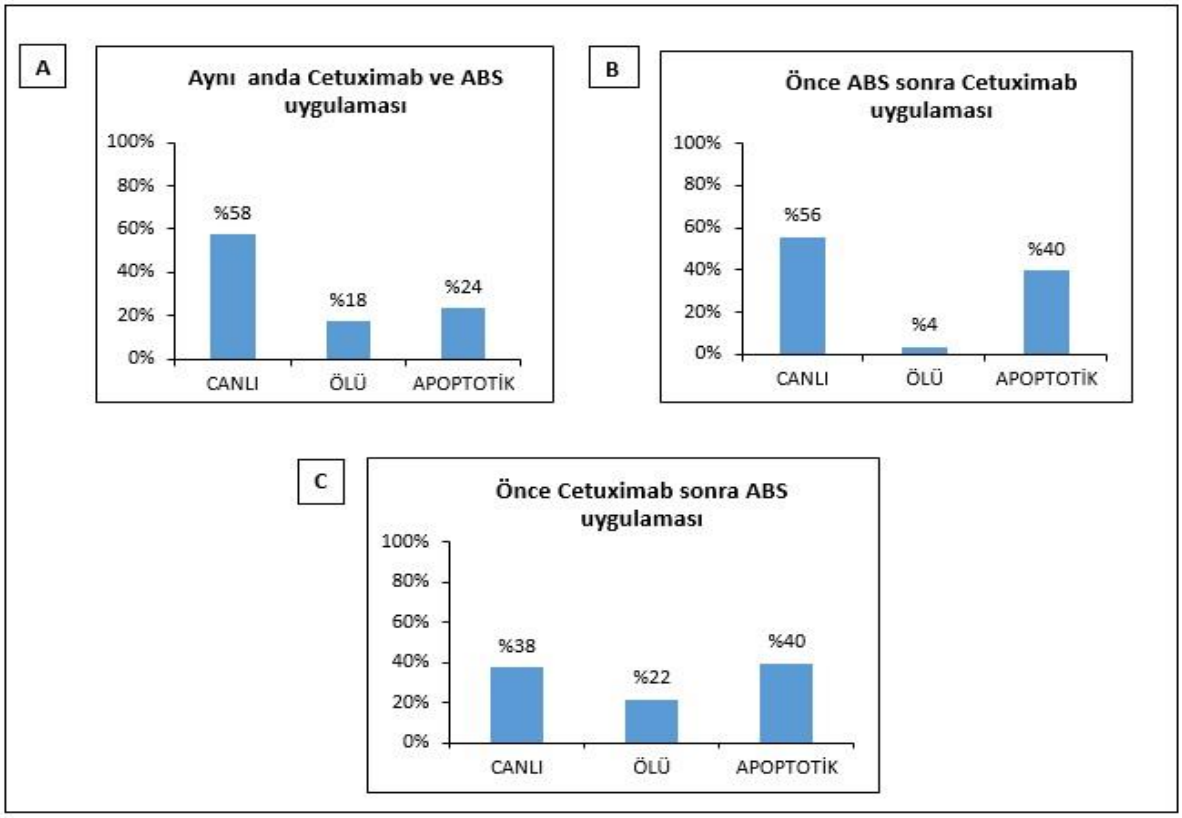


Şekil 32. HT-29 Hücre Hattında, madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları A: Aynı anda Oxaliplatin ve ABS, B: Önce ABS sonra Oxaliplatin C:Önce Oxaliplatin sonra ABS

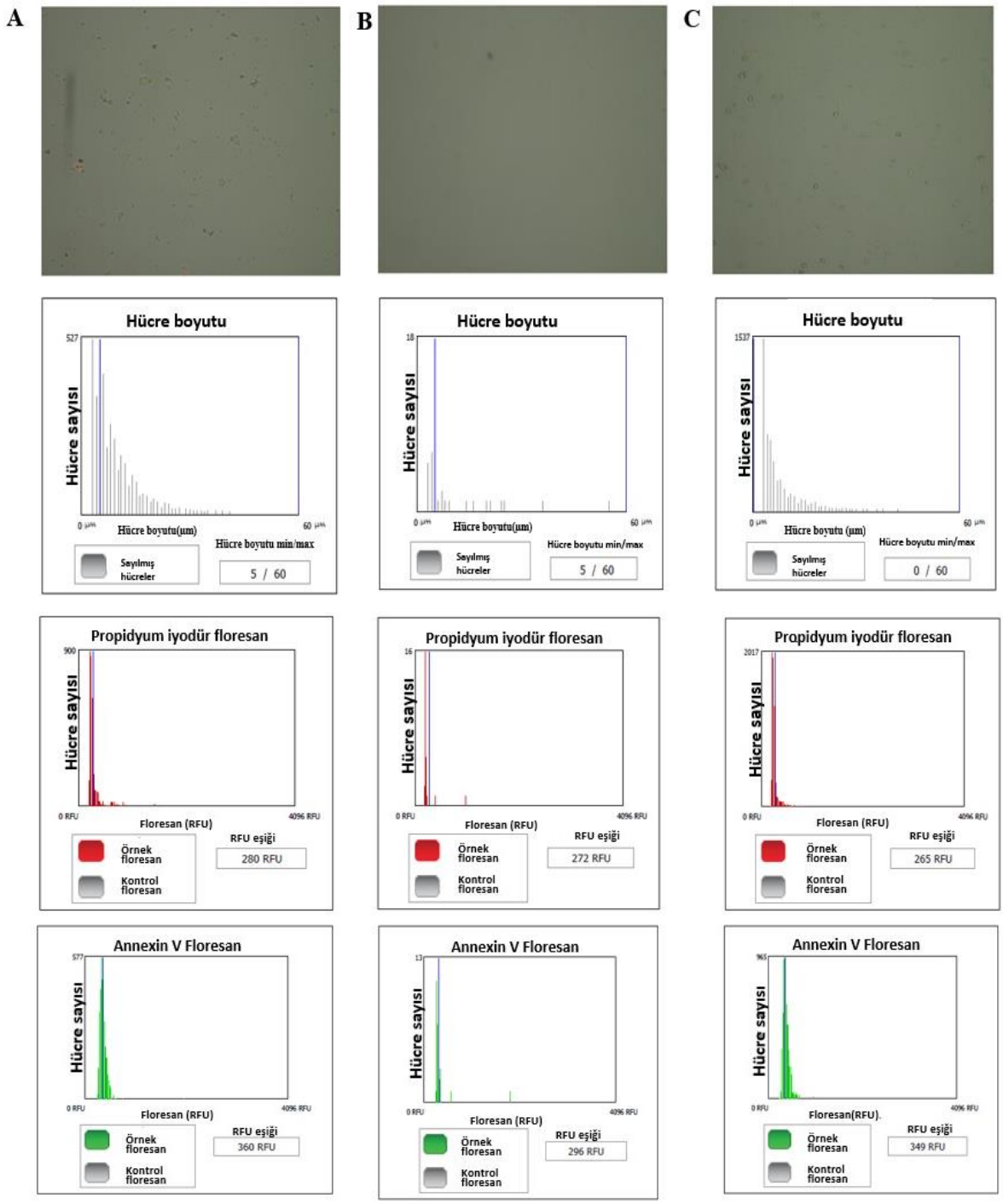
HT-29 Hücre Hattında ABS ile Cetuximab Kombinasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HT-29 hücrelerinde ABS'nin Cetuximab ile aynı anda, önce ve sonra kombine uygulamasının yapıldığı gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, PI floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları Şekil 33 ve Şekil 34'de verilmiştir.

HT-29 hücrelerinde aynı anda ABS ve Cetuximab uygulaması yapılan hücrelerde; canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı sırası ile %58, %18, %24 olarak belirlenmiştir (Şekil 33A). Önce ABS sonra Cetuximab uygulaması yapılan hücrelerde; canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı sırası ile %56, %4, %40 olarak belirlenmiştir (Şekil 33B). Önce Cetuximab sonra ABS uygulaması yapılan hücrelerde; canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı sırası ile %38, %22, %40 olarak belirlenmiştir (Şekil 33C). ABS'nin Cetuximab ile kombine tedavisinde kontrol grubunda %92 olan canlılık oranının %38'e düştüğü ve yine kontrol grubunda %1 olan apoptotik hücre oranının %40'a çıktığı, önce Cetuximab sonra ABS kombine uygulamasının daha etkin sonuç verdiği saptanmıştır.



Şekil 33. HT-29 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Aynı anda Cetuximab ve ABS, B: Önce ABS sonra Cetuximab, C:Önce Cetuximab sonra ABS



Şekil 34. HT-29 Hücre Hattında, madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları. A: Aynı anda Cetuximab ve ABS, B: Önce ABS sonra Cetuximab, C:Önce Cetuximab sonra ABS

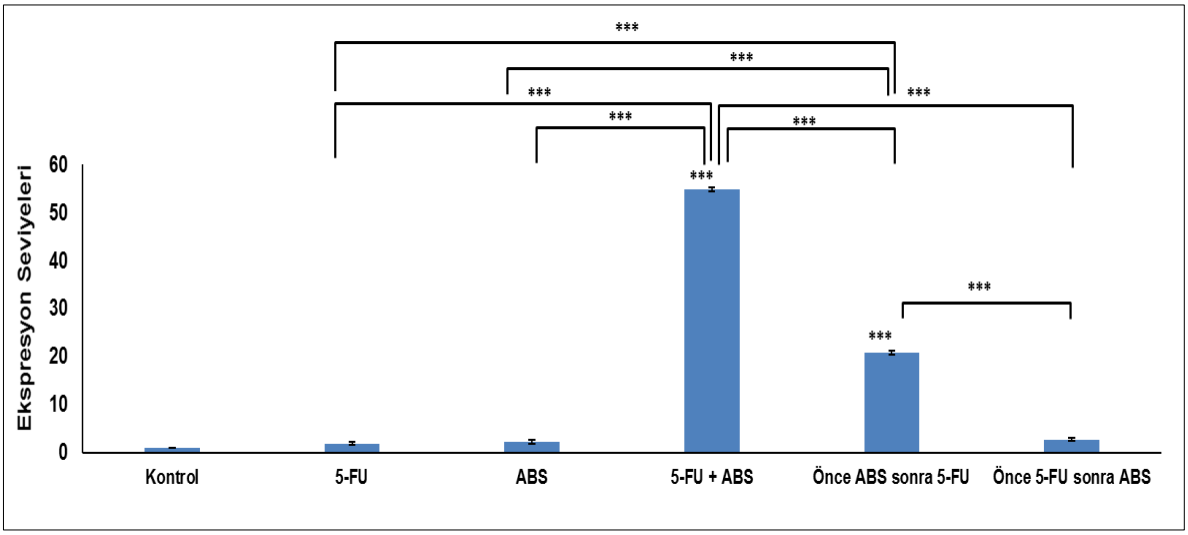
HT-29 Hücre Hattında Tek ve Kombine Halde Kullanılan ABS, 5-Florourasil, Oxaliplatin ve Cetuximab'ın Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

Çalışmada, HT-29 hücre hattından materyal ve metod kısmında anlatıldığı şekilde izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar kullanılarak, gen ifadelerinde meydana gelen değişimler RT-PCR metodu ile saptanmıştır. HT-29 kolon kanseri hücrelerinde uygulamaların yapıldığı grupların kontrol grubuna göre belirlenen genlerin ifadelerinde meydana gelen değişiklikler, 4 tekrar olmak üzere çalışmaya alınmış ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

HT-29 hücre hattında tek ve kombine halde kullanılan 5-FU ve ABS'nin gen ekspresyonları üzerine etkisi

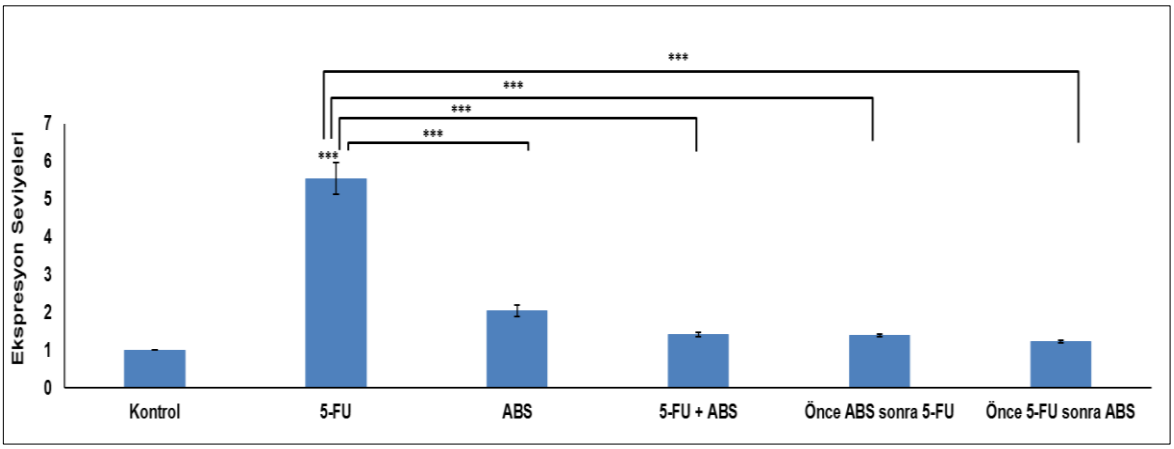
HT-29 hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı RT-PCR analizi sonuçlarına göre; tek başına ve kombine halde uygulanan ABS ve 5-Florourasil'in apoptotik yolağının en önemli elemanlarından olan p53, bcl-2, bax, sitokrom c, apaf-1 ve kaspaz-3 gen ifadelerinde meydana getirdiği değişimler aşağıda gösterilmektedir.

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında p53 gen ifadesinin ilaçların kombine uygulamalarında genellikle artış gösterdiği ve en belirgin artışın aynı anda 5-FU ve ABS uygulamasında kontrole göre 54.89±0.41 kat olduğu, bunu kontrole göre 20.77±0.36 kat artış ile önce ABS sonra 5-FU uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 35). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).



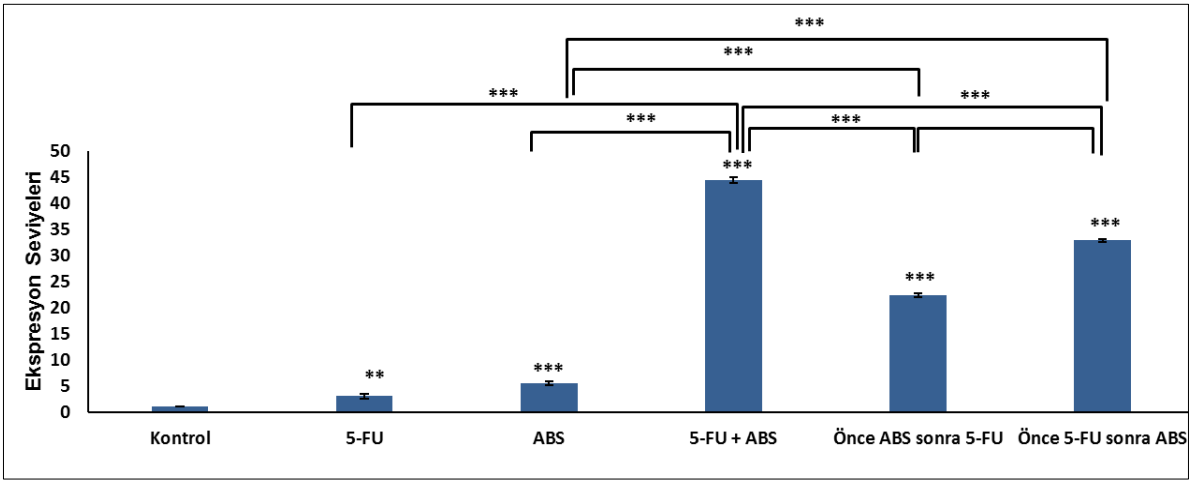
Şekil 35. HT-29 hücre serisine 5-FU, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda p53 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0.001

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında Bcl-2 gen ifadesinin, sadece 5-FU uygulamasında (kontrole göre 5.55±0.41 kat) istatistiksel olarak önemli artışa sebep olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 36). Uygulama grupları arasında (5-FU hariç) ise, istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).



Şekil 36. HT-29 hücre serisine 5-FU, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda Bcl-2 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0.001

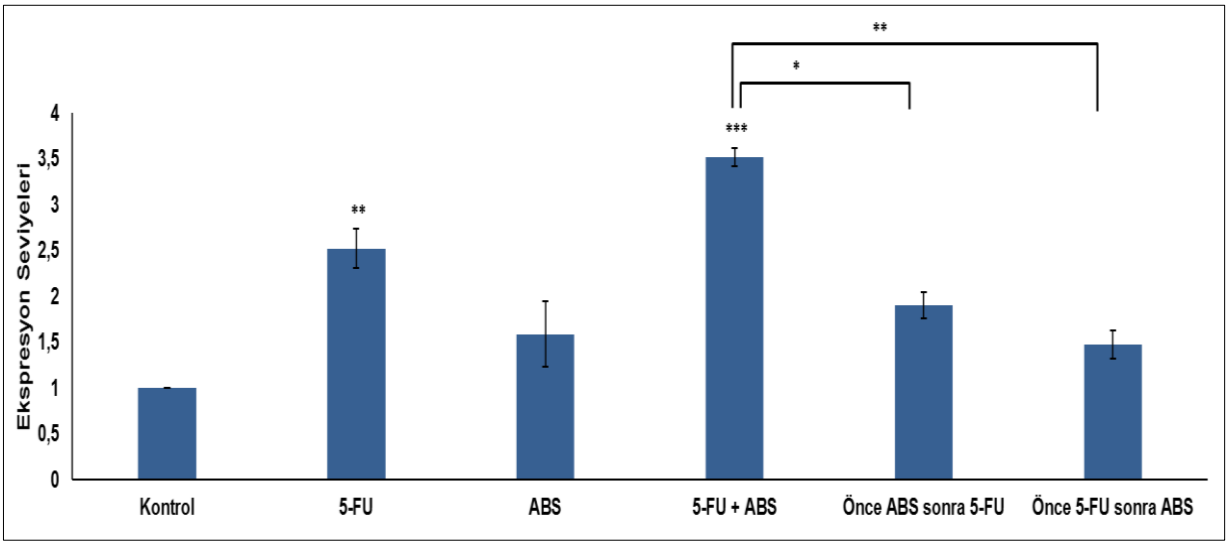
Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında bax gen ifadesinde, 5-FU ve ABS'nin tek başına uygulamalarında sırası ile kontrole göre 3.01±0.51 ve 5.46±0.38 kat artış saptanmıştır. Bax gen ifadesinin, ABS'nin 5-FU ile kombine olarak uygulanmasında genellikle artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 37).



Şekil 37. HT-29 hücre serisine 5-FU, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda bax gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata **p<0.01 ***p<0.001

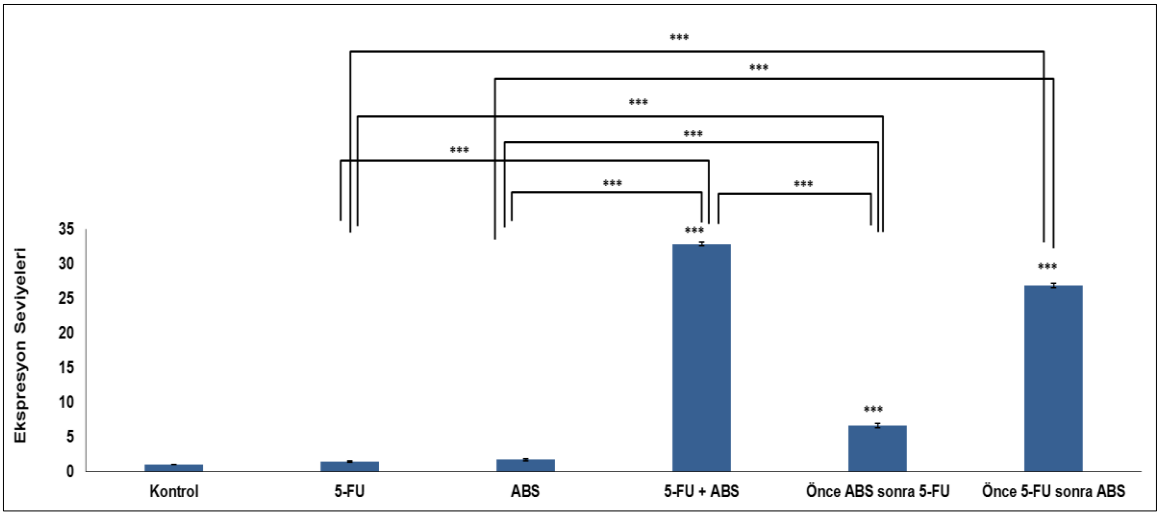
Kombine uygulamalarda bax gen ifadesinde en belirgin artışın, aynı anda 5-FU ve ABS uygulamasında kontrole göre 44.5±0.54 kat olduğu, bunu kontrole göre 32.90±0.32 kat artış ile önce 5-FU sonra ABS uygulamasının izlediği ve ardından kontrole göre 22.42±0.37 kat artış ile önce ABS sonra 5-FU uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 37).

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında 5-FU'nun tek başına uygulamasında, sitokrom c gen ifadesinde, kontrole göre 2.52±0.21 kat artış saptanmıştır. Kombine uygulamalarda en belirgin artışın, aynı anda 5-FU ve ABS uygulamasında kontrole göre 3.52±0.10 kat olduğu saptanmıştır ($p<0.001$) (Şekil 38). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı gözlenmiştir. ($p>0.05$).



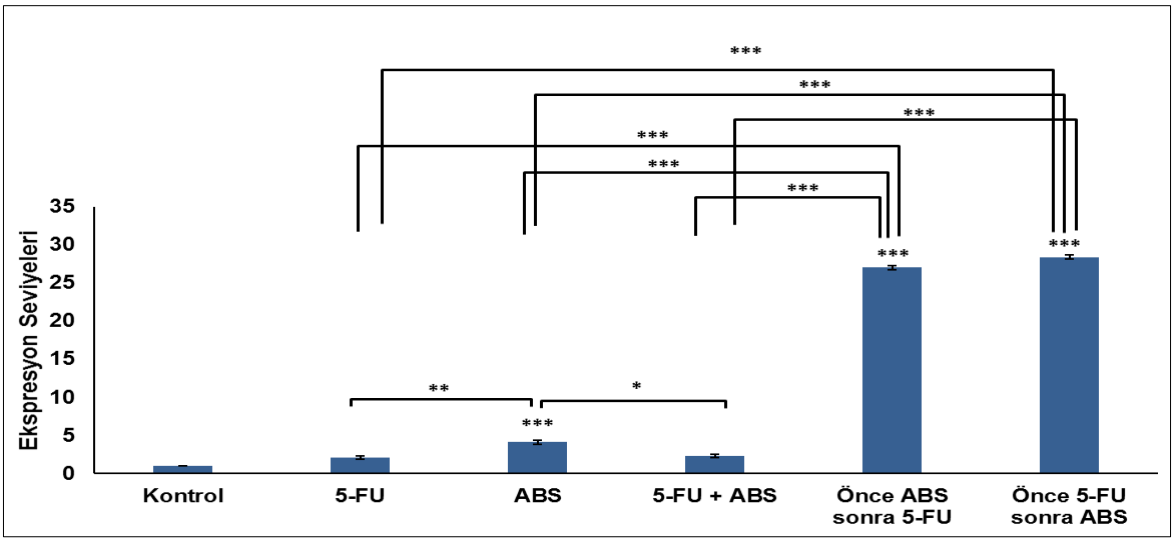
Şekil 38. HT-29 hücre serisine 5-FU, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda sitokrom c gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata
***p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001**

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında apaf-1 gen ifadesinin ilaçların kombine uygulamalarında genellikle artış gösterdiği ve en belirgin artışın aynı anda 5-FU ve ABS uygulamasında kontrole göre 32.8±0.26 kat olduğu, bunu kontrole göre 26.81±0.28 kat artış ile önce 5-FU sonra ABS uygulamasının ve kontrole göre 6.59±0.35 kat artış ile önce ABS sonra 5-FU uygulamasının takip ettiği saptanmıştır ($p<0.001$) (Şekil 39). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).



Şekil 39. HT-29 hücre serisine 5-Florourasil, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda apaf-1 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0.001

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında kaspaz-3 gen ifadesinde, ABS'nin tek başına uygulamasında kontrole göre 4.10±0.27 kat artış saptanmıştır ($p<0.001$) (Şekil 40). Kombine uygulamalarda en belirgin artışın önce 5-FU sonra ABS uygulamasında kontrole göre 28.4±0.27 kat olduğu, bunu kontrole göre 26.99±0.30 kat artış ile önce ABS sonra 5-FU uygulamasının takip ettiği saptanmıştır. Diğer gruplarda ise, kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 40).

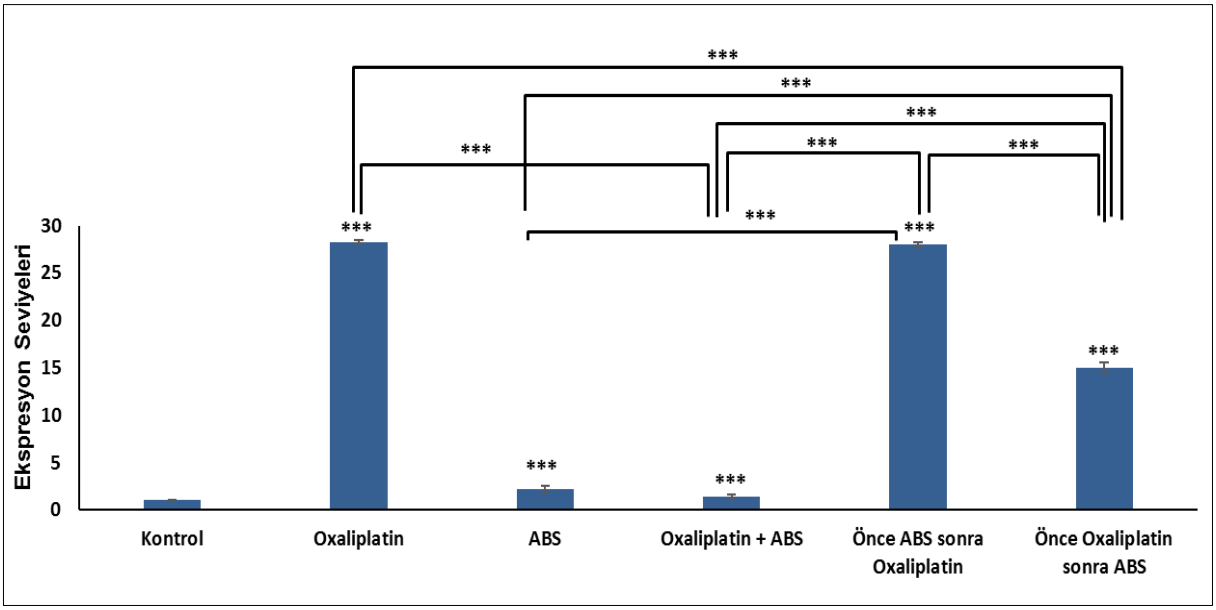


Şekil 40. HT-29 hücre serisine 5-Florourasil, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda kaspaz-3 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

HT-29 Hücre Hattında Tek ve Kombine Halde Kullanılan Oxaliplatin ve ABS'nin Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

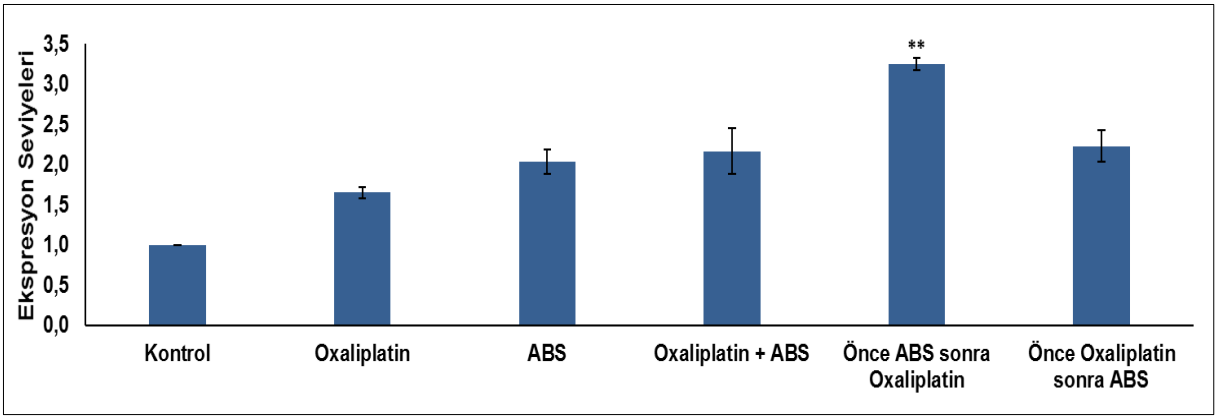
HT-29 hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı RT-PCR analizi sonuçlarına göre; tek başına ve kombine halde uygulanan ABS ve Oxaliplatin'in apoptotik yolağının en önemli elemanlarından olan p53, bcl-2, bax, sitokrom c, apaf-1 ve kaspaz-3 gen ifadelerinde meydana getirdiği değişimler aşağıda gösterilmektedir.

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında p53 gen ifadesinde Oxaliplatin ve ABS'nin tek başına uygulamalarında sırası ile kontrole göre 28.28±0.21 ve 2.18±0.38 kat artış saptanmıştır. Kombine uygulamalarda en belirgin artışın önce ABS sonra Oxaliplatin uygulamasında kontrole göre 27.97±0.21 kat olduğu, bunu kontrole göre 15.03±0.47 kat artış ile önce Oxaliplatin sonra ABS uygulamasının izlediği ve ardından kontrole göre 1.42±0.21 kat artış ile aynı anda Oxaliplatin ve ABS uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 41).



Şekil 41. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda p53 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0.001

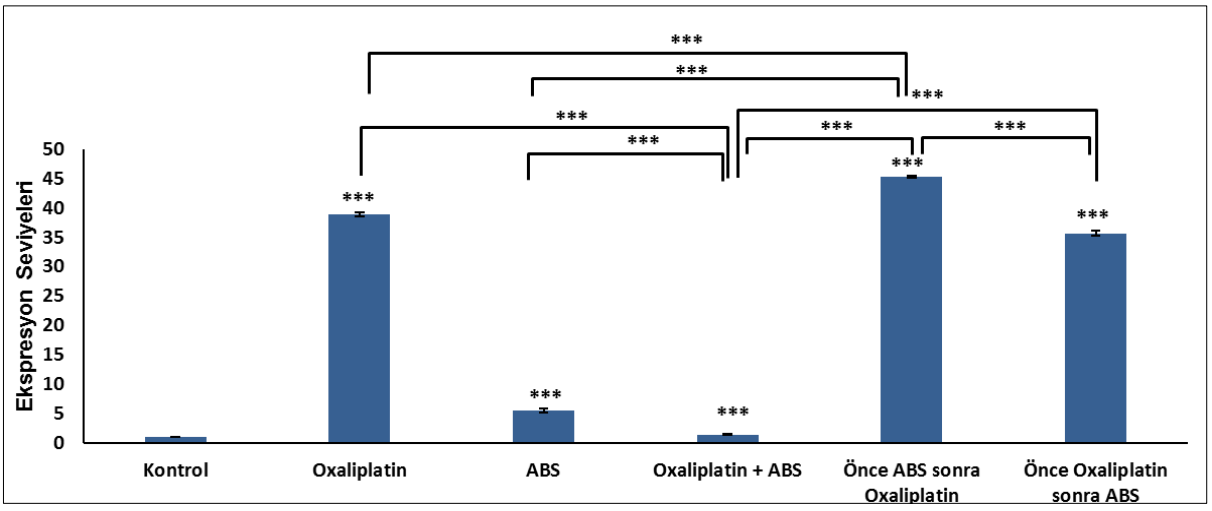
Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında bcl-2 gen ifadesinin sadece önce ABS sonra Oxaliplatin uygulamasında (kontrole göre 3.25±0.07 kat) istatistiksel olarak önemli artışa sebep olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). Uygulama grupları arasında ise istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$) (Şekil 42).



Şekil 42. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda Bcl-2 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ** p<0,01

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında bax gen ifadesinde, Oxaliplatin ve ABS'nin tek başına uygulamalarında sırası ile kontrole göre 38.91±0.40 ve 5.46±0.38 kat artış saptanmıştır.

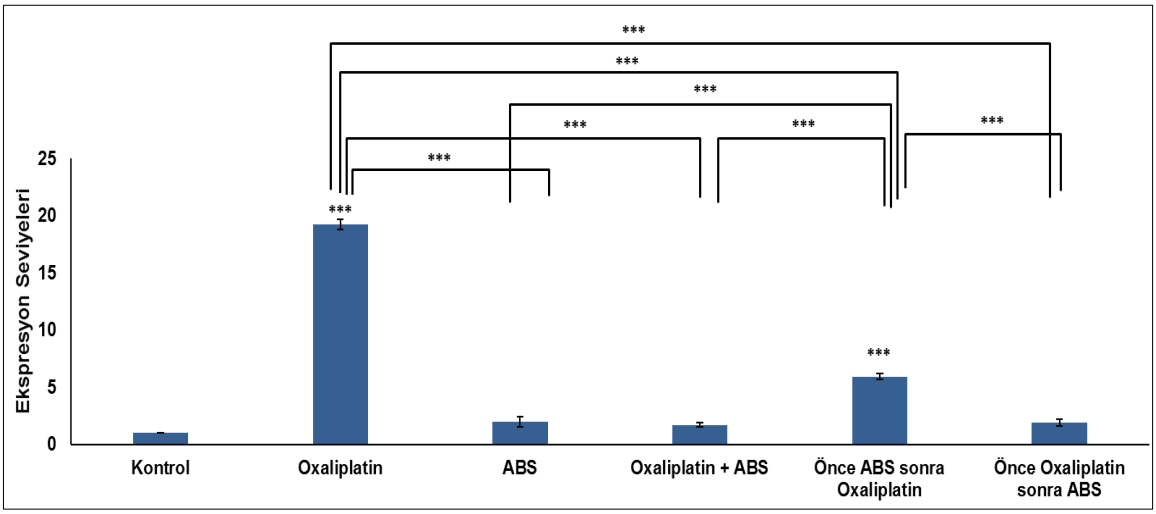
Kombine uygulamalarda bax gen ifadesindeki en belirgin artışın, önce ABS sonra Oxaliplatin uygulamasında kontrole göre 45.3±0.24 kat olduğu, bunu kontrole göre 35.64±0.48 kat artış ile önce Oxaliplatin sonra ABS uygulamasının izlediği ve ardından kontrole göre 1.37±0.13 kat artış ile aynı anda Oxaliplatin ve ABS uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 43).



Şekil 43. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda bax gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0.001

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında sitokrom c gen ifadesinde, Oxaliplatin'in tek başına uygulamasında kontrole göre 19.23±0.44 kat artış saptanmıştır.

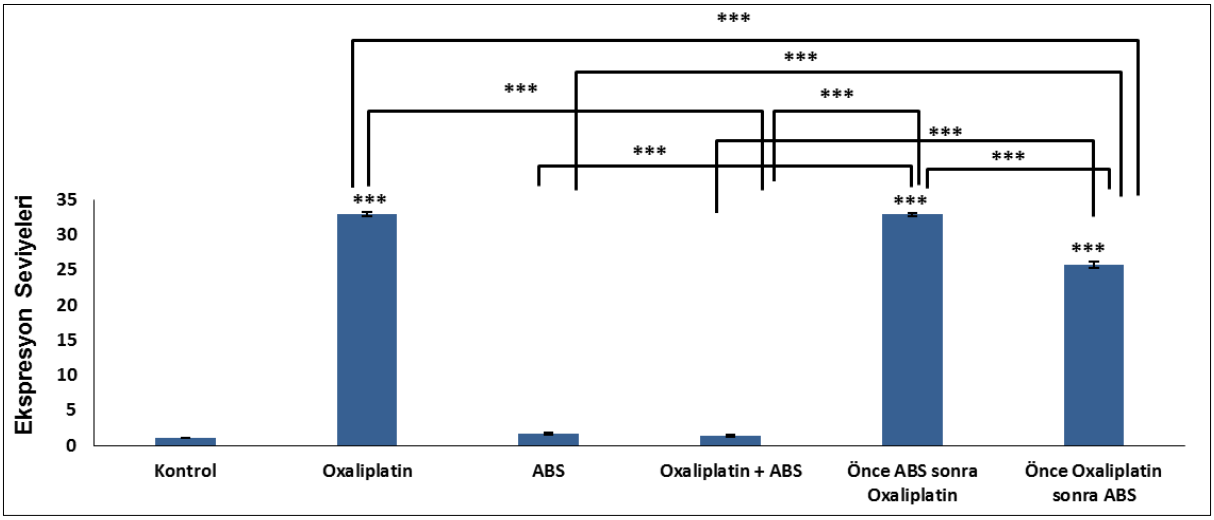
Kombine uygulamalarda en belirgin artışın, önce ABS sonra Oxaliplatin uygulamasında kontrole göre 5.95±0.27 kat olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı gözlenmiş ($p>0.05$), ancak uygulama gruplarının gen ifadelerinin birbiri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 44).



Şekil 44. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda sitokrom c gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0.001

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında apaf-1 gen ifadesinde, Oxaliplatin'in tek başına uygulamasında kontrole göre 32.97±0.33 kat artış saptanmıştır.

Kombine uygulamalarda en belirgin artışın, önce ABS sonra Oxaliplatin uygulamasında kontrole göre 32.9±0.29 kat olduğu, bunu kontrole göre 25.68±0.46 kat artış ile önce Oxaliplatin sonra ABS uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir ($p<0.001$). Diğer uygulama gruplarında ise kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı saptanmış ($p>0.05$), ancak grupların kendi aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 45).

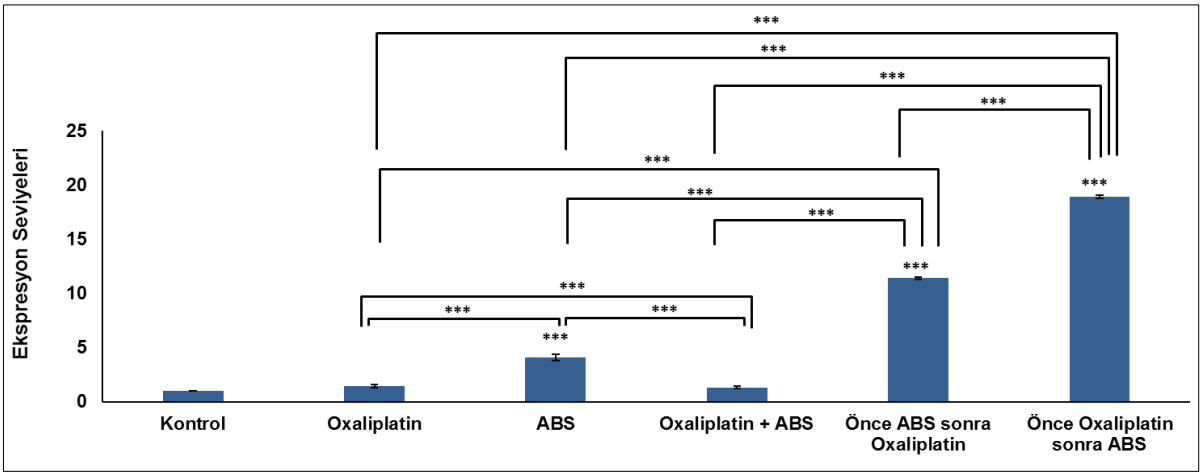


Şekil 45. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda apaf-1 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0.001

Analiz sonuçlarına göre HT-29 hücre hattında kaspaz-3 gen ifadesinde, ABS'nin tek başına uygulamasında kontrole göre 4.10±0.27 kat artış saptanmıştır.

Kombine uygulamalarda en belirgin artışın önce Oxaliplatin sonra ABS uygulamasında kontrole göre 18.9±0.15 kat olduğu, bunu kontrole göre 11.41±0.12 kat artış ile önce ABS sonra Oxaliplatin uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir ($p<0.001$)(Şekil 46).

Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$), ancak grupların kendi aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir($p<0.001$).

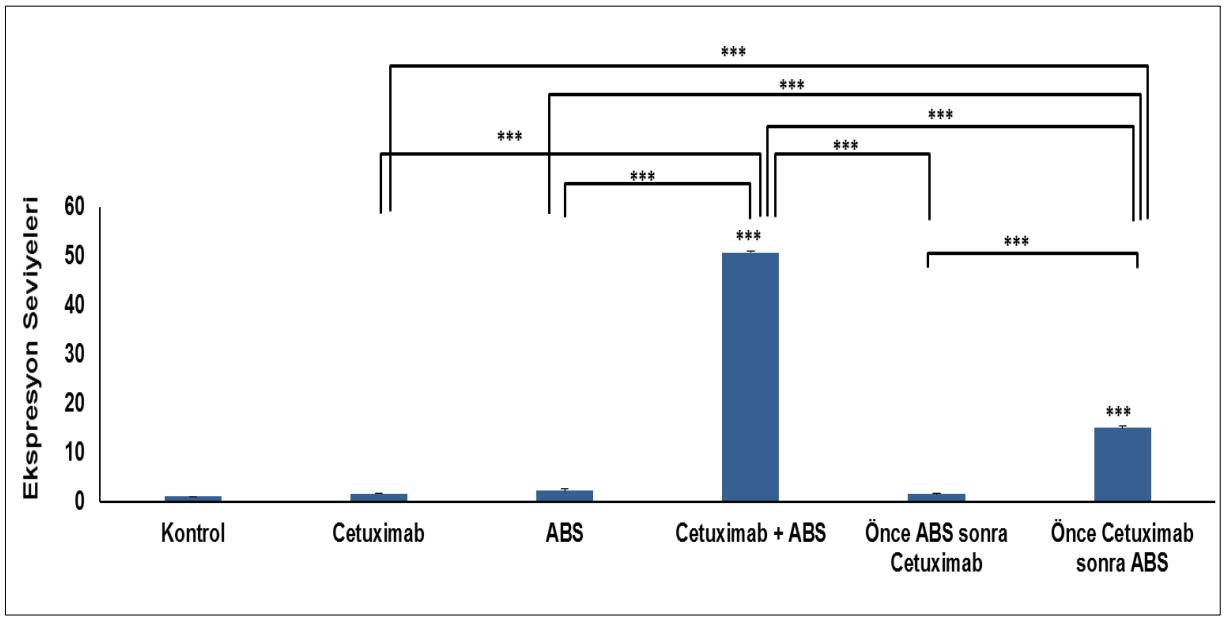


Şekil 46. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda kaspaz-3 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0,001

HT-29 Hücre Hattında Tek ve Kombine Halde Kullanılan Cetuximab ve ABS'nin Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

HT-29 hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı RT-PCR analizi sonuçlarına göre, tek başına ve kombine halde uygulanan ABS ve Cetuximab'ın apoptotik yolağının en önemli elemanlarından olan p53, bcl-2, bax, sitokrom c, apaf-1 ve kaspaz-3 gen ifadelerinde meydana getirdiği değişimler aşağıda gösterilmektedir.

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında p53 gen ifadesinde, en belirgin artışın aynı anda Cetuximab ve ABS uygulamasında kontrole göre 50.7 ±0.31 kat olduğu, bunu kontrole göre 15.01±0.29 kat artış ile önce Cetuximab sonra ABS uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir ($p<0.001$). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$) (Şekil 47).

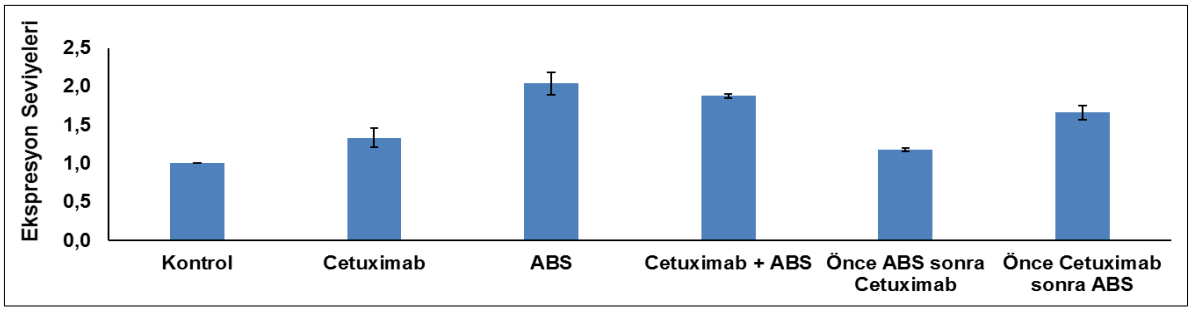


Şekil 47. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda p53 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0.001

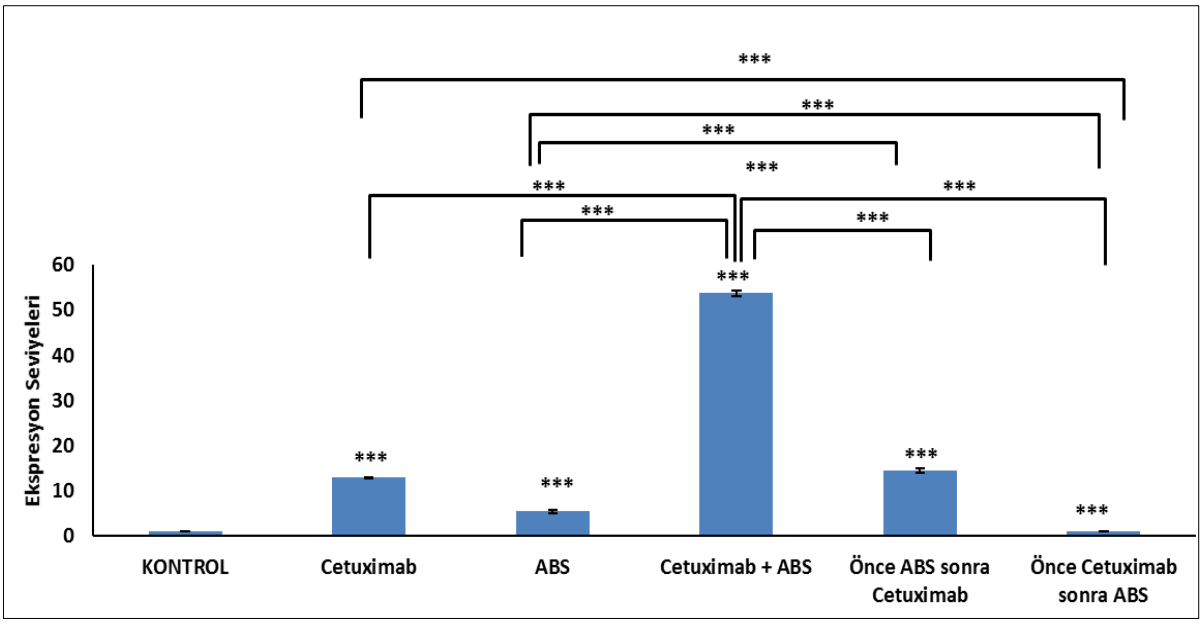
Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında bcl-2 gen ifadesinin, Cetuximab, ABS ve kombinasyonlarının uygulamasında, kontrole göre ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 48).

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında bax gen ifadesinde, Cetuximab ve ABS'nin tek başına uygulamalarında sırası ile kontrole göre 12.89±0.19 ve 5.46±0.38 kat artış saptanmıştır. Kombine uygulamalarda en belirgin artışın, aynı anda Cetuximab ve ABS uygulamasında kontrole göre 53.8±0.58 kat olduğu, bunu kontrole göre 14.57±0.54 kat artış ile

önce ABS sonra Cetuximab uygulamasının izlediği ve ardından kontrole göre 1.15±0.01 kat artış ile önce Cetuximab sonra ABS uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir ($p<0.001$)(Şekil 49).



Şekil 48. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda Bcl-2 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata.

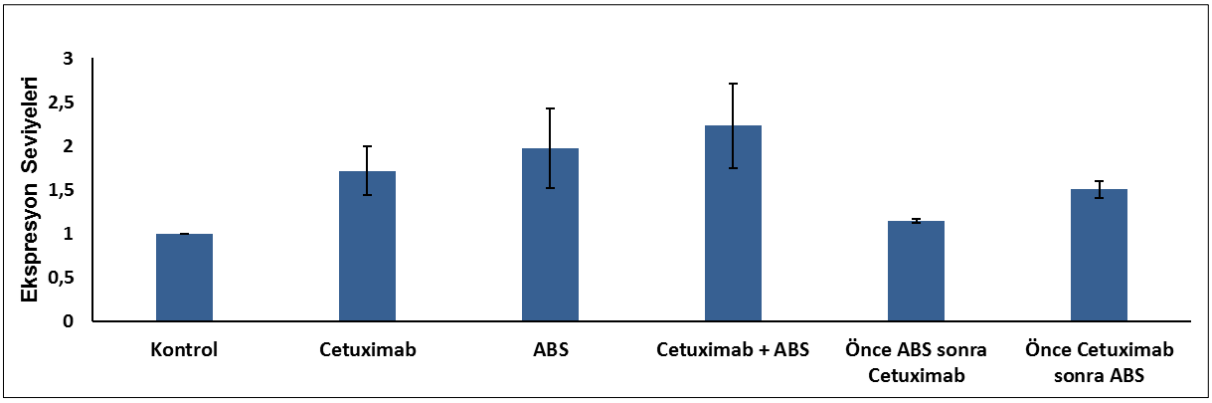


Şekil 49. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda bax gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata ***p<0.001

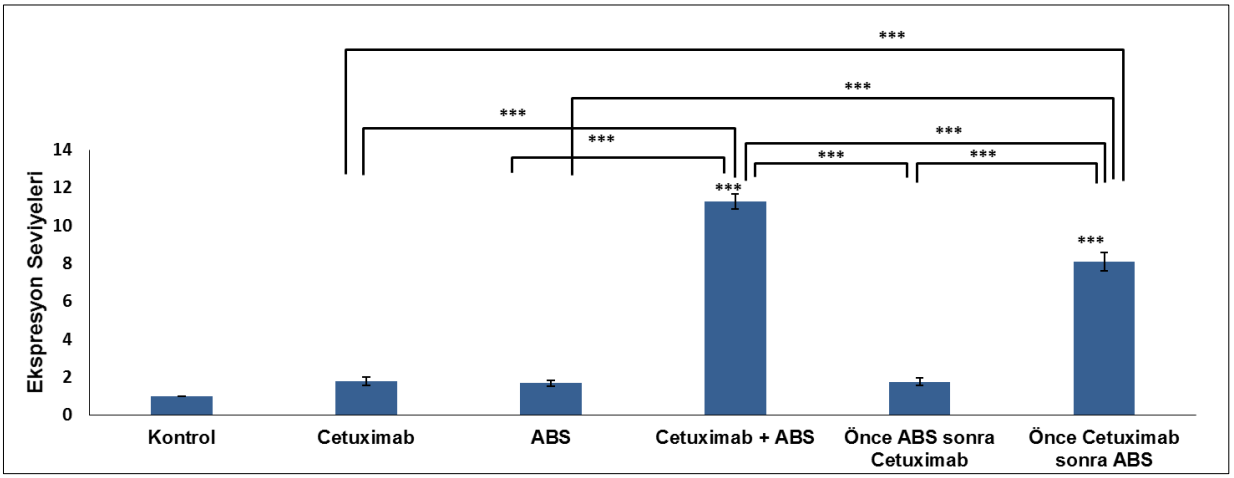
Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında sitokrom c gen ifadesinin, Cetuximab, ABS ve kombinasyonlarının uygulamasında, kontrole göre ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 50).

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında apaf-1 gen ifadesinin, ilaçların kombine uygulamalarında genellikle artış gösterdiği ve en belirgin artışın aynı anda Cetuximab ve ABS uygulamasında kontrole göre 11.3±0.39 kat olduğu, bunu kontrole göre 8.09±0.49 kat artış ile

önce Cetuximab sonra ABS uygulamasının takip ettiği saptanmıştır ($p<0.001$). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı saptanmış ($p>0.05$), ancak grupların kendi aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 51).



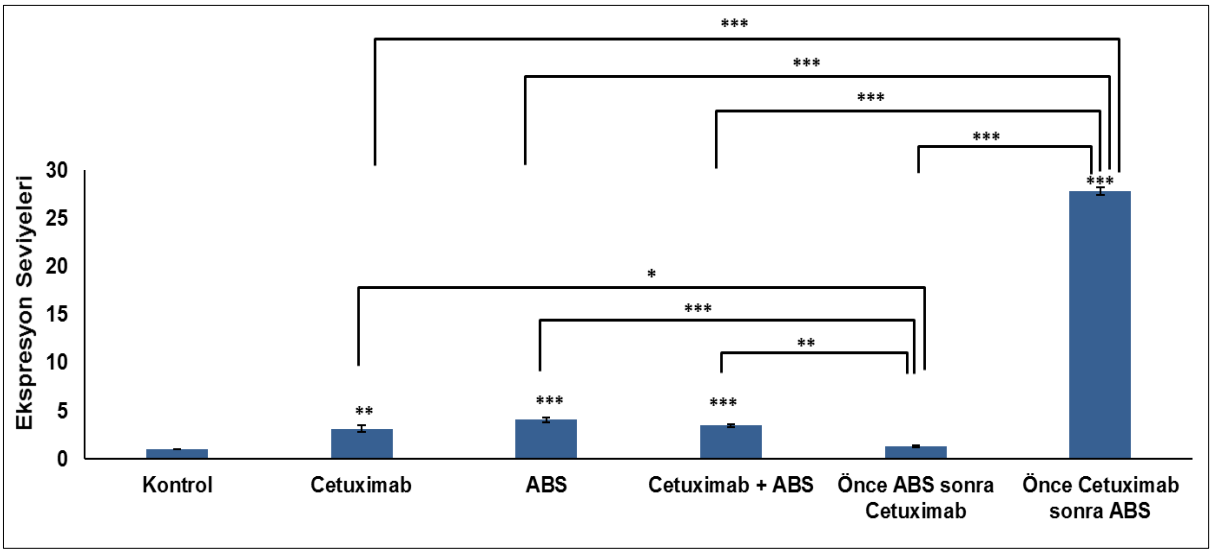
Şekil 50. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda sitokrom c gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata



Şekil 51. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda apaf-1 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata
*****p<0.001**

Analiz sonuçlarına göre; HT-29 hücre hattında kaspaz-3 gen ifadesinde, Cetuximab ve ABS'nin tek başına uygulamalarında sırası ile kontrole göre 12.89±0.19 ve 5.46±0.38 kat artış saptanmıştır. Kombine uygulamalarda en belirgin artışın, önce Cetuximab sonra ABS uygulamasında kontrole göre 53.8±0.58 kat olduğu, bunu kontrole göre 14.57±0.54 kat artış ile aynı anda Cetuximab ve ABS uygulamasının izlediği ve ardından kontrole göre 1.15±0.01 kat

artış ile önce ABS sonra Cetuximab uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir (p<0.001) (Şekil 52).



Şekil 52. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda kaspaz-3 gen ekspresyonu değişimi, ortalama±standart hata
*** p<0.05 ** p<0.01 ***p<0.001**

TARTIŞMA

Kolorektal kanserler, başta ABD olmak üzere, Avrupa ve diğer Batılı ülkelerde kanserle ilişkili morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden biridir. ABD'de erkeklerde prostat ve akciğer kanserinden sonra, kadınlarda ise meme ve akciğer kanserinden sonra ölüme yol açan kanserler arasında 3. sırada yer almaktadır (1).

Kolon kanseri gelişimi, pek çok faktörle ilişkili olan çok basamaklı bir süreçtir (3). Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonlarındaki kayıplar, azalmış apoptozis ve aşırı hücre proliferasyonu kolon kanseri gelişimine yol açan değişiklikler olarak kabul edilmektedir (4).

5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab, hem erken evre hem de metastatik kolon kanseri tedavisinde standart tedavide kullanılan ajanlardır (136). Ancak bu ilaçların kullanımından bir süre sonra meydana gelen ilaç dirençleri ve ilaç toksisiteleri, kolon kanserli hastalarda tedavi yanıtını olumsuz etkilemektedir (137). Bu nedenle, yeni ajanların ve ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır.

Kanser başta olmak üzere hastalıkların tedavisinde, iki ya da daha fazla ilacın kombine kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır ve standart hale gelmektedir (130). Kombine ilaç tedavisinin, birçok kanser türünde başarıları mevcuttur (114,123,125,127). Preklinik çalışmalarda denenen kombinasyonların yan etkilerinin az olması, minimum dirence yol açması, ilacın sağlıklı hücrelere minimum zarar vermesi ve daha çok kanser hücrelerini hedef alması önemlidir (131).

İlaç tedavilerinin sorunlarından biri olan yan etki, yüksek dozlarda artış göstermektedir. Tedavilerde aranan özellik, ilacın hedefe yönelik davranış göstermesi ve hastaya yan etkisinin az olmasıdır. Bu çalışmada; kolon kanserinin hücresel modeli olan

HT-29 kullanılarak, ABS'nin Oxaliplatin, Cetuximab ve 5-FU ile kombine kullanımının sitotoksik ve apoptotik etkileri ilk defa araştırılmış olup, bulgular orjinaldir.

ABS, *Thymus vulgaris* (kekik), *Glycyrrhiza glabra* (meyan), *Vitis vinifera* (üzüm), *Alpinia officinarum* (havlıcan) ve *Urtica dioica* (ısırgan) bitkilerinden elde edilen bitkisel bir ekstraktır ve bu bitkilerin endotelyum, kan hücreleri, anjiogenez ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri mevcuttur. ABS, klinikte hemostatik ajan olarak bilinmektedir (6).

Yapılan çalışmalarda, ABS'nin kolon kanseri de dahil olmak üzere bir çok kanser türünde potansiyel bir anti-kanser ajan olduğu gösterilmiştir (6-8). Klinikte hemostatik ajan olarak kullanılan ABS ile ilgili literatürde, *in vivo* olarak kanser üzerinde yapılmış çalışma bulunmamaktadır. ABS'nin bu özellikleri göz önünde bulundurularak, çalışmamızda ABS'nin kolon kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlarla kombinasyonunun uygun olacağı düşünüldü.

Bu çalışmada, kolon kanseri hücre hatlarında ABS ile 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab'ın farklı dozlarda kombinasyonlarının olası sinerjistik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda, ilk olarak kolon kanseri hücrelerinde ABS, 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab'ın tek olarak uygulamalarında LD_{50} değerleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda; hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz LD_{50}, ABS için 27 µl, 5-FU için 9.6 µM, Oxaliplatin için 1.009 µg/ml ve Cetuximab için 0.59 µg/ml olarak saptanmıştır.

ABS'nin LD_{50} dozu, Koçyiğit ve ark.'larının (2017) BF16F10 melanoma ve L-929 sağlıklı fibroblast hücre hatlarında ABS'nin sitotoksik, genotoksik, apoptotik ve reaktif oksijen üretme aktivitesi üzerine yaptıkları *in vitro* bir çalışmada, BF16F10 ve L-929 hücre hattında sırasıyla %1.1 ve %2 olarak saptanmıştır (138). Çalışmamızda ABS'nin LD_{50} dozu 27 µL olarak bulundu. Bu çalışma ABS'nin solid kanserler üzerindeki etkisinin ve konvansiyonel ilaçlarla etkileşiminin irdelenmesi açısından ilktir.

5-FU'nun LD_{50} dozu, Zhou ve ark.'larının (2010) HCT-116 ve HCT-8 kolon kanseri hücre hatlarında yaptığı çalışmada, sırasıyla 11.06 µM ve 8.21 µM (139), Ikehata ve ark.'larının (2014) kolon kanseri hücre hatları olan HT-29, SW480, SW48 ve HCT-116 üzerinde yaptığı çalışmada, sırasıyla 10, 10.7, 7.5, 3.2 µM (140), Sharma ve ark.'larının (2008) SW620 kolon kanseri hücre hattında yaptığı bir çalışmada, 4 µM (141), Nita ve ark.'larının (1998) kolon kanseri hücre hatları olan HT-29, Colo320, DLD1, LoVo ve SW480 üzerinde yaptığı çalışmada, sırasıyla 19.3, 3.1, 21, 1.5, 17.5 µM (142), Li ve ark.'larının (2017) kolon kanseri hücre hatları olan HT-29 ve SW620 hücre hatlarında yaptıkları

çalışmada, sırasıyla 26.70, 26.71 µM (143), Zhou ve ark.'larının (2016) BCG-823 mide kanser hattında yaptığı bir çalışmada 0.1 mM (144), Flis ve ark.'larının (2009) kolon kanseri hücre hatları olan Colo-205, SW48 ve HT-29 üzerinde yaptığı bir çalışmada, sırasıyla 31, 27, 20 µM olarak saptanmıştır (145). Çalışmamızda ise 5-FU'nun LD_{50} dozu 9.6 µM olarak bulundu.

Oxaliplatin'in LD_{50} dozu, Sharma ve ark.'larının (2008) SW620 kolon kanseri hücre hattında yaptığı bir çalışmada 0.1 µM (141), Florento ve ark.'larının (2012) HT-29 kolon kanseri hücre hattında yaptığı bir çalışmada 6.7 µg/ml (146), Plasencia ve ark.'larının (2006) HT-29 kolon kanseri hücre hattında yaptığı bir çalışmada 7 µM (147), du Plessis-Stoman ve ark.'larının (2011) kolon kanseri hücre hattı HT-29 yaptığı bir çalışmada 12.30 µM (148), Flis ve ark.'larının (2009) kolon kanseri hücre hatları olan Colo-205, SW48 ve HT-29 üzerinde yaptığı bir çalışmada, sırasıyla 34, 7, 9 µM olarak saptanmıştır (145). Bizim çalışmamızda ise Oxaliplatin'in LD_{50} dozu 1.009 µg/ml olarak bulunmuştur.

Cetuximab'ın LD_{50} dozu, Sharma ve ark.'larının (2008) HCT-8 kolon kanseri hücre hattında yaptığı bir çalışmada 50 µg/ml (141), Morelli ve ark.'larının (2005) Özefagus skuamöz hücreli karsinoma hücre hattında yaptığı bir çalışmada 2.5 µg/ml (149) olarak saptanmıştır. Çalışmamızda ise Cetuximab'ın LD_{50} dozu 0.59 µg/ml olarak bulundu.

Çalışmamızda elde ettiğimiz LD_{50} değerleri, ilaçların farklı hücre hatlarında uygulanması ve hücre hatlarında ilaçların uygulanma sürelerinin farklılık göstermesi nedeniyle değişiklik gösterebilmekte, bununla birlikte bulunan değerler literatür verileriyle uyum göstermektedir.

Kombinasyon tedavilerinden elde edilecek başarı, iki farklı tedavinin doğru sıralanması ve bu tedavinin uygun dozlarda uygulanmasına bağlıdır. Bu durum göz önüne alınarak, test edilen ilaçların hücre üzerinde ne gibi etkiler yaratacağı önceden düşünülmeli ve ardından tedavi yöntemi uygulamaya geçilmelidir. Bizlerde bu sebeple çalışmamızda ABS'nin kemoterapötik ilaçlar ile kombinasyonu uygulamalarını buna göre planladık. Kombine ilaç tedavisi, ilaçların sıralı bir şekilde önce ABS sonra kemoterapötik ilaçlar ve tam tersi olacak şekilde uygulandığı gibi, bu iki ajanı aynı anda uygulayarak HT-29 kolon kanseri hücrelerinde oluşturdukları sitotoksisite değerlendirildi.

Çalışmamızda; *in vitro* ortamda ABS ve 5-FU'nun, her ikisinin de tek başına HT-29 kolon kanseri hücre hattında doz ilişkili olarak sitotoksik etkilerinin olduğu gözlemlendi (Şekil 14,15). Kombinasyon tedavisinde ilaçların sitotoksik etkisi, tek ajan tedaviye kıyasla daha yüksek bulundu (Şekil 18,21,24) ve en düşük dozda dahi çok kuvvetli sinerjistik etki

gösterdi. Bu sonuçlar ABS'nin 5-FU ile birlikte kullanılmasının en etkili doz ve süreye ulaşmada tek başına kullanılmasına göre çok daha yararlı olabileceğini göstermektedir.

Aynı şekilde çalışmamızda *in vitro* ortamda ABS ve Oxaliplatin'in, her ikisinin de tek başına HT-29 kolon kanseri hücre hattında doz ilişkili olarak sitotoksik etkilerinin olduğu gözlemlendi. Kombinasyon tedavisinde ilaçların sitotoksik etkisi, tek ajan tedaviye kıyasla daha yüksek bulundu (Şekil 19,22,25) ve bu kombinasyon en düşük dozda dahi çok kuvvetli sinerjistik etki gösterdi. Tedavinin uygulama sırasında ise ajanların aynı anda kullanımının daha yüksek sitotoksisiteye neden olduğu gözlendi (Şekil 19).

In vitro ortamda ABS ve Cetuximab'ın her ikisinin de, tek başına HT-29 kolon kanseri hücre hattında doz ilişkili olarak sitotoksik etkilerinin olduğu gözlendi. Kombinasyon tedavisinde ilaçların sitotoksik etkisi, tek ajan tedaviye kıyasla daha yüksek bulundu (Şekil 20,23,26) ve bu kombinasyon en düşük dozda dahi çok kuvvetli sinerjistik etki gösterdi. Tedavinin uygulama sırasında ise, ajanların önce ABS ardından Cetuximab kullanımının daha yüksek sitotoksisiteye neden olduğu gözlendi (Şekil 23).

Çalışmamızda; 5-FU ve ABS kombine uygulamalarında düşük dozda çok kuvvetli sinerjizm gösteren 1/4 LD_{50} dozu seçildi ve çalışmanın apoptoz ve gen ekspresyonu analizi aşamasındaki uygulamalarda 1/4 LD_{50} dozu kullanıldı.

5-FU, ABS ve kombinasyonlarının apoptotik hücre ölümüne yol açıp açmadığı, TALİ testi ile değerlendirildi. Kolon kanseri hücrelerinde yapılan TALİ testinde, kombine tedavi önce ABS sonra 5-FU ve tam tersi olacak şekilde uygulandığı gibi, bu iki ajan aynı anda uygulanarak bu kombinasyonların hücre ölümüne etkileri değerlendirildi. ABS ile kombine halde uygulanan 5-FU'nun canlı, ölü ve apoptotik hücre oranlarında değişikliklere neden olduğu saptandı.

Nitekim kolon kanseri hücrelerinde 5-FU ile aynı anda, önce ve sonra uygulanan ABS'nin, tek başına 5-FU uygulamasına göre canlılık oranının sırası ile 1.5 kat, 2.2 kat ve 1.1 kat azalmasına neden olduğu belirlendi. Yine aynı koşullarda ABS'nin kolon kanseri hücrelerindeki apoptoz oranının sırası ile 2.8 kat, 3.7 kat ve 1.7 kat artmasına neden olduğu, nekrotik ölüm oranlarında ise önemli bir değişim oluşturmadığı saptandı.

Çalışmamızda; 5-FU ve ABS arasındaki sinerjistik etkiden sorumlu mekanizmayı değerlendirmek amacıyla, apoptoz ile ilgili genler olan p53, apaf-1, sitokrom c, kaspaz 3, bax ve bcl-2 genleri RT-PCR tekniği ile incelendi.

Kanser hastalarının çoğunda, p53 geninin mutasyona uğradığı görülmektedir. p53 geni bir tümör baskılayıcı gendir ve bu genin aşırı ekspresyonu apoptozis göstergesidir (150).

HT-29 hücrelerine ABS ile 5-FU tek başına ve kombine olarak uygulandığında, kombine uygulamaların tek başına yapılan uygulamalara göre p53 gen ifadesinde, istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirdiği gözlendi. En etkili artışın kontrole göre 55 kat artış ile aynı anda ABS ve 5-FU kombine uygulamasında olduğu belirlendi (Şekil 35). ABS ve 5-FU kombine tedavisinin ilaçların ayrı ayrı kullanımına kıyasla bcl-2 gen ifadesinde önemli derecede azalma meydana getirdiği gözlendi (Şekil 36). Bcl-2 gen ekspresyonunda meydana gelen azalmaya karşılık bax geninin ilaçların kombine uygulamasında tek başlarına uygulanmasına göre ekspresyonunun arttığı ve en fazla artışın kontrole göre 44.5 kat artış ile aynı anda ABS ve 5-FU kombine uygulamasında olduğu görüldü (Şekil 37). Bax/bcl-2 oranındaki bu artış apoptozis lehine olmuştur. Benzer şekilde, Chan ve ark.'ları (2012) skuamöz hücreli baş boyun kanserinde yaptığı bir çalışmada 5-FU ve Apigenin'in birlikte kullanımının kuvvetli sinerjistik etki gösterdiğini belirtmiş, bu kombine uygulamanın bcl-2 gen ifadesinde azalmaya, bax, kaspaz-3 gen ekspresyonlarında ise önemli derecede artışa neden olduğunu ve bcl-2 bağımlı olarak apoptozu indüklediğini rapor etmişlerdir (151).

Apoptozis, pro-apoptotik ve apoptotik proteinlerin arasındaki dengeye bağlıdır. Bu proteinlerin ifade düzeylerindeki değişikliklerin önemli sonuçlarından biri mitokondri membran potansiyelinin bozulması ve sitokrom c'nin sitozole salınımıdır (63). ABS ve 5-FU kombine uygulanması sitokrom c gen ifade düzeyinin ilaçların tek başına uygulanmalarına ve kontrole göre artış gösterdiği gözlendi (Şekil 38).

Mitokondri membranından sitozole salınan sitokrom c, sitozolde bulunan apaf-1'e bağlanır ve aktive eder. ATP'nin de katılımı ile apoptozom kompleksini oluşturur. Bu kompleks, inaktif olan prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a dönüştürür. Aktive olan kaspaz-9 ise, kaspaz-3'ü aktive ederek, kaspaz kaskadının başlamasını sağlar ve hücreyi apoptoza götürür (63). Çalışmamızda; ABS ve 5-FU kombine uygulamasının apaf-1 gen ifadesinde, ilaçların tekli uygulanmasına göre önemli derecede artışa sebep olduğu saptandı ve en etkili artışın kontrole göre 32.8 kat artış ile aynı anda ABS ve 5-FU kombine uygulamasında olduğu gözlendi (Şekil 39). İçsel apoptoz yolağında kaspaz kaskadında efektör kaspaz olan kaspaz-3 gen ifadesinde, ABS ve 5-FU kombine uygulamalarında önemli bir artış meydana geldiği tespit edildi. En etkili artışın kontrole göre 28.4 kat artış ile önce 5-FU sonra ABS kombine uygulamasında olduğu görüldü. (Şekil 40). Kim ve ark.'larının (2013), insan kolon kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada, 5-FU ve partenolit kombinasyonunun sinerjizm gösterdiği, p53-bağımlı olarak mitokondriyal apoptozu indüklediği ve kolon kanseri hücrelerinin canlılığını önemli derecede azalttığı gösterilmiştir. 5-FU-partenolit kombinasyonunun; bax,

sitokrom c ve kaspaz-3 ekspresyonunda artış, bcl-2 gen ekspresyonunda ise azalma meydana getirdiğini bildirmişlerdir (152).

Sonuç olarak; bu kombinasyonun apoptotik proteinler olan sitokrom c, apaf–1, kaspaz–3 proteinlerinin ekspresyonlarını istatistiksel olarak belirgin şekilde arttırdığı, anti-apoptotik bir protein olan bcl-2 ekspresyonunu ise belirgin şekilde azalttığı saptanmış ve bu kombinasyonun mitokondriyal apoptoz yolağını aktive ederek hücreyi ölüme götürdüğü belirlenmiştir. Elde edilen gen analizi sonuçlarıyla TALİ sonuçlarının da birbirini doğrular ölçüde olması ABS ve 5-FU kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde apoptotik etkinliği olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda ABS'nin 5-FU ile kombine uygulamasında ilaçların etkileri kıyaslandığında, önce ABS sonra 5-FU ve tam tersi olacak şekilde uygulandığı gibi, bu iki ajan aynı anda uygulanarak bu kombinasyonların hücre ölümüne etkileri değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre kombine tedavide en etkili kombinasyonun 5-FU'nun apoptoz üzerindeki etkisinin 3.7 kat artışına yol açan önce ABS sonra 5-FU kombinasyonu olduğu belirlendi.

Çalışmamızda; bir başka kemoterapötik ajan olan Oxaliplatin ve ABS'nin kombine uygulamalarında, düşük dozda çok kuvvetli sinerjizm gösteren 1/4 LD_{50} dozu seçilmiş olup, çalışmanın apoptoz ve gen ekspresyonu analizi aşamasında uygulamalarda 1/4 LD_{50} dozu kullanıldı.

Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonlarının, apoptotik hücre ölümüne yol açıp açmadığı TALİ testi ile değerlendirildi. Kolon kanseri hücrelerinde yapılan TALİ testinde, kombinasyonlar önce ABS sonra Oxaliplatin ve tam tersi olacak şekilde uygulandığı gibi, bu iki ajan aynı anda uygulanarak bu kombinasyonların hücre ölümüne etkileri değerlendirildi. ABS ile kombine halde uygulanan Oxaliplatin'in; canlı, ölü ve apoptotik hücre oranlarında değişikliklere neden olduğu saptandı.

Nitekim kolon kanseri hücrelerinde Oxaliplatin ile aynı anda, önce ve sonra uygulanan ABS'nin tek başına Oxaliplatin uygulamasına göre canlılık oranının sırası ile 1.9 kat, 1.2 kat ve 1.3 kat azalmasına neden olduğu belirlendi. Yine aynı koşullarda ABS'nin hücrelerde apoptoz oranının sırası ile 3.4 kat, 2.7 kat ve 2.2 kat artmasına neden olduğu ve nekrotik ölüm oranlarında önemli bir değişim oluşturmadığı saptandı.

Çalışmamızda; ABS'nin Oxaliplatin ile arasındaki sinerjistik etkiden sorumlu mekanizmayı değerlendirmek amacıyla, apoptoz ile ilgili genler olan p53, apaf-1, sitokrom c, kaspaz 3, bax ve bcl-2 genleri RT-PCR tekniği ile incelendi.

HT-29 hücrelerine ABS ile Oxaliplatin'in tek başına ve kombine olarak uygulamasında, kombine uygulamaların tek başına yapılan uygulamalara göre p53 gen ifadesinde, istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirdiği ve en etkili artışın kontrole göre 27.9 kat artış ile önce ABS sonra Oxaliplatin kombine uygulamasında olduğu görüldü (Şekil 41). ABS ve Oxaliplatin kombine uygulamasında bcl-2 gen ifadesinde önemli bir artış gözlenemedi (Şekil 42), buna karşılık bax gen ifadesinde önemli derecede artış olduğu gözlemlendi ve en fazla artışın kontrole göre 45.3 kat artış ile önce ABS sonra Oxaliplatin kombine uygulamasında olduğu gözlendi (Şekil 43). Bax/bcl-2 oranında artış görüldü ve bu artış apoptozis lehine olmuştur. Benzer şekilde Zhou ve ark.'larının (2016), BCG-823 mide kanser hattında yaptıkları bir çalışmada; Curcumin ve FOLFOX kombinasyonunun bcl-2/bax oranını azalttığı, kaspaz 3, 8 ve 9 aktivasyonunu önemli derecede artırdığını belirtmiş olup, bcl-2/bax-kaspaz-8, 9 ve kaspaz-3 yolağından apoptuzun indüklendiğini bildirmişlerdir (144).

Anti-apoptotik bir gen olan bcl-2'nin ekspresyonunun azalması ve pro-apoptotik bir gen olan bax'ın ekspresyonunun artması mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına ve sitokrom c'nin mitokondri membranından sitozole salınımına yol açar. ABS ve Oxaliplatin kombine uygulanmasında sitokrom c gen ifade düzeyinin kontrole göre artış gösterdiği görüldü (Şekil 44). Sitozole salınan sitokrom c, apaf-1 ve prokaspaz-9 ile birleşir ve apoptozom kompleksini oluşturur. Prokaspaz-9, aktif kaspaz-9'a dönüşür. Aktive olan kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz kaskadının başlamasını sağlar ve hücreyi apoptoza götürür (54).

Çalışmamızda ABS ve Oxaliplatin kombine uygulamasının apaf-1 gen ifadesinde önemli derecede artışa sebep olduğu ve en etkili artışın kontrole göre 32.9 kat artış ile önce ABS sonra Oxaliplatin kombine uygulamasında olduğu gözlendi (Şekil 45). ABS ve Oxaliplatin kombine uygulamalarının apoptoz yolağında kaspazlar arasında hücre ölümünün doğrulanmasında en önemli role sahip olan kaspaz-3 gen ekspresyonunda önemli bir artış meydana getirdiği ve en etkili artışın kontrole göre 18.9 kat artış ile önce Oxaliplatin sonra ABS uygulamasında olduğu görüldü. (Şekil 46). Guo ve ark.'larının (2015), kolon kanseri oluşturulmuş nude farelerle yaptığı *in vivo* bir çalışmada, Oxaliplatin ve Curcumin kombine tedavisinin sinerjistik etki gösterdiği, hücre proliferasyonunu baskıladığı ve apoptozisi indüklediği belirtilmiştir. Bu kombinasyonun hücre döngüsünün durmasına (arrest) neden olduğu, bax, kaspaz-3 gen ifadesinde artışa, bcl-2, HSP70, survivin ve c-myc gen ifadesinde

ise azalmaya yol açtığı, poli-(ADP-riboz) polimeraz'ın yıkılımına neden olduğu ve bu kombinasyonun apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (153).

Sonuç olarak bu kombinasyonun apoptotik proteinler olan sitokrom c, apaf-1, kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonlarını istatistiksel olarak belirgin şekilde arttırdığı, anti-apoptotik bir protein olan bcl-2 ekspresyonunu ise belirgin şekilde azalttığı saptanmış ve bu kombinasyonun mitokondriyal apoptoz yolağını aktive ederek hücreyi ölüme götürdüğü belirlenmiştir.

Elde edilen gen analizi sonuçlarıyla TALİ sonuçlarının birbirini doğrular ölçüde olması ABS ve Oxaliplatin kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde apoptotik etkinliği olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda ABS'nin Oxaliplatin ile kombine uygulamasında; ilaçların etkileri kıyaslandığında, önce ABS sonra Oxaliplatin ve tam tersi olacak şekilde uygulandığı gibi, bu iki ajan aynı anda uygulanarak bu kombinasyonların hücre ölümüne etkileri değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre; kombine tedavide en etkili kombinasyonun, Oxaliplatin'in apoptoz üzerindeki etkisinin 3.4 kat artışına yol açan aynı anda ABS ve Oxaliplatin kombinasyonu olarak belirlendi.

Çalışmamızda; kemoterapötik ajan olan Cetuximab ve ABS'nin kombine uygulamalarında, düşük dozda çok kuvvetli sinerjizm gösteren 1/4 LD_{50} dozu seçilmiş olup, çalışmanın apoptoz ve gen ekspresyonu analizi aşamasında uygulamalarda 1/4 LD_{50} dozu kullanıldı.

Cetuximab, ABS ve kombinasyonlarının, apoptotik hücre ölümüne yol açıp açmadığı TALİ testi ile değerlendirildi. Kolon kanseri hücrelerinde yapılan TALİ testinde, önce ABS sonra Cetuximab ve tam tersi olacak şekilde uygulandığı gibi, bu iki ajan aynı anda uygulanarak bu kombinasyonların hücre ölümüne etkileri değerlendirildi. ABS ile kombine halde uygulanan Cetuximab'ın, canlı, ölü ve apoptotik hücre oranlarında değişikliklere neden olduğu saptandı.

Kolon kanseri hücrelerinde; Cetuximab ile aynı anda, önce ve sonra uygulanan ABS'nin tek başına Cetuximab uygulamasına göre canlılık oranının sırası ile 1.2 kat, 1.2 kat ve 1.8 kat azalmasına neden olduğu belirlendi. Yine aynı koşullarda, ABS'nin hücrelerde apoptoz oranının sırası ile 2 kat, 3.3 kat ve 3.3 kat artmasına neden olduğu saptandı.

Çalışmamızda; ABS'nin Cetuximab ile arasındaki sinerjistik etkiden sorumlu mekanizmayı değerlendirmek amacıyla apoptoz ile ilgili genler olan p53, apaf-1, sitokrom c, kaspaz 3, bax ve bcl-2 genleri, RT-PCR tekniği ile incelendi.

p53, hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok organizmada kanseri baskılamak için çok önemli bir proteindir (154). DNA hasar gördüğünde p53 aktive olur ve ekspresyonu artar (150). Çalışmamızda; HT-29 hücrelerine ABS ile Cetuximab'ın kombine uygulamalarının, p53 gen ifadesinde istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirdiği ve en etkili artışın kontrole göre 50.7 kat artış ile aynı anda ABS ve Cetuximab kombine uygulamasında olduğu gözlendi (Şekil 47). DNA hasar gördüğünde p53 aktive olur ve pro-apoptotik bir gen olan bax'ın ekspresyonu artar. Normal hücrelerde bcl-2, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını engeller. DNA hasarı ile birlikte bcl-2 gen ifadesinin azalması ve bax gen ekspresyonunun artmasıyla birlikte sitokrom c mitokondriden salınır ve sırasıyla apaf-1 ve prokaspaz-9 ile birlikte apoptozom kompleksi oluşturarak prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a dönüştürür. Kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz kaskadını başlatır ve apoptoz gerçekleşir (48).

ABS'nin Cetuximab ile kombine uygulamasında bcl-2 gen ifadesinde önemli bir artış olmamakla birlikte (Şekil 48), bax gen ifadesinde önemli derecede artış olduğu gözlendi ve en fazla artış kontrole göre 53.8 kat artış ile aynı anda ABS ve Cetuximab kombine uygulamasında görüldü (Şekil 49). Bax/bcl-2 oranında artış olduğu saptandı. Tortora ve ark.'larının (1999), ZR-75–1 meme kanseri hücre hattında yaptıkları çalışmada DNA/RNA hibrid bir oligonükleotit olan HYB 165 ve Cetuximab'ın kombine kullanımının meme kanseri hücreleri üzerinde sinerjistik etki gösterdiği, bu kombinasyona dosetaksel eklendiğinde sinerjizmin arttığı belirtilmiştir. İlaçların üçlü kombinasyonları ilaçların tekli ve ikili kombinasyonuna göre karşılaştırıldığında, bcl-2 fosforilasyonun bu üçlü kombinasyonda daha fazla olduğu saptanmış ve daha fazla apoptoz görüldüğü bildirilmiştir (155).

ABS ve Cetuximab kombine uygulanmasında, sitokrom c gen ifade düzeyinin kontrole göre artış gösterdiği gözlendi (Şekil 50). Bunu takiben ABS ve Cetuximab kombine uygulamasının, apaf-1 gen ifadesinde artışa sebep olduğu ve en etkili artışın kontrole göre 11.3 kat artış ile aynı anda Cetuximab ve ABS kombine uygulamasında olduğu tespit edildi (Şekil 51). Efektör kaspaz olan kaspaz-3 gen ifadesinin, ABS ve Cetuximab kombine uygulamalarında önemli bir artış meydana getirdiği ve en etkili artışın kontrole göre 53.8 kat artış ile önce Cetuximab sonra ABS uygulamasında olduğu saptandı (Şekil 52).

Sonuç olarak bu kombinasyonun apoptotik proteinler olan sitokrom c, apaf-1, kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonlarını istatistiksel olarak belirgin şekilde arttırdığı, anti-apoptotik bir protein olan bcl–2 ekspresyonunu ise belirgin şekilde azalttığı saptanmış ve bu

kombinasyonun mitokondriyal apoptoz yolağını aktive ederek hücreyi ölüme götürdüğü belirlenmiştir.

Elde edilen gen analizi sonuçlarıyla TALİ sonuçlarının birbirini doğrular ölçüde olması, ABS ve Cetuximab kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde apoptotik etkinliği olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda ABS'nin Cetuximab ile kombine uygulamasında ilaçların etkileri kıyaslandığında, önce ABS sonra Cetuximab ve tam tersi olacak şekilde uygulandığı gibi, bu iki ajan aynı anda uygulanarak bu kombinasyonların hücre ölümüne etkileri değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre; kombine tedavide en etkili kombinasyonun Cetuximab'ın apoptoz üzerindeki etkisinin 3.3 kat artışına yol açan önce Cetuximab sonra ABS kombinasyonu olarak belirlenmiştir.

Çalışmamız; ABS ve 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab'ın kombine olarak HT-29 hücre hattındaki sitotoksisitesini inceleyen ve güçlü sitotoksik etkinin saptandığı ilk çalışmadır. Ayrıca, ABS'nin HT-29 hücre hattında kombinasyon tedavisinde sitotoksik etkinin şeklini değerlendiren ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Literatürde, kolon kanseri tedavisinde ABS'nin kemoterapötik ilaçlarla kullanıldığında etkisinin sinerjistik olduğunu gösteren başka bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin etki mekanizmalarının araştırılacağı *in vitro* ve *in vivo* yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuç olarak; araştırmamız, devam çalışmaları gerekli olmakla birlikte ABS'nin gelecekte hem tek başına hem de kemoterapötiklerle kombine olarak kolon kanseri tedavisinde etkin olarak kullanılabilecek bir ajan olduğunu göstermektedir.

SONUÇLAR

Kolon kanseri HT-29 hücrelerinde, ABS'nin kolon kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlar olan 5-FU, Oxaliplatin, Cetuximab ile kombinasyonunun sitotoksik ve apoptotik etkilerinin ilk defa araştırıldığı bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Kolon kanserinin hücresel modellerinden biri olan HT-29 hücrelerinde; ABS ve 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab'ın tek tek ve kombine kullanımı hem doza hem zamana bağlı sitotoksik ve apoptotik etki göstermiştir.
2. Beş farklı bitki ekstraktından elde edilen ABS'nin HT-29 hücreleri için LD_{50} değeri, 27 µl olarak bulundu.
3. Kolon kanseri tedavisinde kullanılan olan 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab için LD_{50} değeri, sırasıyla 10 µM, 1.009 µg/ml ve 0.59 µg/ml'dir.
4. ABS'nin 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab ile kombinasyonlarında kullanılan en düşük dozlarda dahi anlamlı sinerjistik sitotoksisite gözlendi.
5. ABS'nin 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab ile kombine kullanımında saptanan sinerjistik sitotoksisitenin, mitokondriyal apoptoz yolağının aktivasyonuyla gerçekleştiği gösterildi.
6. ABS ve 5-FU kombine tedavinin uygulanmasında; aynı anda, kemoterapiden önce ve sonra 3 farklı şekilde uygulanan kombinasyonlardan en etkili kombinasyonun, en çok apoptotik aktivite gösteren önce ABS sonra 5-FU uygulaması olduğu gözlenmiştir.
7. ABS ve Oxaliplatin kombine tedavinin uygulanmasında en etkili kombinasyonun, en çok apoptotik aktivite gösteren aynı anda ABS ve Oxaliplatin uygulaması olduğu gözlenmiştir.

8. ABS ve Cetuximab kombine tedavinin uygulanmasında en etkili kombinasyonun, en çok apoptotik aktivite gösteren önce Cetuximab sonra ABS uygulaması olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak; çalışmamız ABS'nin kolon kanseri tedavisinde kombine kullanımının kolon kanseri tedavisinde etkili olabileceği konusunda gelecek vaadetmektedir. Bu kombinasyonların etkileşimi sonucu meydana gelen sinerjistik ve apoptotik etkilerin, diğer kolon kanseri hücre hatlarında doğrulanması ve bu verilerin *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

ÖZET

Kolorektal kanserler, dünyada önemli morbidite ve mortalite sebeplerinden biri olup, 3. en sık görülen kanser türüdür. Kolorektal kanserin klinik tedavisinde, 5-Florourasil, Oxaliplatin ve Cetuximab yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kemoterapi ilaçları anti-tümör etkiye sahiptir. Ancak, sağlıklı dokular üzerinde de ciddi yan etkilere sahiptir. İlaçların bu yan etkilerinden dolayı, bitkilerden ilaç elde etmeye yönelik araştırmalar artış göstermektedir.

ABS; *Thymus vulgaris, Glycyrrhiza glabra, Vitis vinifera, Alpinia officinarum* ve *Urtica dioica* bitkilerinden elde edilen standardize bir doğal ekstrakt üründür. Bileşenlerinin her birinin, çeşitli deneysel modellerde antineoplastik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, kolorektal adenokarsinoma hücre hattı üzerinde ABS'nin 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab ile kombinasyonlarının sinerjistik etkileri araştırıldı. MTT testi ile hücrelere ait % canlılık oranları belirlendi. Uygulanan tedavi gruplarına ait IC_{50} değerleri hesaplandı. IC_{50} değerlerine göre ABS tek başına ve ilaçlar ile kombine olarak hücrelere uygulandı. Kombinasyonların etkinlikleri, Chou ve Talalay'ın kombinasyon indeksi metodunu temel alan CompuSyn programı ile yapıldı.

Apoptozun indüksiyonu, Tali görüntü tabanlı sitometre ile analiz edildi. Uygulanan tedavilerin, apoptotik yolaklarda önemli rollere sahip olan p53, bax, bcl-2, sitokrom c, apaf-1 ve kaspaz-3 gen ve proteinleri üzerindeki etkileri RT-PCR yöntemi ile analiz edildi.

Çalışmanın sonuçları; ABS'nin tek başına veya 5-FU, Oxaliplatin ve Cetuximab ile kombinasyonlarının hücre proliferasyonunu baskıladığı ve ABS'nin bcl-2 gen ifadesinde

azalmaya ve bax, p53, sitokrom c ve kaspaz-3 gen ifadesinde artmaya neden olarak, HT-29 hücrelerinde mitokondriyal aracılıklı apoptozu indüklediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: HT-29, ABS, kolon kanseri, ilaç kombinasyonu

THE EFFECT OF ANKAFERD BLOODSTOPPER ON *IN VITRO* PROLIFERATION OF COLON CANCER CELLS

SUMMARY

Colorectal cancer is a major cause of morbidity and mortality throughout the world and it is the third most common cancer. In the clinical treatment of colorectal cancer 5-FU, Oxaliplatin and Cetuximab are widely used.

These drugs have anti-tumor effect. However, they also have severe side effects on normal tissues. Because of this severe side effects research on obtaining medicines from plants has increased.

Ankaferd Blood Stopper is a standardized natural extract product prepared from *Thymus vulgaris, Glycyrrhiza glabra, Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum* and *Urtica dioica* and known as hemostatic agent. Each constituent of ABS has been proven to have an antineoplastic effect in various experimental models.

In this study, synergistic effects of ABS combination with 5-FU, Oxaliplatin and Cetuximab were investigated in HT-29 cell line. Cell survival rates were determined by MTT. IC_{50} values of the treatment groups were calculated. According to the IC_{50} value, ABS was applied to cells alone or in combination with drugs. Efficacy of this combination was determined by CompuSyn software based on combination index method of Chou and Talalay.

Induction of apoptosis was analyzed by Tali image based cytometer. The effects of the applied treatment on p53, bax, bcl-2, cytochrom-c, apaf-1 and caspase-3 which have an important role in the apoptotic pathway were analyzed by RT-PCR.

Results of the study show that ABS alone or in combination with 5-FU, Oxaliplatin and Cetuximab suppressed proliferation and induces mitochondrial-mediated apoptosis in HT-29 cells via decrease levels of bcl-2 and increase of bax, p53, cytochrom-c, apaf-1 and caspase-3.

Key words: HT-29, ABS, colon cancer, drug combination

KAYNAKLAR

1. Ertürk S. Kolorektal kanserler: Epidemiyoloji, etiyolojide rol oynayan etkenler, tarama ve kemoprevansiyon. Baykan A, Zorluoğlu A, Geçim E, Terzi C (Editörler). Kolon ve rektum kanserleri İstanbul:Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği. 2010;15-30.

2. Lin C, Ng HLH, Pan W, Chen H, Zhang G, Bian Z, et al. Exploring different strategies for efficient delivery of colorectal cancer therapy. International journal of molecular sciences 2015;16(11):26936-26952.

3. Yamada S, Ajioka Y, Watanabe H, Hashidate H, Takaku H, Kazama S, et al. Heterogeneity of p53 mutational status in intramucosal carcinoma of the colorectum. Japanese journal of cancer research 2001;92(2):161-166.

4. Kasar Z. Geldanamycin Uygulanmış Kolon Kanseri Hücre Dizilerinde Apopitozis Mekanizmasının Araştırılması. Manisa: Celal Bayar Üniversitesi; 2013.

5. Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, Kirazli S, Akman U, Ozturk Y et al. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper®. Journal of International Medical Research 2008;36(1):163-170.

6. Mumcuoglu M, Akin DF, Ezer U, Akar N. Ankaferd Blood Stopper induces apoptosis and regulates PAR1 and EPCR expression in human leukemia cells. Egyptian Journal of Medical Human Genetics 2015;16(1):19-27.

7. Goker H, Cetinkaya D, Kilic E, Haznedaroglu IC, Kirazli S, Firat H. Anti-cancer activity of ankaferd blood stopper on osteosarcom (SAOS-2) cell lines in vitro. Ankaferd: Scientific perspectives and basic-clinical data. Istanbul: Naviga Publications, 2008:109.

8. Goker H, Kilic E, Cetinkaya D, Buyukasik Y, Aksu S, Turgut M, et al. Anti-cancer activity of Ankaferd on human colon cancer (CACO-2) in vitro. Ankaferd: Scientific perspectives and basic-clinical data. Istanbul, Naviga Publications, 2008:108.

9. İlgi S. Gastrointestinal Sistem Anatomisi Edit.: Sayek İ. Temel Cerrahi. Cilt 1, 2. baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 1996: 901-903.

10. Kalın bağırsağın bölümleri. Erişim Tarihi: 16.04.2016 http://www.biyolojisitesi.net/uniteler/sindirim/kalin-bagirsak.html

11. Akpınar G. Kolon kanserinde apoliprotein e (Apo E) gen polimorfizminin araştırılması. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi; 2006

12. Tenesa A, Dunlop MG. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. Nature Reviews Genetics 2009;10(6):353-358.

13. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics 2012. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2015;65(2):87-108.

14. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Global cancer statistics 2016. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2016; 66:7–30.

15. Kanser istatistikleri. Erişim Tarihi: 07.05.2016 http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html

16. Kolon kanseri. Erişim Tarihi: 01.05.2016 http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/ahmet-dobrucali/Kolon-kanseri.pdf

17. Rashid A, Zahurak M, Goodman SN, Hamilton SR. Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered supressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. Gut 1999;44(6):826-833.

18. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. Gut 2005;54(9):1283-1286.

19. Zeng M, Kikuchi H, Pino MS, Chung DC. Hypoxia activates the K-ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells. PLoS One 2010;5(6):e10966.

20. Jiang Y, Mackley H, Cheng H, Ajani JA. Use of K-Ras as a predictive biomarker for selecting anti-EGF receptor/pathway treatment. Biomarkers in medicine 2010; 4(4):535-541.

21. Mark L. Epithelial neoplasms of the large intestine. In: Odze RD, Goldblum JR, Crawford JM (Eds.). Surgical pathology of the GI tract, Liver, Bilier Tract and Pancreas. 1st ed. Elsevier press; 2004. p.441-472.

22. Bullard KM, Rothenberger DA. Colon, Rectum, and Anus. In: Brunicardi FC, Andersen DK (Eds.). Schwartz's Principles of Surgery. 8th ed. New York: The McGraw-Hill Companies Inc; 2005. p.1055-1117.

23. Corman ML. Carcinoma of the Colon. In: Corman ML (Ed.) Colon & Rectal Surgery. 5th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins. 2005. p. 767-903.

24. Adenoma to carcinoma sequence Erişim Tarihi: 27.11.2016. http://clinicalvignettes.blogspot.com.tr/2010/12/old-man-with-colonoscopic-findings-of.html

25. Yamak N. N. Kolon kanseri hastalarında survivin gen polimorfizmlerinin incelenmesi (tez). Düzce: Düzce Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsü; 2012.

26. Itzkowitz SH, Rochester J. Colonic Polyps and Polyposis Syndromes. In: Feldman M, Fiedman LS, Brandt LJ (Eds.). Gastrointestinal and Liver Disease. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p-2713-2757.

27. Laurent S, Franchimont D, Coppens JP, Leunen K, Macken L, Peeters M, Tejpar S. Familial adenomatous polyposis: clinical presentation, detection and surveillance. Acta gastro-enterologica Belgica 2011;74(3):415-420.

28. Fredericks E, Dealtry G, Roux S. Molecular aspects of Colorectal Carcinogenesis: A Review. Journal of Cancer Biology & Research 2015;3(1):1057.

29. Mohammad I. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. The Journal of pathology 2005; 205(2):130–144.

30. Wnt signaling pathway Erişim Tarihi: 18.09.2016 http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S095506741400101X-gr1.jpg

31. Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. Cellular signalling 2007;19(4):659-671.

32. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang, H, Habas R, He X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. Nature 2005;438(7069):873-877.

33. Xing Y, Clements WK, Kimelman D, Xu W. Crystal structure of a β-catenin/axin complex suggests a mechanism for the β-catenin destruction complex. Genes& development 2003; 17(22), 2753-2764.

34. Wu G, Huang H, Abreu JG, He X. Inhibition of GSK3 phosphorylation of β-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6. PloS one 2009;4(3):e4926.

35. Everly DN, Kusano S, Raab-Traub N. Accumulation of cytoplasmic β-catenin and nuclear glycogen synthase kinase 3β in Epstein-Barr virus-infected cells. Journal of virology 2004;78(21):11648-11655.

36. Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. Trends in Genetics 1993;9(9): 317-321.

37. Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β-catenin. Current opinion in genetics & development 2006;16(1):51-59.

38. Dönmez HG, Demirezen Ş, Beksaç MS. WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. DEÜ Tıp Fakültesi dergisi 2011;25(3):189-199.

39. Pavlovic-Calic N, Muminhodzic K, Zildzic M, Smajic M, Gegic A, Alibegovic E, et al. (2007). Genetics, clinical manifestations and management of FAP and HNPCC. Medicinski arhiv 2007;61(4): 256.

40. Lipton LR, Johnson V, Cummings C, Fisher S, Risby P, Sadat AE, Thomas HJW. Refining the Amsterdam Criteria and Bethesda Guidelines: testing algorithms for the prediction of mismatch repair mutation status in the familial cancer clinic. Journal of Clinical Oncology. 2004;22(24):4934-4943.

41. Ho A, Dowdy SF. Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. Current opinion in genetics & development 2002;12(1):47-52.

42. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature 2001;411(6835):342-348.

43. Fışkın K. Genetik ve kanser, Genetik ve davranış. Öner C (Ed.). Genetik Kavramlar. Ankara: Palme yayıncılık 2002 s.635-681.

44. Ulukaya E. Hücre Döngüsü ve Apoptozis. Erişim Tarihi: 10.05.16 http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf

45. http://www.mccordresearch.com/olivamine Erişim Tarihi:19.05.16

46. Cabadak H. Hücre Siklusu ve Kanser. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2008;9(3):51-61

47. Yokuş B, Çakır DÜ. Kanser biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2012;1:7-18.

48. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2008;19(1):55-63.

49. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer 1972;26(4):239.

50. Engür S. Lösemi ve kolon kanseri hücrelerinde yeni bir proteozom inhibitörü olan mln9708'in antineoplastik etkilerinin araştırılması (tez). Eskişehir: Anadolu üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2013.

51. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene 2006; 25(34);4798-4811.

52. http://sciprose.blogspot.com.tr/2014_04_01_archive.html Erişim Tarihi: 24.05.16

53. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2011;20(3):145-158.

54. Atagün G, Eren Z, Gürkanlı İ. Apoptoziste Mitokondrinin Rolü.

55. Turgut B, Demir T, Çeliker Ü. Oftalmolojide apopitoz. Fırat Tıp Dergisi 2006;11(1):6-11.

56. Kartlaşmış K, Kökbaş U, Kayrın L. Apoptozisin Biyokimyası. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2016;25(1):52-69.

57. Purring-Koch C, McLendon G. Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(22):11928-11931.

58. Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z. Apoptozis. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi 2012;3(11).

59. Arslanyüreği H. Epigallocatechin-gallat`ın c6 glioma hücrelerine apoptotik etkileri (tez). İstanbul: İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2009.

60. Cooper DM. The balance between life and death: defining a role for apoptosis in aging. Journal of Clinical & Experimental Pathology 2012;4:001

61. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology 2007;35(4):495-516.

62. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: a review. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 2011;1813(1):238-259.

63. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. Biyokimya Anabilim Dalı. 2003.

64. Agbarya A, Ruimi N, Epelbaum R, Ben-Arye E, Mahajna J. Natural products as potential cancer therapy enhancers: A preclinical update. SAGE open medicine. 2014;*2*:2050312114546924.

65. Da Rocha AB, Lopes RM, Schwartsmann G. Natural products in anticancer therapy. Current opinion in pharmacology 2001;1(4):364-369.

66. Molinari G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. In: Guzman CA, Feuerstein GZ (Eds.). Pharmaceutical biotechnology: Advances in experimental medicine and biology. vol. 665, New York: Springer; 2009. p.13-27.

67. Doğan İ, Yar AS, Ergin V, Menevşe S, Menevşe A, Ekmekçi A. L929 Fibroblast Hücre Hattında Topoizomeraz İnhibisyonunun DNA Onarımı ve Apoptozis Üzerine Etkisi. Türk Biyokimya Dergisi 2013;38 (2):229–237.

68. Şener NEB. Taksan sınıfı bileşiklerin antitümör etkileri. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2000;29(1):77-90.

69. Temel MK. Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi. Türk Onkoloji Dergisi 2015;30(2):96-108.

70. Uludağ MK. Antikanser etkili bazı indol türevlerinin araştırılması (bitirme ödevi). Kayseri: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi; 2012.

71. Ayan AK, Çalışkan Ö, Çırak C. Isırganotu (*Urtica spp.)*'nun ekonomik önemi ve tarımı. OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi 2006; 21(3): 357-363.

72. www.raintreenutrition.com/nettles.html Erişim Tarihi: 10.02.16.

73. Gülçin I, Küfrevioğlu Öİ, Oktay M, Büyükokuroğlu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica L.*). Journal of ethnopharmacology 2004;90(2):205-215.

74. Uzun E, Sarıyar G, Adsersen A, Karakoç B, Ötük G, Oktayoğlu E, Pırıldar S.Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. Journal of Ethnopharmacology 2004;95(2):287-296.

75. Yongna Z, Wantana R, Pisit B, Zhongkun L, Rongping Z. Analgesic and antipyretic activities of the aqueous extract of *Urtica macrorrhiza* in experimental animals. Fitoterapia 2005;76(1):91-95.

76. Randall C, Meethan K, Randall H, Dobbs F. Nettle sting of *Urtica dioica* for joint pain-an exploratory study of this complementary therapy. Complementary therapies in medicine 1999;*7*(3):126-131.

77. Aksu MI, Kaya M. Effect of usage *Urtica dioica L.* on microbiological properties of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage. Food Control 2004;15(8):591-595.

78. Tahri A, Yamani S, Legssyer A, Aziz M, Mekhfi H, Bnouham M, Ziyyat A. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. Journal of Ethnopharmacology 2000;73(1):95-100.

79. Bnouham M, Merhfour FZ, Ziyyat A, Mekhfi H, Aziz M, Legssyer A. Anti hyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. Fitoterapia 2003;74(7):677-681.

80. Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. Journal of ethnopharmacology 1997;58(1):45-54.

81. Testai L, Chericoni S, Calderone V, Nencioni G, Nieri P, Morelli I, Martinotti E. Cardiovascular effects of *Urtica dioica L.(Urticaceae*) roots extracts: *in vitro* and in vivo pharmacological studies. Journal of ethnopharmacology 2002;81(1):105-109.

82. Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-κB. FEBS letters 1999;442(1):89-94.

83. Wilt TJ, Ishani A, Rutks I, MacDonald R. Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. Public health nutrition 2000;3(4a):459-472.

84. Havlıcan. Erişim Tarihi: 21.08.16 https://tr.wikipedia.org/wiki/Havlıcan

85. An N, Zou ZM, Tian Z, Luo X. Z, Yang SL, Xu LZ. Diarylheptanoids from the rhizomes of *Alpinia officinarum* and their anticancer activity. Fitoterapia 2008;79(1):27-31.

86. Ghil S. Antiproliferative activity of *Alpinia officinarum* extract in the human breast cancer cell line MCF-7. Molecular medicine reports 2013;7(4):1288-1292.

87. Dhingra D, Parle M, Kulkarni SK. Memory enhancing activity of *Glycyrrhiza glabra* in mice. Journal of ethnopharmacology 2004;91(2):361-365.

88. Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. International immunopharmacology 2006;6(3):494-498.

89. Dhingra D, Sharma A. Antidepressant-like activity of *Glycyrrhiza glabra L.* in mouse models of immobility tests. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2006;30(3):449-454.

90. Abaza MSI, Orabi KY, Al-Quattan E, Raja'a J. Growth inhibitory and chemo-sensitization effects of naringenin, a natural flavanone purified from *Thymus vulgaris*, on human breast and colorectal cancer. Cancer cell international 2015;15(1):1.

91. Stahl-Biskup, Elisabeth, and Francisco Sáez. Thyme: The Genus Thymus. London: Taylor and Francis, 2002.

92. Meister A, Bernhard G, Chrisoffel V, Buschauer A: Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on isolated *guinea-pigtrachea*: discrimination between drug and ethano leffects. PlantaMed 1999;65:512–516.

93. Çoban ÖE, Patır B. Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi 2010;5(2):7-19.

94. Shabnum S, Wagay MG. Essential oil composition of *Thymus vulgaris L*. and their uses. Journal of Research & Development 2011;11:83-94.

95. El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hathout AS, Hassan NS, Aly SE, Abdel-Wahhab MA. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. Toxicon 2011;57(7):984-991.

96. Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, Wu N. Activities of ten essential oils towards Propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. Molecules 2010;15(5):3200-3210.

97. Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T. Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. Anticancer research 2011;31(1):81-87.

98. Torregrosa L, Verries C, Tesniere C. Grapevine (*Vitis vinifera L.*) promoter analysis by biolistic-mediated transient transformation of cell suspensions. VITIS-Journal of Grapevine Research 2015;41(1):27.

99. Food & Agricultural Organization of the United Nations, 2011.

100. https://tr.wikipedia.org/wiki/%C3%9Cz%C3%BCm Erişim Tarihi: 20.09.16

101. Güven G. Hemostatik ajan olan ankaferd blood stopper (ABS)'ın kemik ve yumuşak doku yarası üzerine erken ve geç dönem etkilerinin histopatolojik olarak araştırılması. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı; 2012.

102. Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. Food research international 2003;36(2): 117-122.

103. Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1998;46(4):1460-1464.

104. Teissedre PL, Frankel EN, Waterhouse AL, Peleg H, German JB. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. Journal of the Science of Food and Agriculture 1996;70:55–61.

105. Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D. Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. Int. J.Mol. Med 2005;15 (6):1013–1022.

106. Stagos D, Kazantzoglou G, Theofanidou, D, Kakalopoulou G, Magiatis P, Mitaku S, Kouretas D. Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in Salmonella typhimurium strain TA102. Mutat. Res 2006; 609(2):165–175.

107. Shrotriya S, Deep G, Gu M, Kaur M, Jain AK, Inturi S, et al. Generation of reactive oxygen species by grape seed extract causes irreparable DNA damage leading to G_2/M arrest and apoptosis selectively in head and neck squamous cell carcinoma cells. Carcinogenesis 2012;33 (4):848–858.

108. Sun T, Chen QY, Wu LJ, Yao XM, Sun XJ. Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. Food Chem Toxicol 2012;50(10):3462–3467.

109. Agarwal C, Sharma Y, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a polyphenolicfraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1arrest and apoptosis. Mol Carcinogen 2000;28(3):129–138.

110. Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal R. Anti-angiogenic efficacy of grape seed extract in endothelial cells. Oncol Rep 2004;11:681–685.

111. Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I, Vamvakou G, Kazantzoglou G, Magiatis P, Skaltsounis AL, Kremastinos DT. Polyphenolic compounds from redgrapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heartdisease. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2005;12(6):596–600.

112. Moura RS, Viana FS, Souza MAV, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EPB, et al. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a *vinifera* grape skin extract. Journal of pharmacy and pharmacology 2002;54(11):1515-1520.

113. Cuevas VM, Calzado YR, Guerra YP, Yera AO, Despaigne SJ, Ferreiro RM,et al. Effects of grape seed extract, vitamin C, and vitamin E on ethanol-and aspirin-induced ulcers. Advances in pharmacological sciences 2011.

114. https://tr.wikipedia.org/wiki/Ankaferd_BloodStopper Erişim Tarihi: 02.10.2016

115. Lenz HJ. Cetuximab in the management of colorectal cancer. Biologics: targets & therapy 2007;1(2):77.

116. Bou-Assaly W, Mukherji S. Cetuximab (Erbitux). American Journal of Neuroradiology 2010;31(4):626-627.

117. Overholser JP, Prewett MC, Hooper AT. Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. Cancer 2000;89:74–82.

118. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V. Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. Clin Cancer Res 1999;5:909-16.

119. Prewett MC, Hooper AT, Bassi R. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMCC225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. Clin Cancer Res 2002;8(5):994-1003.

120. Seetharam RN, Sood A, Goel S. Oxaliplatin: pre-clinical perspectives on the mechanisms of action, response and resistance. Ecancermedicalscience. 2009;*3*.

121. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. Clinical Cancer Research 2000;6(4):1205-1218.

122. Cancer Care Ontario Formulary. 2016.

123. Hector S, Bolanowska-Higdon W, Zdanowicz J, Hitt S, Pendyala L. In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance. Cancer chemotherapy and pharmacology 2001;48(5):398-406.

124. Oxaliplatin Erişim Tarihi: 03.11.2016 https://en.wikipedia.org/wiki/Oxaliplatin

125. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. Current Oncology 2011;18(1):18-25.

126. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. Molecules 2008;13(8):1551-1569.

127. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer 2003;3(5):330-338.

128. Clinical structures of 5-FU and Uracil Erişim Tarihi: 24.12.2016 http://imaging.ubmmedica.com/cancernetwork/journals/oncology/images/o9910sup5df1.gif

129. Akbari R, Javar HA. Efficacy of Capecitabine and 5-Fluorouracil (5-FU) on the human breast cancer cell line (MCF7)–effect of concentration. American Journal of Research Communication 2013;1(16):75-91.

130. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev 2006;68:621–81.

131. Ölgen S, Bıçak I, Nebioğlu D. Angiogenesis Ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. J Fac Pharm 2002;31(3):193-214.

132. Le CT. Experiment Designs for the Assessment of Drug Combination Synergism. Austin Biom and Biostat 2014;1(2): 6.

133. Pinto AC, Moreira JN, Simões S. Combination chemotherapy in cancer: Principles, evaluation and drug delivery strategies. INTECH Open Access Publisher, 2011:693-715.

134. Beytur A, Tekin S, Keleştimur T, Ergin Z, Sandal S. Yeni sentezlenen bir tiyosemikarbazon türevinin prostat kanseri hücre kültürleri üzerine antikanserojenik özelliklerinin belirlenmesi: In vitro bir çalışma. FÜ Sağ Bil Tıp Derg 2011; 25(1):25-32.

135. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. YY Ü Veteriner Fakültesi Dergisi 2008;2:73-78.

136. https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/colorectal
Erişim Tarihi: 01.05.2017.

137. Tawfik E, Ahamed M, Almalik A, Alfaqeeh M, Alshamsan A. Prolonged exposure of colon cancer cells to 5-fluorouracil nanoparticles improves its anticancer activity. Saudi Pharmaceutical Journal 2017;25(2): 206-213.

138. Kocyigit A, Guler EM, Haznedaroglu IC, Malkan UY. Ankaferd hemostat induces DNA damage, apoptosis and cytotoxic activity by generating reactive oxygen species in melanoma and normal cell lines. Internatıional Journal of Clinical And Experimental Medicine 2017;10(2):2116-2126.

139. Zhou J, Zhou Y, Yin B, Hao W, Zhao L, Ju W, Bai C. 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells in vitro. Oncology reports 2010; 23(1):121.

140. Ikehata M, Ogawa M, Yamada Y, Tanaka S, Ueda K, Iwakawa S. Different effects of epigenetic modifiers on the cytotoxicity induced by 5-fluorouracil, irinotecan or oxaliplatin in colon cancer cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin 2014; 37(1):67-73.

141. Sharma RI, Smith TA. Colorectal tumor cells treated with 5-FU, oxaliplatin, irinotecan, and cetuximab exhibit changes in 18F-FDG incorporation corresponding to hexokinase activity and glucose transport. Journal of Nuclear Medicine 2008;49(8):1386-1394.

142. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. British journal of cancer 1998;78(8):986.

143. Li Y, Fan L, Niu Y, Mian W, Zhang F, Xie M, et al. An apple oligogalactan enhances the growth inhibitory effect of 5-fluorouracil on colorectal cancer. European journal of pharmacology 2017.

144. Zhou X, Wang W, Li P, Zheng Z, Tu Y, Zhang Y, et al. Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in inducing gastric cancer cell apoptosis both in vitro and in vivo. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics 2016; 23(1-2):29-34.

145. Flis S, Spławiński J. Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. Anticancer research 2009;29(1): 435-441.

146. Florento L, Matias R, Tuaño E, Santiago K, Dela Cruz F, Tuazon A. Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using In Vitro Cell-Based Approach. Int J Biomed Sci 2012;8(1):76-80.

147. Plasencia C, Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Quinn DI, Abad A, Neamati N. Expression analysis of genes involved in oxaliplatin response and development of oxaliplatin-resistant HT29 colon cancer cells. International journal of oncology 2006;29(1):225.

148. du Plessis-Stoman D, du Preez JGH, Van de Venter M. Combination treatment with oxaliplatin and mangiferin causes increased apoptosis and downregulation of NFκB in cancer cell lines. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 2011;8(2).

149. Morelli MP, Cascone T, Troiani T, De Vita, F, Orditura M, Laus G, et al. Sequence-dependent antiproliferative effects of cytotoxic drugs and epidermal growth factor receptor inhibitors. Annals of Oncology 2005;16(4):iv61-iv68.

150. Yılmaz E, Altunok V. Kanser ve p53 Geni. Avkae Dergisi 2011;1:19-23.

151. Chan LP, Chou TH, Ding HY, Chen PR, Chiang FY, Kuo PL, et al. Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor-and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 2012;1820(7):1081-1091.

152. Kim SL, Kim SH, Trang KTT, Kim IH, Lee SO, Lee ST, et al. Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil in combination with parthenolide in human colorectal cancer. Cancer letters 2013;335(2):479-486.

153. Guo LD, Shen YQ, Zhao XH, Guo LJ, Yu ZJ, Wang D, et al. (2015). Curcumin combined with oxaliplatin effectively suppress colorectal carcinoma in vivo through inducing apoptosis. Phytotherapy research 2015;29(3):357-365.

154. Koçak N, Yıldırım İH, Yıldırım SC. p53 ve p53 gen ailesi üyeleri olan p63 ve p73'ün hücresel işlevleri. Dicle Medical Journal/Dicle Tıp Dergisi 2011;38(4).

155. Tortora G, Caputo R, Pomatico G, Pepe S, Bianco AR, Agrawal S, et al. Cooperative inhibitory effect of novel mixed backbone oligonucleotide targeting protein kinase A in combination with docetaxel and anti-epidermal growth factor-receptor antibody on human breast cancer cell growth. Clinical cancer research 1999;5(4):875-881.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1. Kalın bağırsağın başlıca bölümleri 3

Şekil 2. Dünyada kolon kanseri görülme sıklıkları 4

Şekil 3. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) 5

Şekil 4. Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) 5

Şekil 5. Genetik değişikliklerin birikimi 7

Şekil 6. Wnt/β-katenin sinyal yolağı 8

Şekil 7. Hücre siklusu 10

Şekil 8. Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler 12

Şekil 9. Ölüm reseptörleri yolağı 14

Şekil 10. Mitokondriyal yolak 15

Şekil 11. Cetuximab EGFR sinyal kaskadına etkisi 23

Şekil 12. Oxaliplatinin moleküler yapısı 24

Şekil 13. 5-Florourasil ve urasilin moleküler yapısı 25

Şekil 14. HT-29 hücre hattında 1-90 µl doz aralıklarında ABS uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....38

Şekil 15. HT-29 hücre hattında 0,1-50 µM doz aralıklarında 5-Florourasil uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....39

Şekil 16. HT-29 hücre hattında 0,01-100 µg/ml doz aralıklarında Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....40

Şekil 17. HT-29 hücre hattında 0,02-10 µg/ml doz aralıklarında Cetuximab uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....41

Şekil 18. HT-29 hücre hattında ABS ve 5-Florourasil'in aynı anda uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....42

Şekil 19. HT-29 hücre hattında ABS ve Oxaliplatin'in aynı anda uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....44

Şekil 20. HT-29 hücre hattında ABS ve Cetuximab'ın aynı anda uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....45

Şekil 21. HT-29 hücre hattında önce ABS sonra 5-Florourasil uygulamasının hücre canlılığına etkisi 46

Şekil 22. HT-29 hücre hattında önce ABS sonra Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi 48

Şekil 23. HT-29 hücre hattında önce ABS sonra Cetuximab uygulamasının hücre canlılığına etkisi 49

Şekil 24. HT-29 hücre hattında önce 5-Florourasil sonra ABS uygulamasının hücre canlılığına etkisi 51

Şekil 25. HT-29 hücre hattında önce Oxaliplatin sonra ABS'nin uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....53

Şekil 26. HT-29 hücre hattında önce Cetuximab sonra ABS uygulamasının hücre canlılığına etkisi 54

Şekil 27. HT-29 hücre hattında Tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A:Kontrol, B:ABS, C:5-Florourasil, D:Oxaliplatin, E:Cetuximab Uygulaması.....56

Şekil 28. HT-29 hücre hattında madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları. A: Kontrol, B: ABS, C: 5-Florourasil Uygulaması.....58

Şekil 28. (Devamı) HT-29 hücre hattında, madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları. D:Oxaliplatin, E: Cetuximab Uygulaması.....59

Şekil 29. HT-29 hücre hattında Tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Aynı anda 5-FU ve ABS, B: Önce ABS sonra 5-FU, C:Önce 5-FU sonra ABS 60

Şekil 30. HT-29 hücre hattında madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları. A: Aynı anda 5-FU ve ABS, B: Önce ABS sonra 5-FU, C:Önce 5-FU sonra ABS 61

Şekil 31. HT-29 hücre hattında Tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Aynı anda Oxaliplatin ve ABS, B: Önce ABS sonra Oxaliplatin, C:Önce Oxaliplatin sonra ABS.....62

Şekil 32. HT-29 hücre hattında madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları. A: Aynı anda Oxaliplatin ve ABS, B: Önce ABS sonra Oxaliplatin, C:Önce Oxaliplatin sonra ABS.....63

Şekil 33. HT-29 hücre hattında Tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Aynı anda Cetuximab ve ABS, B: Önce ABS sonra Cetuximab, C:Önce Cetuximab sonra ABS 64

Şekil 34. HT-29 hücre hattında madde uygulaması yapılan hücrelerin hücre boyutları, PI (Kırmızı) ve Annexin V (Yeşil) floresan yoğunlukları. A:Aynı anda Cetuximab ve ABS, B: Önce ABS sonra Cetuximab, C:Önce Cetuximab sonra ABS 65

Şekil 35. HT-29 hücre serisine 5-Florourasil, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda p53 gen ekspresyonu değişimi.....66

Şekil 36. HT-29 hücre serisine 5-Florourasil, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda Bcl-2 gen ekspresyonu değişimi.....67

Şekil 37. HT-29 hücre serisine 5-Florourasil, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda bax gen ekspresyonu değişimi.....67

Şekil 38. HT-29 hücre serisine 5-Florourasil, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda sitokrom c gen ekspresyonu değişimi.....68

Şekil 39. HT-29 hücre serisine 5-Florourasil, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda apaf-1 gen ekspresyonu değişimi 69

Şekil 40. HT-29 hücre serisine 5-Florourasil, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda kaspaz-3 gen ekspresyonu değişimi 69

Şekil 41. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda p 53 gen ekspresyonu değişimi.....70

Şekil 42. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda Bcl-2 gen ekspresyonu değişimi.....71

Şekil 43. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda bax gen ekspresyonu değişimi.....71

Şekil 44. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda sitokrom c gen ekspresyonu değişimi.....72

Şekil 45. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda apaf-1 gen ekspresyonu değişimi 73

Şekil 46. HT-29 hücre serisine Oxaliplatin, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda kaspaz-3 gen ekspresyonu değişimi 73

Şekil 47. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda p53 gen ekspresyonu değişimi..... 74

Şekil 48. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda Bcl-2 gen ekspresyonu değişimi..... 75

Şekil 49. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda bax gen ekspresyonu değişimi..... 75

Şekil 50. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda sitokrom c gen ekspresyonu değişimi..... 76

Şekil 51. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda apaf-1 gen ekspresyonu değişimi 76

Şekil 52. HT-29 hücre serisine Cetuximab, ABS ve kombinasyonları uygulanmış gruplarda kaspaz-3 gen ekspresyonu değişimi 77

TABLOLAR

Sayfa No

Tablo 1. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler 12

Tablo 2. Kaspazlar 13

Tablo 3. Doğal ürünlerden geliştirilen ilaçlar 16

Tablo 3. (Devamı) Doğal ürünlerden geliştirilen ilaçlar..... 17

Tablo 4. Başlıca bitkisel kemoterapötik ilaçlar ve elde edilen bitkiler kaynak 18

Tablo 5. Mikroorganizma kökenli kemoterapötik ajanlar ve elde edildiği mikroorganizmalar 18

Tablo 6. Ampul formunda Ankaferd Blood Stopper®içerikleri 22

Tablo 7. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler 28

Tablo 7. (Devamı) Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler 29

Tablo 8. Deneylerde kullanılan alet ve malzemeler..... 29

Tablo 9. cDNA mix için hazırlanması gereken maddeler 34

Tablo 10. Thermal Cycler cihazında uygulanan program..... 34

Tablo 11. RT PCR karışımında bulunan maddeler..... 35

Tablo 12. Çalışmada kullanılan primerler 35

Tablo 13. CI değerleri değerlendirme tablosu 36

Tablo 14. ABS ve 5-FU'nun aynı anda uygulamasının CI değerleri..... 43

Tablo 15. ABS ve Oxaliplatin'in aynı anda uygulamasının CI değerleri 44

Tablo 16. ABS ve 5-FU'nun aynı anda uygulamasının CI değerleri..... 46

Tablo 17. Önce ABS ve sonra 5-FU'nun uygulamasının CI değerleri..... 47

Tablo 18. Önce ABS ve sonra Oxaliplatin uygulamasının CI değerleri..... 49

Tablo 19. Önce ABS ve sonra Cetuximab uygulamasının CI değerleri 50

Tablo 20. Önce 5-FU ve sonra ABS uygulamasının CI değerleri 52

Tablo 21. Önce Oxaliplatin ve sonra ABS uygulamasının CI değerleri..... 53

Tablo 22. Önce Cetuximab ve sonra ABS uygulamasının CI değerleri 55

ÖZGEÇMİŞ

01.09.1990 tarihinde Kastamonu'da doğdum. İlköğrenimimi İstanbul Güngören Ali Fuat Cebesoy İlköğretim Okulu ve İncirlibahçe İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Ortaöğrenimimi İstanbul Güngören Osman Ülkümen Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde tamamladım. Lisans eğitimimi ise Adnan Menderes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde birincilikle tamamladım. 2013 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım ardından ÖYP programı ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümünün yüksek lisans programına yerleştim ve aynı bölümde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.