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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İlker DIBIRDIK

ANKAFERD BLOOD STOPPER KANAMA DURDURUCUNUN *İN VİTRO* MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN ÇOĞALMALARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Çiğdem FİDAN

Referans no: 10077630

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* MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN ÇOĞALMALARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Çiğdem FİDAN

Destekleyen Kurum : TÜBAP 2016/65

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 Çiğdem FİDAN tarafından tez başlığı "Ankaferd Blood Stopper Kanama Durdurucunun *İn Vitro* Meme 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

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim yüksek lisans eğitimim süresince bana emek veren, yönlendiren ve motive eden tez danışman hocam sayın Prof. Dr. İlker DIBIRDIK başta olmak üzere benden yardımlarını esirgemeyen, bilimsel katkıları ile bana yol gösteren, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, sayın Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, sayın Prof Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, sayın Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a ve bana hep yol gösterici olan Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı olan hocam sayın Doç. Dr. Savaş GÜZEL'e ayrıca tez çalışmamı proje olarak destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve başta Araş. Gör. Büşra DİLER ZENGİNER olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **KANSER NEDİR?** 3
- **KANSER CERRAHİSİ ORTAK TEDAVİ YÖNTEMLERİ** 6
- **İN VİTRODA KANSER ARAŞTIRILMASININ ÖNEMİ** 7
- **KANSER YOLAKLARINA GENEL BAKIŞ** 7
- **KANSER ORANLARI** 10
- **MEME KANSERİ** 12
- **APOPTOZİS** 13
- **HÜCRE DÖNGÜSÜ VE APOPTOZİS** 19
- **ANKAFERD** 20
- **DENEYDE KULLANILAN KEMOTERAPÖTİK İLAÇLAR** 26

GEREÇ VE YÖNTEMLER 31

BULGULAR 39

TARTIŞMA 100

SONUÇLAR 113

ÖZET 115

SUMMARY 117

KAYNAKLAR 119

RESİMLEMELER LİSTESİ 135

ÖZGEÇMİŞ 140

SİMGE VE KISALTMALAR

AB : Avrupa birliği
ABS : Ankaferd kanama durdurucu
AIF : Apoptoz indükleyici faktör
AMP : Adenozin monofosfat
ATP : Adenozin trifosfat
AP2 : Protein 2
AR : Androjen reseptörü
APAF-1 : Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
BAX : Bcl-2 bağımlı X protein
Bcl-2 : B hücreli lenfoma 2 geni
BRCA : Meme kanserine duyarlılık
Cdks : Siklin bağımlı kinazlar
cDNA : Komplementer deoksiribo nükleik asit
CI : Kombinasyon indeksi
CKI : Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CREB : Siklik AMP cevap elementi bağlama proteini
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : Dimetil sülfoksit
DNA : Deoksiribonükleik asit
EGFR : Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMEM : Eagle's minimum essential medium
ERK : Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
GTP : Guanidin trifosfat
ICE : İnterlökin konverting enzım

IL **:** İnterlökin

JAK/STAT **:** Janus kinase/signal-transducer and activator of transcription protein

JNK **:** c-Jun NH2- terminal kinaz

MAPK **:** Mitojenle etkileşen protein kinaz

MCF-7 **:** Meme kanseri hücreleri

MTT **:** Mitokondriyal toksisite testi

NF1 **:** Nükleer faktör 1

OD **:** Optik Dansite

P53 **:** Protein 53

PBS **:** Fosfat tamponu çözeltisi

PI3K **:** Fosfoinozitid-3 kinaz

PPAR **:** Peroksizom proliferatör active edici reseptörü

PS **:** Fosfotidil serin

RAS **:** Rat sarcoma virüsü

RAF **:** Ras ilişkili faktör

RNA **:** Ribonükleik asit

RT-PCR **:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

TNF-α **:** Tümör nekroz faktörü- α

GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, 60 yaş üzeri kadınlarda tüm yeni kanser vakalarının % 30'unu oluşturmaktadır (1-6). Cerrahi işlem, koruyucu kemoterapi, hormonal terapi ve radyoterapi gibi tedavilerin yaşam ömrünü iyileştirdiği ve tümörün tekrar ortaya çıkma riskini azalttığı gösterilse de, meme kanseri kadınlarda önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak kalmaktadır (1-6). Kanser teşhisi konan hastalar için mevcut tedavilerdeki önemli gelişmelere ve bu tedavilerin sağ kalım üzerindeki olumlu etkilerine rağmen, mevcut kemoterapi veya radyasyon tedavisi; uyku bozukluğu, depresyon, bulantı, endişe, yorgunluk ve kusma gibi çeşitli travmatik yan etkilere neden olmaktadır (7,8). Bu yüzden tamamlayıcı ve alternatif tıp ile tedavide kullanılan konvensiyonel ilaçlara ek olarak, doğal bileşiklerin etkileri araştırmaya alınmıştır.

Apoptoz, birçok yaşam evresinde önemli bir rol oynayan normal fizyolojik bir süreçtir (9,10). Apoptozdaki bozukluklar, birçok kanser tipinde yaygın olarak görülmektedir (9-11). Bu nedenle apoptoz yollarının modülasyonu ve apoptozun kimyasal ajanlar tarafından seçici olarak indüklenmesi, kanser tedavisinde umut verici bir yaklaşımdır (12,13).

Birçok tümör hücresi, örneğin; anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarını azaltmak veya mutasyona neden olmak gibi, apoptozdan kaçınmak için mekanizmalar geliştirir (14-17). Apoptoz ile sonuçlanan iki sinyal yolağı vardır; ekstrinsik ölüm reseptörü yolu ve iç mitokondriyal yol (15-17). Bu nedenle, antikanser ilaçların hedef noktasında bu iki yolak bulunmaktadır. Apoptoz yolağını hedeflemek, malign tümörlerin tedavisi için önemli kemoterapötik stratejilerden biridir ve bu yol kemoterapötik ajanların çoğunun hedef noktasıdır (15-17). Bu nedenle, terapötik etkinliğini etkilemeden kemoterapi ve radyoterapi dozunu azaltmanın yollarını bulmak, tümör tedavisi için önemli bir özellik olmaktadır.

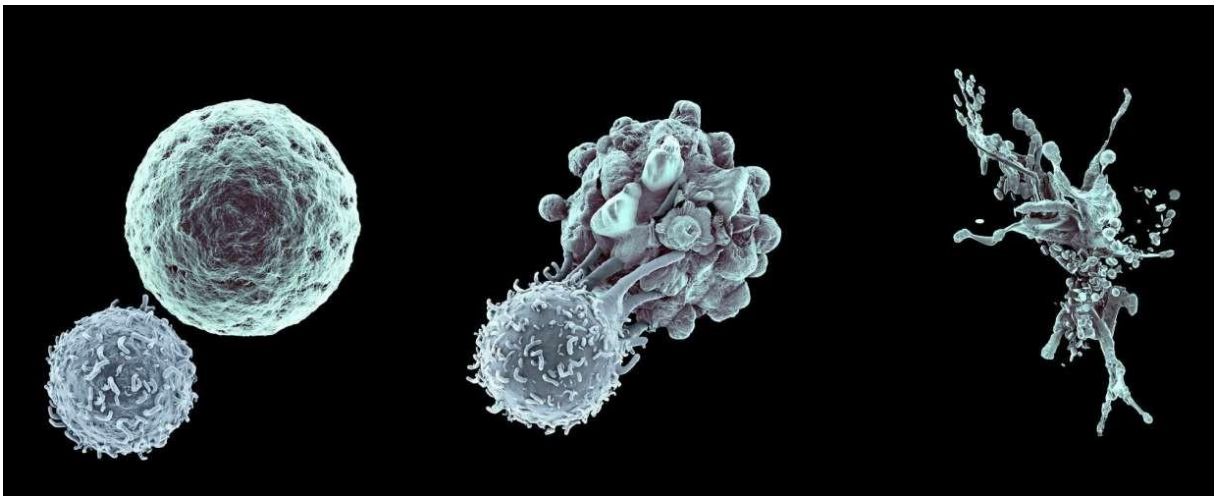
Apoptozun çok karmaşık bir süreç olması ve çok sayıda sinyal molekülü içermesi, kanser tedavisinde apoptozun indüklenmesindeki başarısızlığın başlıca nedenlerinden biridir. Bu yüzden kullanılan yöntemlere ek olarak, insan hücreleri üzerinde biyolojik olarak aktif olan doğal bileşiklerin etkileri araştırmaya alınmıştır (18).

Kanser tedavisinde düzenli olmayan apoptozun restorasyonu, yeni kemoterapötiklerin geliştirilmesi için bir yaklaşım olarak önerilmektedir. Bu çalışmada; hemostatik aktivitesi ile bilinen ve bitki ekstratlarının karışımından oluşan ABS'nin (Ankaferd Bloodstoper) insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerine apoptotik etkisi araştırıldı. ABS; *Thymus vulgaris, Glycyrrhiza glabra, Vitis vinifera, Alpinia officinarum* ve *Urtica dioica*'dan oluşan bitki ekstratlarının bir karışımıdır. Bu bitkilerin her biri endotel, kan hücreleri, anjiogenezis, hücre proliferasyonu ve hücre aracıları üzerinde bazı etkilere sahiptir (19,20). Daha ileri ki çalışmalar için başlangıç niteliğinde olan bu çalışma ile ABS'nin tek başına ve bazı konvensiyonel ilaçlarla kombinasyon halinde uygulanmasının, sitotoksik etkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

KANSER NEDİR?

Kanser, tümör gelişim faktörleri tarafından yönetilen hücrelerin anormal çoğalması ve farklılaşmasının neden olduğu bir hastalıktır (Şekil 1). Yüzden fazla kanser çeşidi ve alt türleri belirli organlarda bulunmaktadır. İnsan tümörlerinin çoğu; büyüme sinyalleri konusunda kendine yetme, büyümeyi önleyici sinyallere duyarsız olma, programlı hücre ölümünden kaçınma, sınırsız replikasyon potansiyeli, sürekli anjiyogenez, doku istilası ve metastazı içeren tümör gelişimi sırasında ortaya çıkan altı fizyolojik özellikle karakterize olmakla birlikte dünyada ikici ölüm nedenidir (21).



Şekil 1. Kanser hücreleri (14)

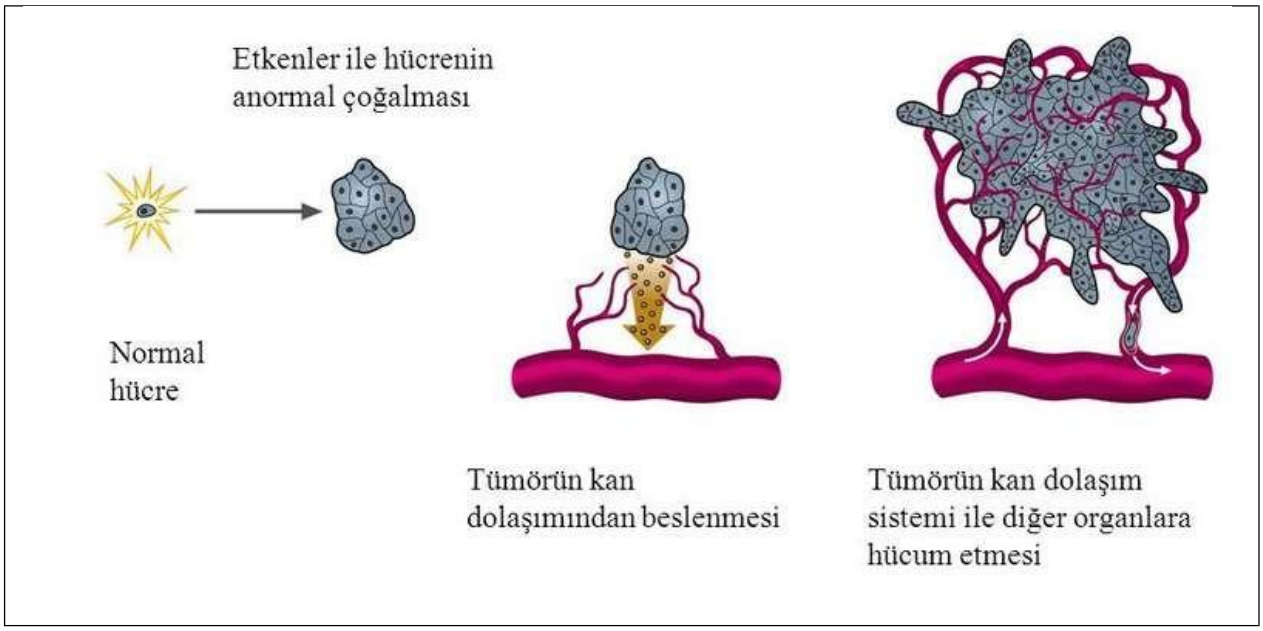
Kanser, esasen vücuttaki tüm hücrelerin çekirdeğinde bulunan genlerde mutasyona neden olarak, benign veya malign olabilir. Kanserli hücreler vücudun belirli bir organında lokalize olursa, benign tümör olarak adlandırılır, ancak bu tümör hücreleri diğer organlara

doğru göç etmeye başladığında malign hale gelir (6,7).

Kanser hücreleri, normal hücrelerde bulunmayan aşırı büyüme hızına sahip hücrelerdir. Kanser hücrelerinde hücreye glikoz girişi artarken, büyüme faktörleri salgılayarak ya da aşırı DNA üretimi gerçekleştirerek çoğalmaya devam edebilir, bulunduğu bölgeye yayılarak alanını genişletebilir ve normal hücreye fiziksel ve biyokimyasal olarak benzer özelliklere sahip hale gelebilmektedir. Metastaz ise, kanser hücresinin kaynak olarak bulunduğu bölgeden ayrılarak yeni bir dokuda tekrardan oluşması gibi bir takım farklı özellikler gösterir. Kansere neden olan birçok gen mevcut olduğu gibi, bu genler üzerinde de farklı noktalarda mutasyonlar tanımlanmıştır. Ayrıca, aynı kanser türüne sahip kişilerde hastalık farklı bölgelerdeki genetik mutasyonlardan olabilirken, aynı genetik bölgedeki değişimler farklı kanserlerin gelişimine de neden olabilir. Sonuç olarak, kanser gelişimi anlaşılması zor ve kompleks etkileşime sahip olan bir süreçtir (7,8).

Hücreler içerisinde bulunan genetik materyalde meydana gelen mutasyonlar, hücre çoğalmasının artmasına yol açar. Mutasyona uğrayan hücreler, çoğalıp sayılarını arttırmaya başlayarak normal hücrelerin yerini almaya başlar ve yayılırlar. İlk süreçte gendeki bir fonksiyon bozukluğundan dolayı ortaya çıkarak, çeşitli bölgelerinde meydana gelen hasarların birikimi ile devam ederler. Oluşan bu gen, mitozla çoğalmayı sürdürüp DNA yapısında kalıcı hasara yol açar ve hücresel fonksiyonların yapısını değiştirmeye başlayarak tümör hücresine dönüşür (14-17).

Bazen de somatik genlerdeki değişimden dolayı ortaya çıkan ve yatkınlık yaratan mutasyonlar, aileden kalıtımsal olarak aktarılabilmektedir. Kanserlerin %10- 15'inin, kalıtımsal olduğu, yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90'lık kısmını ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile meydana geldiği düşünülmektedir (4,14,21). Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanser dokusunun oluşmasını sağlar (Şekil 2). Kanser multifaktöriyel olup, bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumuna sebep olabilir. Tüm bu etkiler de, kanserin doğal bir evrimsel süreç olduğunu düşündürebilir (14,21-23).



Şekil 2. Kanserin yayılımı (14)

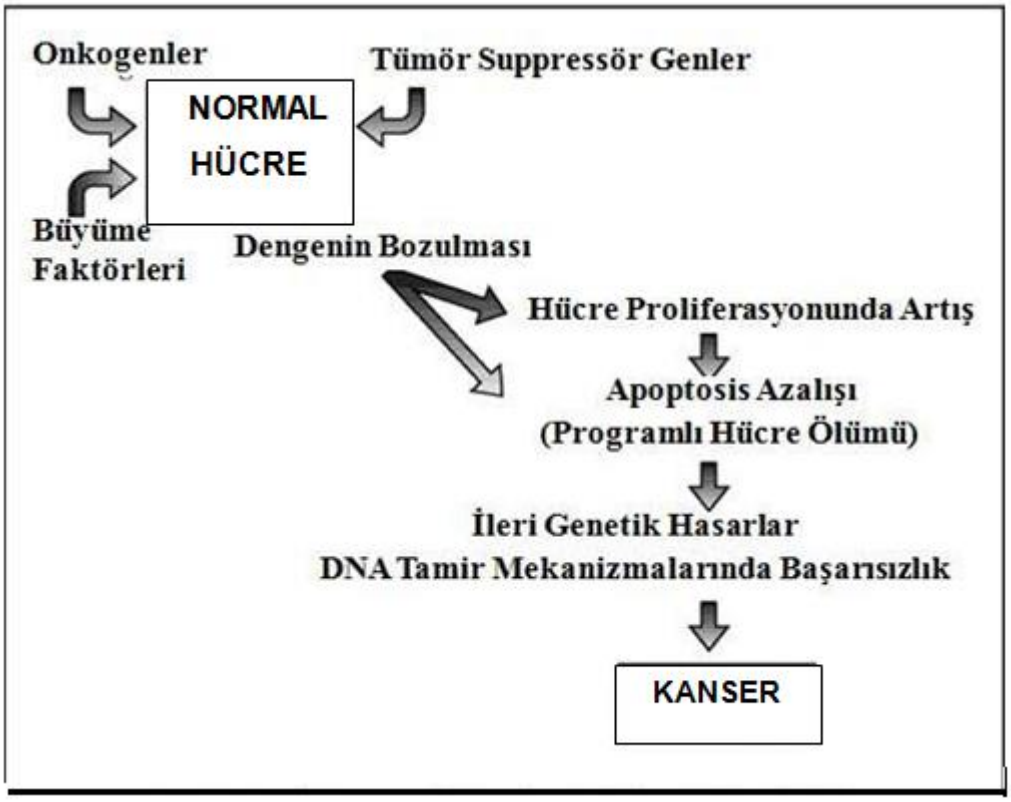
Kansere neden olan genler, iki farklı başlık altında toplanmaktadır. Bunlar; onkogenler ve tümör süpressör genlerdir.

Onkogenler

Hücre farklılaşması ve proliferasyonu üzerinde etkili olan genlerdir. Normal şartlar altında genetik değişimlerin olmadığı durumlarda, bu yapılara protoonkogenler denilmektedir. Fonksiyonel değişikliğe sebep olan mutasyonların gözlenmesi halinde ise, onkogen olarak adlandırılıp aşırı hücre çoğalmasına sebep olurlar (Şekil 3) (21,22). Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü kromozomal translokasyonlar, nokta mutasyonları, gen amplifikasyonu, promotor ve arttırıcı ilavesi sonucunda büyüme faktörlerinin üretimi artarak hücre bölünmesi üzerindeki kontrol kaybolmakta, hücre membranında büyüme faktörü uyarısıyla başlayıp çekirdeğe ulaşan sinyal ileti sistemi kontrolsüz uyarılarak çekirdekte transkripsiyon faktörlerinin sentezi artmakta ve hücre kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam etmektedir (23).

Tümör Süpressör Genler

Hücre proliferasyonunu baskılayan ve kontrol altında tutan genlerdir. Etkilerini; bozulan hücre döngüsünün sürmesine engel olup, hücre DNA'sının replikasyonu, tamiri ile ayrılmasının düzgün gerçekleşmesini sağlayarak ve gerekli durumlarda hücreleri apoptozise yönlendirerek genomun stabil kalmasını sağlar ve böylece mutasyon oranlarını düşük seviyede tutarak etki etmiş olurlar (21).



Şekil 3. Onkogenler ve tümör supressör genlerin hücreye etkisi (21)

KANSER CERRAHİSİ ORTAK TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Kanser, tümör oluşturucu faktörler tarafından yönlendirilen, hücrelerin anormal çoğalmasına ve farklılaşmasına neden olan bir hastalıktır. Kemoterapi, en önemli kanser tedavi yöntemlerinden biridir. Doku invazyonu ve metastaza giden, sürekli proliferasyonu ve anjiyogenezi içeren kanser hücrelerini hedefleyerek işlev görür (24).

Kemoterapi, kanser tedavisinin geleneksel bir yöntemi olarak, genellikle sitotoksik ajanlar kullanılarak gerçekleştirilir. Radyoterapi, meme kanserinde lenf nodu metastazının lokal tedavisinde hayati bir rol oynamaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi, kanser tedavisinde en yaygın yöntemler olarak kabul edilmesine rağmen, bu tedavi yöntemleri her zaman yararlı olmadığı gibi klinik sonuçları da kabul edilebilir değildir (25). Çünkü, kemoterapi ve radyoterapinin hem normal hem de tümör hücrelerine etkisi vardır, bu da hastada yan etkileri olabileceği anlamına gelir ve toksisite daima doza bağımlı olarak seyreder (1-6). Bu yüzden normal dokunun etkilenmeden kanser dokusunun tamamen yok edilmesi, tedavinin başlıca hedefidir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kanser hastalarının yaklaşık % 50-60'ı kemoterapi ve radyasyona ek ve eş zamanlı olarak tamamlayıcı tıp adı altında tedaviye girmiş doğal kökenli maddeleri kullanmaktadır (1,20).

İN VİTRO OLARAK KANSER ARAŞTIRILMASININ ÖNEMİ

İn vitro tümör modelleri kanser araştırmaları ve ilaç tedavileri için düşük maliyetli tarama platformlarına izin verdiği için önemlidir. Ancak kanserin nüksetmesi, kansere bağlı ölümlerin çoğunluğunun nedeni olan metastazdan dolayı büyük ölçüde kontrolsüz kalır. Kanser tedavisinin ve ilerlemesinin daha iyi anlaşılması için gerekli yüksek doğruluk ve *in vitro* tümör modellerinin fizyolojik uygunluğuna ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak, *in vitro* tümör modelleri daha kompleks hale gelmiş ve bunların çıkış parametreleri daha çeşitlendirilmiş olup, bu modeller proliferasyon, invazyon, sitotoksite taraması ve metastatik kaskadın kritik basamaklarında intravazasyon, ekstravazasyon, anjiyogenez, matriks oluşumu ve tümör hücre engeli gibi durumlar için yinelenmiştir (26).

Tümör hücre biyolojisi, 3D hücre kültürü, doku mühendisliği, biyomalzeme, mikroimalat ve mikroakışkan gelişmeler *in vitro* tümör modellerinde hızlı ve yeni gelişim sağlamıştır (26).

KANSER YOLAKLARINA GENEL BAKIŞ

Karsinogenezisin temelinde; hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır (27). Bu nedenle, kanserlerde ilk etkilenen mekanizma genellikle hücre içindeki sinyal iletim yolakları olmakta, bunların problemlerinden başta kanser olmak üzere farklı hastalıklar oluşabilmektedir (28).

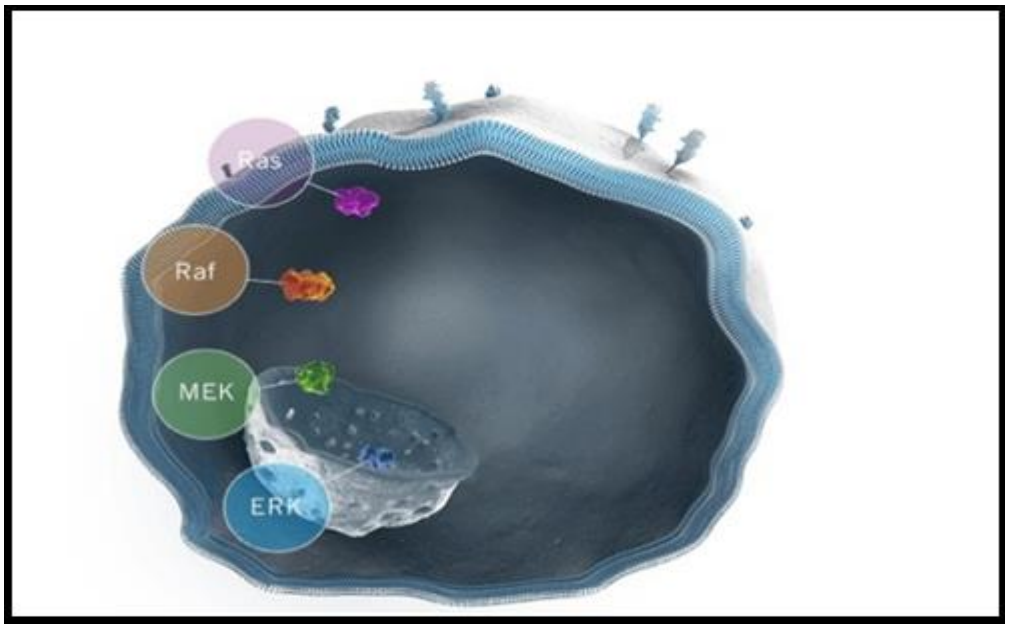
Hücre sinyal iletiminde, protein kinazlar aktif olarak rol alır. ATP'den substrata eklenecek fosfat aktifleşmesini sağlayarak, diğer basamaklara uyarının aktarılması ve devam etmesini sağlar. Protein kinazlar içerisinde yer alan önemli iletim mekanizmalarından biri, tirozin kinazlardır. Tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler, serin/treonin kinaz üzerinden çalışan Ras/Raf/MEK/MAPK gibi sistemleri kullanarak etki gösterirler (ör; Interlökin 3: IL-3). Uyarı, bu adaptör proteinler üzerinden sinyal transdüksiyon faktörlerine iletilir. Gen transkripsiyonunun uyarılması sonucunda da, apoptoz veya proliferasyon/hücre onarımı yapılmaktadır (29).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) / HER1 ayrıca ErbB1 olarak da bilinir ve ErbB reseptör tirozin kinazların ailesinin bir üyesidir ve dört farklı transmembran reseptöründen oluşur (HER1-HER4). HER1/EGFR ve HER2/c-erb-B2 bu aile üyelerinden tamamen araştırılmış olup, bazı kanser türlerinin patogenezinde yer aldığı bilinen üyelerdendir (30).

Normal hücrelerde, HER aktivasyonu süreci dikkatle düzenlenerek hücre büyümesi kontrol altında tutulur. Kanserde HER reseptörleri, tümör hücrelerinin kontrolsüz büyümesine ve yayılmasına yol açarak, uygun olmayan bir şekilde aktive olabilirler (31). HER reseptörlerinin aşırı ekspresyonu, sinyalizasyonda artışa yol açarak genetik mutasyonlar ve ligand bağlanması olmadan bile aktive olabilen HER reseptörlerinin üretilmesine yol açar (32). Tümörlerin hem HER ailesi reseptörlerini hem de ilişkili ligandlarını ekspre etmesi sonucunda, tümörün kendi büyümesini uyardığı bir otokrin halka meydana gelebilir (31).

Mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) yolu, Ras, Raf, MEK ve ERK sinyal moleküllerini içerir. Normal olarak, hücre dışı büyüme faktörleri tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak yolu etkiler ve MAPK yolunda sinyal molekülleri aracılığıyla kaskadın başlamasını uyarır. Sonuçta, MAPK yolağının aktivasyonu, hücre büyümesi, hücre çoğalması ve hücre farklılaşması gibi temel hücresel işlevlerin düzenlenmesinde yer alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonuna yol açar (33,34).

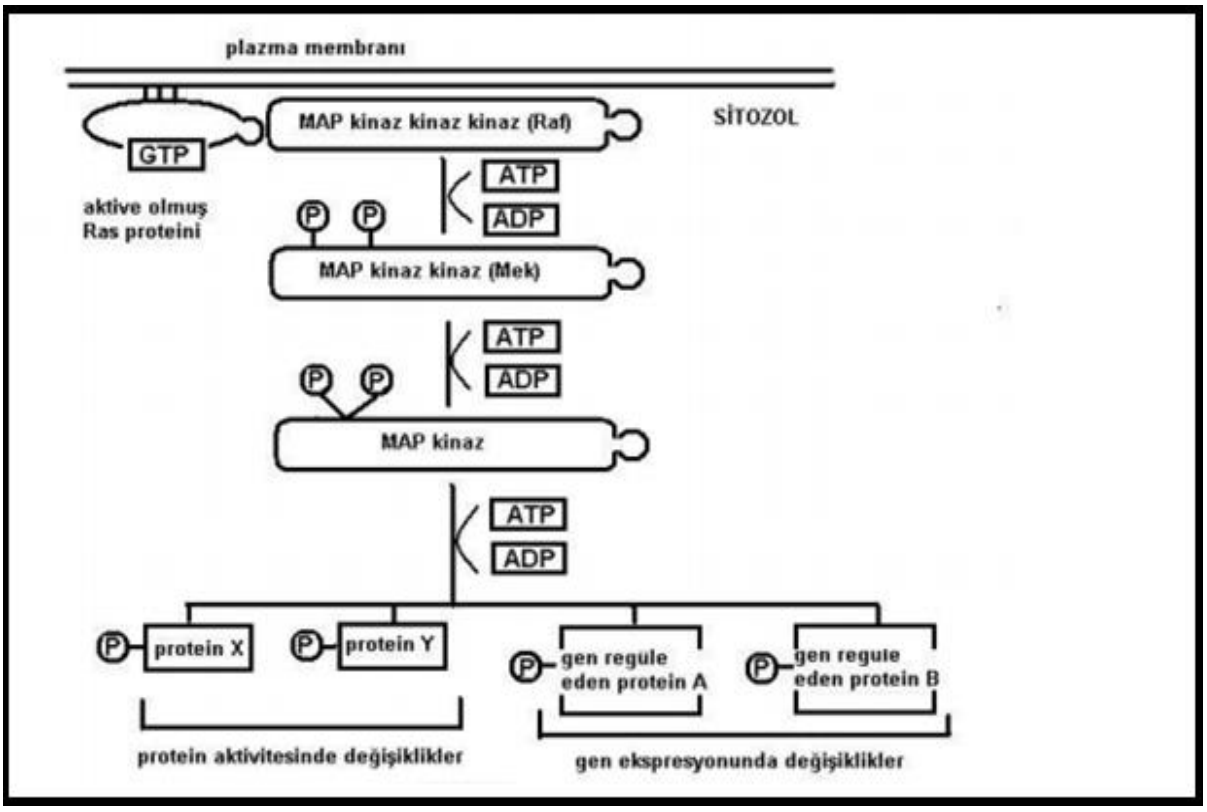
RAS proteini aktivasyonu ile aktif olan RAF/MEK/ERK sinyal iletim yolu (Şekil 4), insan kanserlerinin yaklaşık %30'unda etkilendiği bilinen önemli bir yolaktır (33,34).



Şekil 4. RAS proteini aktivasyonu ile aktif olan RAF/MEK/ERK sinyal iletim yolu (35)

Normal hücrelerde sinyal iletimini yaparak, gen ekspresyonunun aktivasyonunu sağlarlar. Kanser hücrelerinde, tirozin kinazlar veya RAS'ın onkogenik aktivasyonu sonucu MAPK sinyalleşmesi sıklıkla artmıştır. Bu MAPK yolağı, aynı zamanda klasik mitojenik kaskad veya standart yolak olarak düşünülmektedir ve sitoplazmada bulunan bu proteinler

hücre zarıyla çekirdek arasındaki sinyal mekanizmasında önemlidir. Ras proteinlerinin GTP molekülünü bağladıkları ve içsel GTPaz aktiviteleri olduğu, 1980'li yıllarda ortaya çıkarılmıştır. Ras onkoproteinlerini aktive eden mutasyonların, proteinin GTPaz aktivitesini bozarak GTP hidrolizini engelleyen mutasyonlar oldukları ve bunun sonucunda anormal aktivitelere sahip Ras-GTP formlarının birikerek, hücre çoğalmasını tetikledikleri de belirlenmiştir (36-40).



Şekil 5. Map kinazın yapmış olduğu etkiler (38)

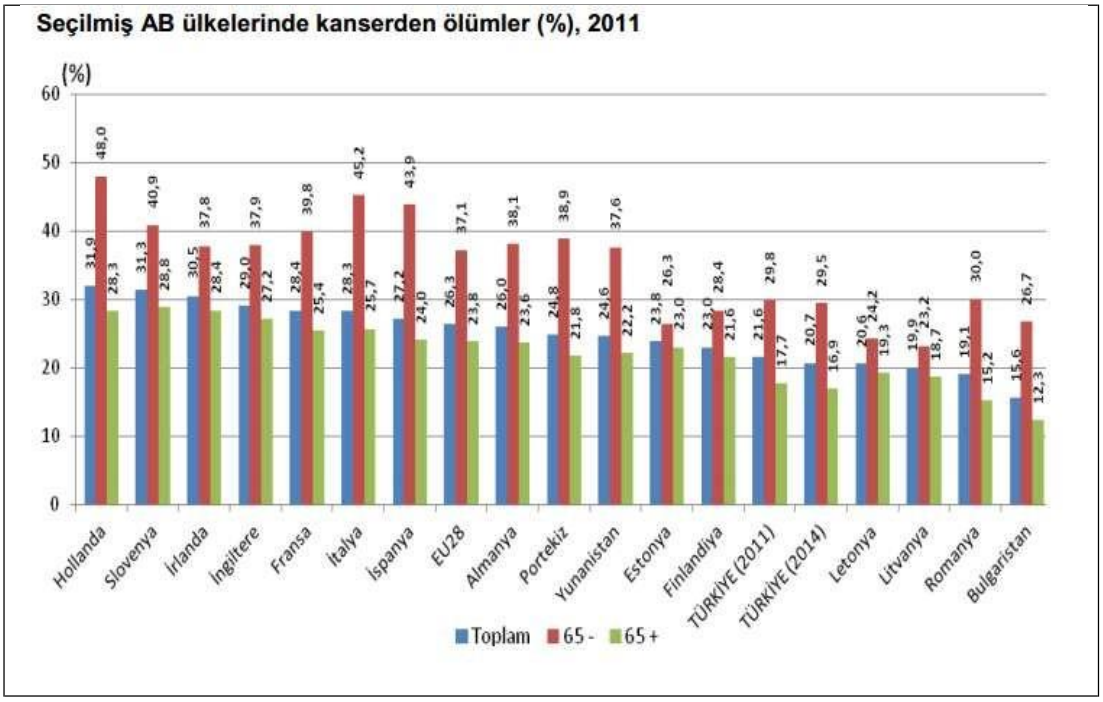
RAS Genleri

Bu genler ilk defa hayvanlarda tümör oluşturan Harvey (H-ras) ve Kirsten (K-ras) sarkoma virüslerinin tümör oluşturucu özelliklerinden sorumlu olarak tanımlamış ve insan hücrelerindeki hücresel eş değerlerinin, insan tümörlerinin gelişiminde rol oynayabileceğine yönelik ilk ipuçlarını sağlamışlardır. Ras gen ürünleri, plazma zarının iç yüzünde yerleşmiş olan protein grubudur. Guanin nükleotidlerini bağlayarak büyüme faktörlerinden çekirdeğe sinyal ileti yolları ile aktarılan mitojenik sinyalleri düzenleyen moleküler kontrol noktaları olarak çalışmaktadırlar (41,42).

KANSER ORANLARI

Türkiye'deki 5 Ölümden 1'i Kanserden Olmaktadır

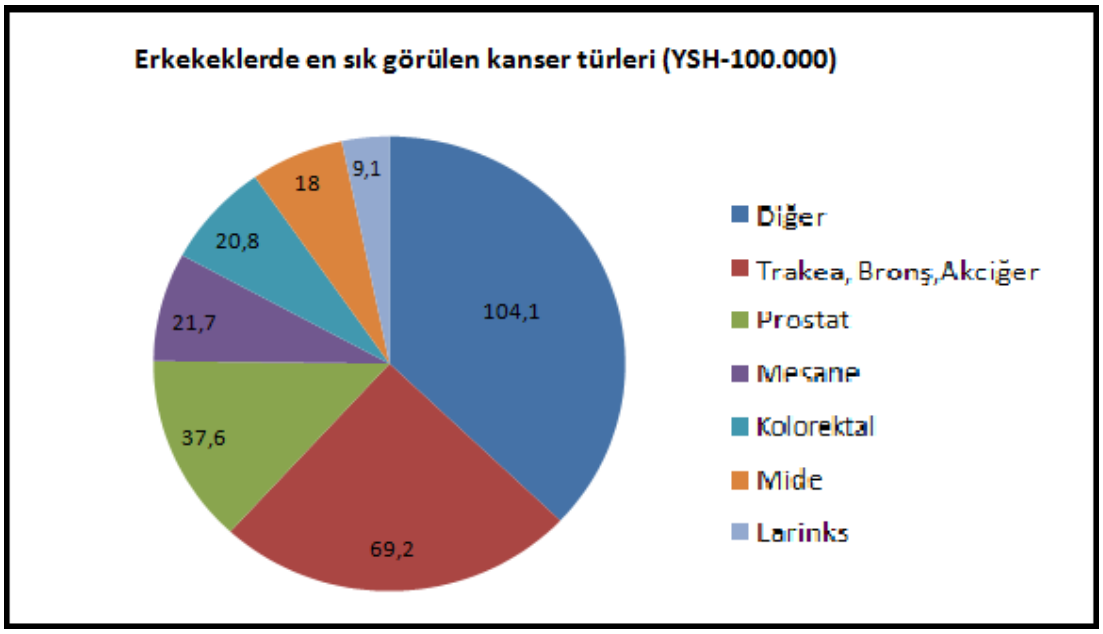
Avrupa Birliği'nin güncel verisi olan 2011 yılı incelendiğinde, Avrupa'daki her dört ölümden birinin kanserden kaynaklandığı ortaya çıkmaktadır. Kanserden ölümlerin toplam ölüm içindeki oranları dikkate alındığında, Türkiye'nin 2011 yılında % 20,7 ile bu sıralamanın 5. sırasında yer aldığı görülmektedir (43,44). Yaş faktörü göz önüne alındığında ise Avrupa'daki 65 yaş altı ölümlerden %37,1'inin, 65 yaş ve üzeri ölümlerden ise % 23,8'inin kanserden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Şekil6) (45).



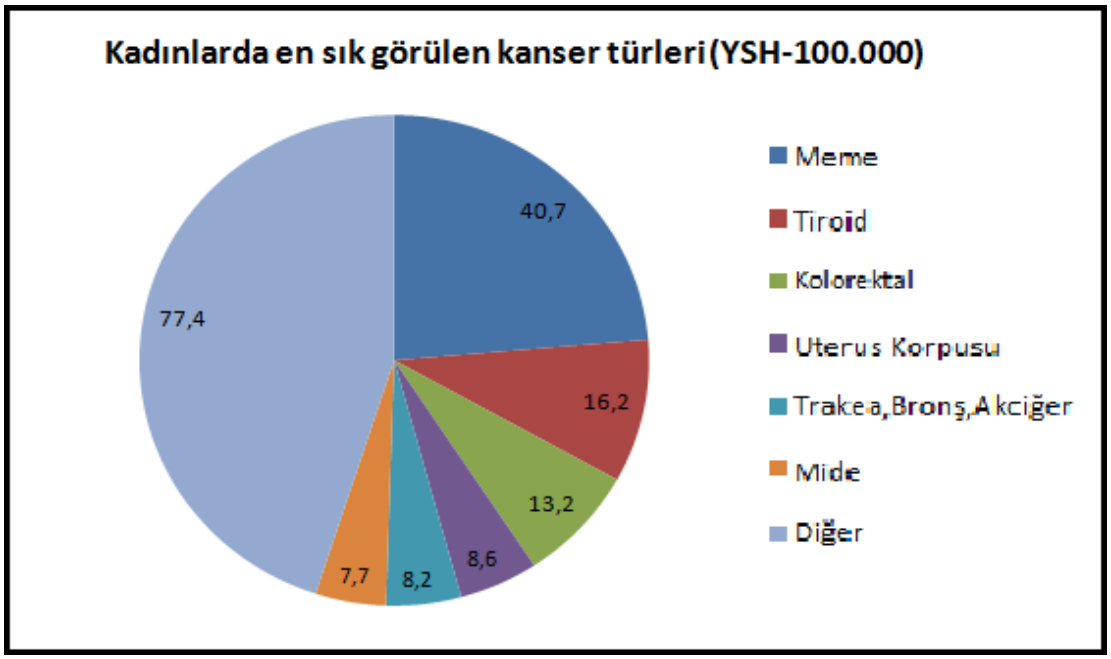
Şekil 6. Seçilmiş AB ülkelerinde kanserden ölüm oranları (45)

Ülkelerin 65 yaş altı oranları incelendiğinde, Türkiye 2011 yılında %29,5'lik oran ile alttan 6. sırada yer almaktadır. 65 yaş ve üstü oranlar incelendiğinde ise; Türkiye, 2011 yılında %16,9'luk oranla Bulgaristan ve Romanya'nın ardından en düşük 3. sırada yer almaktadır (43,44).

Dünyada, erkeklerde ilk üç sırayı alan kanser türleri, prostat, akciğer ve kolon iken (Şekil 7), Türkiye'de bu sıralama akciğer, prostat ve mesane şeklinde olmaktadır. Erkeklerde akciğer kanser insidansı Türkiye'de yüz binde yaklaşık 69'larda olup ortalaması ise yüz binde 30-35'lerde yer alırken, Avrupa Birliği ortalaması ise yüz binde 48 civarındadır (44,45). Meme kanseri, kadınlarda dünyada ve Türkiye'de en çok görülen kanser türüdür (Şekil 8).



Şekil 7. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri (45)



Şekil 8. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri (45)

MEME KANSERİ

Meme kanseri, kadınlarda görülen kanser tipleri arasında birinci sırada yer almaktadır (46). Hayat boyu her 8 kadından birinin kansere yakalanma riski olduğu bilinmektedir. Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerden gelişen kanserler olup meme dokusunun herhangi bir yerinden kaynaklanabilir. Çoğunlukla süt kanallarından veya süt toplama kanallarının lobüllerinden kaynaklanır. Meme kanserinin oluşum köküne bağlı olarakta, duktal veya lobüler karsinomlar olabilir Ayrıca diğer dokulardan kaynaklanan daha nadir medüller, tübüler, müsinöz gibi tipleri de vardır. Meme kanseri oluşumunda, genetik değişiklikler çok önemlidir. Genetik yapıda oluşan çeşitli faktörler ve normal yaşlanmanın etkisiyle ortaya çıkan bozukluklar, kansere neden olabilmektedir. Ancak, meme kanserlerinin sadece %7-9'luk bir kısmı ailesel geçişlidir. Özellikle anne tarafında genç yaşta meme kanseri ve erkek meme kanseri görülmesi, ailesel bir geçişe işaret edebilir (47).

Meme kanseri, esasen BRCA1 ve BRCA2 genlerinde kalıtsal mutasyonların neden olduğu bir hastalıktır. Aile öyküsüde ağırlıklı olarak meme kanseri patofizyolojisinde rol almaktadır. Meme kanserinin başlıca nedeni, hastalığın kişisel veya aile geçmişindeki hastalık öyküsü ile meme kanserindeki kalıtsal genetik mutasyonlardır. Gen ekspresyonunda görülen mutasyonlar, meme kanserlerinin tüm vakaları arasında yaklaşık %5-10 oranında bulunur (7,48). Meme kanserinde rol aldığı bilinen diğer faktörler arasında; obezite, hormon tedavisi (progestin ve östrojen) kullanımı, artmış meme dokusu yoğunluğu, alkol kullanımı ve fiziksel hareketsizlik sayılabilir (7,49).

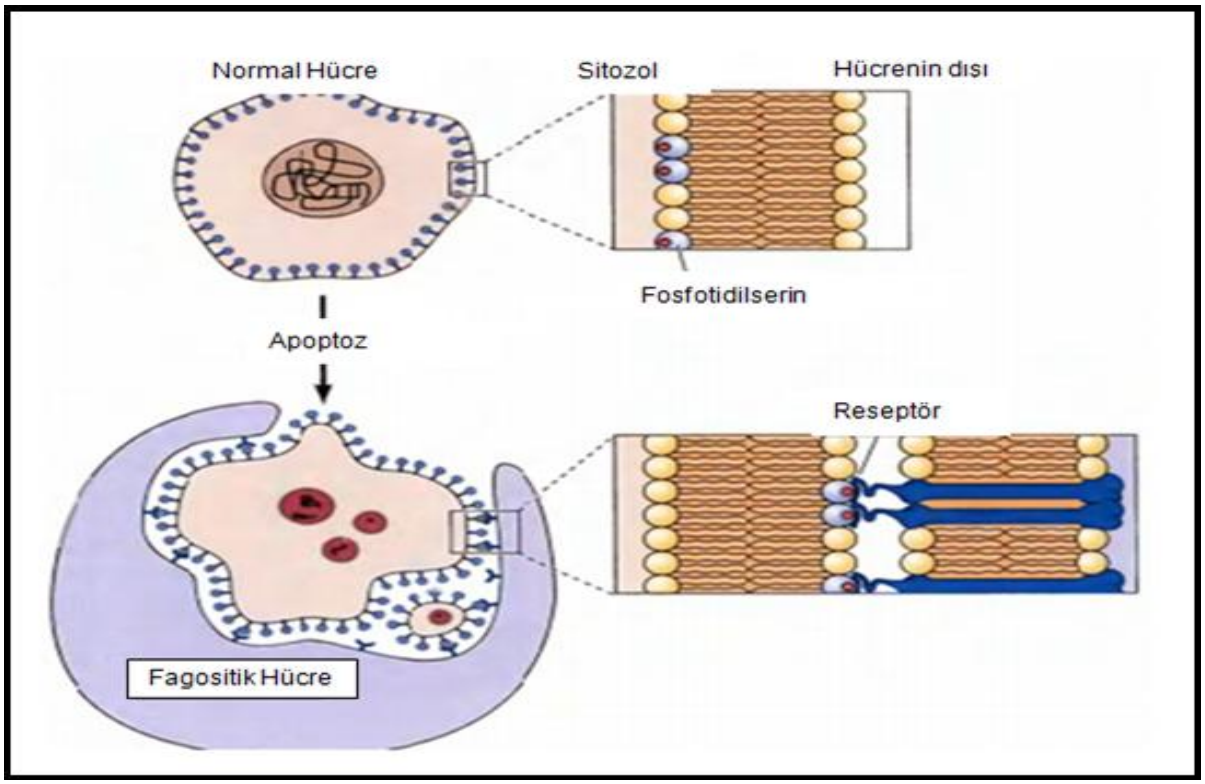
Normalde hücreler yaşam döngüsünü tamamladıktan sonra vücut için daha fazla gerekli olmadıklarında apoptoza gider. Apoptoza giden yolda bu yolaklar arasında; PI3K / AKT yolu ve RAS / MEK / ERK yolu bulunur. Bazen bu yollarla ilişkili genler mutasyona uğrar ve bu mutasyonlar; bu yolların sürekli olarak açık kalmasına neden olarak hücrenin sürekli bölünmesine ve çoğalmasına yol açıp yaşam ömrünün tamamlanmasından sonra hücre intiharını önlemiş olur. Normalde PTEN proteini, hücre apoptozisi sırasında PI3K / AKT yolağını kapatmaktan sorumlu proteindir. Ancak bazı durumlarda PTEN proteininde mutasyon olabilmekte ve bu durum tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına yol açmaktadır. Bir başka sorumlu etken, meme yağ dokularında leptinin aşırı ekspresyonunun olmasıdır. Bununla birlikte, meme kanseri doğrudan vücuttaki östrojen seviyelerine bağlıdır (48).

APOPTOZİS

Biyolojik bilimler literatüründe apoptozis terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (50,51).

Kerr ve arkadaşları, hücre ölümlerini incelerken ölen hücrelerin plazma membranları ile kaplı küçük kürecekilere bölündüğünü ve bu küreciklerin makrofajlar tarafından fagosite edildiğini izlemiştir. Aynı çalışmacılar, hücrelerin bu şekilde küçük parçacıklara ayrılmasını yaprak dökümüne benzettikleri için, bu ölüm şekline "Apoptozis" adını vermişlerdir (50).

Apoptozise giderken, ilk başlangıçta ölüm kararı almış bir hücre normal bir hücreden morfolojik olarak ayırt edilemez. Ancak 2 saat sonra kromatin ve sitoplazma yoğunlaşır ve boyutları küçülür. Bu morfolojik değişim, hücrenin apoptozla öleceğinin ilk işaretidir. Hücre apoptoz kararı alınca, PS (fosfotidil serin) plazma membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkar ve PS'i tanıyan makrofajlar apoptoza uğramış bu hücreleri fagosite ederek ortadan kaldırır (Şekil 9).



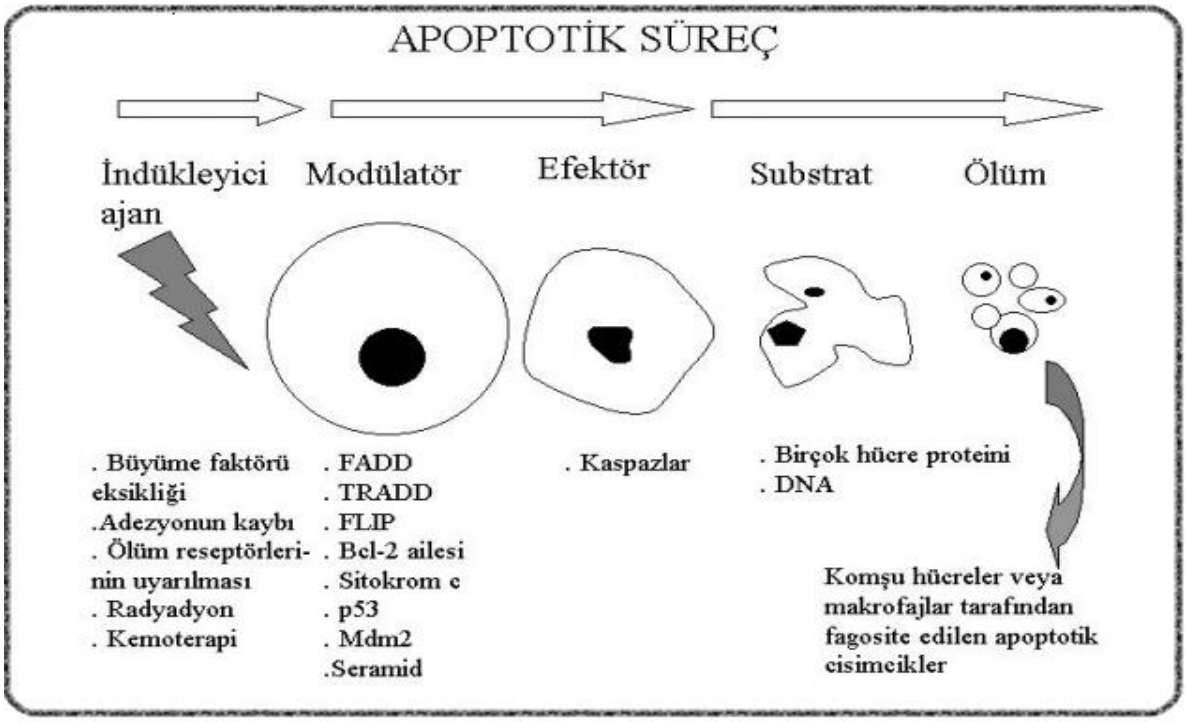
Şekil 9. Fosfotidilserinin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne çıkarak makrofajlarca tanınması ve hücrenin fagosite edilmesi (52)

Apoptoz çeşitli sinyal molekülleri tarafından yönetilen kompleks bir mekanizmadır ve daima bir sinyalle başlamaktadır. Bu sinyal çevreden gelebildiği gibi, hücre kendi içerisindeki bir soruna bağlı olarak kendi içinden de üretebilir (Şekil 10). Apoptotik sinyalin, hücrenin kendinden üretilmesinin çok sayıda nedeni vardır (53).

Apoptozisin Uyarılma Nedenleri ve İşlevi

Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır. Apoptozun yer aldığı durumlara bakacak olursak;

- ✓ Embriyonal gelişimde örneğin insanlarda parmak aralarının şekillenmesi veya göz kapakları arasındaki boşluğun şekillenmesinde,
- ✓ Sürekli çoğalan hücrelerin sayısının azaltılmasında (örneğin deri hücreleri, gastrointestinal sistem hücreleri vb),
- ✓ Metamorfoza uğramış, yaşlanmış ve bu nedenle fonksiyonunu kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılmasında,
- ✓ Enfekte olan hücrelerin ortadan kaldırılmasında,
- ✓ İmmün hücrelerin seçiminde,
- ✓ Kadınlarda menstrual siklusta endometrial hücrelerinin yıkımında,
- ✓ Hormona bağımlı, doğum veya kısırlaştırma sonrası involüsyonda (Örneğin prostat, meme dokusu hücrelerinde doku ve organların küçülerek eski haline dönmesi),
- ✓ Radyasyona maruz kalan hücrelerin yıkımında,
- ✓ DNA hasarı oluşan hücrelerin yıkımında,
- ✓ Tümöral, kansere sebep olabilecek hücrelerin ortadan kaldırılması gibi durumlarda, apoptozis devreye girer (54).



Şekil 10. Hücrenin apoptoza gidişi (53)

Kanser hücrelerinin özellikleri, yalnızca pozitif büyüme sinyallerinin çoğaltılması, kontrol noktalarının ve genlerin mutasyonu ile değil, aynı zamanda hücre ölümünün düzensizliğiyle ilişkilidir. Bu özellikler, kanserin tedavisinde bilinmesi gereken önemli özelliklerdir (55,56).

Apoptoz, aynı zamanda tip I programlı hücre ölümü olarak da adlandırılır ve spesifik uyaranları aldıktan sonra oluşan programlanmış hücre ölümünün bir şeklidir. Kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve hücre hacminin azaltılması gibi morfolojik değişikliklerin yanı sıra, kaspaz aktivasyonu da dahil olmak üzere DNA'nın parçalanması, protein ve membran yüzeyinde biyokimyasal değişikliklerin meydana gelmesiyle oluşur (56-58).

Apoptoz, tamamlayıcı iki yol olan ekstrinsik ve intrinsik yol ile tetiklenebilir. Biri ölüm ligandlarının ölüm reseptörlerine bağlanmasını, diğeri ise (intrinsik) "mitokondriyal" yolağı başlatır (59). Birçok tümör hücresi, apoptozdan kaçınmak için mekanizmalar geliştirir, örneğin anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu veya pro-apoptotik hücre ölüm bileşenlerinin mutasyonu veya downregülasyonu gibi (60). Bu nedenle, apoptoz yolağını hedeflemek, malign tümörler için önemli kemoterapötik tedavilerden biridir ve bu yol ön kemoterapötik ajanların çoğunun hücre ölümünü majör olarak indüklediği yerdir (61).

Apoptoz Süreci

Bir hücrenin apoptozisle intihar kararı vermesi için, iki mekanizma vardır.

- Hücre içinden gelen sinyallerle meydana gelme,
- Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile başlatılma.

İçsel olan mitokondriyal yol, dışsal olan hücre ölüm reseptörü aracılığıyla oluşan yoldur. Apoptotik yollar içsel ve dışsal olarak yoğun çalışır. Dışsal yolda ilk olarak tümör nekroz faktörü (TNF) ailesine ait olan membrana bağlı ölüm reseptörü (DR) ile kaspaz aktivasyonu başlatılır (62). Bu süreçte belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl–2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteinidir.

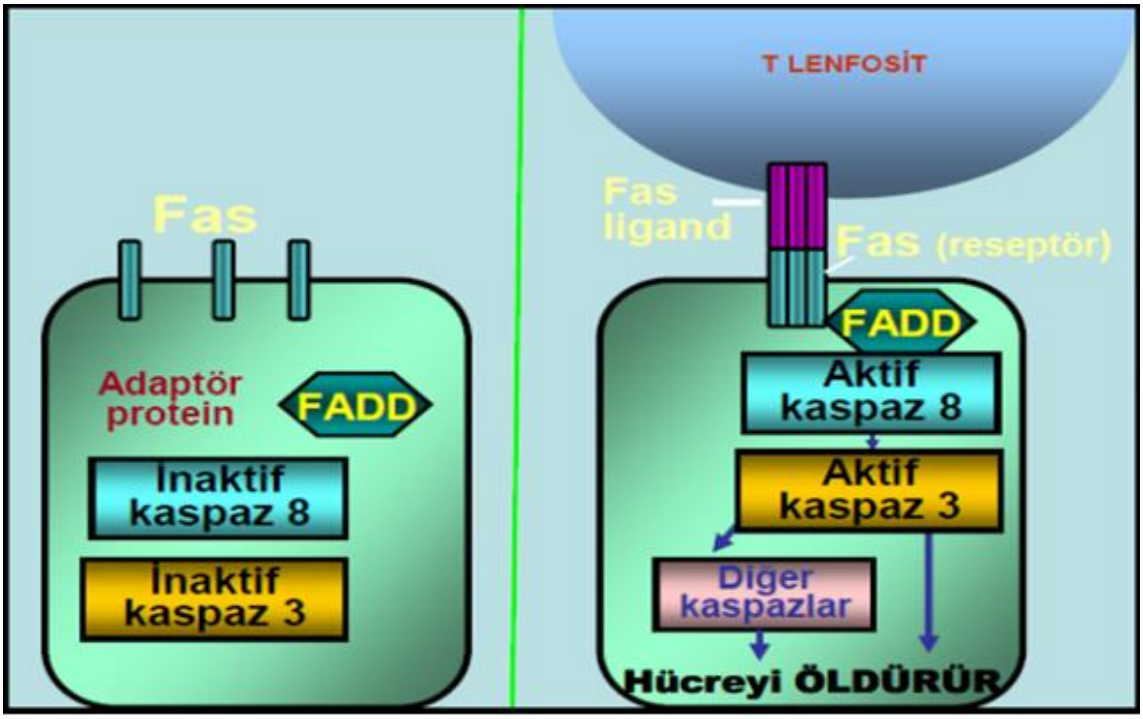
Kaspazlar: Cysteine Aspartate Specific Proteases sözcüklerinin baş harflerinden türetilmiştir. Eski adı ile ICE (interlökin konverting enzim) ailesine dahildir. Sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar (63).

Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini allosterik regülasyon ile aktif hale getirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlemektedirler. Apoptoziste hücreyi parçalayan, yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler olarak bilinmektedirler. (64).

Kaspaz aktivasyonu; ayrıca monositin makrofaja farklılaşmasının yanı sıra eritrosit, keratinositler, iskelet kası, lens lif hücrelerinin farklılaşmasında da yer almaktadır (65-69).

FAS ve FAS Ligand: FAS ve FAS ligand, tümör nekrozis ailesinin transmembran proteinleridir. FAS ligand FAS'a bağlandığında, hedef hücrenin ölüm olgusunu başlatmaktadır. Bu sistem, immün yanıtın sonlandırılmasında da önemli bir rol oynar. Tümör hücreleri, FAS ekspresyonunun azaltılmasıyla FAS-aracılı apoptozise karşı direnç kazanabilir (70,71).

Onkogenler ve p53 gibi tümör süpressör genlerdeki mutasyonlar, FAS sinyal işlemiyle de interfere olur. Hücrenin plazma membran yüzeyinde Fas antijenini eksprese etmesi, sinyalin başlangıcıdır. Fas antijenini yüzeyinde sergileyen bu hücreler sitotoksik T-hücrelerinin Fas ligandları tarafından tanınır (Şekil 11) ve sitotoksik T-hücreleri de, bu antijeni sergileyen hücrelere gelip bağlanarak apoptoz kaskadını başlatır (72).



Şekil 11. Fas-fas ligand aracılı apoptozis (73)

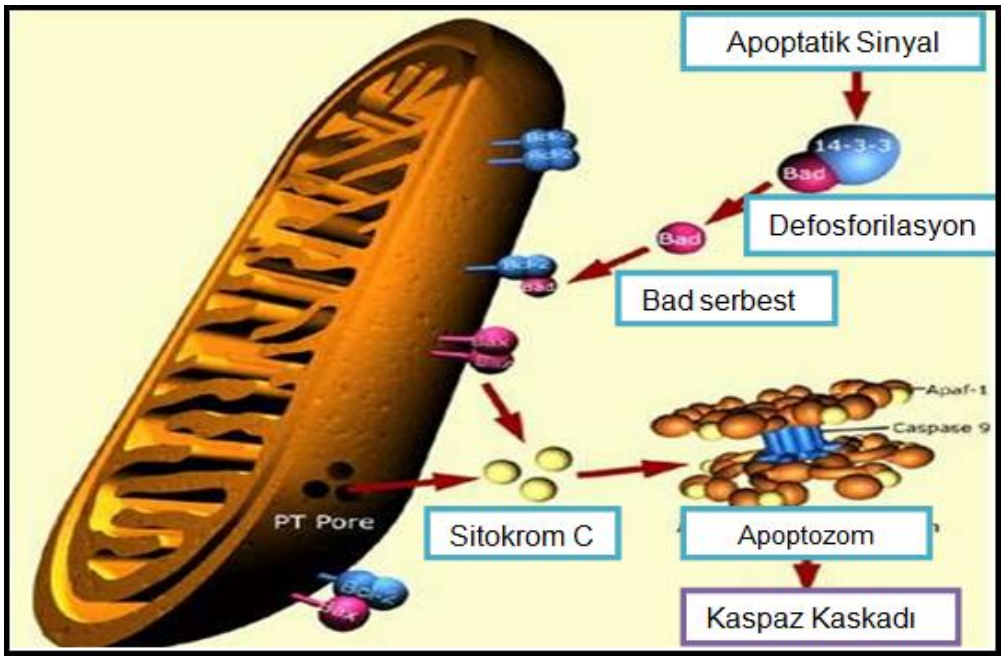
Apoptoz ile İlişkili Hücresel Genler

- pRb
- Fas
- Mdm2
- c-myc
- c-Jun
- Bcl-2 ailesi
- P53 (74,75)

Bcl-2: Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur (Şekil 12). Bcl-2 ve Bcl-xl apoptozu engelleme fonksiyonunu, ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-c gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir (76,77).

Bcl-2 ailesinde proapoptotik olanlar; Bax, Bad, Bix, Bcl-Xs'tir. Apoptozisi inhibe edenler ise; Bcl-2 ve Bcl-xl'dir (78,79).

Bax: Bcl-2 ailesinin bir proapoptotik üyesidir, mitokondri aracılı apoptozisi destekler**.** Membran üzerinde yer alan Bax/Bcl2'nin oranı, hücrenin apoptoza gidip gitmediğini belirler (80-82).

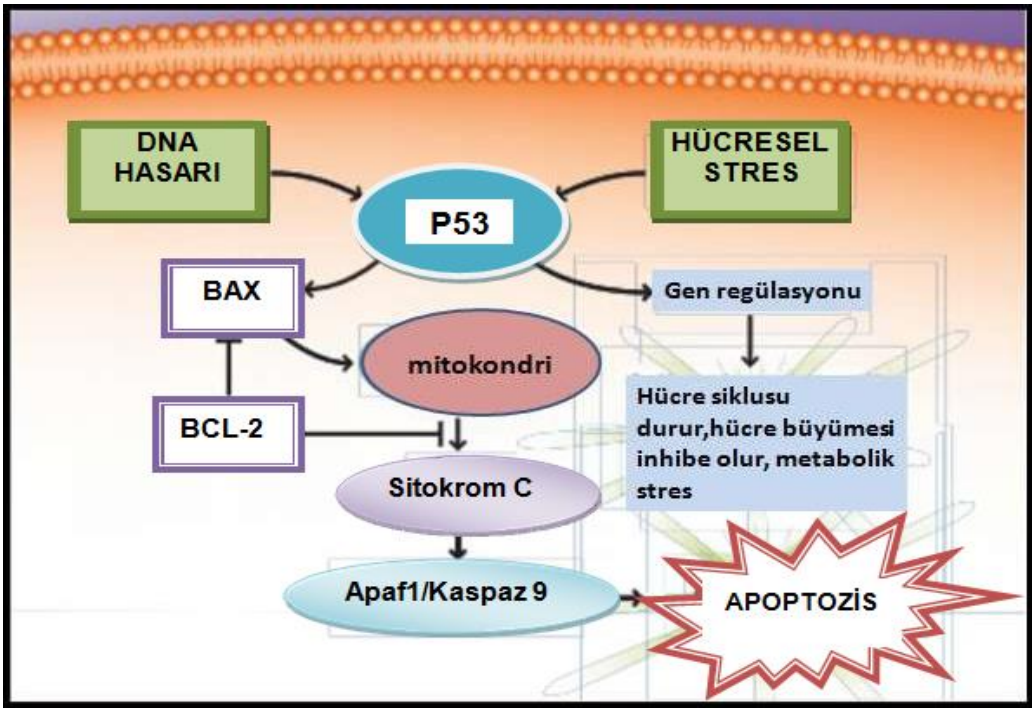


Şekil 12. Apoptotik sinyal ile başlayan kaspaz kaskadı (83)

(PT: permeability transition pore=geçirgenlik poru)

P53: p53 apoptozu uyarıcı bir proteindir. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçererek, p53 seviyesini arttırmaya yönelik etki eder. Bu aktivasyon, ya hasarın tamirine ya da apoptoza yol açar (84,85).

P53 aynı zaman da Bax/Bcl-2 oranını düzenler ve bu da hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirler (Şekil 13).



Şekil 13. P53'ün etkileri (86)

HÜCRE DÖNGÜSÜ VE APOPTOZİS

Hücre döngüsünün bölümleri arasındaki geçiş ve farklı hücre döngülerinde meydana gelen işlemler, hücre içi sinyallerin yanı sıra çevreden gelen hücre dışı sinyallerle de düzenlenmektedir. Hücre dışı sinyallerle hücre döngüsünün düzenlenmesine örnek vermek gerekirse, hücrelerinin çoğalmasına büyüme faktörlerinin yaptığı etkidir.

Hücre büyümesi, DNA replikasyonu ve mitoz gibi hücresel süreçler, hücre döngüsü sırasında farklı kontrol noktalarında düzenlenirler. Fazları göz önüne alırsak, hücre döngüsünde üç tane kontrol noktası vardır. Bunlar; G1, G2 ve metafaz kontrol noktalarıdır (87).

G1 evresi DNA'nın replikasyona hazırlandığı, ribozom ve diğer organellerin sayısını iki katına çıkardığı fazdır. Buradaki kontrol; organellerin sayısının doğru bir şekilde artıp artmadığının kontrolü şeklindedir (88).

S evresinde; organellerin iki katına çıkması devam eder ve ayrıca yeni DNA sentezi bu fazda gerçekleşmektedir. S fazından sonra G2 fazı gelir. G2 kontrol noktası, replikasyon ve diğer olayların doğru bir şekilde olup olmadığının kontrol edildiği yerdir. Eğer bu zamana kadar gerçekleşen işlemler eksikse, onarılması mümkündür ve başa dönülebilir.

G1 ve G2 fazlarının diğer bir önemi de, mitoz öncesi ve sonrası hücreye büyüme zamanı kazandırmalarıdır. Hücre bölünmesine hazırlık aşamasında hücre kütlesinin iki katına

çıkarılması için, hücrenin büyümesi gerekir (88).

Hücre döngüsünün kontrolündeki ana rol; düzenleyici proteinlerden olan siklinlere, siklin bağımlı kinazlara (Cdks), bunların substrat proteinlerine, Cdk inhibitörlerine (CKI) ve tümör baskılayıcı gen ürünleri, p53 ve pRb' ye bağımlıdır. Bu faktörler, hücre döngüsünün geçiş ve kontrol noktasından sorumlu temel düzenleyici faktörlerdir. Memeli hücrelerinin G1 kontrol noktasında durması, p53 proteini ile olmaktadır. Bu protein, hasarlı DNA tarafından çok hızlı bir şekilde indüklenmektedir. Birçok kanser türünde, p53 proteinini kodlayan gende mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların sonucu olarak p53 işlevinin kaybolması, DNA hasarına cevap olarak G1'de durma olayı gerçekleşmez. Böylece hasarlı DNA replikasyona uğramakta ve onarılmadan aktarılmaya devam etmaktedir. Hasarlı DNA'nın bu şekildeki kalıtımı, mutasyon sıklığının ve kanser gelişimine eşlik eden hücre genomunun genel kararsızlığının artmasına neden olur. P53 genindeki mutasyonlar, insan kanser türlerinde en sık görülen genetik değişikliklerdir (89,90).

Hücrenin apoptozu ve çoğalması birbiriyle ilişkilidir. Bazı hücre döngüsü düzenleyicileri, hem hücre bölünmesini hem de apoptozu etkileyebilir (91).

Hücre döngüsünün durması ve apoptoz, anti-kanser ilaç tedavisinde yer alan iki önemli mekanizmadır (92,93). Kontrolsüz hücresel proliferasyon, kanserlerin ortak özelliklerinden biridir ve bu yüzden hücre döngüsünün bloke edilmesi, kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için etkili bir yöntem olarak görülmektedir (92,94). Pek çok kemoterapötik maddenin, hücre döngüsünü bazı kontrol noktalarında durdurarak anti-proliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir (92,95). Hücre döngüsü aracılı apoptoz kavramı, gittikçe artan bir ilgi görmektedir. Çünkü bu yol, edinilen ilaç direncinin üstesinden gelmek, mutajenezi azaltmak ve toksisiteyi azaltmak için bir fırsat sağlayabilir (92,95).

ANKAFERD

Ankaferd Bloodstopper (ABS), klinik çalışmalarda test edilen kırmızı kan hücresi fibrinojen ilişkileri ile ilgili ilk lokal hemostatik ajandır (96,97). Ankaferd adı iki kelimenin birliğinden kaynaklanmaktadır: "Anka" ve "Ferd". Batı geleneğinde Phoenix olarak bilinen Anka, her hayvandan bir işaret taşıyan çok renkli tüyleri ve insan yüzüne benzeyen bir yüze sahip mitolojik bir kuştur. Birçok kültürde ruh ve yeniden doğuş sonsuzluğunu temsil eder ve yanarak küllerinden doğan anlamındadır. Ferd ise, eşsiz anlamında Anka'nın benzersizliğini vurgulamaktadır. Ankaferd Phoenix'e tek güç olarak tercüme edilebilir, şimdiyse modern bir ilaç olarak kendi tarihini yaratmaktadır (96).

Ankaferd Bloodstopper, geleneksel bir bitkisel karışımdır ve bu karışım, Anadolu'da

yüzyıllardır kanamayı durdurmak için lokal olarak kullanılmaktadır. ABS de bulunan bitkiler, *Thymus vulgaris* (kekik), *Glycyrrhiza glabra* (meyan), *Vitis vinifera* (asma), *Alpinia officinarum* (havlıcan) ve *Urtica dioica* (ısırgan) otunun bir standart karışımıdır. Endotelyum, kan hücreleri, anjiyogenez, hücre çoğalması, damar dinamikleri ve hücre aracıları üzerindeki etkileri sayesinde, ABS artık Türkiye'de konvansiyonel anti-hemorajik önlemlere dirençli inatçı kanamalar için resmi olarak alternatif hemostatik bir tıp ilacı haline gelmiştir. (97).

ABS aynı zamanda protein-2 (AP2), androjen reseptörü (AR), siklik AMP cevap elementi aktif transkripsiyon faktör-1 (CREATF1), siklik AMP cevap elementi bağlama proteini (CREB) E2F1-5, E2F6, EGR, interferon (IFN) uyarılmış yanıt elementi (ISRE), Myc-Max, nükleer faktör-1 (NF-1), protein-53 (p53), SMAD2 / 3, peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör (PPAR) ve Yin-Yang (YY1) gibi hücresel fonksiyonlarda rol oynayan çeşitli protein ve faktörlerin düzeyini belirler. Bu faktörler; hücre döngüsünün regülasyonu, apoptozis, anjiyogenez, sinyal iletimi, inflamasyon, immünolojik süreçler ve metabolik yolaklar gibi çeşitli hücresel mekanizmalarda rol oynamaktadır (98).

Ankaferd Üretim Şekli Ve Yöntemi

Bitkiler toplandıktan sonra depolanır ve aynı zamanlarda olacak şekilde, kalitesine göre uygun şekillerde aşağıdaki gibi ayrılır.

- *Urtica dioica* (kurutulmuş kök)
- *Vitis vinifera* (kurutulmuş yaprak)
- *Glycyrrhiza glabra* (kurutulmuş yaprak)
- *Alpinia officinarum* (kurutulmuş yaprak)
- *Thymus vulgaris* (kurutulmuş ot)

Bitkilerin parçalara ayrılması, fiziksel ve kimyasal olarak kalite kontrollerinin yapılmasının ardından dolum ve paketleme işlemi yapılır.

ABS ampul, tampon (Tablo 1) ve sprey (Tablo 2) formlarında olmak üzere 3 farklı formda hazırlanır.

1.ABS ampul 2 mL

2.ABS tampon (2.5cm x 7 cm – 3 ml, 5 cm x 7.5 cm - 10 ml, 20 cm x 20 cm – 100 ml)

3. ABS sprey (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 200 ml)

Tablo 1. Ampul ve tampon formda ABS içinde bulunma miktarları (97)

	Etkin madde miktarı (mg)			
Etkin madde adı	**Ampul**	**Tampon**		
	2ml	2.5 x 7 cm 3 ml	5 x 7.5 cm 10 ml	20 x 20 cm 100 ml
***Urtica dioica*[1]**	0.12	0.18	0.6	6
***Vitis vinifera*[2]**	0.16	0.24	0.8	8
***Glycrrhiza glabra*[2]**	0.18	0.27	0.9	9
***Alpinia officinarum*[2]**	0.14	0.21	0.7	7
***Thymus vulgaris*[3]**	0.10	0.15	0.5	5
[1] kurutulmuş kök ekstresi, [2] kurutulmuş yaprak ekstersi, [3] kurutulmuş ot ekstresi				

Tablo 2. Sprey formda ABS içinde bulunma miktarları (97)

Etkin madde adı	**Etkin madde miktarı (mg/ml)**
***Urtica dioica*[1]**	**0.06**
***Vitis vinifera*[2]**	**0.08**
***Glycrrhiza glabra*[2]**	**0.09**
***Alpinia officinarum*[2]**	**0.14**
***Thymus vulgaris*[3]**	**0.10**
[1] kurutulmuş kök ekstresi, [2] kurutulmuş yaprak ekstersi, [3] kurutulmuş ot ekstresi	

ABS'nin Kanama Durdurucu Özelliği

ABS'nin hemostatik eyleminin temel mekanizmalarından biri, çok hızlı bağlantı noktaları yaparak bir protein ağı oluşturup eritrosit agregasyonu yapmasıdır. ABS; protein ağı zenginleştirilmiş kan hücreleri ile özellikle eritrositleri, pıhtılaşma faktörlerini ve trombositleri bozmadan birincil ve ikincil hemostatik sistemi kapsar (97,99,100).

ABS'de Yer Alan Bitkilerin Özellikleri

1. ***Vitis vinifera* (Asma):** Üzüm çekirdeği ekstresi, periferal venöz yetmezliğe karşı, antioksidan olarak, variköz venlerde, kapiller incelme, diyabetik retinopatinin de dahil olduğu retina hastalıkları, ödem, okülar stres ve premenstrüel sendromda pozitif etkiler göstermektedir. *In vitro* ve hayvan deneylerinde vasküler, antioksidan, sitotoksik, kemopreventif ve sitoprotektif etkileri gösterilmiştir. Ayrıca üzüm çekirdeği ekstresinin çok iyi olan antioksidan etkileri, aterosklerozis ve kanser gibi diğer kronik dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu olarak önerilmektedir. Yapılan bir *in vitro* çalışmanın sonuçları, prosiyanidinlerin hidrofilik ve lipofilik radikallerin giderilmesinde oldukça etkili olduğu saptanmıştır. Prosiyanidinler, dikkate değer anlamda doz bağımlı, anti-lipoperoksidan aktivite göstermiştir. Bu bağlamda, lipozomal membranları şelasyon mekanizması aracılığı ile radikal temizleyici etkileri sonucunda, lipit peroksidasyonundan koruyabilmektedirler. Ayrıca çeşitli araştırmalarda; üzüm çekirdeğinin anti-aterosklerotik, antikarsinojenik/antitümör etkileri, antioksidan, kardiyoprotektif etkilerinin olduğu ve kollajen stabilizasyonunu sağlamada etkili olduğu ortaya konmuştur (97-100).

Bir çalışmada, üzüm çekirdeği ekstresinin bazı kanser hücrelerine karşı sitotoksisite gösterdiği rapor edilmiştir (101).

Üzüm çekirdeği ekstresinin, kemoterapötik ajanların toksik etkilerini düzeltebildiği (101); testislerdeki spermatogonial hücreleri üzerine olan radyasyon hasarına karşı koruyuculuk sağladığı (102); ve asetaminofenin indüklediği hepatik DNA hasarını, apototik hücre ölümü ve gen ekspresyonu etkisini hafifletebildiği gibi *in vitro* etkilerinin olduğu, çeşitli bildiri özetlerinde rapor edilmiştir (103).

2. ***Thymus vulgaris* (Kekik):** Akdeniz bölgesi ve komşu ülkelerinde, Kuzey Afrika ve Asya'nın bir bölümünde doğal olarak yetişmektedir (104,105). Kekik; balgam söktürücü, antispazmodik, anthelmintik, karminatif ve diüretik özellikler nedeniyle toplumda yaygın olarak kullanılmaktadır. Thymus cinsinin aromatik ve tıbbi özellikleri, onu Dünya genelinde en popüler bitkilerden biri yapmaktadır. *Thymus* türleri; güçlü antibakteriyel, antifungal,

antiviral ve antioksidan etkilere sahiptir (104,106). Birçok farmakolojik *in vitro* çalışmada, hem kekik esansiyel yağının hem de bitki özütlerinin farmakolojik aktiviteleri ortaya çıkarılmıştır (104,107).

Geleneksel tıptaki çeşitli kekik kullanımları ve anti kanser aktivitesine sahip olabileceği hipotezi göz önüne alındığında; Thymus vulgaris biyoaktif bir bitkidir. İzole edilerek ve tanımlanması yapılarak biyoaktif öncülleri belirlenmiş ve bunların koleraktel ve meme kanseri hücre büyümesini baskıladığı, DNA-bağımlı ilaçlarla meme ve koleraktel kanser hücrelerinin kemo duyarlılığını arttırdığı, apoptozisi ve hücre döngüsünü regüle eden faktörlerin düzenlenmesinde rol alan intraselüler sinyal iletim yollarını baskıladığı belirtilmiştir (107). Yapraklarının, bilinen antioksidanlar olan alfa-tokoferol ve bütile hidroksitoluenle kıyaslanabilir düzeyde antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (108).

3. ***Glycyrrhiza glabra*** **(Meyan):** Köklerinden elde edilen ekstraktın, *in vitro* hücre dizilerinde antianjiyojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu bitki kökünün antiinflamatuvar, antitrombotik, antioksidan ve antiaterosklerotik etkileri çeşitli araştırmalarla gösterilmektedir (109-115). Öte yandan meyan kökünün mineralokortikoid etki nedeniyle, kan basıncını yükselttiği belirlenmiştir. *Glycyrrhiza glabra* köklerinin de antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkileri araştırılmıştır (109-117).

Meyanın antiülser olarak kullanımı, eskilerden günümüze kadar uzanmaktadır ve ayrıca pek çok enfeksiyöz hastalık üzerinde etkilidir. Soğuk algınlığı ve grip için kullanılan preparatların kullanılmasında sıklıkla yer alır ve bronşitin tedavisinde kullanılmaktadır (110-114). Kortikal hormonların endojen üretimini ve prolongasyonunu stimüle eden meyanın, menapoz ve premenstrüel şikayetlerin olduğu durumlarda da kullanımının olduğu bildirilmektedir (115,116).

Glisirizin solüsyonu ile intravenöz tedavinin, kronik hepatit C olan hastalarda hepatoselüler karsinoma gelişimini önlediği bildirilmiştir. Hayvan deneylerinde, meyan derivelerinin antitümör aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir (114).

Glabridin tirozin kinaz aktivitesini, süperoksit anyonu üretimini ve siklooksijenaz aktivitesini inhibe etmek suretiyle anti-inflamatuvar etki gösterdiği de saptanmıştır (116).

Meyan, kortizolün kortizona çevrilmesinden sorumlu enzim olan renal 11-B hidroksisteroid dehidrogenazı (B-HSD) inhibe eder. Kortizolün mineralokortikoid etkileri, serum potasyum düzeylerinde azalmaya, serum sodyum düzeylerinde artışa neden olur. Bu durum; su retansiyonuna, kilo artışına ve hipertansiyona neden olur (118).

Meyan, sitokrom P450 3A4'ü *in vitro* olarak inhibe eder. Meyan ile birlikte bu

enzimlerle metabolize olan ilaçların kullanılması söz konusu olduğunda, dikkatli olunmalıdır. Uzun süre yüksek doz alınması (20 gr'ın üzerinde ekstre ve 50 gr'ın üzerinde meyan kökü); hipokalemi, hipernatremi, ödem, hipertansiyon ve kardiyak şikayetlere neden olur (119).

4. ***Alpinia officinarum*** **(Havlıcan):** Zencefil ailesinin bir üyesidir ve Güneydoğu Asya'da yaygın olarak bulunur. *A. officinarum'*un rizom kısmı; mide ağrısı, soğuk ve şişlik tedavisinde geleneksel tıpta kullanılmaktadır (120). Bu bitkiden iki bileşik, diarilheptanoidler ve galangin izole edilmiştir. Önceki araştırmalar *A. officinarum* özütünün ve ana bileşenlerinin; karaciğer, akciğer, meme ve nöroblastoma gibi çok sayıda kanser hücre dizisinde anti kanser etkisinin olduğunu göstermiştir (120-122). Bu bitkiden izole edilen birçok kimyasal bileşenden biri olan diarilheptanoidler, karakteristik bileşikler arasındadır ve anti-platelet, antioksidan, antiproliferatif, anti-emetik, antihepatotoksik ve anti-inflamatuar aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir (123).

5. ***Urtica dioica*** **(Isırgan):** Anadolu'daki yöresel adları; dızlağan, çızlağan, cızgan, dalagan, cınçar, ağdalak, ısırgı ve ısırgan otudur. Isırgan otu, içerdiği birçok farmakolojik etkili metabolitin yanı sıra, diğer tıbbi bitkiden farklı olarak ağırlığının % 17'sini oluşturan yüksek oranda gerilmeye dayanıklı, hafif, uzun ve dirençli liflere sahiptir. Bu özellikleri ile ısırgan otu, hem tıbbi bir bitki hem de bir lif bitkisi olarak değerlendirilmesi noktasında büyük bir potansiyele sahiptir. Isırgan otugiller familyasındaki bitkilerin büyük bir kısmı çok yıllık olup, diğerleri ise tek yıllık gelişim göstermektedir. Genelde otsu yapıya sahip olmakla birlikte, çalı formunda olanları da mevcuttur. Yaprak yüzeyinde bulunan yakıcı tüylerinde, çeşitli kimyasal maddeler bulunmaktadır. (124).

Urtica dioica, sahip olduğu birçok farmakolojik ve klinik etkiden dolayı ilaç olarak yaygın şekilde kullanılan otlardan biridir. *Urtica dioica* veya ısırgan otu, *Urticaceae* ailesinin bir üyesidir. Çok sayıda küçük tüyleri olan ve histamin, formik asit, asetilkolin, asetik asit gibi yapraklar ve saplar üzerinde temas sonrası cilt tahrişine neden olan salgıları vardır (125).

Urtica dioica; diyabet, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalık, prostat kanseri gibi hastalıkların tedavisinde ilaç olarak çeşitli kullanım alanlarına sahiptir (126-128).

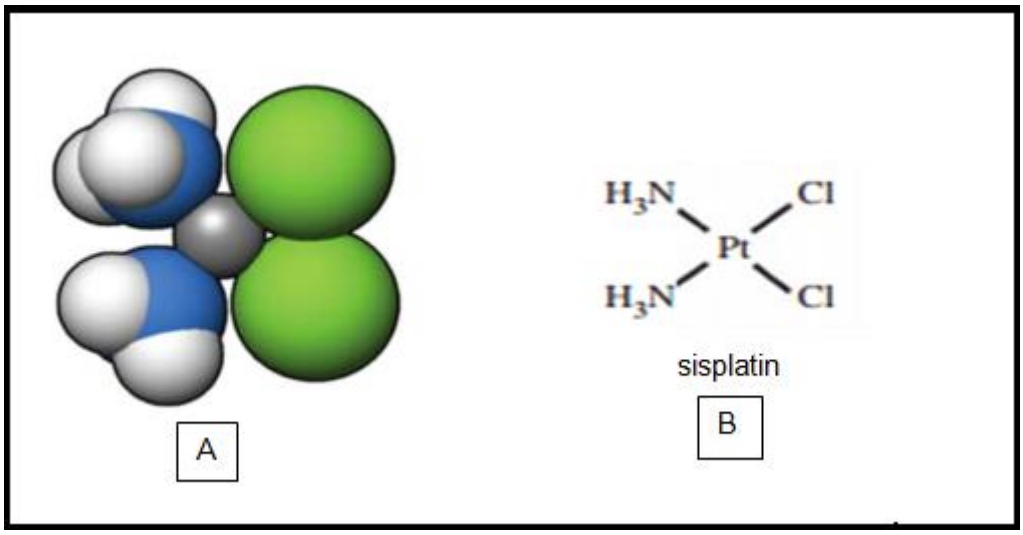
Isırganın yaprak özütünün antiinflamatuar etkiye sahip olduğu gösterilmiş (126,129) ve dahası, bu bitki antihiperglisemik (126,130) antioksidan, antimikrobiyal, antiülser ve analjezik aktivitelere sahiptir (126,131). Önceki çalışmalarda; *Urtica dioica*'nın bradikardiyal bir etkiye sahip olduğu (126,132) ve hipotansif ve diüretik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (126,133). Bunlara ek olarak yapılan bir tarama çalışmasında; *Urtica dioica*'nın havadaki

kısımlarının ham sulu bir özütünün, platellet agregasyonunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır (126,134).

DENEYDE KULLANILAN KEMOTERAPÖTİK İLAÇLAR

Sisplatin

Platin bileşikleri, en çok kullanılan anti-kanser ilaç sınıflarından birini oluştururlar. Kemoterapi alan tüm kanser hastalarının neredeyse yarısı, sisplatin, karboplatin veya oksaliplatin ile tedavi edilmektedir (Şekil 14) (135).



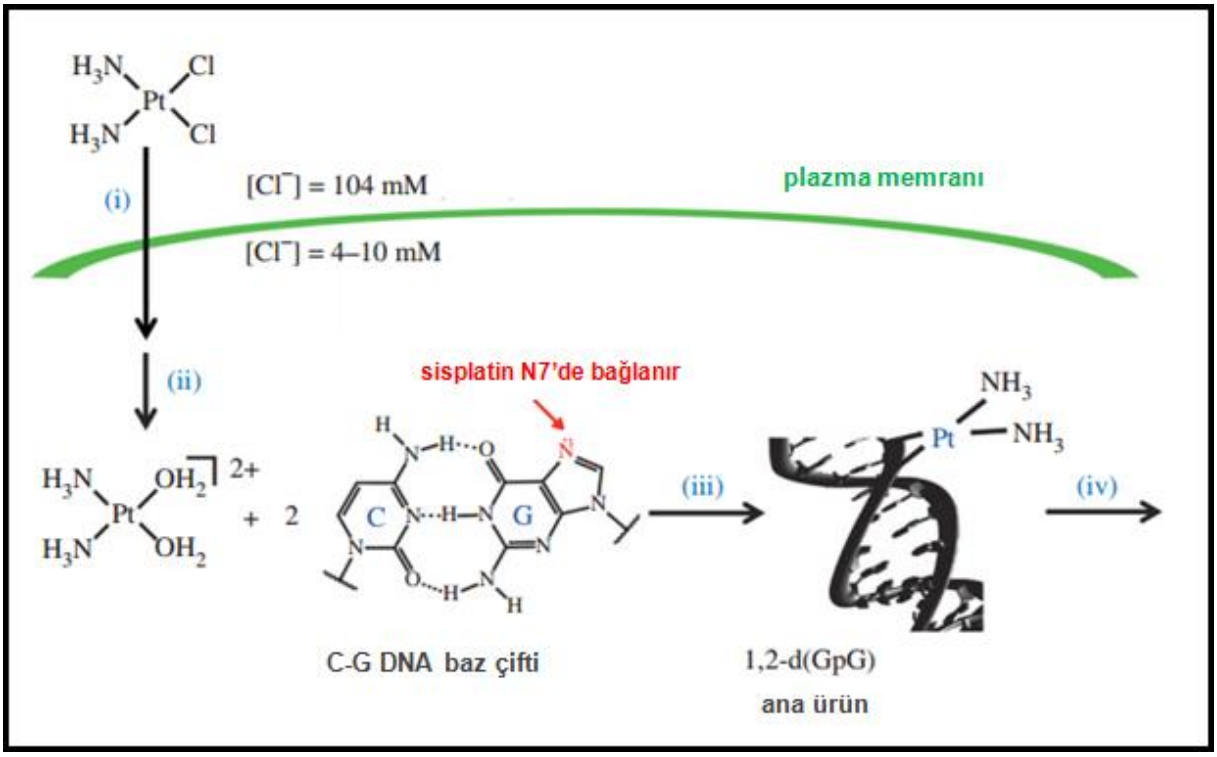
Şekil 14. Sisplatinin moleküler (A) (136) ve kimyasal yapısı (B) (135)

Oda sıcaklığında, beyaz veya sarı-turuncu kristal tozdur. Suda çözünürlüğü azdır ve dimetilprimanid ve N, N-dimetilformamid içinde de çözünürlüğü mümkündür. Sisplatin, normal sıcaklık ve basınç altında kararlı bir yapıdadır ancak zamanla yavaşça trans-izomer'e dönüşebilir (136,137).

Meme kanseri, dünya genelinde kadın ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir. Kemoterapi, malign meme kanserinin tedavisindeki tek seçenektir ve hastanın yaşam ömrünün uzamasını sağlayan bir durumdur (138). Devam eden meme kanseri sorununa karşı koymak için kemoterapötik ajanlar geliştirilmiştir. Bununla birlikte, çoğu kemoterapötik ilaç hızlı bir şekilde bölünerek hasarlara neden olan hücreleri hedefler ve bunlar "sitotoksik ilaçlar" olarak adlandırılırlar.

Sisplatin; yaygın olarak kullanılan önemli bir kemoterapötik ajandır ve meme, testis, yumurtalık, servikal, prostat, baş ve boyun, mesane, akciğer ve refrakter non-Hodgkin lenfomaları gibi çeşitli malignitelerin tedavisinde kullanılır (139,140).

Sitotoksik etki; apoptozun indüksiyonu ve sisplatinin DNA'ya bağlanarak, replikasyonunu inhibe etmesiyle sonuçlanır (Şekil 15) (137,142).



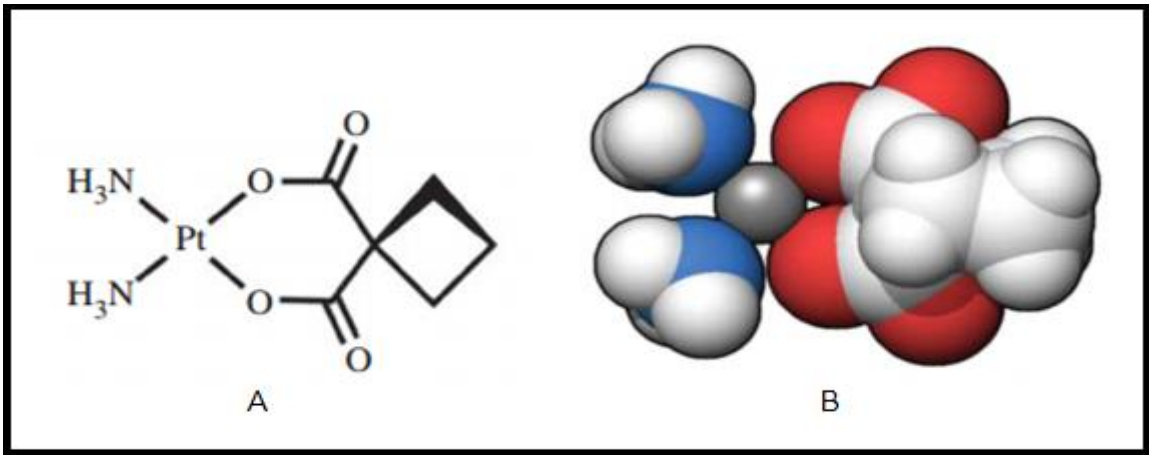
Şekil 15. Sisplatinin etki mekanizması; (i) hücresel alım, (ii) aktivasyon, (iii) DNA'nın platinlenmesi ve (iv) apoptozise giden hücresel yol (142)

Esas olarak sisplatin kaynaklı genotoksik stres, apoptoz veya kemo direncine katkıda bulunabilen çoklu sinyal iletim yollarını aktive eder (137).

Karboplatin

Kemoterapötik platin ilaçları sisplatin ve karboplatin, DNA alkilleyici ajanlar olarak sınıflandırılır (Şekil 16). Bu tür ilaçların ana etki mekanizmalarının pürin DNA bazlarına kovalent olarak bağlanıp, DNA adukt formlarını oluşturduğuna dair güçlü görüşler vardır. Sonuç olarak, bu DNA hasarı çeşitli sinyal iletim yollarını harekete geçirerek etki eder. Örneğin; DNA hasarının tanınması ve sonrasında onarımı, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozis gibi (143,144).

Karboplatin; temel bileşik olan sisplatin'e göre daha az nefrotoksisite, nörotoksisite ve orotoksisiteye sahip bir sisplatin analoğudur (145).



Şekil 16. Karboplatinin kimyasal (A) (142) ve moleküler yapısı (B) (146)

Karboplatin veya Cis-diammin (1,1-siklobutandikarboksilat) platin (II); yumurtalık, meme, akciğer, baş ve boyun kanseri için kullanılan, kemoterapötik bir ilaçtır. Karboplatin yapısal açıdan, sisplatinde var olan iki klorit ligandının yerine, dikarboksilat ligandına sahip olmasıyla sisplatinden ayrılır (147,148).

Karboplatin aynı reaksiyon ürünlerini *in vitro*da sisplatin ile eşdeğer dozlarda oluştursa da, daha düşük reaktiflik ve daha yavaş DNA bağlanma kinetiği sergilemektedir. Sisplatin'in aksine, karboplatin alternatif mekanizmalara duyarlı olabilir. Bazı çalışmalar, sisplatin ve karboplatinin sitotoksik davranışlarını sürdürürken, MCF-7 hücre dizisinde farklı morfolojik değişikliklere neden olduğunu göstermektedir (147).

Karboplatin, başlangıçta monoterapide ve daha sonrada metastatik meme kanseri hastalarında, farklı antitümör ilaçlarla kombinasyon halinde araştırılmıştır (145).

Dosetaksel

Meme kanseri hastalarında taksan tedavisine direnç, neo-adjuvan veya adjuvan taksan ile tedavi edilen hastaların yaklaşık % 20'sinde, meme kanserinden sonra hastalığın nüksetmesi büyük bir klinik problem olmaya devam etmektedir. Taksan direnci ile ilişkili moleküler değişiklikler ile tahmini belirteçlerin tanımlanması ve doğrulanmasının, taksanların daha etkin bir şekilde kullanılmasına, hayatta kalma oranının iyileşmesine, toksisite ve maliyetlerin azalmasına neden olacağı hipotezine varılmıştır (149).

Taksanlar (dosetaksel, paklitaksel), mitotik inhibitörler olup, primer ve ileri meme kanserinin tedavisinde anahtar rol oynamaktadır (150-153).

Taksanlar, mikrotübüllerin beta-tübülin alt ünitesine bağlanarak mitotik bir blok oluşturur ve bunların ayrışmalarını engeller (154). Bununla birlikte, taksanlara karşı direnç taksan tedavisi sırasında veya sonrasında ortaya çıkarak, hastanın morbidite ve mortalitesinde artışa

neden olabilir (149).

Doksorubisin

Antrasiklin doksorubisin, insan kanserlerine karşı geniş bir spektruma sahip antitümör ajanlar sınıfına ait iken (örneğin; lösemi, meme kanseri, yumuşak doku sarkomları, çocukluk çağı solid tümörleri, agresif lenfomalar) kolon kanseri de dahil olmak üzere, sadece birkaç kanser türü bu ilaca cevapsızdır (155-158).

Bununla birlikte, kanser ilacı olan doksorubisinin terapötik etkinliği, tümörlerde ilaç direncinin başlangıcı, konjestif kalp yetmezliği ve kötü tümör seçiciliği eşliğinde kardiyotoksisite gibi çeşitli yan etkilerle sınırlıdır (155,157-160).

Seçicilik eksikliğini gidermek için, doksorubisin ve diğer anti kanser ajanları, kanser hücrelerinin spesifik bağlanma bölgeleriyle veya aşırı eksprese edilen reseptör aracılığıyla o bölgeye yönelecek şekilde modifiye edilmiştir. Bu durumda, peptid hormonu (161), folik asit (162), antikor (163), transferrin ve albumin ilaç konjügatları (164), tartışmasız bir rol oynamakta ve antitümör ajanların alan seçici verimini mümkün kılmaktadır (155,165,166).

Yinede, bu konjugatların büyük çoğunluğu, kanser hücrelerinde ilaç direncinin üstesinden gelememektedir (155).

İlaç Kombinasyonları Neden Yapılır?

Çok eski yıllardan beri, ilaç kombinasyonları hastalıkların tedavisinde ve acıyı azaltmakta kullanılmaktadır. Geleneksel Çin ilaçları, özellikle bitkisel ilaçlar, bunların canlı örnekleridir. İzolasyon teknolojisi ve kimyasal sentez yeteneği ilerledikçe, ilaç kombinasyonları daha iyi ve gelişmiş hale getirilerek, kapsamları da genişletilmeye devam edilmektedir (167).

Son yüzyılda, her bir ilacın tek başına ve kombinasyonlarının doz-etki ilişkilerini nicel olarak ölçmek için girişimlerde bulunulmuş ve verilen bir ilaç kombinasyonunun sinerjik bir etki kazanıp kazanamayacağı saptanmıştır. Biyolojik sistemler ve doz-etki modelleri son derece kompleks olduğu için, son yüzyılda ilaç kombinasyonu analizine ilişkin çok sayıda model, yaklaşım, hipotez ve teori ile tartışmalar da olmuştur (167).

Birden fazla ilacın kullanımı; birden fazla hedefi, birden fazla alt popülasyonu veya birçok hastalığı aynı anda hedefleyebilir. Farklı etki mekanizmalarına veya etki yöntemlerine sahip birden fazla ilacın kullanımı, tek bir hedefe veya bir hastalığa karşı direk etki gösterebilir ve daha etkili bir şekilde tedavi edebilir (167).

Sinerjizmde oluşabilecek olumlu sonuçlar şunlardır; terapötik etkinin etkinliğinin

arttırılması, toksisiteyi önlemek için dozajı azaltmak fakat aynı etkinliğin arttırılması veya sürdürülmesi, ilaç direncinin oluşmasını en aza indirgemek veya yavaşlatmak ve konakçı aleyhine hedefe karşı (veya sinerjizm etkisi) seçici sinerjizm sağlamak (veya toksisite antagonizması). Bu terapötik yararlarından dolayı, ilaç kombinasyonları yaygın şekilde kullanılmakta ve AIDS dahil olmak üzere kanser ve bulaşıcı hastalıklar gibi ölümcül hastalıkların tedavisinde önde gelen bir seçenek haline gelmektedir (167).

Kombinasyonların sinerjistik etkilerini incelemek üzere; medyan etki denklemi ve kombinasyon indeksi denklemlerine göre iki veya daha fazla ilacın aditif, sinerjistik veya antagonistik etki gösterip göstermediğini otomatik olarak analiz eden CompuSyn programı kullanıldı. Bu program, Chou tarafından ortaya konan CI (kombinasyon indeksi) prensibine dayanarak ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veriyi genel olarak üç şekilde verir: CI değeri; ilaç kombinasyonlarının aditif etkilerini belirlerken (CI=1 olduğunda aditif etki), beklenen aditif etkiden daha fazla etkiye sahipse antagonizmi (CI>1), beklenen aditif etkiden daha az etkiye sahipse de sinerjistik etkiyi (CI<1) ifade etmektedir (167).

Bizde araştırmamızda; kullanılan hücrelerin LD_{50} değerlerini bulduktan sonra, ilaçları farklı dozlarda kombine ederek 72 saatlik hücre kültürü inkübasyonu sonucunda çıkan yüzde canlılık oranlarını CompuSyn programına girerek, sinerji bulunan kombinasyonları belirledik.

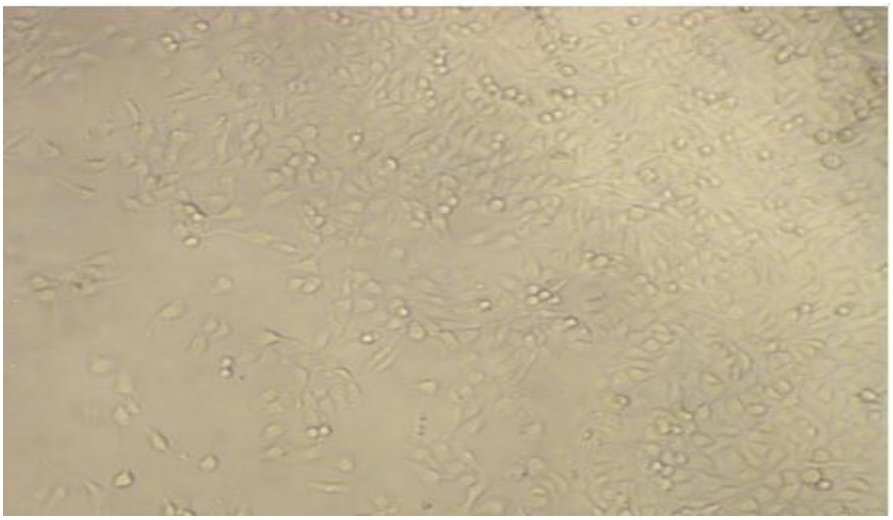
Tablo 3. İki ilacın hücre kültürlerinde kombine kullanımının sinerjistik -aditif-antagonistik sitotoksik etkilerini belirlemede kullanılan CI değerleri

CI (kombinasyon indeksi)	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	Aditif etki
>1.1	Antogonizm

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hücre Kültürü

Hücre kültürü, deney süresince hücrelerin inkübatörde çoğaltılarak yetiştirilmesi işlemidir. Çalışmada kullanılan hücrelerimizi Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinden (TÜTAGEM) edindik. MCF-7 insan meme kanseri hücre dizileri, 37ºC'de etüve konup çözülene kadar bekletildi. Kriyovialdeki hücre süspansiyonu, içerisinde 3 ml besiyeri bulunan 25 cm^2'lik flasklara aktarıldı ve hücrelerin 1 gün boyunca flaska yapışmasını bekledikten sonra, flakstaki DMSO'lu besiyeri uzaklaştırılıp 3 ml taze besiyeri konuldu. 37ºC'de, %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücre besiyeri ortamı yenilenerek, hücrelerin büyümeleri sağlandı. Flasklar, her gün mikroskop altında kontrol edildi (Şekil 17).



Şekil 17. MCF-7 hücrelerinin mikroskopta görünümü

Hücreler büyük oranda konfluent olduklarında, tripsinizasyon işleminden (bu işlemde flasktaki besiyeri dökülerek 3 ml tripsin koyup inkübayonda 10 dk bekletildi) sonra hücreler flasktan alınıp steril polipropilen konik dipli tüpe aktarıldı ve 2000 rpm'de 2,5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı kısmı alındı. Kalan pelet, 2 ml besiyeriyle süspanse edildikten sonra içinde 4 ml besiyeri bulunan daha büyük hacimli 75 cm^2'lik flakslara aktarıldı. Bu şekilde hücrelerin istenilen sayıya ulaşıncaya kadar çoğalmaları sağlandı ve hücre kültürü pasaj işlemlerinin tümü laminar akım kabinlerinde gerçekleştirildi.

Kullanılan Besiyerleri, Sıvılar ve Hücrelerin Üretilmesi

MCF-7 hücre dizisi için; içerisinde %5 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS), (ATCC® 30-2200™) 30 ml, penisilin ya da streptomisinden 6 ml, 200 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ATCC ® 30-2002™, 200 ml Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ATCC® 30-2003™, 200 ml F-12K Medium (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) (ATCC® 30-2004™) ve 6 ml L-Glutamin Solüsyonu (200 mM ATCC® 30-2214™) içeren bir besiyeri oluşturuldu. Flakslara ekilen hücreler, besiyeri içerisinde %5'lik CO^2'li inkübatörde 37°C'de kültüre edildi.

İlaçların Hazırlanması

Karboplatin (Koçak Farma, 450 mg/45 ml infüzyon için solüsyon içeren flakon), doksorubisin (Farmar, 50 mg/25 ml enjektabl solusyon içeren flakon), sisplatin (Koçak Farma,10 mg/20 ml infüzyon için konsantre solüsyon içeren flakon) ve dosetaksel (Sanofi Aventis, 20 mg infüzyon için konsantre solüsyon içeren flakon) antikanser ilaçları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kemoterapi İlaç Hazırlama Ünitesi'nden temin edildi. Her bir ilaç; önceden tanımlanan ve *in vitro* koşullarda hücre üremesini engelleyen en düşük olacağı düşünülen konsantrasyonları baz alınarak, ilk konsantrasyon değerinin hep yarı değerleri olacak şekilde 1/2 oranında dilüsyon oranıyla dozlar uygulandı.

Uygulanan İlaç Grupları

a. Kontrol grubu (ilaçsız grup)
b. Sadece ABS içeren grup
c. Sadece anti-kanser ilaç içeren grup (Karboplatin/Sisplatin/Doksorubisin/ Dosetaksel)
d. Aynı anda anti-kanser ilaç+ABS (Karboplatin+ABS/Sisplatin+ABS/

Doksorubisin+ABS/Dosetaksel+ABS)

e. İlk önce anti-kanser ilaç sonra ABS eklenen grup (1.Karboplatin 2.ABS/ 1.Sisplatin 2.ABS / 1.Doksorubisin 2.ABS / 1.Dosetaksel 2.ABS)
f. İlk önce ABS sonra anti-kanser ilaç eklenen grup (1.ABS 2.Karboplatin / 1.ABS 2.Sisplatin / 1.ABS 2.Doksorubisin / 1.ABS 2.Dosetaksel)

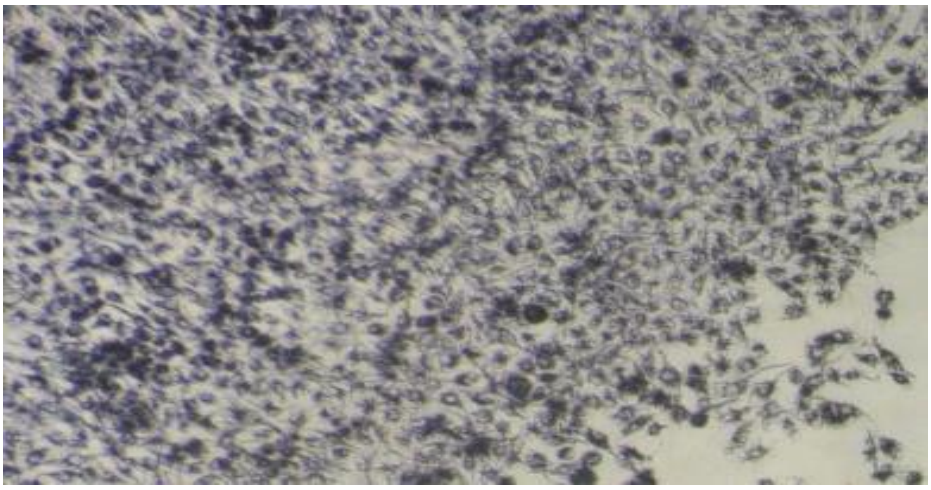
ABS'nin ve kemoterapötik ilaçların MCF-7 hücreleri üzerindeki LD_{50}, hücrelerin %50'sini inhibisyona götüren doz, değerleri spektrofotometrik olarak bulunduktan sonra, hücreler LD_{50} değerlerinin 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, ve 1/16 konsantrasyonlarında (maksimum 7 ayrı doz) ABS ile; önce ABS sonra ilaç, önce ilaç sonra ABS ve ABS ile ilaçlar aynı anda olacak şekilde kombine edildi. Chou tarafından ortaya konan CI prensibine dayanarak; ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan, sinerjizmin en çok görüldüğü kombinasyonlar, hücresel apoptozis ve hücre proliferasyonunu ilgilendiren *in vitro* deneylerle analiz edilerek, apoptoz ve gen ifade çalışmaları yapıldı.

Alet ve Malzemeler

Spektrofotometre (Ratastie 2,FI-01620 Vantaa, Finlandiya)
-150° C dondurucu (Panasonic/MDF-1156-PE, Japonya)
Mixing blok (MB-102,Çin)
Soğutmalı santrifüj (Hermle/Z326K, Almanya)
Vorteks (MX-S. Dragon Lab)
75 cm^2 hücre kültürü flaskı (USA)
Hücre kültürü plate (Nest Biotech, Çin)
Kabin (Ferrara, İtalya)
CO_2 Inkübatör (Panasonic Healthcare Co., Japonya)
Mikroskop (Nikon Eclipse TS100)
Sanrifüj (Pro-Research, Centurion Scientific Ltd., UK)
Derin dondurucu (Vestel)
Buzdolabı (Vestel)
Otomatik pipet (Eppendorf, Almanya)
Cam malzemeler (Deney tüpleri, balon jojeler, beherler v.b)

Hücre Canlılık Testi

Bu yöntem, MTT (mitokondriyal toksisite testi) boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir
(Şekil 18) (168,169).



Şekil 18. MTT testi uygıulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde oluşan formazon kristallerinin görünümü

MCF-7 meme kanseri hücrelerinin, 96 kuyucuklu petriye ekimleri yapıldı ve 24 saat boyunca hücrelerin yüzeye yapışması için beklendi.

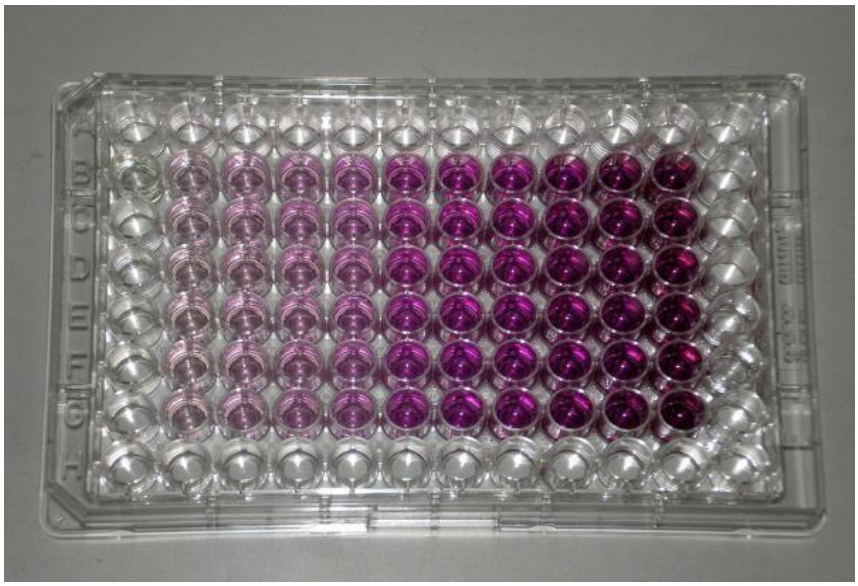
1. İlk olarak LD50 değerlerini bulmak için yaptığımız uygulamada; hazırladığımız farklı dozdaki kematörapik ilaçlar ve ABS, 24 saat sonunda platelere uygulandı ve 24 saat sonunda boşaltılıp taze besiyeri konulup 72 saat boyunca inkübe edildi. Kombinasyonlarda ise; önce ABS sonra ilaç uygulamasında; 24 saat sonra ABS uygulandı ve 24 saat sonunda boşaltılıp taze besiyeriyle birlikte ilaç uygulaması yapıldı. İlaç uygulamasında da 24 saat beklettikten sonra, plate boşaltılıp taze besiyeri konulup 72 saat boyunca inkübe edildi. Önce ilaç sonra ABS uygulamasında; 24 saat sonra ilaç uygulandı ve 24 saat sonunda boşaltılıp taze besiyeriyle birlikte ABS uygulaması yapıldı. ABS uygulamasında da 24 saat beklettikten sonra, plate boşaltılıp taze besiyeri konulup 72 saat boyunca inkübe edildi. Aynı anda ABS ve ilaç uygulamasında; 24 saat sonra ABS ve ilaç uygulaması aynı anda yapıldı. 24 saat

beklettikten sonra, plate boşaltılıp taze besiyeri konulup 72 saat boyunca inkübe edildi.

2. Ardından 20 µl MTT çözeltisi, her bir kuyucuğa eklendi ve hücreler 37°C'de, %5 CO2 ortamında 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

3. MTT ayıracı eklenmiş besiyeri, hücrelerden çekildi ve her kuyucuğa 200 µl DMSO maddesi ilave edildi. Plaka, oda sıcaklığında 5 dakika süreyle karanlıkta inkübe edildi (Şekil 19).

4. Mikroplaka okuyucusunda, optik yoğunluk (OD) 492 nm'lik bir referans dalga boyunda absorbans ölçülerek tespit edildi.



Şekil 19. MTT uygulamasından sonra genel plate görünümü

Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi

Tali sitometre ile apoptoz tayin çalışmaları, Annexin V Apoptosis Detection Kit-APC eBioscience kullanılarak kit prosedürüne göre yapıldı. Bu yöntemde; apoptotik hücreler yeşil floresan, ölü hücreler kırmızı ve yeşil floresan (sarı olarak gözlenir), canlı hücreler çok az floresan gösterirler. Yöntem, apoptoz sırasında Annexin-V ve membran bütünlüğü bozulmuş hücre içine giren Propidiumiyodid (PI) floresan boyalarının moleküllere bağlanması ile apoptotik/nekrotik hücrelerin belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Apoptotik hücre ölümü sırasında; hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine dönen bir membran fosfolipidi olan fosfatidil serin moleküllerinin Ca^{+2} iyonu varlığında floresan boya Annexin-V ile bağlanması sonucunda apoptotik hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir. Sağlıklı hücrelerde; hücre içine giremeyen, membrandan geçemeyen ve DNA'ya bağlanamayan PI boyası ise, hücre membran bütünlüğünün bozulması ile hücre içine geçerek DNA'ya bağlanarak nekrotik hücre ölüm

yüzdesini belirtmektedir. TALİ sitometre ile apoptoz tayin çalışması için 24 kuyucuklu plağa, 1 ml besiyeri ile birlikte yaklaşık 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin çoğalma durumlarına göre, 1-2 gün karbondioksitli inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bir önceki çalışmada belirlenen süreler ile uygulama yapıldı. İnkübayon süresi sonunda, 24'lü kuyucuklu plaklardaki besi yeri uzaklaştırıldı. Bu kuyucuklara 1 ml tripsin EDTA eklendi, 10 dakika inkübe edildi ve hücreler toplanarak ependorf tüplere alındı. Tüpler 700 rpm devirde, 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda, üstteki tripsin ve süpernatant tamamen çekilerek uzaklaştırıldı ve tüp dibine çöken hücreler analiz için kullanıldı.

1. Tüpün dibinde kalan hücrelere, 200 µl 1X Annexin binding buffer konuldu.
2. Bu karışımın her 100 µl'si için, 5 µl Annexin V konularak vortekslendi.
3. 20 dk karanlıkta bekletildi.
4. 750 g'de 2 dk santrifüj edildi ve üstte kalan kısım uzaklaştırıldı.
5. 100 µl 1X Annexin binding buffer eklenerek vortekslendi.
6. Bu karışıma, 1 µl TALİ® Propidium İodide (PI) solüsyonu katılarak karanlık ortamda 1-5 dk inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında, tüpler içerisindeki karışımdan 25 µl alınarak TALİ için hazırlanan özel lamlara döküldü ve TALİ apoptoz analiz programı ile okundu.

RNA İzolasyonu

MCF-7 hücre kültüründen total RNA izolasyonu için, Total RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences) kullanılarak RNA kit protokolünde yer alan basamaklar izlendi.

1. Hücrelerin kaldırılması işlemi, lysis tamponu ile yapıldı. Hücreler kaldırıldıktan sonra tüplere konuldu.
2. Ardından (1:1) oranında %70'lik etanol konuldu.
3. Vortekslenerek, karışım filtre konulan ependorf tüpe alındı.
4. 12000 g'de 20 sn oda sıcaklığında santrifüjlendi. Filtreli kısım başka bir tüpe alındı.
5. 700 µl yıkama tamponu I (Wash buffer I) eklendi. Oda sıcaklığında 12000 g'de 15 sn santrifüj edildi.
6. Filtreli kısım başka bir tüpe alındı.
7. Filtrenin üzerine 500 µl yıkama tamponu II (Wash buffer II) eklendi.

8. Oda sıcaklığında 12000 g'de 15 sn santrifüj edildi.

9. Alttaki kısım döküldü ve filtrenin üzerine tekrardan 500 µl yıkama tamponu II (Wash buffer II) eklendi.

10. 12000 g'de 2.30 dk oda sıcaklığında santrifüjlendi.

11. Filtreli kısım 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınarak 50 µl RNAaz free water eklendi.

12. Maksimum hızda oda sıcaklığında 2 dakika santrifüjlendi.

13. Filtre çıkarılarak atıldı ve elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü.

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'ların kalitesi ve miktarları, spektrofotometre (NanoQ OPTIZEN) ile ölçümleri yapılarak sonuçlar ng/µl belirlendi. Ölçümleri gerçekleştirilen RNA'lar ile ilgili hesaplamalar yapıldı ve RNA miktarları eşitlendi. ArdındanRT-PCR'da kullanılana kadar, -80°C"lik derin dondurucuda saklandı.

MCF-7 hücre kültüründen izole edilen RNA miktarları Qubit® Fluorometer (Invitrogen) ile belirlendi ve High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak PCR şartları; 25^0C'de 10 dk, 37^0C'de 120 dakika ve 85^0C'de 5dk inkübe edilerek cDNA' lar sentezlendi.

Real Time-PCR (RT-PCR) Çalışmaları

DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Çift zincirli DNA'ya bağlandıkları zaman floresan sinyal veren SYBR Green boyası kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, floresans miktarı ile ölçülmektedir.

MCF-7 hücre hattında; p53 ve Bcl-2, Bax, Sitokrom-c, Apaf-1 ve Kaspaz-9 apoptoz yolak proteinlerinin sentezinden sorumlu gen ekspresyonları, RT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Gen ekspresyon çalışmalarında, "RNA izolasyonu" bölümünde açıklandığı şekilde izole edilen RNA' lardan elde edilen cDNA' lar kullanıldı. Bu cDNA'lar, RT-PCR' da SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak çoğaltıldı ve aşağıda sıraladığımız primerleri kullanılarak, gen ekspresyonları belirlendi.

Bcl-2	F: (5' ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA -3') R: (5' ACAGTTCCACAAAGGCATCC -3')
p53	F:(5'CACGAGCGCTGCTCAGATAGC-3') R: (5'ACAGGCACAAACACGCACAAA-3')

Kaspaz-9 F:(5′-GAGTCAGGCTCTTCCTTTG-3′)
R: (5′- CCTCAAACTCTCAAGAGCAC-3′)

Bax F:(5’-TTCATCCAGGATCGAGCAGA-3’)
R: (5’-GCAAAGTAGAAGGCAACG-3’)

Sitokrom-c F:(5′-AGTGGCTAGAGTGGTCATTCATTTACA-3′)
R: (5′-TCATGATCTGAATTCTGGTGTATGAGA-3′)

Apaf-1 F:(5′-GATATGGAATGTCTCAGATGGCC-3′)
R: (5′-GGTCTGTGAGGACTCCCCA-3′)

Düzeltme faktörü olarak GAPDH: F (5’-TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3) ve R (5’-TGTCATCATATTTGGCAGGTTT-3’) primerlerı kullanıldı. Eldeki syber green mix, cDNA ve primerlar RT-PCR’da PCR program: 1 döngü 2 dakika 50ºC ve 10 dakika 95ºC olarak, bunu takiben, 40 döngü denatürasyon (95ºC 15 s) ve uzatma (60ºC‘de 1 dk) ile çoğaltıldı.

İstatistiksel Analiz

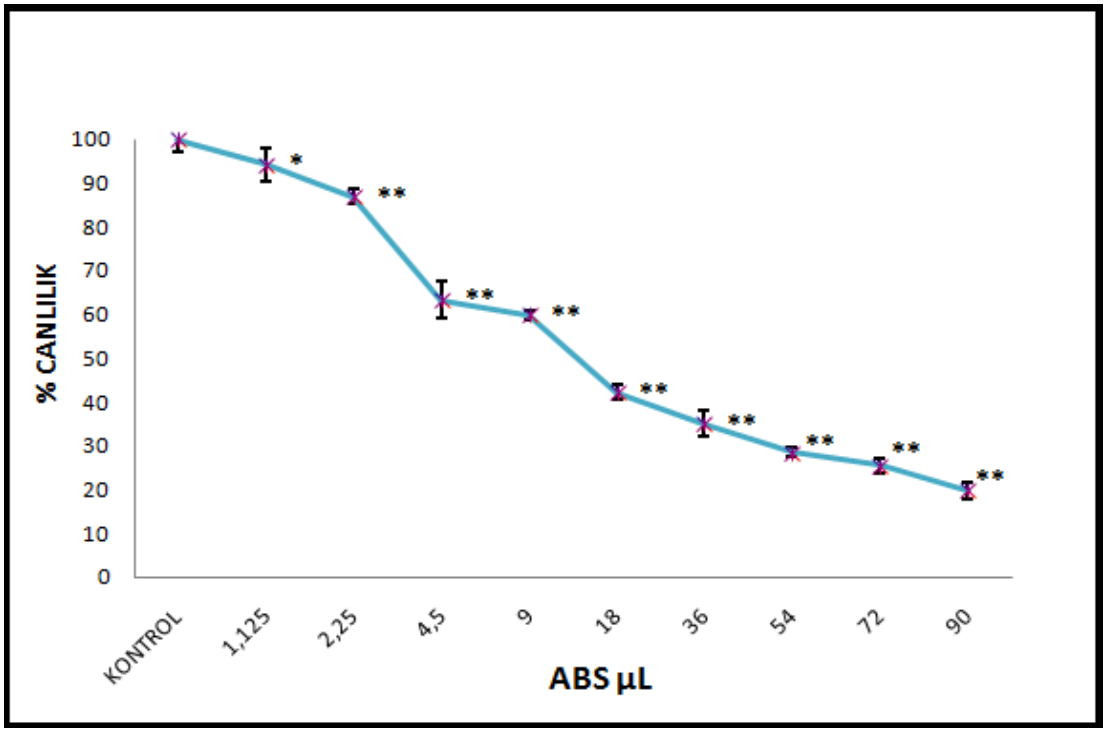
MTT yöntemi ile en az 7 farklı dozda olacak şekilde, ABS ile kemoterapötik ilaçların ve kombinasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki olası etkisi ve % canlılık oranları mikroplaka okuyucu ile belirlendi. ABS ve ilaçların MCF-7 hücreleri üzerindeki LD_{50} değerini bulmak içinde, lojistik regresyona alternatif olarak bir veya daha fazla açıklayıcı değişkenin kategorik bir yanıt değişkeni üzerindeki etkisini bulmak için kullanılan probit analizi yapıldı. Student’s t testi kullanarak elde edilen verilerin analizi, JMP istatistik programı ile yapıldı ve ABS’nin, ilaçların ve kombinasyonların konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılık değerini gösteren grafikler elde edildi. İstatistiksel önem, $p<0.05$ olarak kabul edildi.

Kombinasyonlardaki canlılık yüzde değerleri; sinerjistik, additif ya da antagonistik etkilerini saptamak üzere, veriler CompuSyn programına aktarıldı. CompuSyn’de hesaplanan doz etki değerlerinde en çok sinerjizm gösteren kombinasyon değerleri, gen analizinde kullanıldı. Konsantrasyonlar arasındaki gen ifadelerinin anlamlı olup olmadığı, student’s t testi ile araştırıldı. Sonuçlar, en az 3 paralel çalışmanın ortalaması ± standart hata olarak ifade edildi ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak değerlendirildi.

BULGULAR

MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde ABS ve Kemoterapötik İlaçların LD_{50} Değerlerinin Bulunması

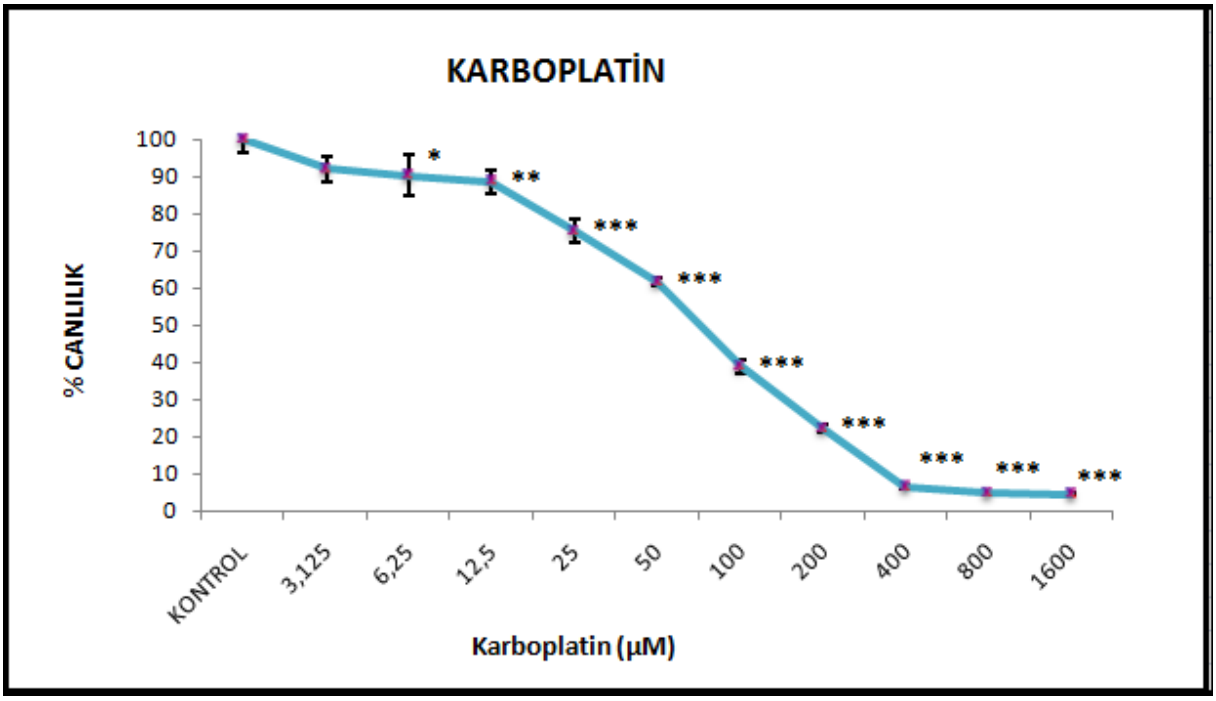
MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine, çeşitli konsantrasyonlarda ABS tek başına uygulandı. Yaptığımız çalışmada; ABS'nin en düşük dozu olan 1.125 µl'de dahi, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Probit analizi ile ABS'nin MCF-7 hücreleri ile yaptığımız MTT deneyinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi, ABS'nin LD_{50} değerinin 13 µl olduğunu göstermiştir. Yaptığımız ilaç etkileşim çalışmalarında da; bu LD_{50} değeri temel alınmıştır. ABS uygulamasından 72 saat sonra, MCF-7 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 20).



**: p<0.0001, *: p<0.05, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 20. MCF-7 hücre dizisinde ABS uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi

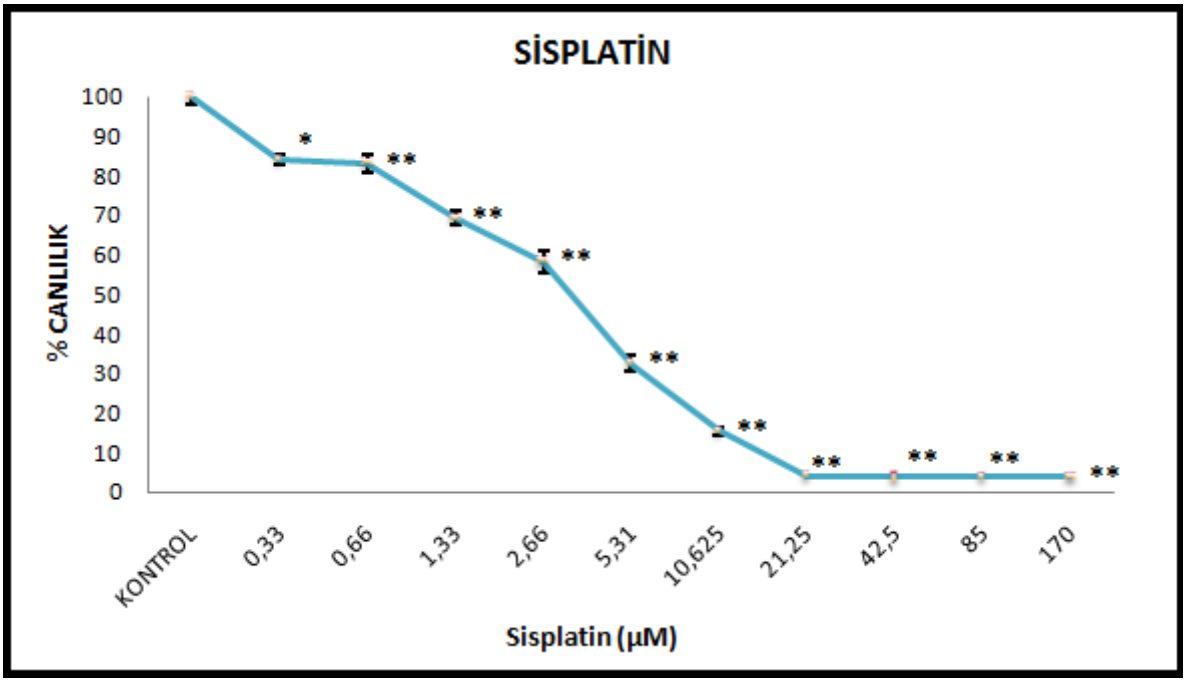
MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine; çeşitli konsantrasyonlarda karboplatin tek başına uygulandığında, kontrole göre 6.25 -1600 µM arasındaki dozlarında anlamlı düzeyde insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Probit analizi ile karboplatinin MCF-7 hücreleri ile yaptığımız MTT deneyinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi, karboplatinin LD_{50} değerinin 63.14 µM olduğunu göstermiştir. Yaptığımız ilaç etkileşim çalışmalarında da, bu LD_{50} değeri temel alınmıştır (Şekil 21).



***: p<0.0001, **: p<0.001, *: p<0.01, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 21: MCF-7 hücre dizisinde karboplatin uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine; çeşitli konsantrasyonlarda sisplatin tek başına uygulandı. Yaptığımız çalışmada, sisplatinin en düşük dozu olan 0.33 µM'da dahi, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Probit analizi ile sisplatinin MCF-7 hücreleri ile yaptığımız MTT deneyinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi, sisplatinin LD_{50} değerinin 2.85 µM olduğunu göstermiştir. Yaptığımız ilaç etkileşim çalışmalarında da, bu LD_{50} değeri temel alınmıştır. Sisplatin uygulamasından 72 saat sonra, MCF-7 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 22).

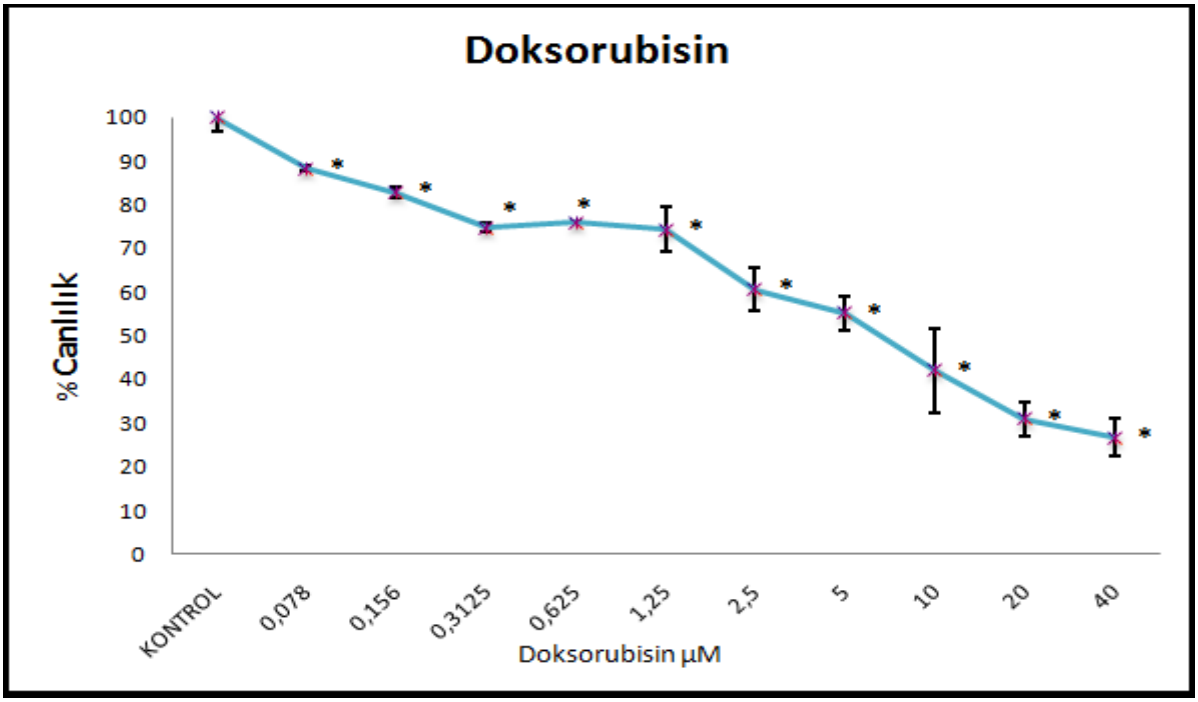


**: p<0.0001, *: p<0.001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 22. MCF-7 hücre dizisinde sisplatinin uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine; çeşitli konsantrasyonlarda doksorubisin tek başına uygulandı. Yaptığımız çalışmada, doksorubisinin en düşük dozu olan 0.078 µM'da dahi, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Probit analizi ile doksorubisinin MCF-7 hücreleri ile yaptığımız MTT deneyinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi, doksorubisinin LD_{50} değerinin 5.1 µM olduğunu göstermiştir. Yaptığımız ilaç etkileşim çalışmalarında da, bu LD_{50} değeri temel alınmıştır. Doksorubisin uygulamasından 72 saat sonra, MCF-7 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 23).

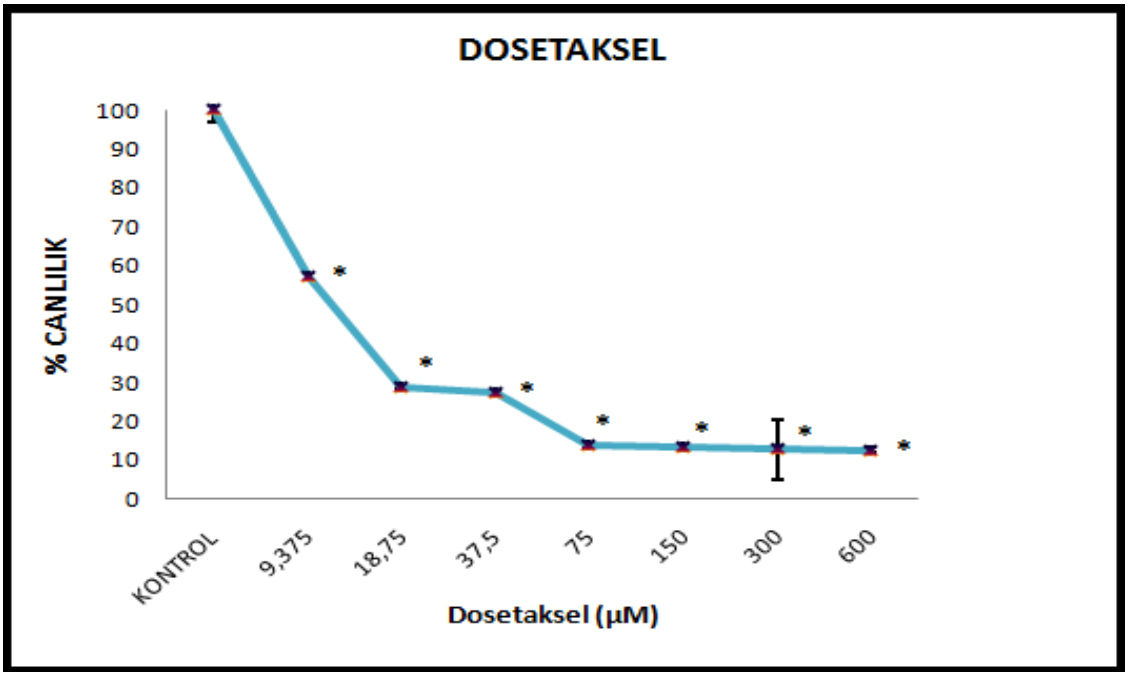
.



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 23. MCF-7 hücre dizisinde doksorubisin uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine; çeşitli konsantrasyonlarda dosetaksel tek başına uygulandı. Yaptığımız çalışmada, dosetakselin en düşük dozu olan 9.375 µM'da dahi, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Probit analizi ile sisplatinin MCF-7 hücreleri ile yaptığımız MTT deneyinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi, dosetakselin LD_{50} değerinin 9.3 µM olduğunu göstermiştir. Yaptığımız ilaç etkileşim çalışmalarında da, bu LD_{50} değeri temel alınmıştır. Dosetaksel uygulamasından 72 saat sonra, MCF-7 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 24).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 24. MCF-7 hücre dizisinde dosetakselin uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi

MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinin ABS ve Kemoterapötik İlaçlar Arasındaki Etkileşimin Araştırılması

Karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakselin ABS ile kombinasyonlarının hücre canlılığı analizleri gerçekleştirildi. Bu analizde; Chou'nun protokolüne göre karboplatin, sisplatin, doksorubisin, dosetaksel ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16LD_{50} konsantrasyonları kombine edildi. Kombinasyonların sinerjistik etkilerini incelemek üzere; medyan etki denklemi ve kombinasyon indeksi denklemlerine göre iki veya daha fazla ilacın aditif, sinerjistik veya antagonistik etki gösterip göstermediğini otomatik olarak analiz eden CompuSyn programı kullanıldı.

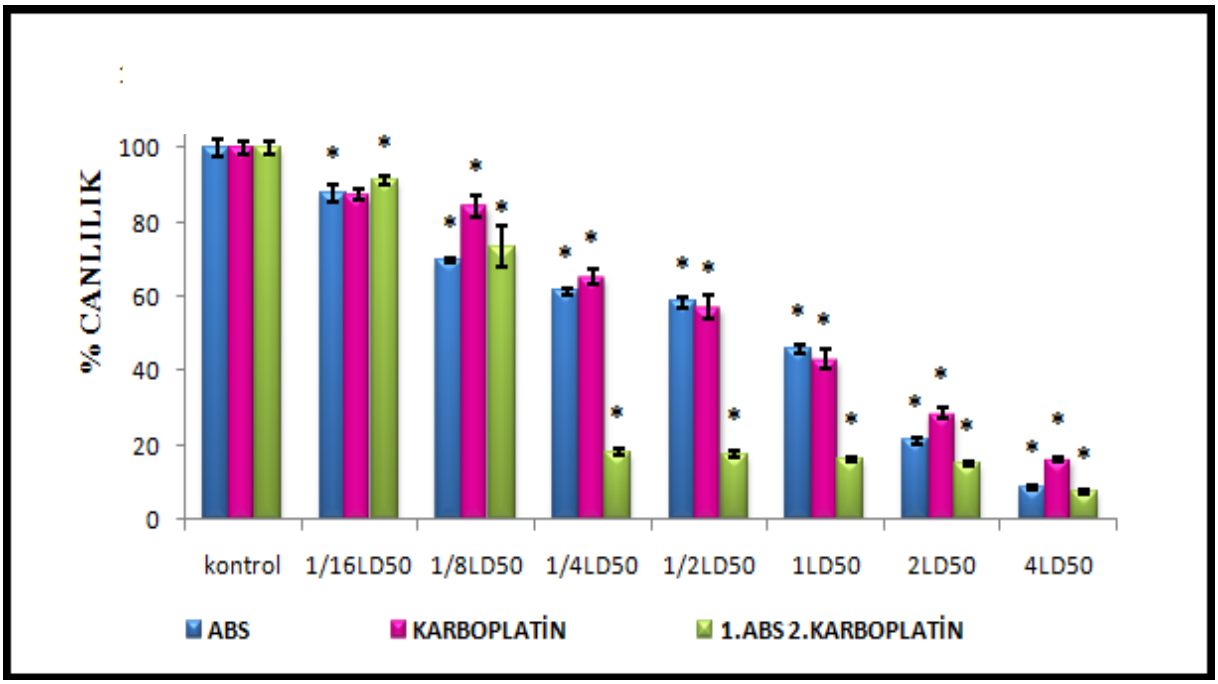
ABS'nin kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonu 3 şekilde gerçekleştirildi. Birincisinde, ABS ve ilaçlar aynı anda uygulandı. İkincisinde, kuyucuklara önce ABS uygulandı ve 24 saat inkübasyonun ardından kemoterapötik ilaç uygulandı. Üçüncüsünde ise, kuyucuklara önce kemoterapötik ilaç uygulandı ve 24 saat inkübasyonun ardından, ABS uygulanarak etkileşimi incelendi.

İlaçlarla 24 saat inkübasyonun ardından, platelerden ilaçlı medium tamamen uzaklaştırıldı ve platelere taze medium eklendi. 72 saat inkübasyon sonrasında, hücre canlılığı

MTT metodu ile değerlendirildi. Elde edilen veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri hesaplandı.

Önce ABS Sonra Karboplatin (1.ABS 2.Karboplatin)

Önce ABS ardından karboplatin uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, karboplatin ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16LD_{50} konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 25). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 25. Önce ABS sonra karboplatin kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 3,94 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %87,40 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %91,23 oranında saptandı. 1/8LD_{50}'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,5 ve 7,88 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %84,5 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %73,44 oranında saptandı. 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 15,75 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %65,38 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre

canlılığına etkisi %18,2 oranında saptandı. 1/2LD_{50}'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 31,5 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %57,20 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %17,7 oranında saptandı. 1LD_{50}'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 63 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %43,23 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %16,28 oranında saptandı. 2LD_{50}'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 126 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %28,57 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,01 oranında saptandı. 4LD_{50}'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 252 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %16,32 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %7,46 oranında saptandı.

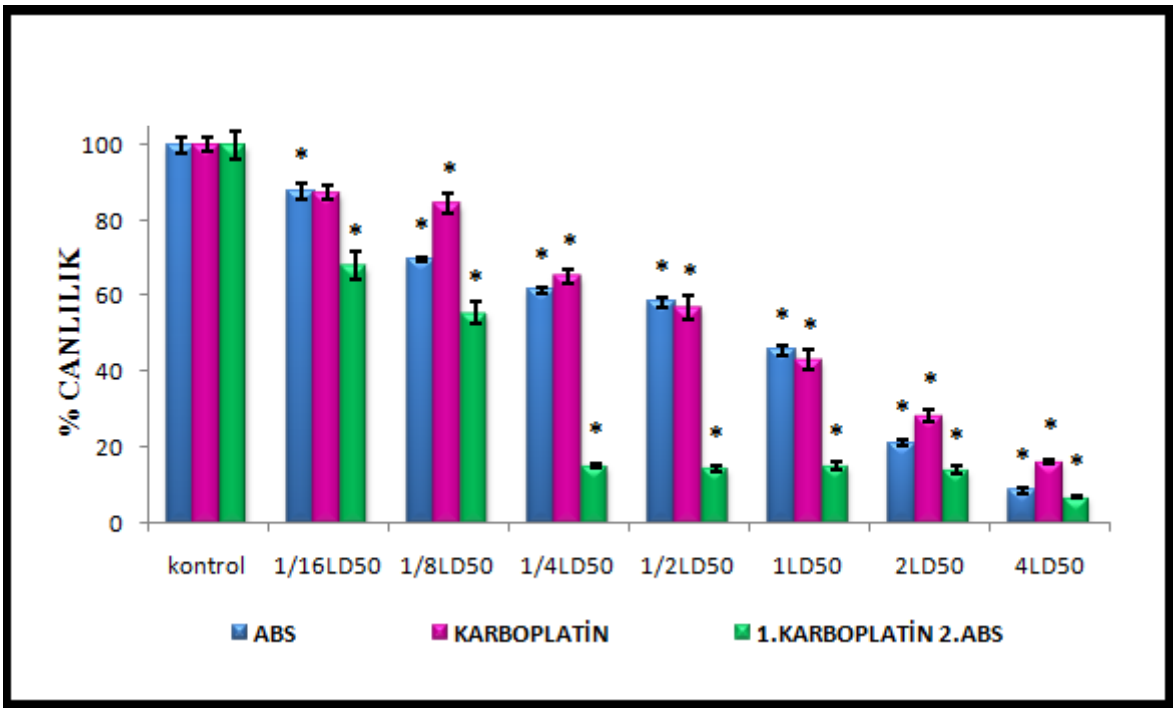
MCF-7 hücre hattına yapılan önce ABS sonra karboplatin kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında (1/16LD_{50} kombinasyonu hariç), hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 4).

Tablo 4. Önce ABS sonra karboplatin kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	**CI (Kombinasyon İndeksi)**	**Yorum**
4LD_{50}: ABS (52µl)+Karboplatin (252µM)	0.86962	Hafif sinerjistik etki
2LD_{50}: ABS (26µl)+Karboplatin(126µM)	1.03932	Aditif etki
1LD_{50}: ABS (13µl)+Karboplatin (63 µM)	0.57834	Sinerjizm
1/2LD_{50}: ABS (6.5µl)+Karboplatin (31.5µM)	0.32328	Sinerjizm
1/4LD_{50}: ABS (3.25µl)+Karboplatin (15.75µM)	0.16814	Kuvvetli sinerjizm
1/8LD_{50}: ABS (1.625µl)+Karboplatin (7.88µM)	1.38729	Antagonist
1/16LD_{50}: ABS (0.8125µl)+Karboplatin (3.94µM)	3.04162	Antagonist

Önce Karboplatin Sonra ABS (1.Karboplatin 2.ABS)

Önce karboplatin ardından ABS uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, karboplatin ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16LD_{50} konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 26). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 26. Önce karboplatin sonra ABS kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 3,94 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %87,40 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %68,06 oranında saptandı. 1/8LD_{50}'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 7,88 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %84,5 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %55,62 oranında saptandı. 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 15,75 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %65,38 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,32 oranında saptandı. 1/2LD_{50}'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 31,5 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %57,20 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %14,5 oranında

saptandı. $1LD_{50}$'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 63 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %43,23 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,15 oranında saptandı. $2LD_{50}$'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 126 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %28,57 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %14,04 oranında saptandı. $4LD_{50}$'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 252 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %16,32 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %7,03 oranında saptandı.

MCF-7 hücre hattına yapılan önce karboplatin sonra ABS kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 5).

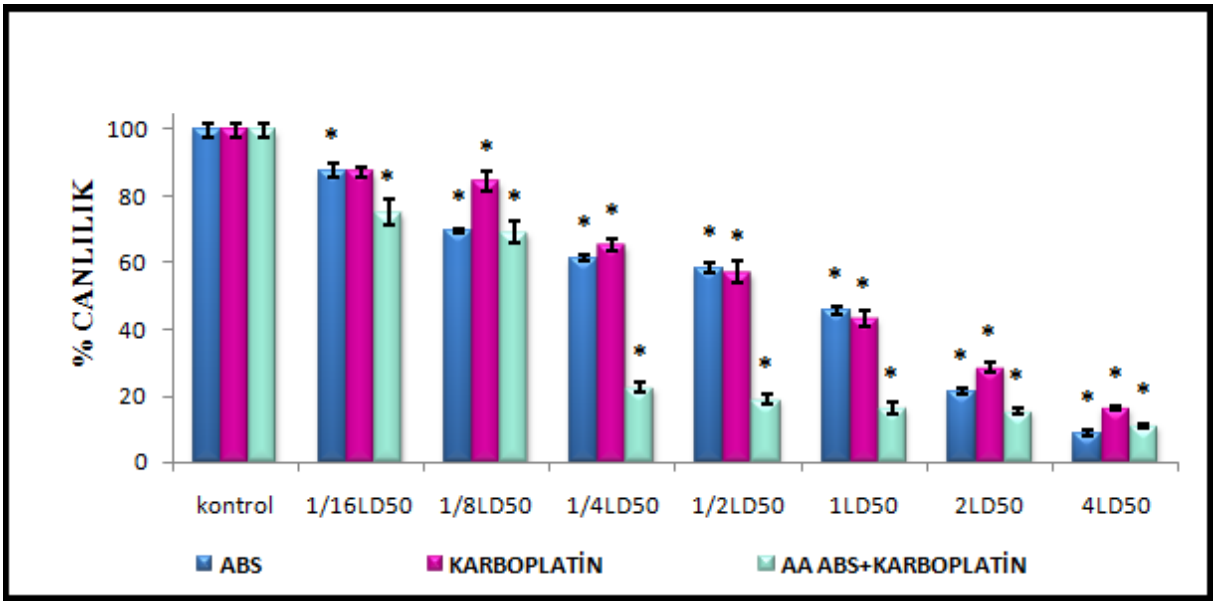
Tablo 5. Önce karboplatin sonra ABS kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$: ABS (52µl)+Karboplatin (252µM)	0.80938	Aditif etki
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Karboplatin (126µM)	0.95296	Aditif etki
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Karboplatin (63 µM)	0.52610	Sinerjizm
$1/2LD_{50}$: ABS (6.5µl)+Karboplatin (31.5µM)	0.24831	Kuvvetli sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Karboplatin (15.75µM)	0.13345	Kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.625µl)+Karboplatin (7.88µM)	0.57461	Sinerjizm
$1/16LD_{50}$: ABS (0.8125µl)+Karboplain (3.94µM)	0.51899	Sinerjizm

Aynı Anda Karboplatin+ABS (AA Karboplatin+ABS)

Aynı anda karboplatin+ABS uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, karboplatin ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 27). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması

sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 27. Aynı anda ABS+karboplatin kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 3,94 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %87,40 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %75,36 oranında saptandı. 1/8LD_{50}'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 7,88 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %84,5 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %69,33 oranında saptandı. 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 15,75 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %65,38 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %22,52 oranında saptandı. 1/2LD_{50}'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 31,5 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %57,20 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %18,86 oranında saptandı. 1LD_{50}'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 63 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %43,23 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %16,18 oranında saptandı. 2LD_{50}'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 126 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %28,57 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,43 oranında saptandı. 4LD_{50}'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77

ve 252 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %16,32 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %11,14 oranında saptandı.

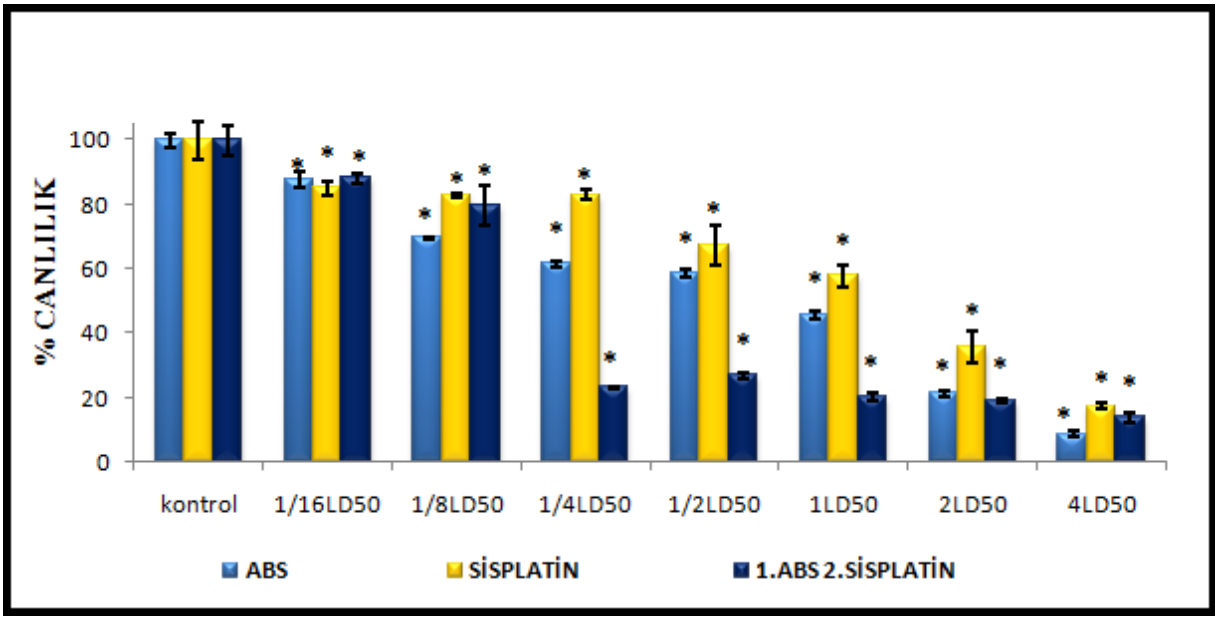
MCF-7 hücre hattına yapılan, aynı anda ABS+Karboplatin kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 6).

Tablo 6. Aynı anda karboplatin+ABS kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$: ABS (52µl)+Karboplatin (252µM)	1.42029	Antagonist
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Karboplatin (126µM)	1.07723	Aditif etki
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Karboplain (63 µM)	0.57373	Sinerjizm
$1/2LD_{50}$: ABS (6.5µl)+Karboplain (31.5µM)	0.35259	Sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Karboplain (15.75µM)	0.22599	Kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.625µl)+Karboplain (7.88µM)	1.10857	Antagonist
$1/16LD_{50}$: ABS (0.8125µl)+Karboplain (3.94µM)	0.77634	Aditif etki

Önce ABS Sonra Sisplatin (1.ABS 2.Sisplatin)

Önce ABS ardından sisplatin uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, sisplatin ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 28). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 28. Önce ABS sonra sisplatin kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; $1/16LD_{50}$'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,178 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %85,05 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %88,11 oranında saptandı. $1/8LD_{50}$'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 0,356 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %82,74 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %79,53 oranında saptandı. $1/4LD_{50}$'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 0,712 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %83,07 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %23,15 oranında saptandı. $1/2LD_{50}$'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 1,425 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %67,54 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %26,81 oranında saptandı. $1LD_{50}$'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 2,85 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %57,87 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %20,07 oranında saptandı. $2LD_{50}$'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 5,7 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %35,88 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %19,09 oranında saptandı. $4LD_{50}$'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 11,4 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %17,28 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %13,78 oranında saptandı.

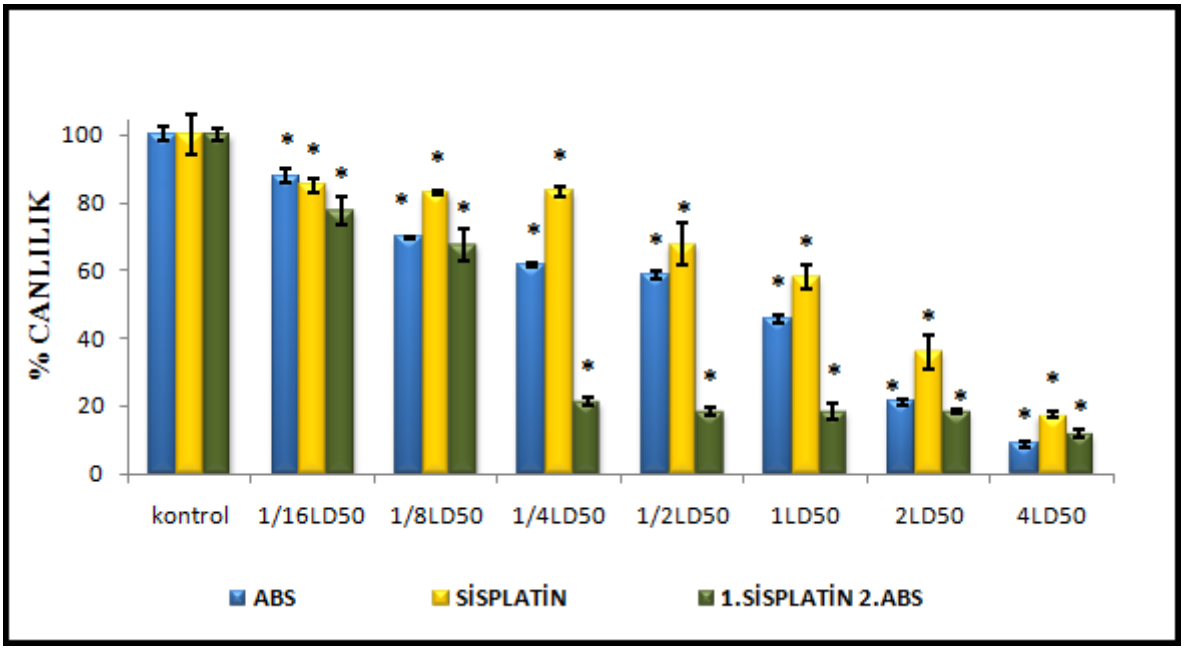
MCF-7 hücre hattına yapılan önce ABS sonra sisplatin kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 7).

Tablo 7. Önce ABS sonra Sisplatin kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$: ABS (52µl)+Sisplatin (11.4µM)	1.53907	Antagonist
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Sisplatin (5.7 µM)	1.19592	Antagonist
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Sisplatin (2.85 µM)	0.64129	Sinerjizm
$1/2LD_{50}$: ABS (6.5µl)+Sisplatin (1.425µM)	0.49196	Sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Sisplatin (0.712µM)	0.19713	Kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.62µl)+Sisplatin (0.356µM)	1.82387	Antagonist
$1/16LD_{50}$: ABS (0.812µl)+Sisplatin (0.178µM)	1.91834	Antagonist

Önce Sisplatin Sonra ABS (1.Sisplatin 2.ABS)

Önce sisplatin ardından ABS uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, sisplatin ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 29). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 29. Önce sisplatin sonra ABS kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,178 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %85,05 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %77,61 oranında saptandı. 1/8LD_{50}'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 0,356 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %82,74 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %67,61 oranında saptandı. 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 0,712 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %83,07 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %21,16 oranında saptandı. 1/2LD_{50}'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 1,425 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %67,54 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %18,26 oranında saptandı. 1LD_{50}'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 2,85 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %57,87 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %18,29 oranında saptandı. 2LD_{50}'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 5,7 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %35,88 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %18,15 oranında saptandı. 4LD_{50}'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 11,4 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %17,28 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %11,58 oranında saptandı.

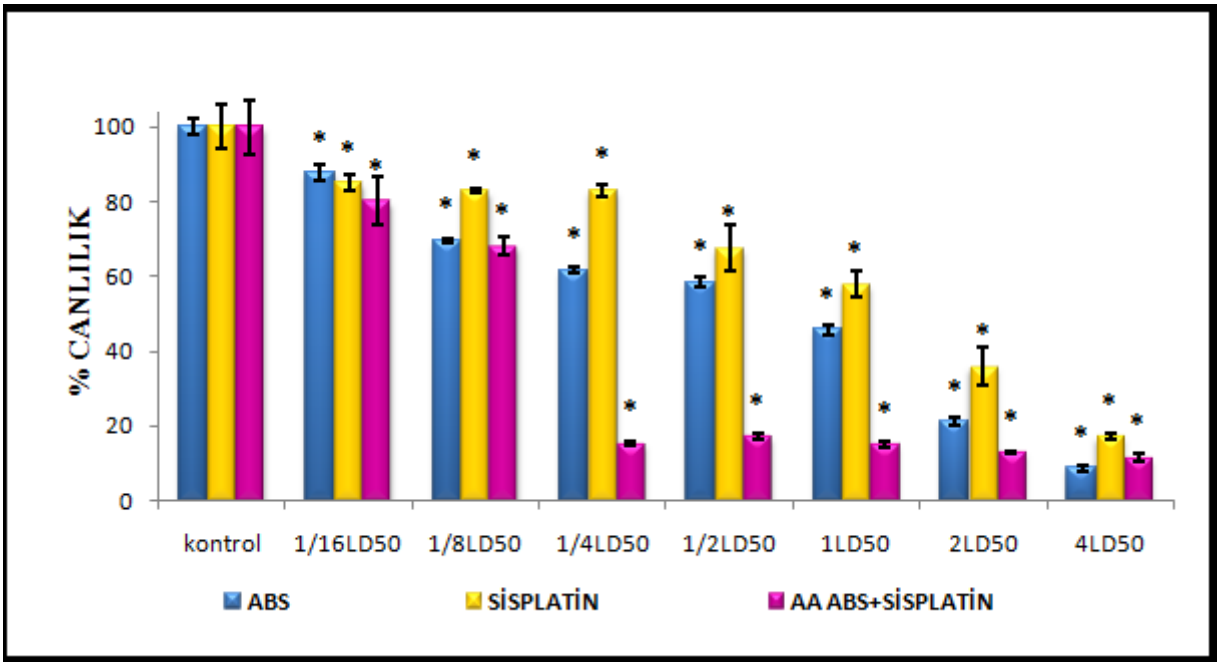
MCF-7 hücre hattına yapılan önce sisplatin sonra ABS kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 8).

Tablo 8. Önce Sisplatin sonra ABS kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$: ABS (52µl)+Sisplatin (11.4µM)	1.22903	Antagonist
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Sisplatin (5.7 µM)	1.11443	Antagonist
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Sisplatin (2.85 µM)	0.56325	Sinerjizm
$1/2LD_{50}$: ABS (6.5µl)+Sisplatin (1.425µM)	0.28086	Kuvvetli sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Sisplatin (0.712µM)	0.17297	Kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.62µl)+Sisplatin (0.356µM)	0.89400	Hafif sinerjistik etki
$1/16LD_{50}$: ABS (0.812µl)+Sisplatin (0.178µM)	0.79913	Hafif sinerjistik etki

Aynı Anda Sisplatin+ABS (AA ABS+Sisplatin)

Aynı anda sisplatin+ABS uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, sisplatin ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 30). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 30. Aynı anda ABS+sisplatin kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; $1/16LD_{50}$'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,178 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %85,05 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %80,14 oranında saptandı. $1/8LD_{50}$'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 0,356 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %82,74 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %68,15 oranında saptandı. $1/4LD_{50}$'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 0,712 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %83,07 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,36 oranında saptandı. $1/2LD_{50}$'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 1,425 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %67,54 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,10 oranında saptandı. $1LD_{50}$'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 2,85 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %57,87 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %18,29 oranında saptandı. $2LD_{50}$'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 5,7 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %35,88 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %13,03 oranında saptandı. $4LD_{50}$'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 11,4 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %17,28 olurken, bu dozların

kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %11,59 oranında saptandı.

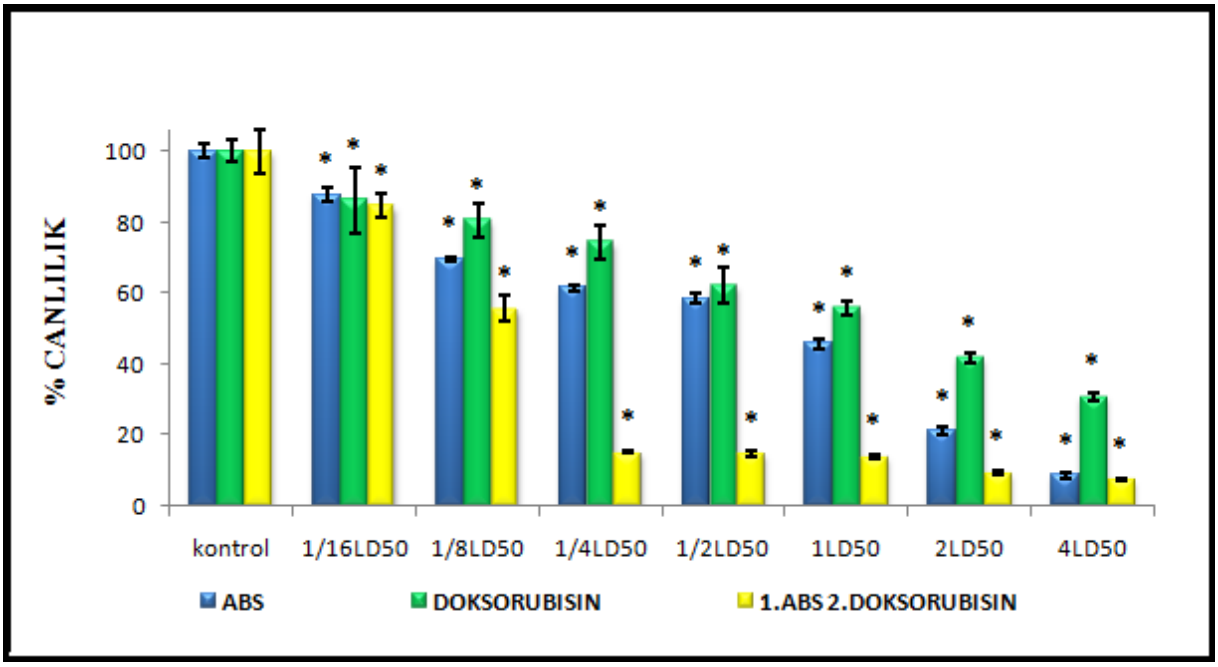
MCF-7 hücre hattına yapılan, aynı anda ABS+Sisplatin kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 9).

Tablo 9. Aynı anda Sisplatin+ABS kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$: ABS (52µl)+Sisplatin (11.4µM)	1.23106	Antagonist
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Sisplatin (5.7 µM)	0.71529	Hafif sinerjistik etki
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Sisplatin (2.85 µM)	0.43425	Sinerjizm
$1/2LD_{50}$: ABS (6.5µl)+Sisplatin (1.425µM)	0.25975	Kuvvetli sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Sisplatin (0.712µM)	0.11103	Kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.62µl)+Sisplatin (0.356µM)	0.91977	Aditif etki
$1/16LD_{50}$: ABS (0.812µl)+Sisplatin (0.178µM)	0.95215	Aditif etki

Önce ABS Sonra Doksorubisin (1.ABS 2.Doksorubisin)

Önce ABS ardından doksorubisin uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, doksorubisin ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 31). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 31. Önce ABS sonra doksorubisin kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,3125 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %86,2 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %84,62 oranında saptandı. 1/8LD50'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 0,625 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %80,52 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %55,6 oranında saptandı. 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 1,25 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %74,28 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,13 oranında saptandı. 1/2LD_{50}'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 2,5 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %62,13 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %14,83 oranında saptandı. 1LD_{50}'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 5 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %55,73 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %14,09 oranında saptandı. 2LD_{50}'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 10 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %41,9 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %9,47 oranında saptandı. 4LD_{50}'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 20 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi

%30,95 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %7,64 oranında saptandı.

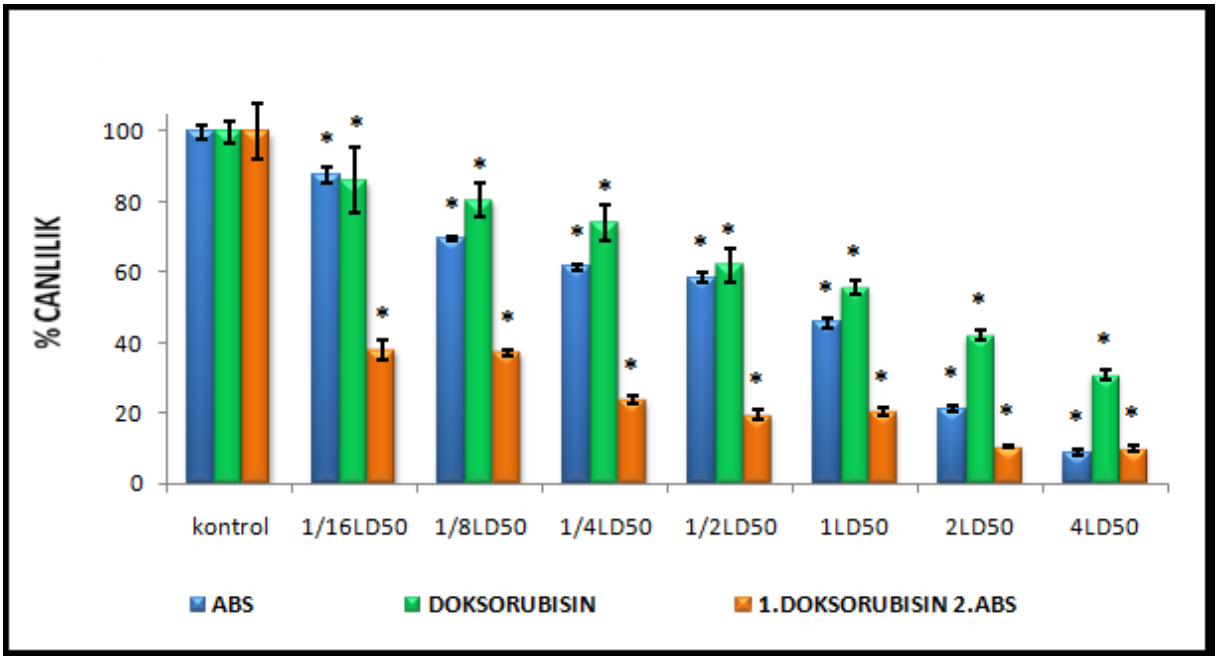
MCF-7 hücre hattına yapılan, önce ABS sonra doksorubisin kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 10).

Tablo 10. Önce ABS sonra doksorubisin kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$:ABS (52µl)+Doksorubisin (20µM)	0.61733	Sinerjizm
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Doksorubisin (10µM)	0.40301	Sinerjizm
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Doksorubisin (5 µM)	0.33789	Sinerjizm
$1/2LD_{50}$: ABS (6.5µl)+Doksorubisin (2.5µM)	0.18112	Kuvvetli sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Doksorubisin (1.25µM)	0.09297	Çok kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.625µl)+Doksorubisin (0.63µM)	0.47744	Sinerjizm
$1/16LD_{50}$: ABS (0.8125µl)+Doksorubisin (0.31µM)	1.59554	Antagonist

Önce Doksorubisin Sonra ABS (1.Doksorubisin 2.ABS)

Önce doksorubisin ardından ABS uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, doksorubisin ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 32). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 32. Önce doksorubisin sonra ABS kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,3125 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %86,2 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %38,12 oranında saptandı. 1/8LD_{50}'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 0,625 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %80,52 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %37,26 oranında saptandı. 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 1,25 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %74,28 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %23,7 oranında saptandı. 1/2LD_{50}'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 2,5 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %62,13 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %19,67 oranında saptandı. 1LD_{50}'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 5 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %55,73 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %20,37 oranında saptandı. 2LD_{50}'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 10 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %41,9 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %10,59 oranında saptandı. 4LD_{50}'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 20 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi

%30,95 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %10,03 oranında saptandı.

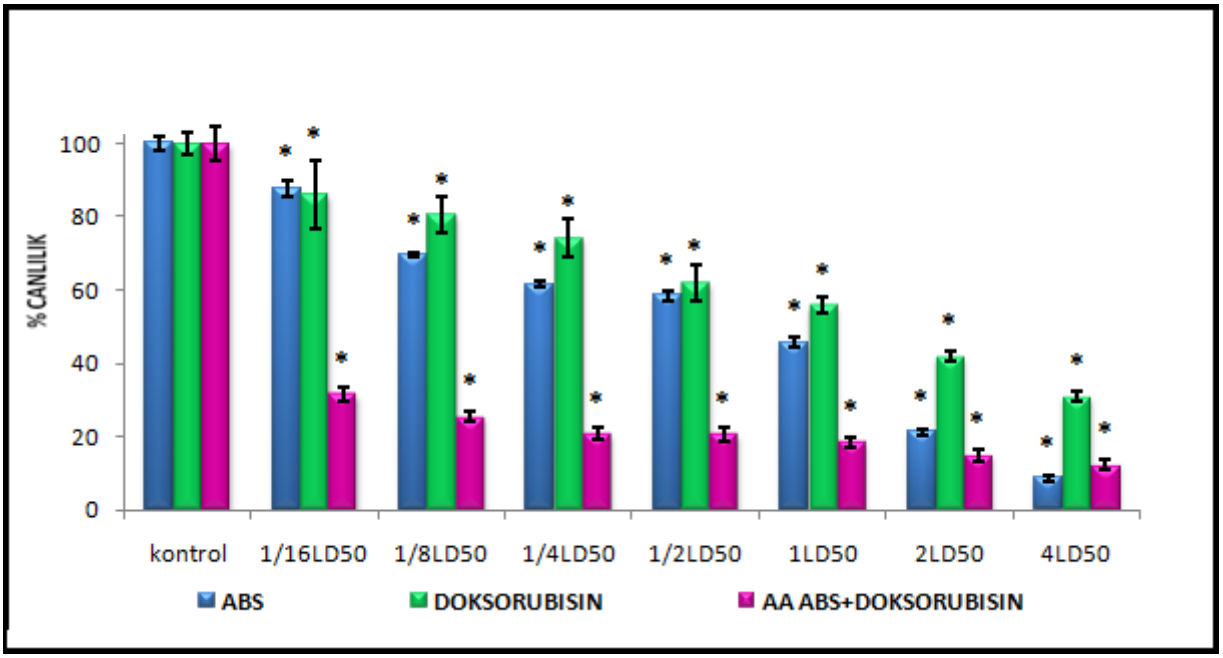
MCF-7 hücre hattına yapılan önce doksorubisin sonra ABS kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 11).

Tablo 11. Önce doksorubisin sonra ABS kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$:ABS (52µl)+Doksorubisin (20µM)	0.86762	Hafif sinerjistiketki
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Doksorubisin (10µM)	0.46494	Sinerjizm
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Doksorubisin (5 µM)	0.56609	Sinerjizm
$1/2LD_{50}$: ABS (6.5µl)+Doksorubisin (2.5µM)	0.26903	Kuvvetli sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Doksorubisin (1.25µM)	0.17771	Kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.625µl)+Doksorubisin (0.63µM)	0.19202	Kuvvetli sinerjizm
$1/16LD_{50}$: ABS (0.8125µl)+Doksorubisin (0.31µM)	0.10034	Çok kuvvetli sinerjizm

Aynı Anda Doksorubisin+ABS (AA ABS+Doksorubisin)

Aynı anda doksorubisin+ABS uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, doksorubisin ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 33). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 33. Aynı anda ABS+doksorubisin kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; $1/16LD_{50}$'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,3125 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %86,2 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %31,61 oranında saptandı. $1/8LD_{50}$'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 0,625 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %80,52 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %25,53 oranında saptandı. $1/4LD_{50}$'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 1,25 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %74,28 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %20,85 oranında saptandı. $1/2LD_{50}$'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 2,5 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %62,13 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %20,71 oranında saptandı. $1LD_{50}$'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 5 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %55,73 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %18,57 oranında saptandı. $2LD_{50}$'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 10 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %41,9 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,02 oranında saptandı. $4LD_{50}$'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 20 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %30,95 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %12,36 oranında

saptandı.

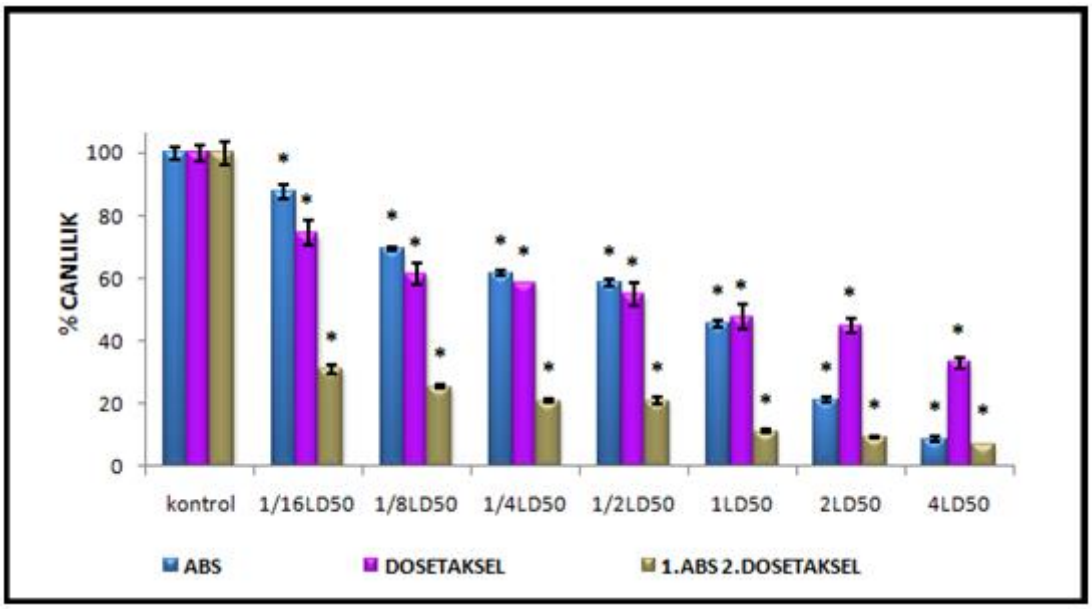
MCF-7 hücre hattına yapılan aynı anda ABS+Doksorubisin kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 12).

Tablo 12. Aynı anda doksorubisin+ABS kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$:ABS (52µl)+Doksorubisin (20µM)	1.13595	Antagonist
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Doksorubisin (10µM)	0.73687	Hafif sinerjistik etki
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Doksorubisin (5 µM)	0.49525	Sinerjizm
$1/2LD_{50}$: ABS (6.5µl)+Doksorubisin (2.5µM)	0.29011	Kuvvetli sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Doksorubisin (1.25µM)	0.14649	Kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.625µl)+Doksorubisin (0.63µM)	0.09982	Çok kuvvetli sinerjizm
$1/16LD_{50}$: ABS (0.8125µl)+Doksorubisin (0.31µM)	0.07113	Çok kuvvetli sinerjizm

Önce ABS Sonra Dosetaksel (1.ABS 2.Dosetaksel)

Önce ABS ardından dosetaksel uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, dosetaksel ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 34). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 34. Önce ABS sonra dosetaksel kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,58 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %74,63 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %31,27 oranında saptandı. 1/8LD_{50}'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 1,16 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %61,46 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %25,67 oranında saptandı. 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 2,33 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %58,55 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %21,05 oranında saptandı. 1/2LD_{50}'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 4,65 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %54,86 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %21,1 oranında saptandı. 1LD_{50}'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 9,3 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %47,7 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %11,34 oranında saptandı. 2LD_{50}'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 18,6 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %45,03 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %9,57 oranında saptandı. 4LD_{50}'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 37,2 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %33,2 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %7,4 oranında saptandı.

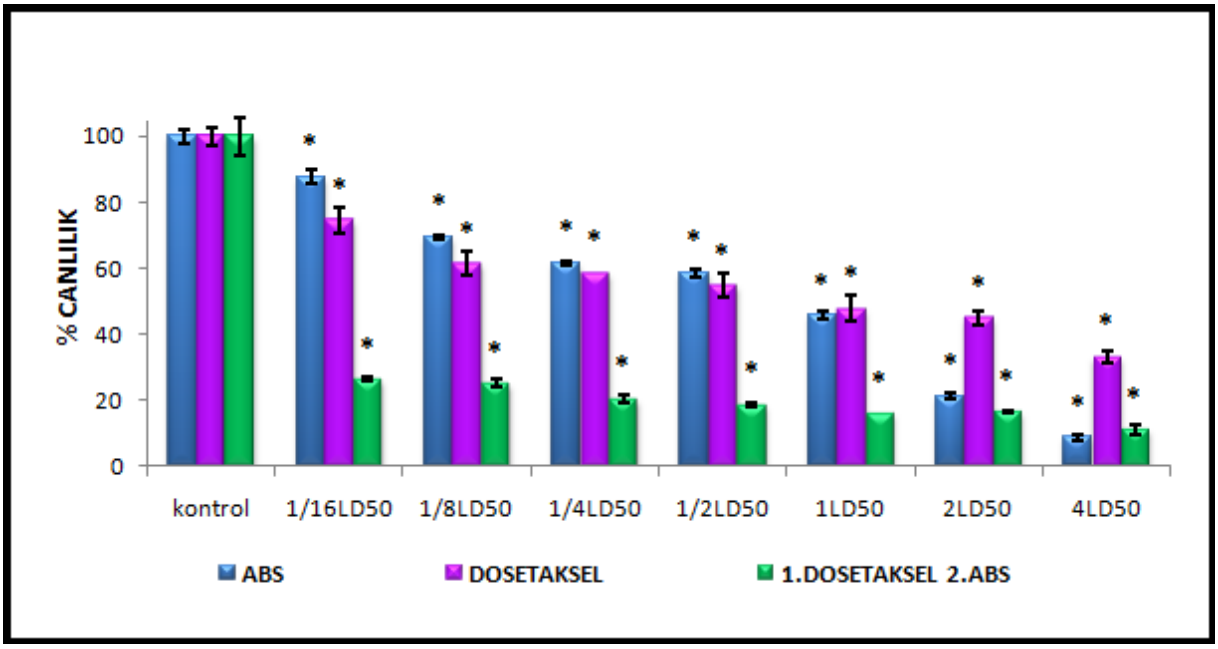
MCF-7 hücre hattına yapılan önce ABS sonra dosetaksel kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 13).

Tablo 13. Önce ABS sonra dosetaksel kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$: ABS (52µl)+Doseteksel (37.2µM)	0.53800	Sinerjizm
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Dosetaksel (18.6µM)	0.36794	Sinerjizm
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Dosetaksel (9.3µM)	0.22716	Kuvvetli sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (6.5µl)+Dosetaksel (4.65µM)	0.26522	Kuvvetli sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Dosetaksel (2.33µM)	0.13216	Kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.625µl)+Dosetaksel (1.16µM)	0.09060	Çok kuvvetli sinerjizm
$1/16LD_{50}$: ABS (0.8125µl)+Dosetaksel (0.58µM)	0.06457	Çok kuvvetli sinerjizm

Önce Dosetaksel Sonra ABS (1.Dosetaksel 2.ABS)

Önce dosetaksel ardından ABS uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, dosetaksel ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 35). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 35. Önce dosetaksel sonra ABS kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; $1/16LD_{50}$'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,58 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %74,63 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %26,38 oranında saptandı. $1/8LD_{50}$'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 1,16 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %61,46 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %25,19 oranında saptandı. $1/4LD_{50}$'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 2,33 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %58,55 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %20,44 oranında saptandı. $1/2LD_{50}$'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 4,65 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %54,86 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %18,6 oranında saptandı. $1LD_{50}$'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 9,3 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %47,7 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %16,14 oranında saptandı. $2LD_{50}$'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 18,6 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %45,03 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %16,65 oranında saptandı. $4LD_{50}$'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 37,2 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %33,2 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %11,28 oranında saptandı.

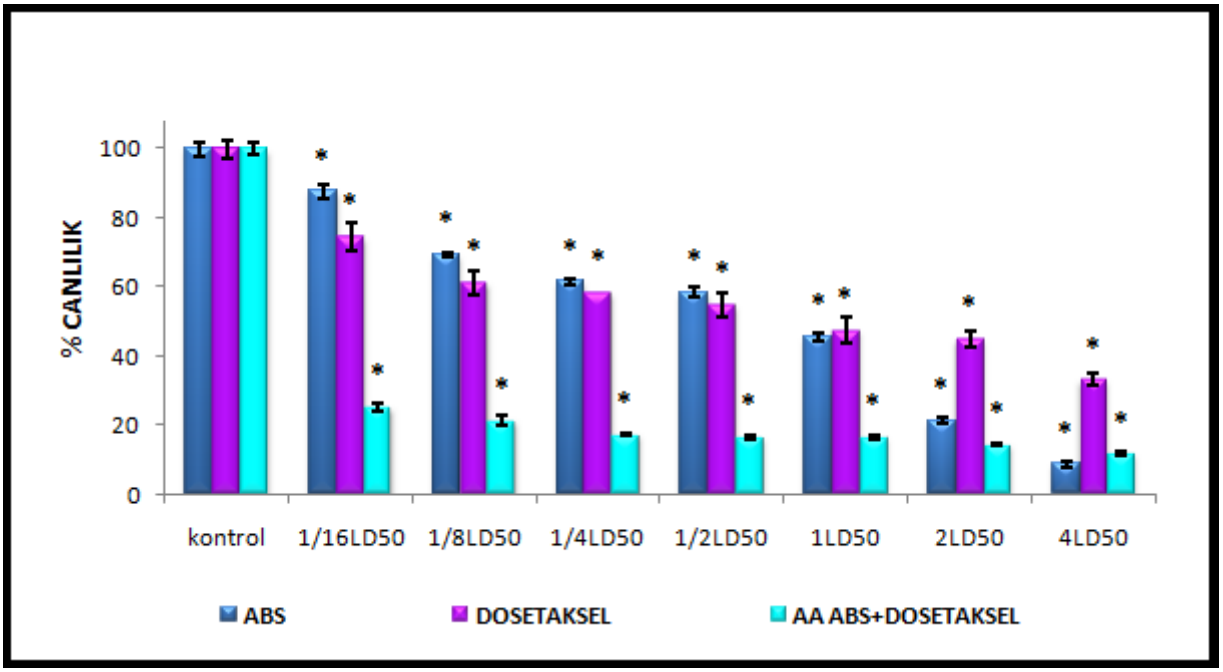
MCF-7 hücre hattına yapılan önce dosetaksel sonra ABS kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 14).

Tablo 14. Önce dosetaksel sonra ABS kombinasyonunun CI değerleri

İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$: ABS (52µl)+Dosetaksel (37.2µM)	0.90199	Aditif etki
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Dosetaksel (18.6µM)	0.75307	Hafif sinerjistik etki
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Dosetaksel (9.3µM)	0.36105	Sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (6.5µl)+Dosetaksel (4.65µM)	0.22026	Kuvvetli sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Dosetaksel (2.33µM)	0.12646	Kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.625µl)+Dosetaksel (1.16µM)	0.08783	Çok kuvvetli sinerjizm
$1/16LD_{50}$: ABS (0.8125µl)+Dosetaksel (0.58µM)	0.04746	Çok kuvvetli sinerjizm

Aynı Anda Dosetaksel+ABS (AA ABS+Dosetaksel)

Aynı anda dosetaksel+ABS uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerine, dosetaksel ve ABS'nin bire bir olarak 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, $1/16LD_{50}$ konsantrasyonları sırasıyla kombine edildi (Şekil 36). Chou protokolüne göre ilaçların kombinasyon halinde uygulanması sonucunda ortaya çıkan veri; CI=1 olduğunda aditif etki, CI>1 ise antagonist, CI<1 ise sinerjizm şeklinde değerlendirildi (167).



*: p<0.0001, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 36. Aynı anda ABS+dosetaksel kombinasyonu

Grafik incelendiğinde MCF-7 hücre hattında; 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,58 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %74,63 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %25,27 oranında saptandı. 1/8LD_{50}'ye denk gelen 1,625 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %69,56 ve 1,16 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %61,46 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %21,49 oranında saptandı. 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 2,33 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %58,55 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %17,31 oranında saptandı. 1/2LD_{50}'ye denk gelen 6,5 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %58,52 ve 4,65 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %54,86 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %16,61 oranında saptandı. 1LD_{50}'ye denk gelen 13 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %45,70 ve 9,3 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %47,7 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %16,59 oranında saptandı. 2LD_{50}'ye denk gelen 26 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %21,21 ve 18,6 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %45,03 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %14,45 oranında saptandı. 4LD_{50}'ye denk gelen 52 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %8,77 ve 37,2 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %33,2 olurken, bu dozların

kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %11,75 oranında saptandı.

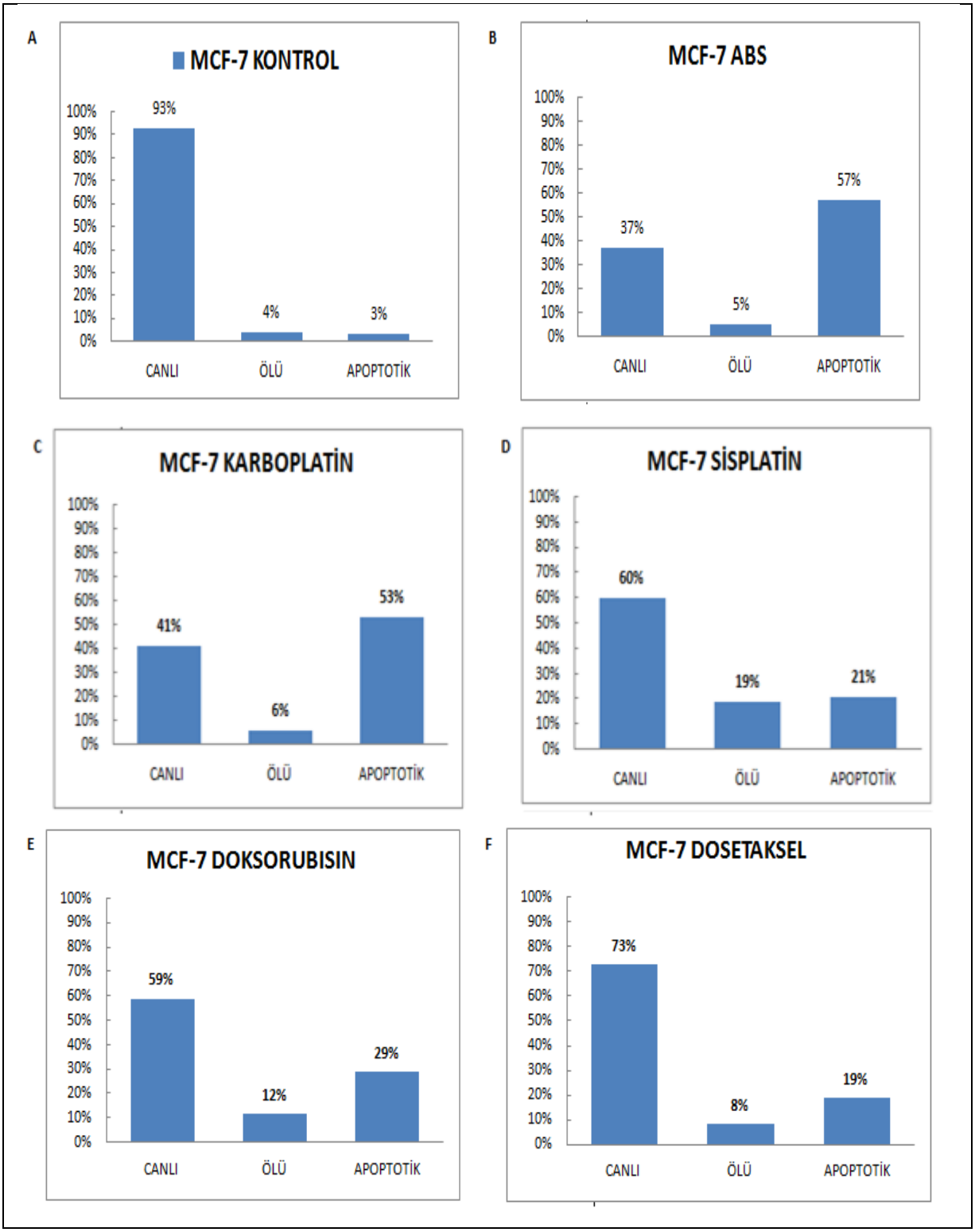
MCF-7 hücre hattına yapılan, aynı anda ABS+Dosetaksel kombinasyonları, 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Veriler, CompuSyn programına girilerek kombinasyonların CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulundu (Tablo 15).

Tablo 15. Aynı anda dosetaksel+ABS kombinasyonunun CI değerleri

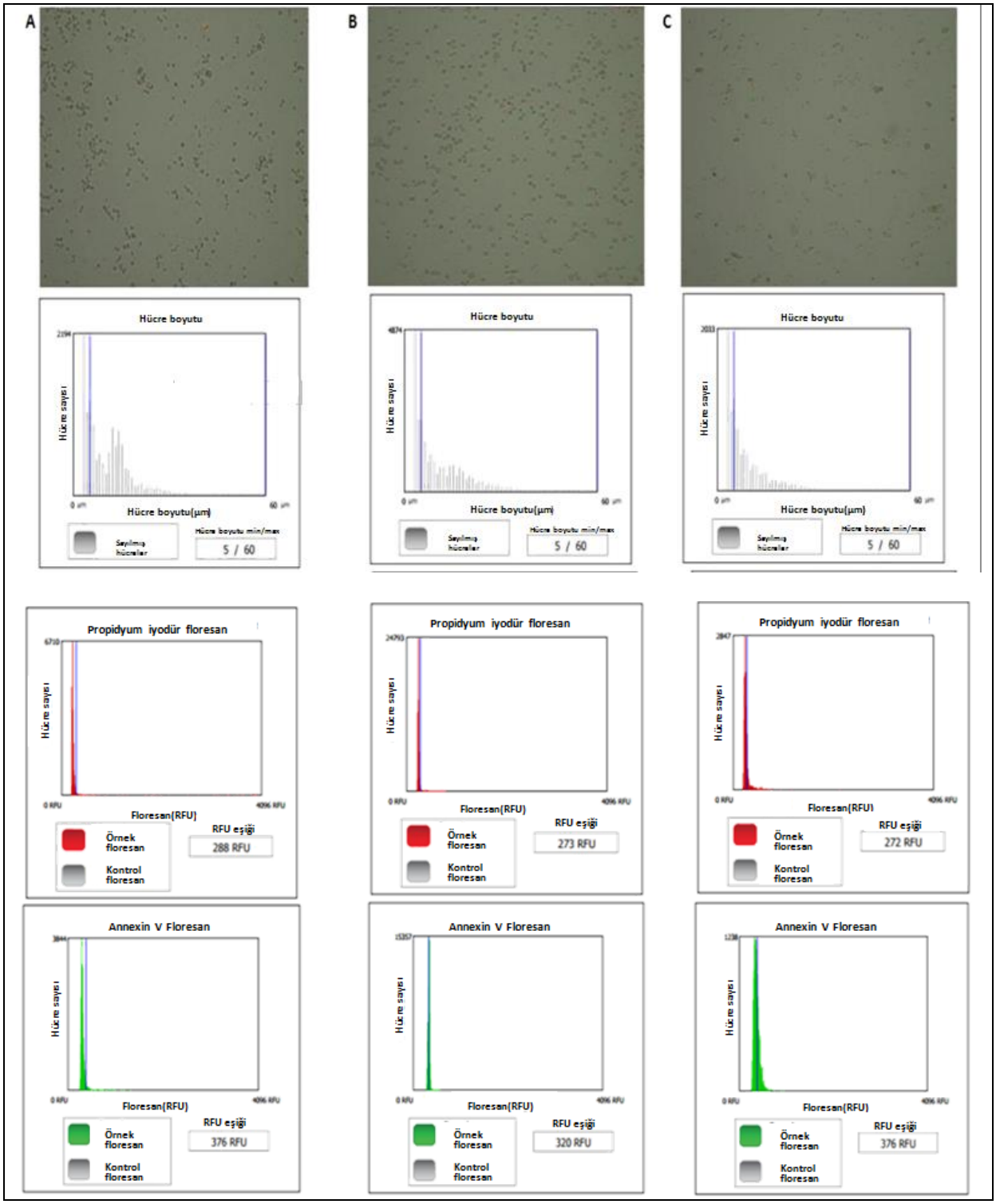
İlaç Konsantrasyonları	CI (Kombinasyon İndeksi)	Yorum
$4LD_{50}$: ABS (52µl)+Dosetaksel (37.2µM)	0.95006	Aditif etki
$2LD_{50}$: ABS (26µl)+Dosetaksel (18.6µM)	0.62142	Sinerjizm
$1LD_{50}$: ABS (13µl)+Dosetaksel (9.3µM)	0.37478	Sinerjizm
1/2 LD_{50}: ABS (6.5µl)+Dosetaksel (4.65µM)	0.18769	Kuvvetli sinerjizm
$1/4LD_{50}$: ABS (3.25µl)+Dosetaksel (2.33µM)	0.09940	Çok kuvvetli sinerjizm
$1/8LD_{50}$: ABS (1.625µl)+Dosetaksel (1.16µM)	0.06822	Çok kuvvetli sinerjizm
$1/16LD_{50}$: ABS (0.8125µl)+Dosetaksel (0.58µM)	0.04412	Çok kuvvetli sinerjizm

MCF-7 Hücre Hattında Tek Olarak Uygulanan ABS, Karboplatin, Sisplatin, Doksorubisin ve Dosetakselin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

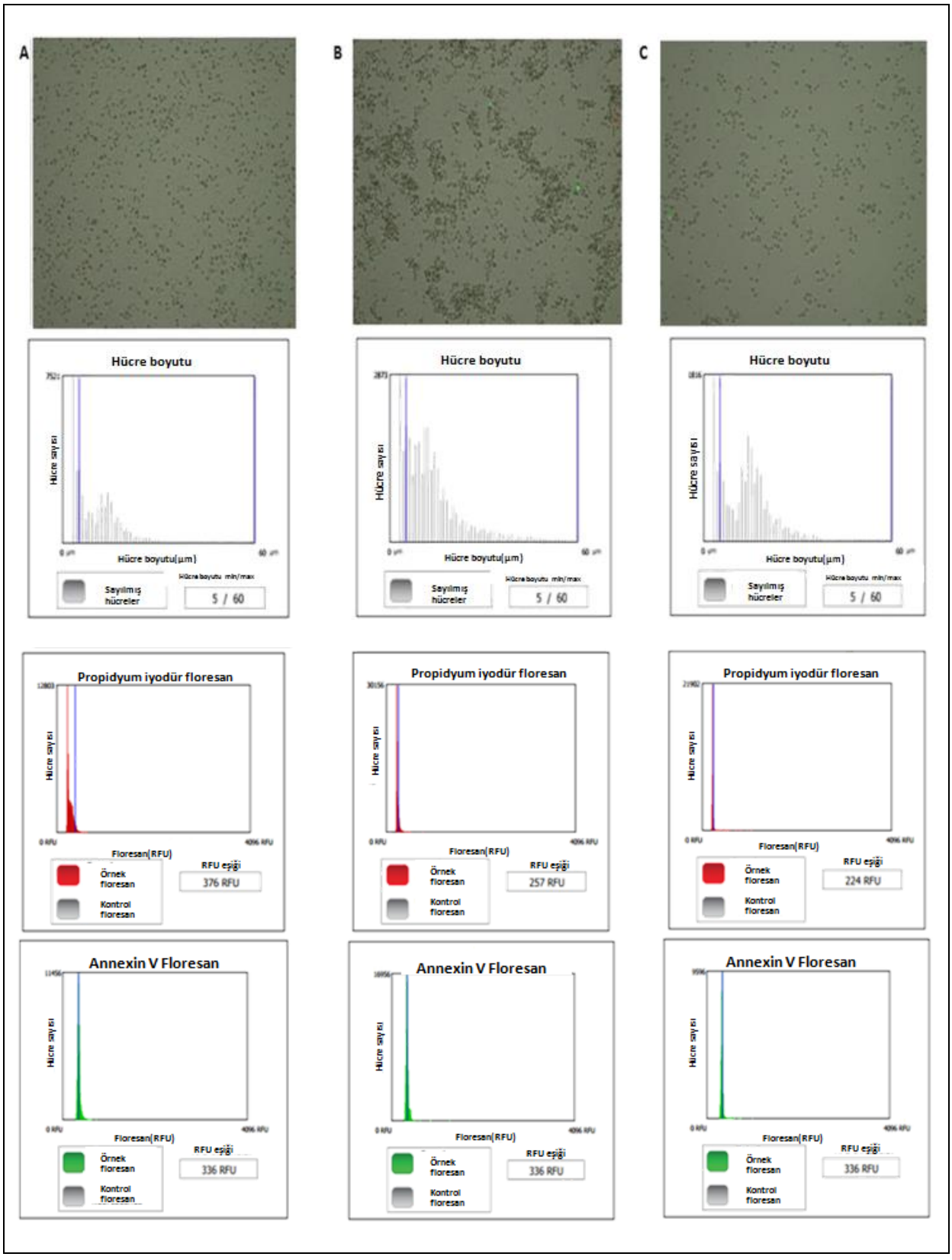
MCF-7 hücrelerinde kontrol ve madde uygulaması yapılan gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, Propidyum iyodür (PI) floresan yoğunluğu ve hüce boyutu histogramları Şekil 38 ve 39'da verilmiştir. Şekil 37'de görüldüğü gibi kontrol grubunda %93 oranında canlı, %4 ölü ve %3 apoptotik hücre olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda %3 olan apoptotik hücre oranının ABS uygulaması ile %57'e yükseldiği, ölü hücre oranının ise kontrole yakın olarak %5 oranında kaldığı saptanmıştır. Karboplatin uygulaması yapılan hücrelerde apoptotik hücre %53, sisplatin uygulamasında %21, doksorubisin uygulamasında %29, dosetaksel uygulamasında ise %19 oranında saptanmıştır.



Şekil 37. MCF-7 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Anneksin V ve Propidyum İyodür ile boyandıktan sonra saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A:Kontrol, B: ABS, C: Karboplatin, D: Sisplatin, E: Doksorubisin, F: Dosetaksel uygulaması



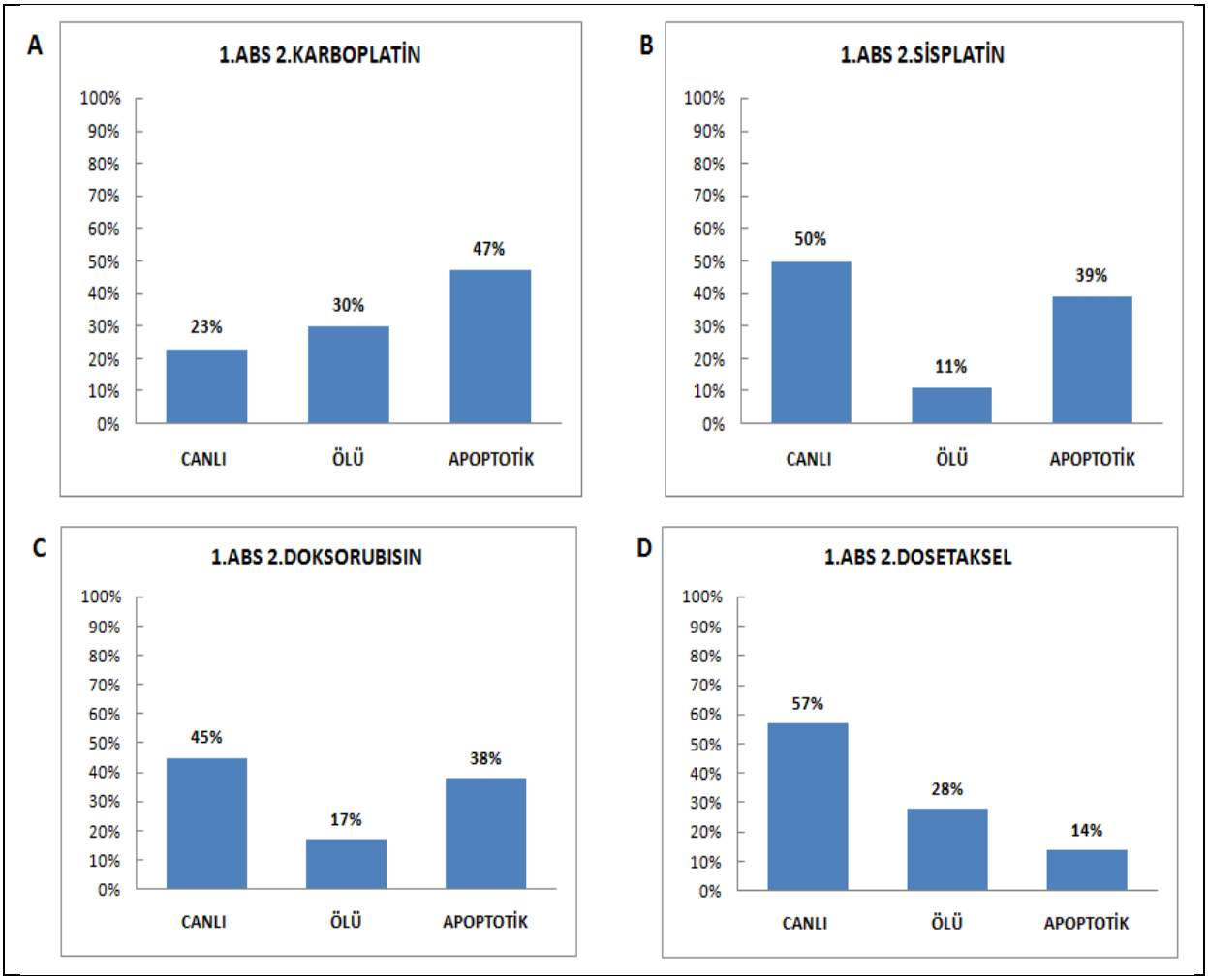
Şekil 38. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Kontrol, B: ABS, C: Sisplatin uygulanması



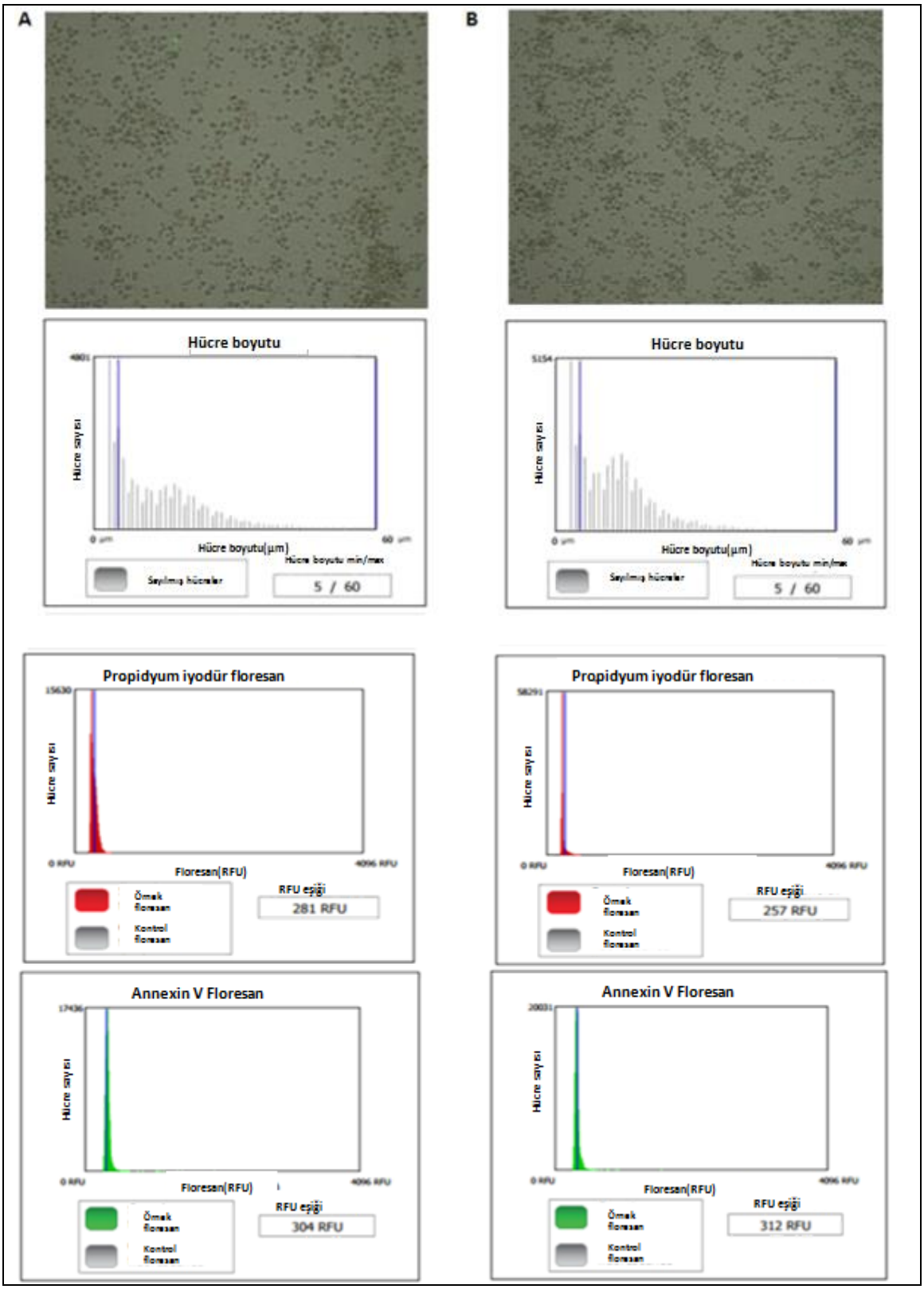
Şekil 39. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Karboplatin, B: Doksorubisin, C: Dosetaksel uygulanması

MCF-7 Hücre Hattında Önce ABS Sonra Karboplatin, Sisplatin, Doksorubisin ve Dosetaksel Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

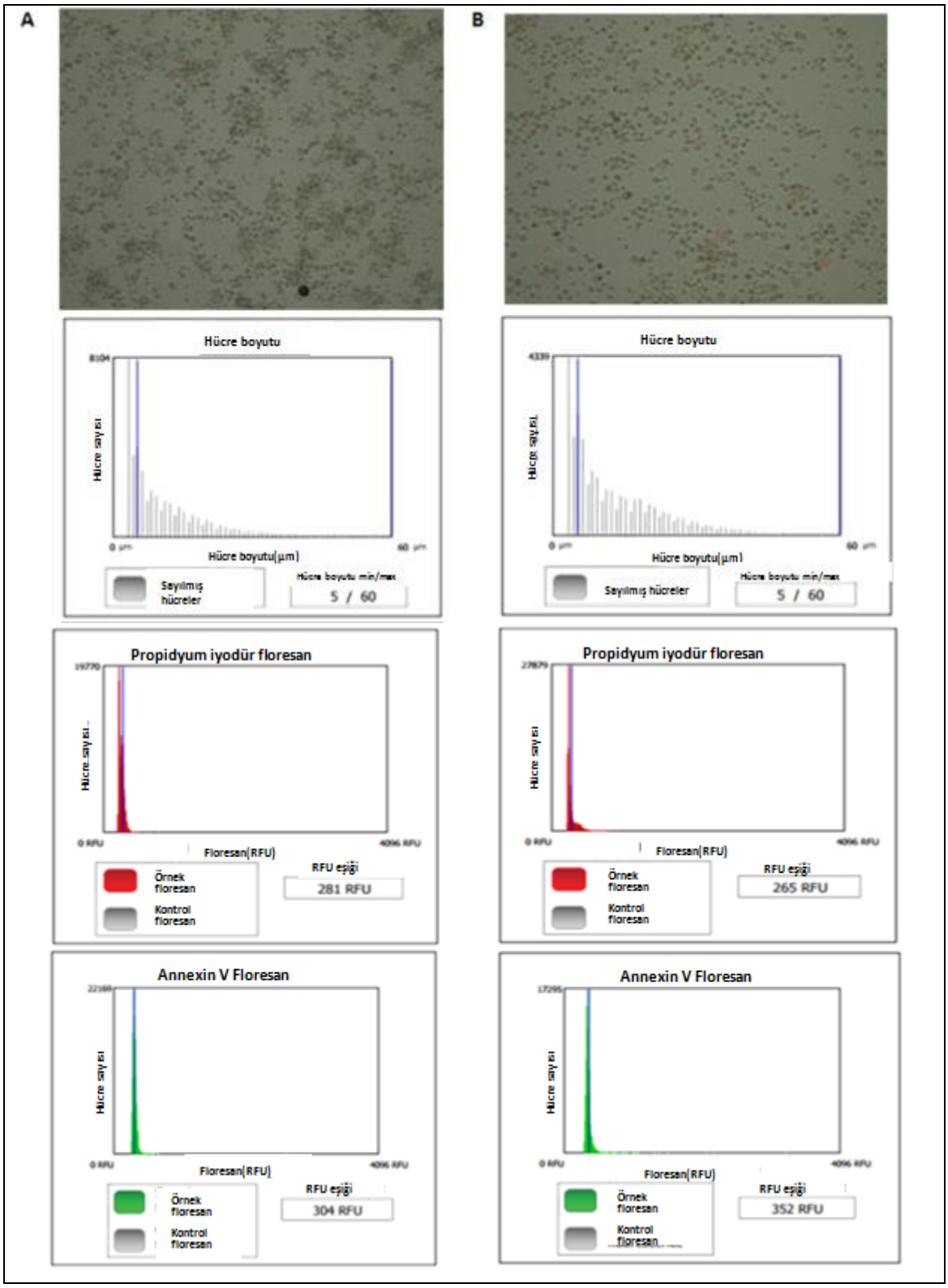
MCF-7 hücrelerinde; önce ABS sonra karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel uygulaması yapılan gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, Propidyum iyodür (PI) floresan yoğunluğu ve hüce boyutu histogramları Şekil 41 ve 42'de verilmiştir. Önce ABS sonra karboplatin uygulaması yapılan hücrelerde; apoptotik %47, önce ABS sonra sisplatin uygulamasında %39, önce ABS sonra Doksorubisin uygulamasında %38 ve önce ABS sonra Dosetaksel uygulamasında %14 olarak saptanmıştır (Şekil 40).



Şekil 40. MCF-7 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Anneksin V ve Propidyum İyodür ile boyandıktan sonra saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Önce ABS sonra karboplatin, B: Önce ABS sonra sisplatin, C: Önce ABS sonra doksorubisin, D: Önce ABS sonra dosetaksel uygulaması



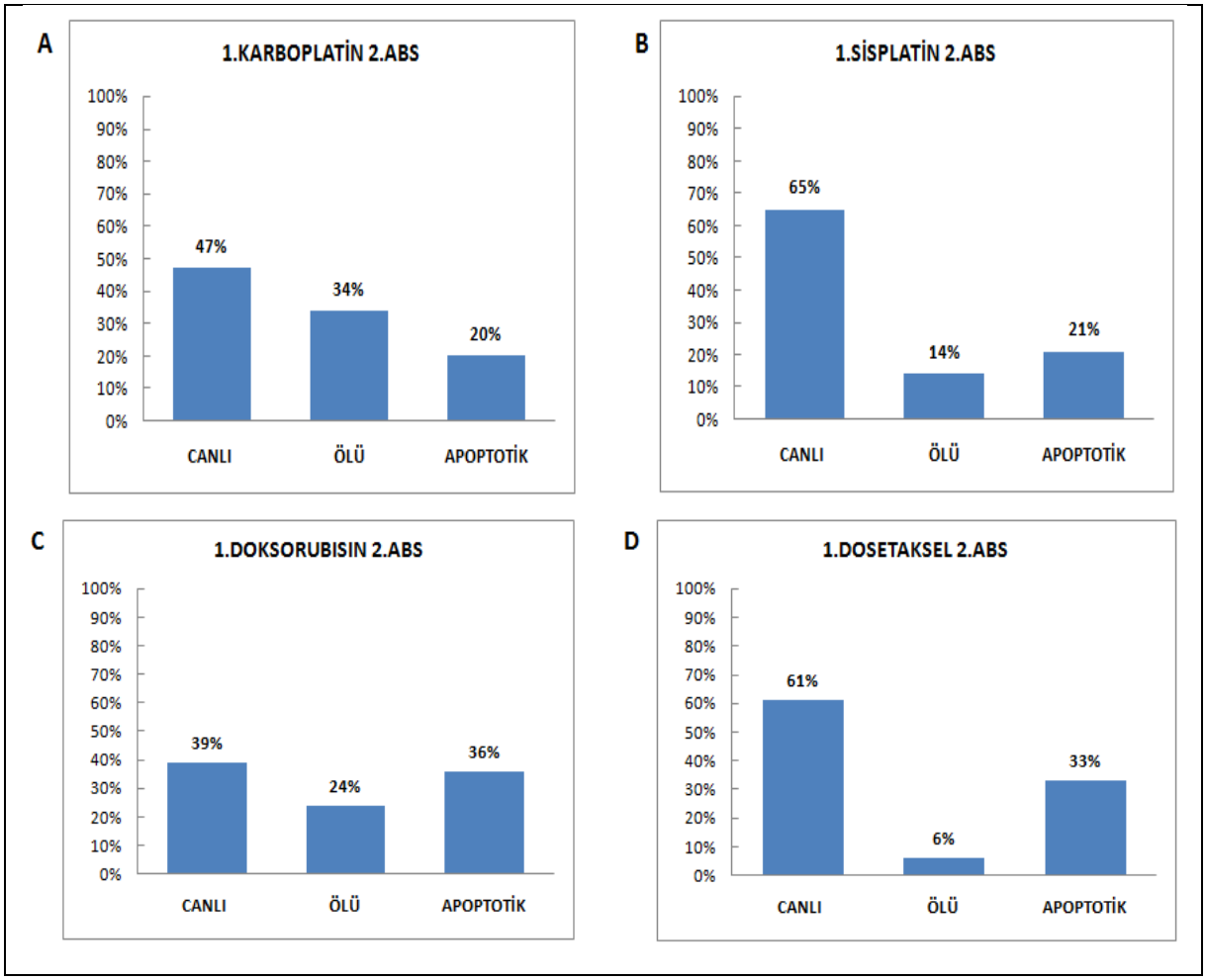
Şekil 41. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Önce ABS sonra karboplatin, B: Önce ABS sonra sisplatin uygulaması



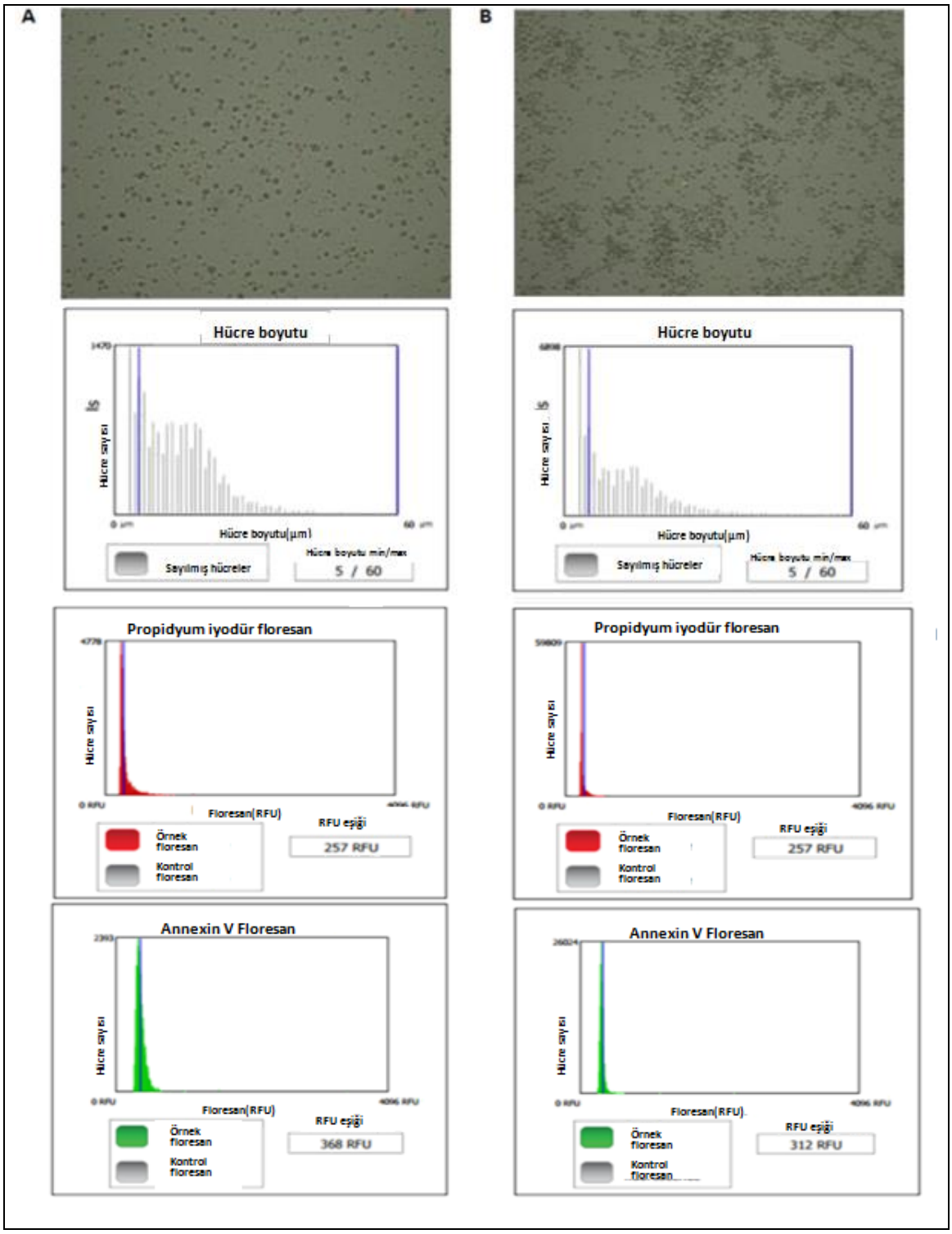
Şekil 42. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Önce ABS sonra doksorubisin, B: Önce ABS sonra dosetaksel uygulaması

MCF-7 Hücre Hattında Önce Karboplatin, Sisplatin, Doksorubisin ve Dosetaksel Sonra ABS Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

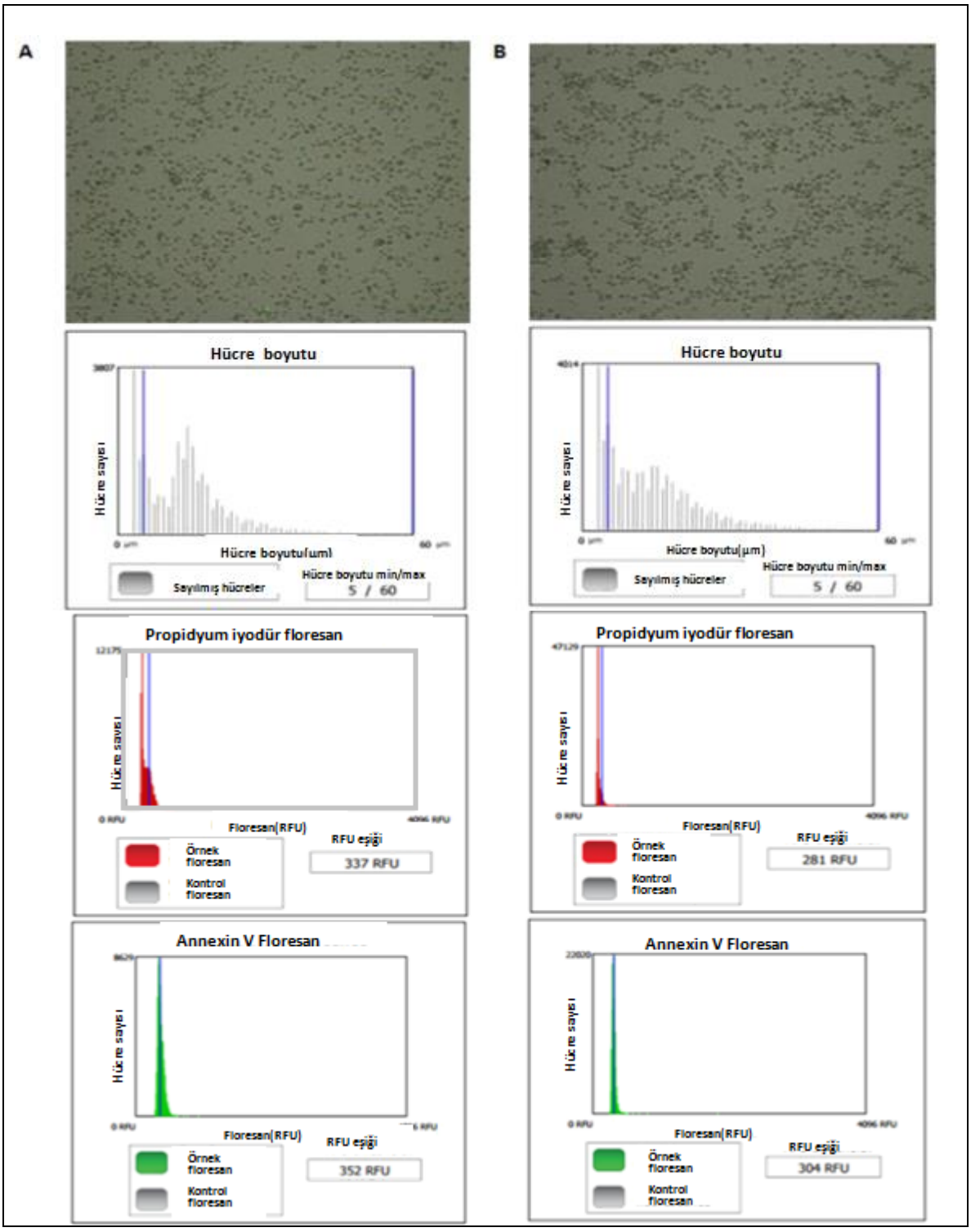
MCF-7 hücrelerinde; önce karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel sonra ABS uygulaması yapılan gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, Propidyum iyodür (PI) floresan yoğunluğu ve hüce boyutu histogramları Şekil 44 ve 45'te verilmiştir. Önce karboplatin sonra ABS uygulaması yapılan hücrelerde; apoptotik %20, önce sisplatin sonra ABS uygulamasında %21, önce Doksorubisin sonra ABS uygulamasında %36 ve önce Dosetaksel sonra ABS uygulamasında %33 olarak saptanmıştır (Şekil 43).



Şekil 43. MCF-7 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Anneksin V ve Propidyum iyodür ile boyandıktan sonra saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Önce karboplatin sonra ABS, B: Önce sisplatin sonra ABS, C: Önce doksorubisin sonra ABS, D: Önce dosetaksel sonra ABS uygulaması



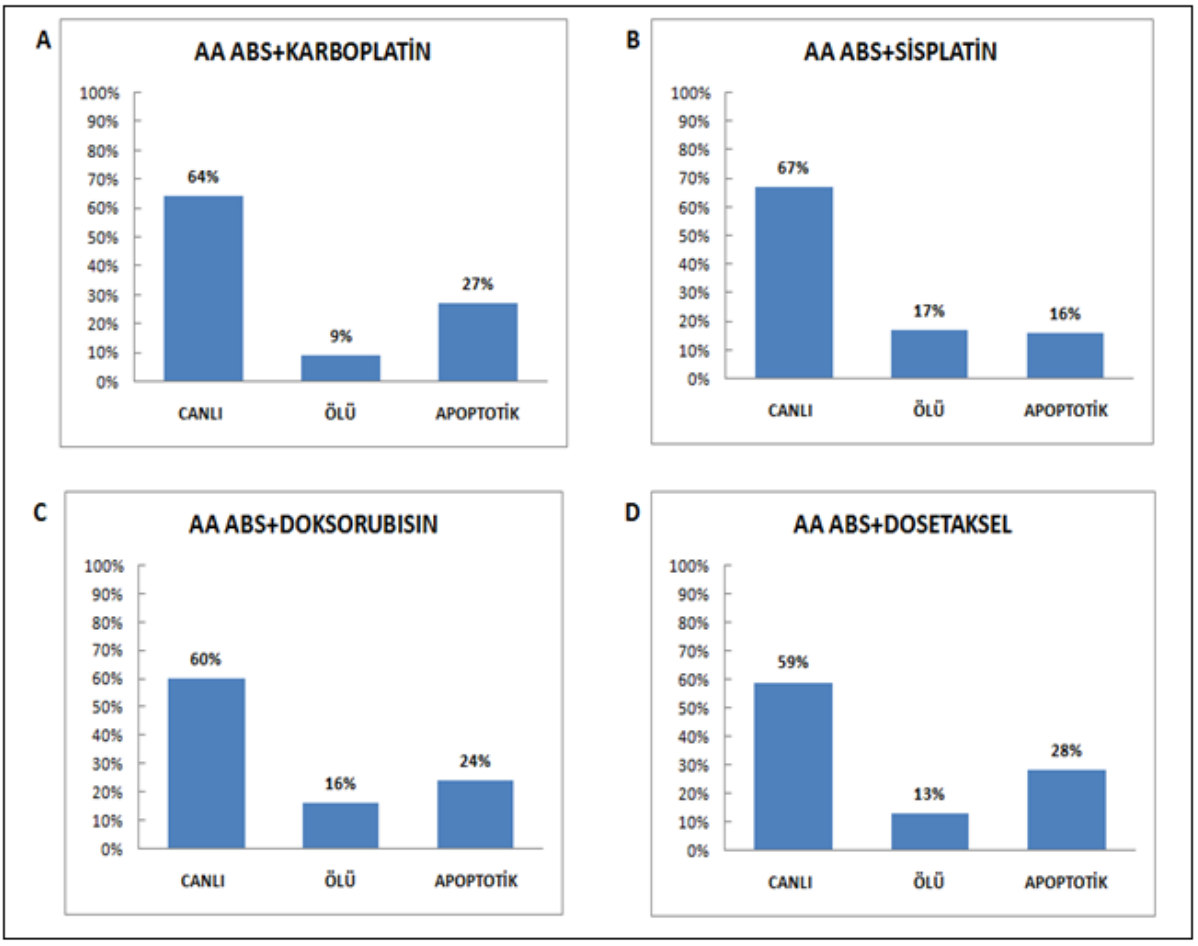
Şekil 44. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Önce karboplatin sonra ABS, B: Önce sisplatin sonra ABS uygulaması



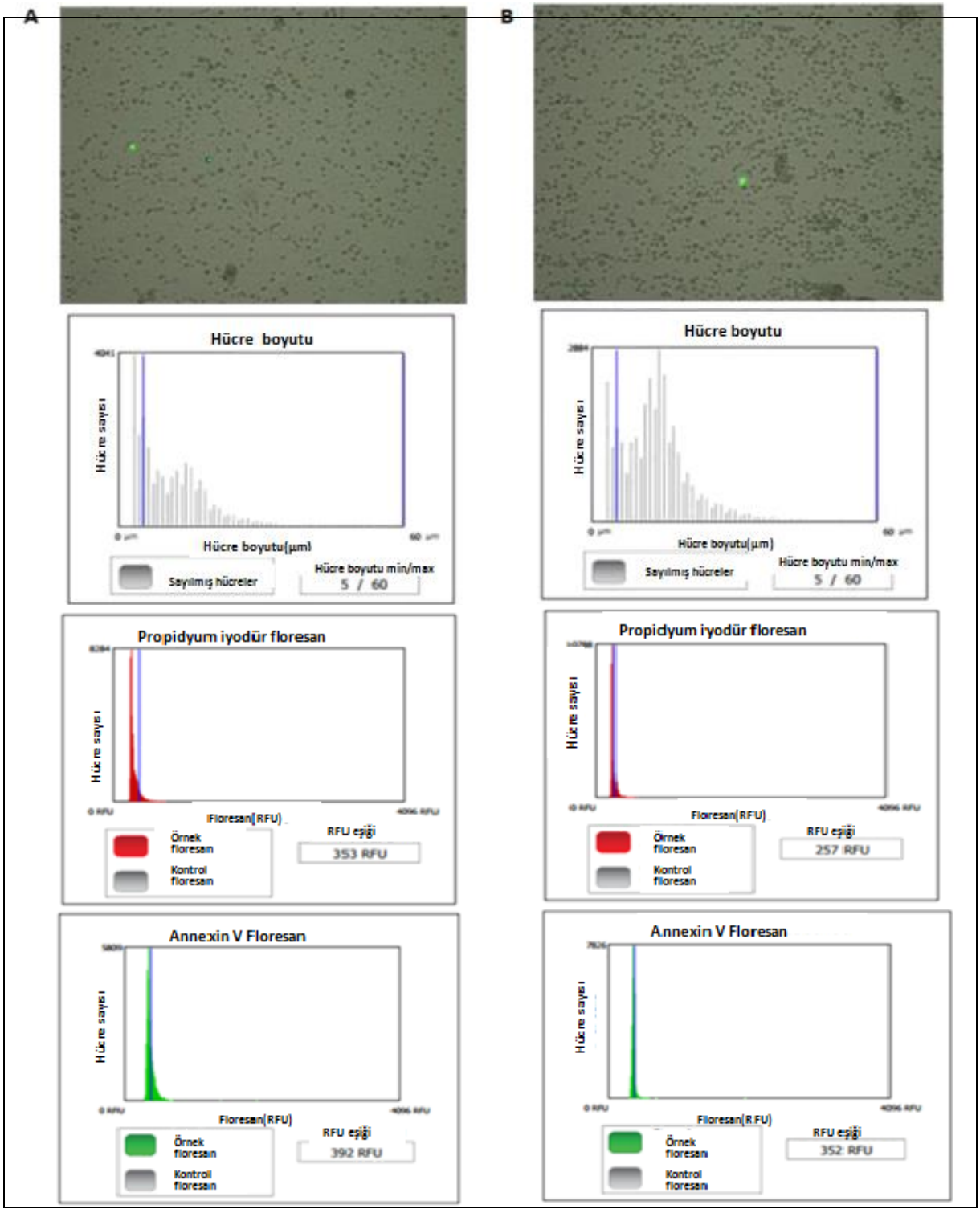
Şekil 45. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Önce doksorubisin sonra ABS, B: Önce dosetaksel sonra ABS uygulaması.

MCF-7 Hücre Hattında ABS ile Aynı Anda Uygulanan Karboplatin, Sisplatin, Doksorubisin ve Dosetakselin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

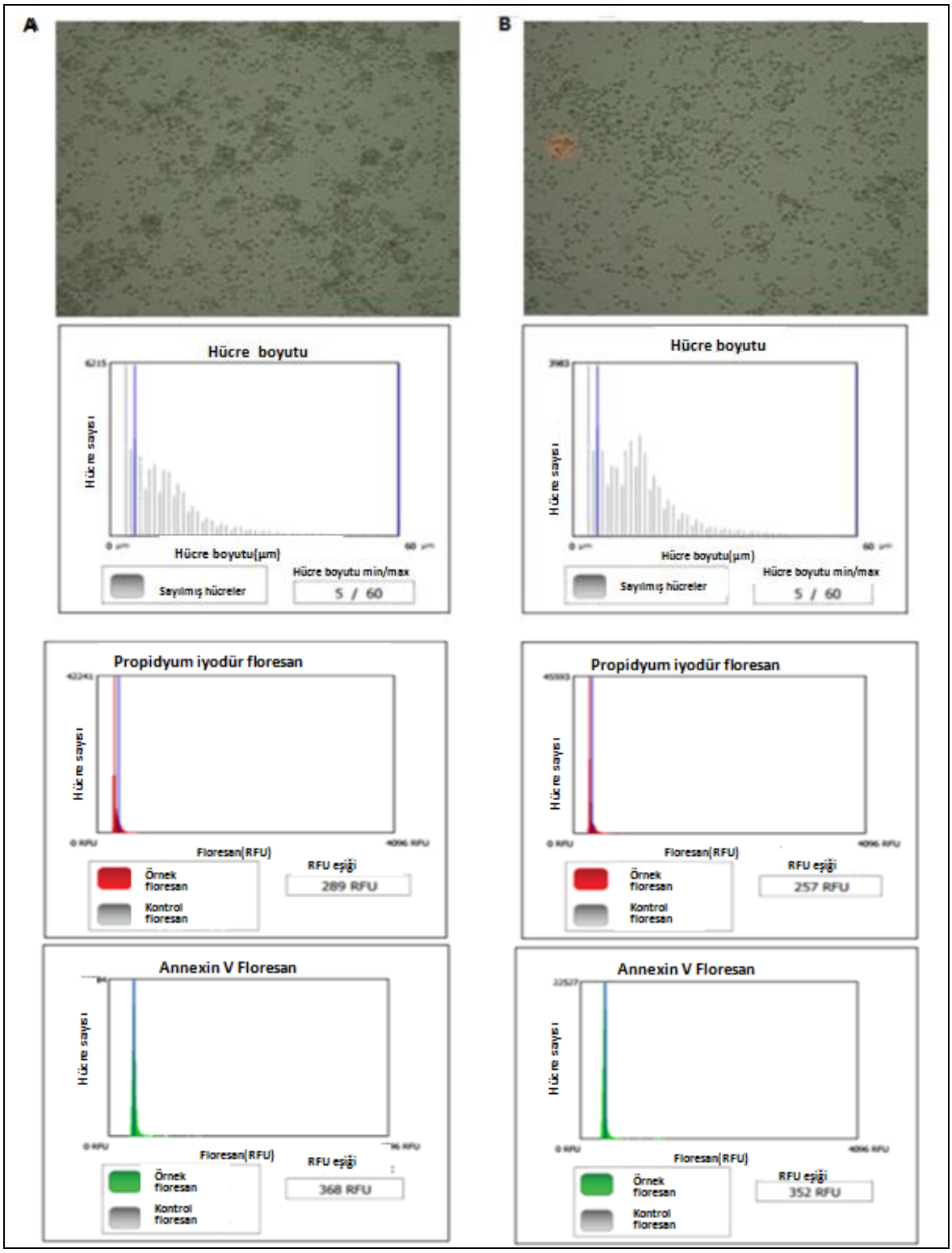
MCF-7 hücrelerinde; ABS ile aynı anda madde uygulaması yapılan gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, Propidyum iyodür (PI) floresan yoğunluğu ve hüce boyutu histogramları Şekil 47 ve 48'de verilmiştir. Aynı anda ABS+Karboplatin uygulaması yapılan hücrelerde; apoptotik %27, aynı anda ABS+Sisplatin uygulamasında %16, ABS+Doksorubisin uygulamasında %24 ve aynı anda ABS+Dosetaksel uygulamasında %28 olarak saptanmıştır (Şekil 46).



Şekil 46. MCF-7 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Annexin V ve Propidyum iyodür ile boyandıktan sonra saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Aynı anda ABS+karboplatin, B: Aynı anda ABS+ sisplatin, C: Aynı anda ABS+doksorubisin, D: Aynı anda ABS+dosetaksel uygulaması



Şekil 47. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin v (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Aynı anda ABS+karboplatin, B: Aynı anda ABS+sisplatin uygulaması



Şekil 48. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Aynı anda ABS+doksorubisin, B: Aynı anda ABS+dosetaksel uygulaması

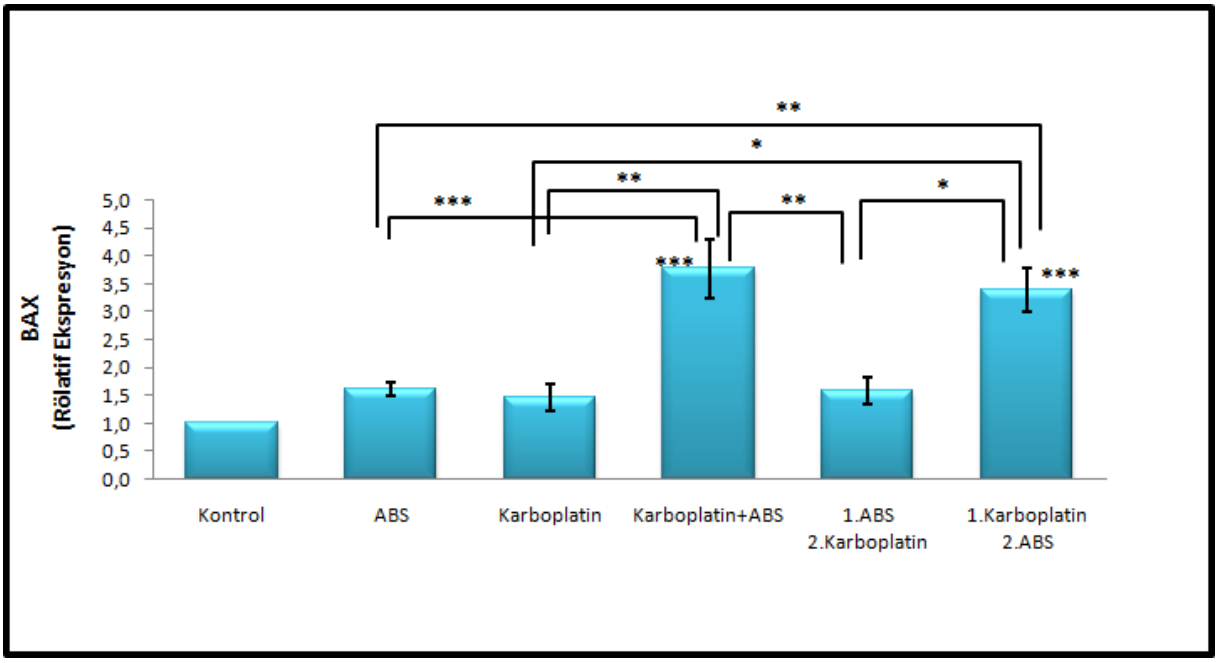
Tek ve Kombine Olarak Uygulanan ABS, Karboplatin, Sisplatin, Doksorubisin ve Dosetakselin Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

Çalışmada; MCF-7 hücre hatlarında materyal ve yöntem kısmında anlatıldığı şekilde izole edilen RNA'lardan elde edilmiş olan cDNA'lar kullanılarak, gen ifadelerinde meydana gelen değişimler RT-PCR metodu ile saptanmıştır. ABS ile ilaçların kombinasyon verileri, CompuSyn programına girildi. CI değerleri ve sinerjizm gösterdikleri kombinasyon değerleri bulunarak, çok kuvvetli sinerjizm gösterilen kombinasyon gruplarının genler üzerine etkisi araştırıldı. MCF-7 hücrelerinde; uygulamaların yapıldığı grupların kontrol grubuna göre belirlenen genlerin ifadelerinde meydana gelen değişiklikler, 3 tekrar olmak üzere çalışmaya alındı ve istatistiksel değerlendirmeleri Student's t testi ile yapıldı.

Bax Gen İfadesi

MCF-7 hücre hatlarında; endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı RT-PCR analizi sonuçlarına göre, kombine halinde uygulanan ABS, karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakselin bax gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler verilmiştir.

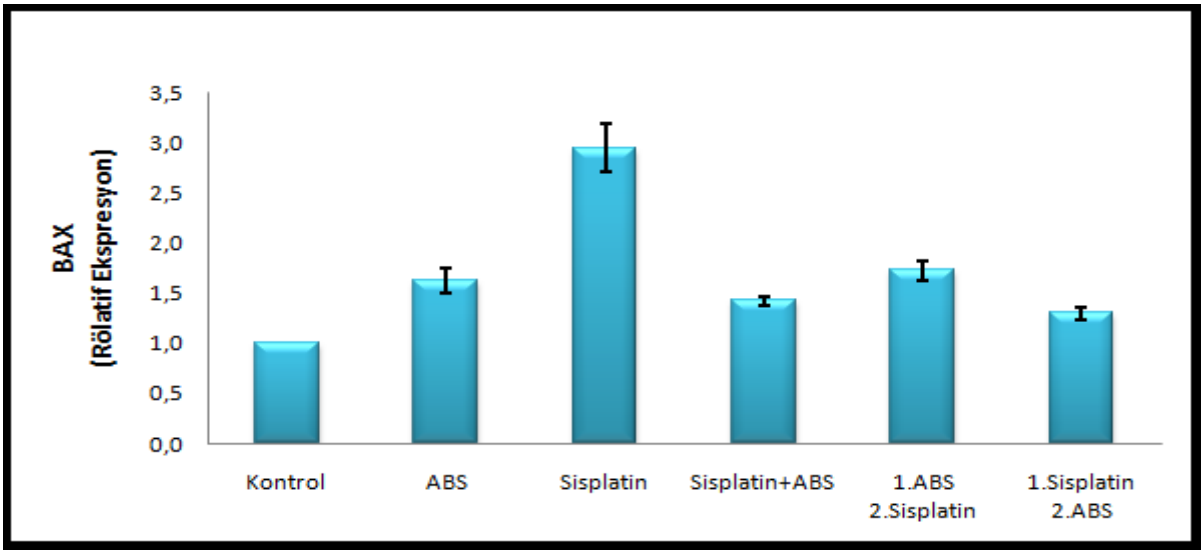
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve karboplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının incelendiği bax gen ifadesinde en belirgin artışın aynı anda ABS+karboplatin uygulanmasında kontrole göre 3,8±0,51 kat olarak belirlendiği, bunu önce karboplatin sonra ABS uygulanmasının kontrole göre 3,4±0,39 kat ile takip ettiği saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 49). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p\geq0.05$), ama grupların kendi arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.0001$).



*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.0001, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

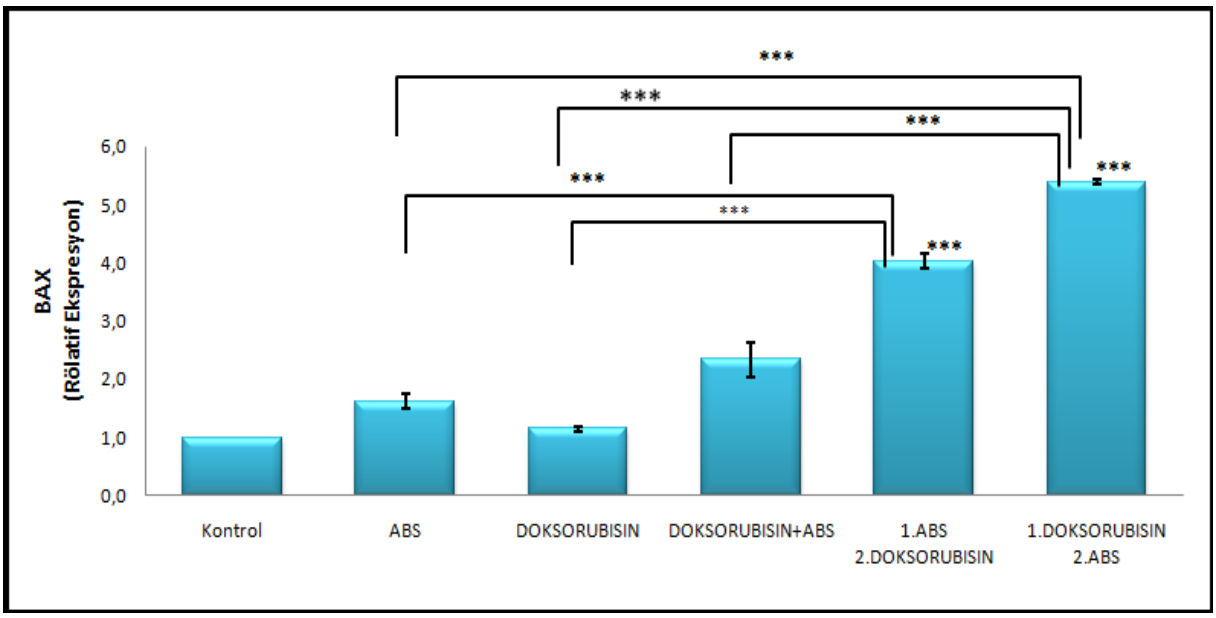
Şekil 49. ABS-karboplatin kombinasyonlarının bax gen ifadesi üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve sisplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı bax gen ifadesinde, en belirgin artışın sisplatin uygulanmasında kontrole göre 2,95±0,24 kat olarak belirlendiği, bunu önce ABS sonra sisplatin uygulanmasının kontrole göre 1,73±0,097 kat ile takip ettiği saptanmıştır (Şekil 50). Ancak, uygulama gruplarında kontrole göre ve grupların kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı (p≥0.05) gözlenmiştir.



Şekil 50. ABS-sisplatin kombinasyonlarının bax gen ifadesi üzerine etkisi

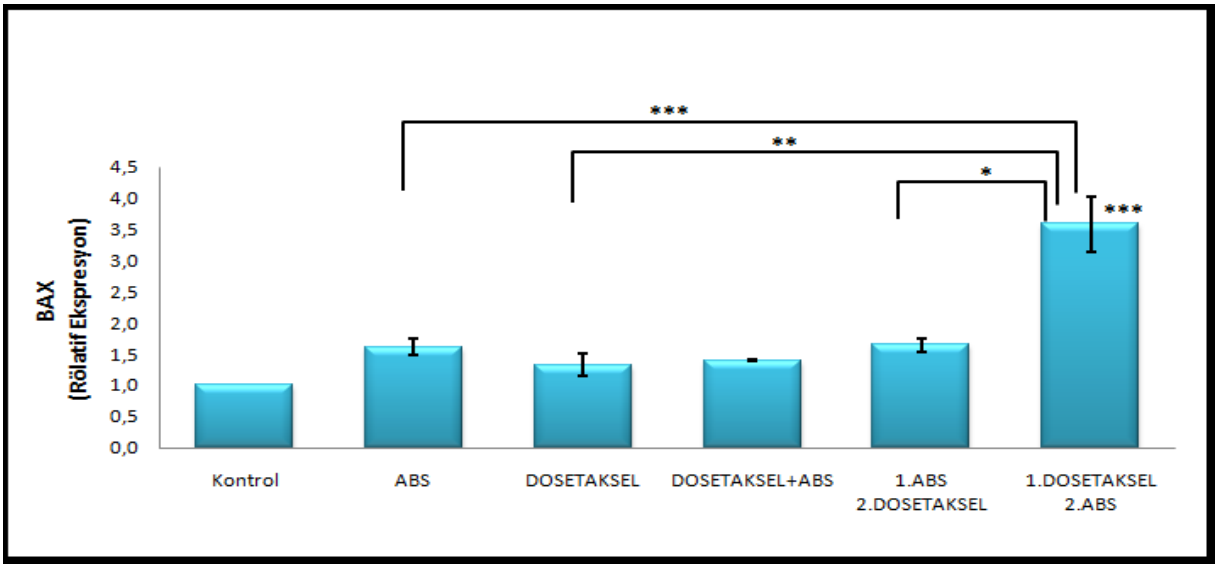
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve doksorubisinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı bax gen ifadesinde, en belirgin artışın önce doksorubisin ardından ABS uygulanmasında kontrole göre 5,39±0,04 kat olarak belirlendiği, bunu önce ABS sonra doksorubisin uygulanmasının kontrole göre 4,03±0,13 kat ile takip ettiği saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 51). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p\geq0.05$), ama grupların kendi arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir ($p<0.0001$).



***: $p<0.0001$, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 51. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının bax gen ifadesi üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve dosetakselin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı bax gen ifadesinde, en belirgin artışın önce dosetaksel sonra ABS uygulanmasında kontrole göre 3,6±0,44 kat olarak belirlendiği saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 52). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p\geq0.05$), ama önce dosetaksel sonra ABS uygulamasının diğer uygulama gruplarına göre de istatstiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.0001$).



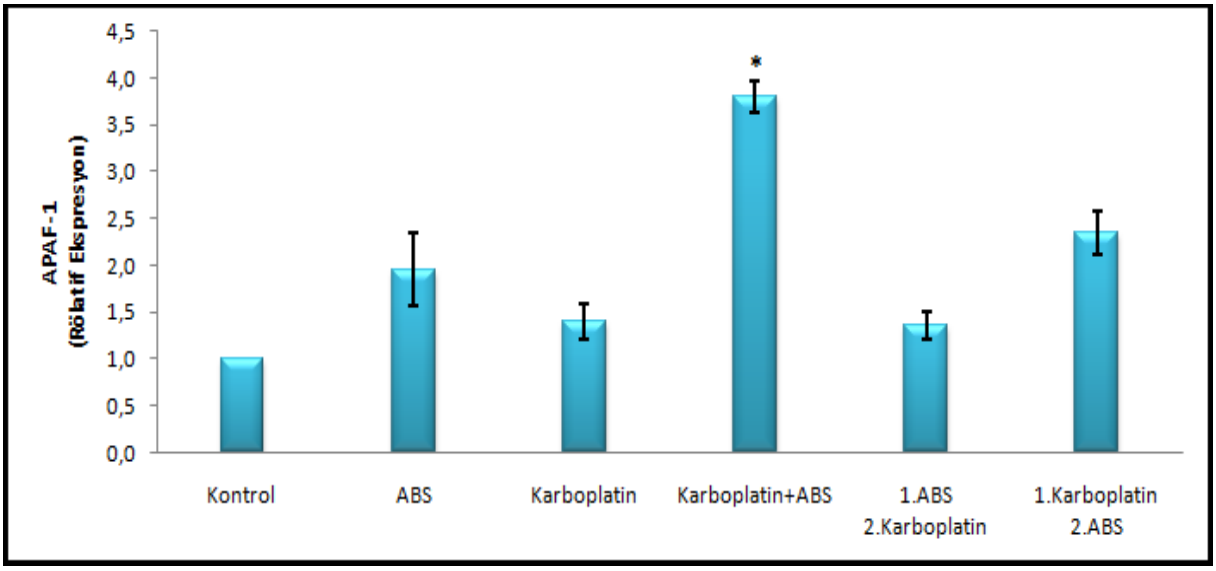
*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.0001$, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 52. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının bax gen ifadesi üzerine etkisi

APAF-1 Gen İfadesi

MCF-7 hücre hatlarında; endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı RT-PCR analizi sonuçlarına göre, kombine halinde uygulanan ABS, karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakselin APAF-1 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler gösterilmiştir.

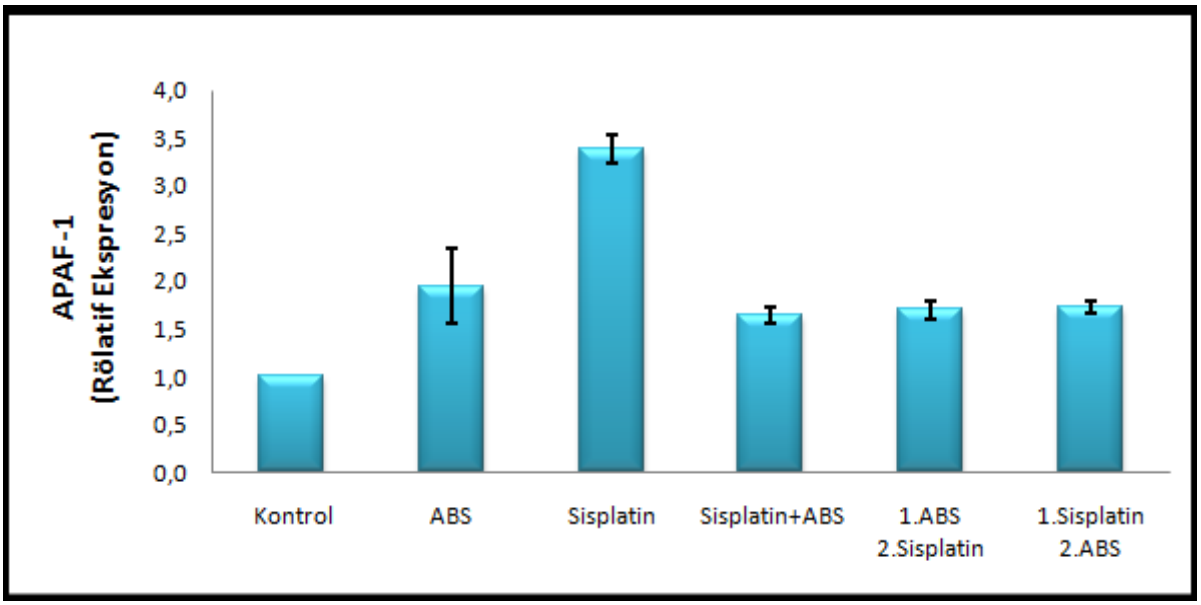
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve karboplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı APAF-1 gen ifadesinde, en belirgin artışın aynı anda ABS+karboplatin uygulanmasında kontrole göre 3,8±0,16 kat olarak belirlendiği saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 53). Bu gruptan sonra, önce karboplatin sonra ABS uygulamasında kontrole göre 2,36±0,23 kat artış gözlenmiş ancak diğer uygulama gruplarıyla birlikte kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p\geq0.05$) ve grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ($p\geq0,05$).



*: $p<0.05$, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

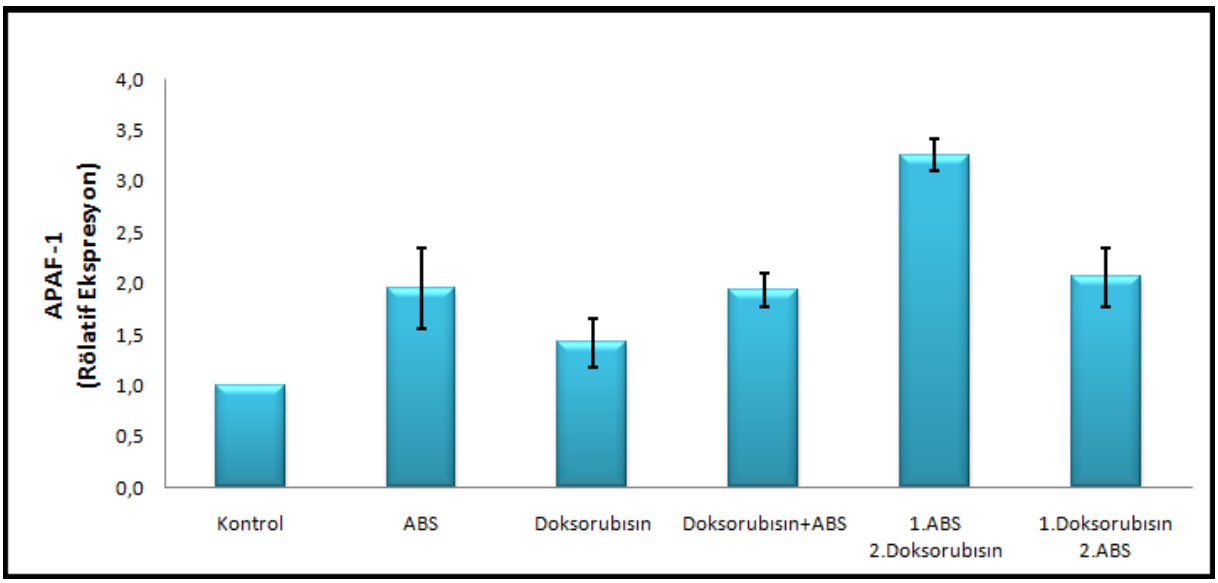
Şekil 53. ABS-karboplatin kombinasyonlarının APAF-1 gen ifadesi üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve sisplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı APAF-1 gen ifadesinde, en belirgin artışın sisplatin uygulanmasında kontrole göre 3,4±0,14 kat olarak belirlendiği, bunu 1,95±0,39 kat ile tek başına ABS uygulamasının takip ettiği saptanmış (Şekil 54), ancak diğer uygulama gruplarıyla birlikte kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı (p≥0,05) ve grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir (p≥0,05).



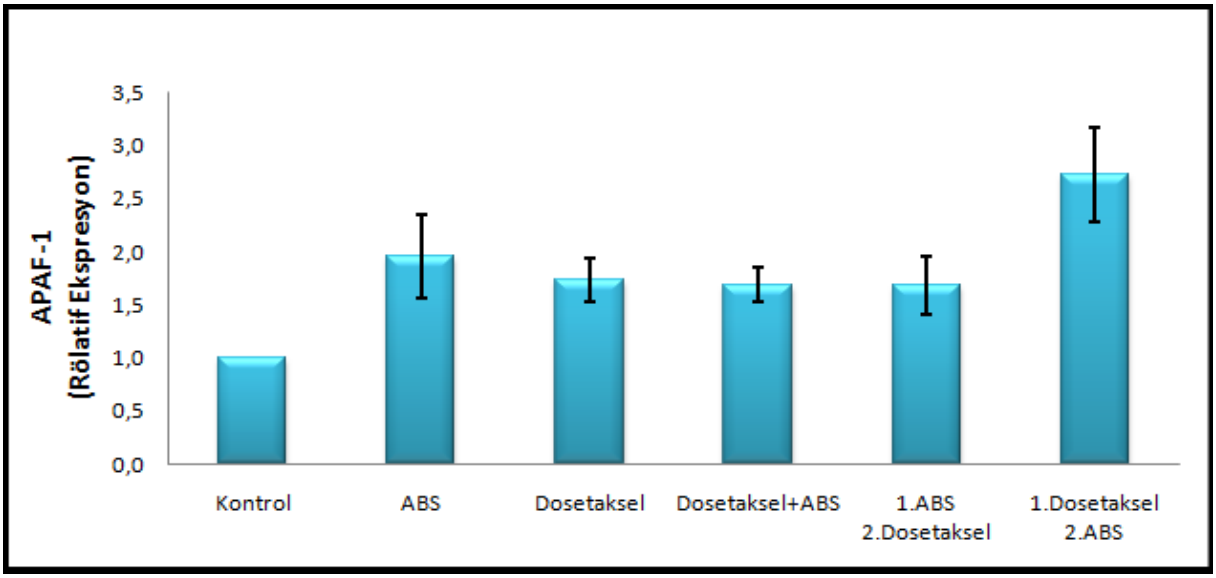
Şekil 54. ABS-sisplatin kombinasyonlarının APAF-1 gen ifadesi üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve doksorubisinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı APAF-1 gen ifadesinde, en belirgin artışın önce ABS sonra doksorubisin uygulanmasında kontrole göre 3,25±0,28 kat olarak belirlendiği, bunu 2,06±0,51 kat ile önce doksorubisin sonra ABS uygulamasının takip ettiği saptanmış (Şekil 55), ancak diğer uygulama gruplarıyla birlikte kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p \geq 0.05$) ve grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ($p \geq 0.05$).



Şekil 55. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının APAF-1 gen ifadesi üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve dosetakselin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı APAF-1 gen ifadesinde, en belirgin artışın önce dosetaksel sonra ABS uygulanmasında kontrole göre 2,7±0,44 kat olarak belirlendiği, bunu 1,95±0,39 kat ile tek başına ABS uygulmasının takip ettiği saptanmış (Şekil 56), ancak diğer uygulama gruplarıyla birlikte kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p \geq 0.05$) ve grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ($p \geq 0.05$).

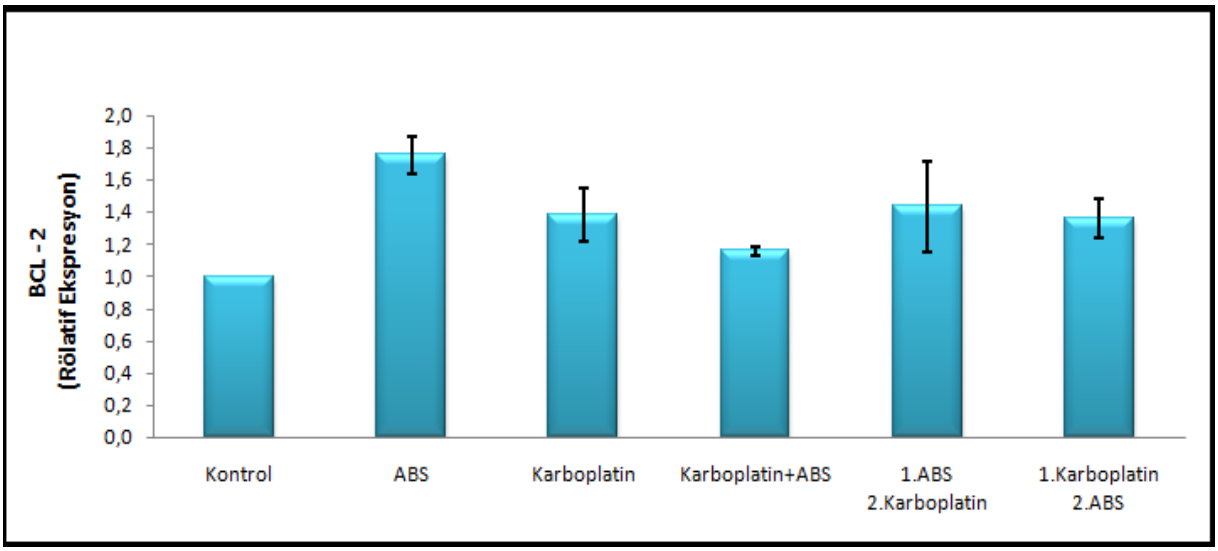


Şekil 56. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının APAF-1 gen ifadesi üzerine etkisi

BCL-2 Gen İfadesi

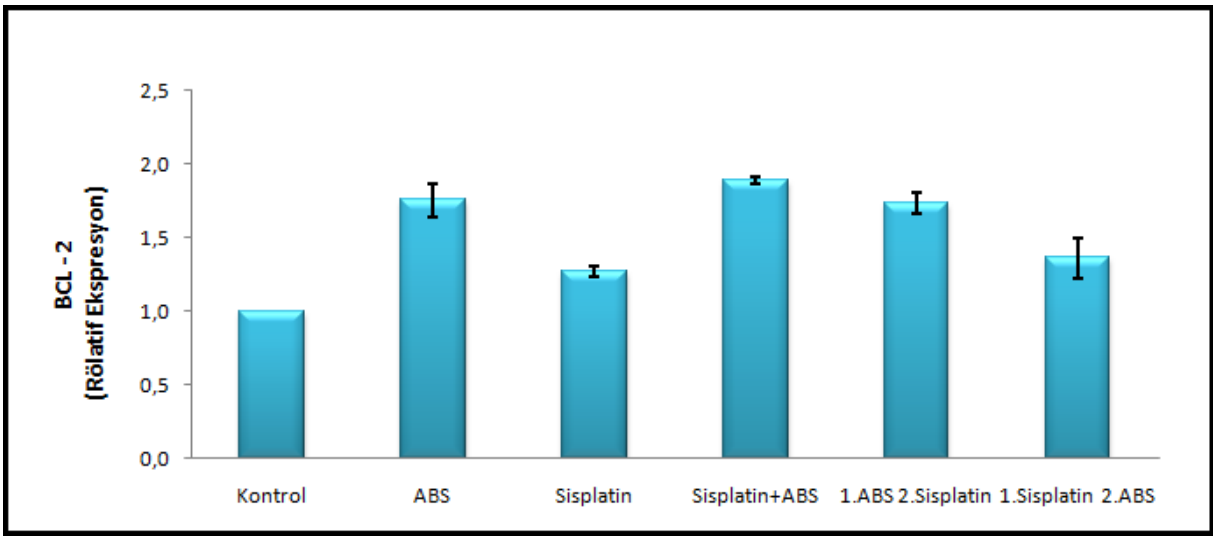
MCF-7 hücre hatlarında; endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı RT-PCR analizi sonuçlarına göre, kombine halinde uygulanan ABS, karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakselin Bcl-2 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve karboplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı Bcl-2 gen ifadesinde, en belirgin artışın ABS uygulanmasında kontrole göre 1,75±0,11 kat olarak belirlendiği saptanmış olup (Şekil 57), diğer uygulama gruplarıyla birlikte kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p \geq 0.05$) ve grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ($p \geq 0.05$).



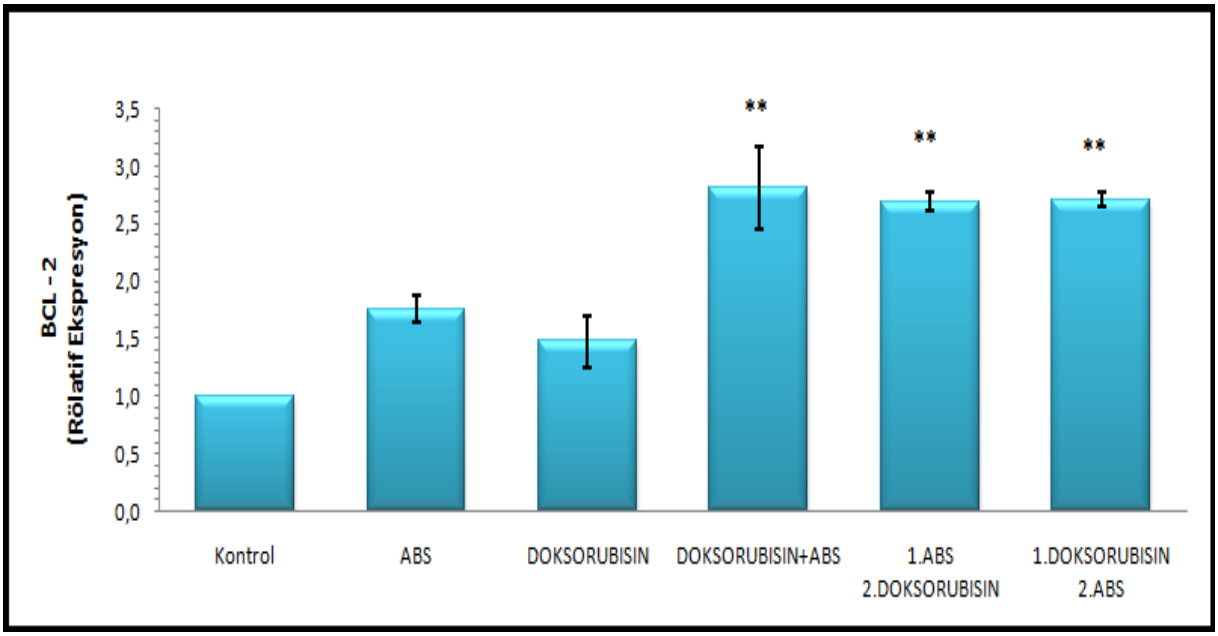
Şekil 57. ABS-karboplatin kombinasyonlarının Bcl-2 gen ifadesi üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve sisplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı Bcl-2 gen ifadesinde, en belirgin artışın ABS+sisplatin uygulanmasında kontrole göre 1,9±0,02 kat olarak belirlendiği saptanmış olup (Şekil 58), diğer uygulama gruplarıyla birlikte kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p \geq 0,05$) ve grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ($p \geq 0.05$).



Şekil 58. ABS-sisplatin kombinasyonlarının Bcl-2 gen ifadesi üzerine etkisi

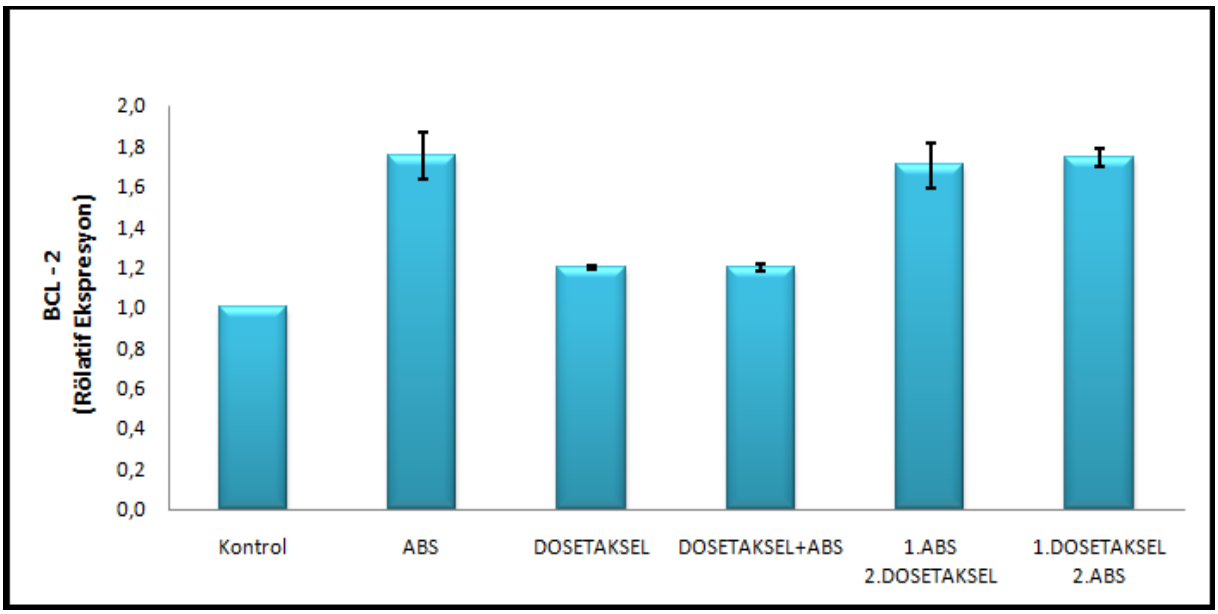
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve doksorubisinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı Bcl-2 gen ifadesinde, en belirgin artışın aynı anda ABS+doksorubisin uygulanmasında kontrole göre 2,81±0,36 kat olarak belirlendiği, bunu önce doksorubisin sonra ABS uygulanmasının kontrole göre 2,71±0,07 kat, önce ABS sonra doksorubisin uygulaması ise 2,69±0,08 kat artarak kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 59). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p \geq 0.05$) ve grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ($p \geq 0.05$).



**: p<0.01, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 59. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının Bcl-2 gen ifadesi üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve dosetakselin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı Bcl-2 gen ifadesinde, en belirgin artışın ABS uygulanmasında kontrole göre 1,75±0,11 kat olarak belirlendiği saptanmış olup (Şekil 60), diğer uygulama gruplarıyla birlikte kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p \geq 0,05$) ve grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ($p \geq 0,05$).

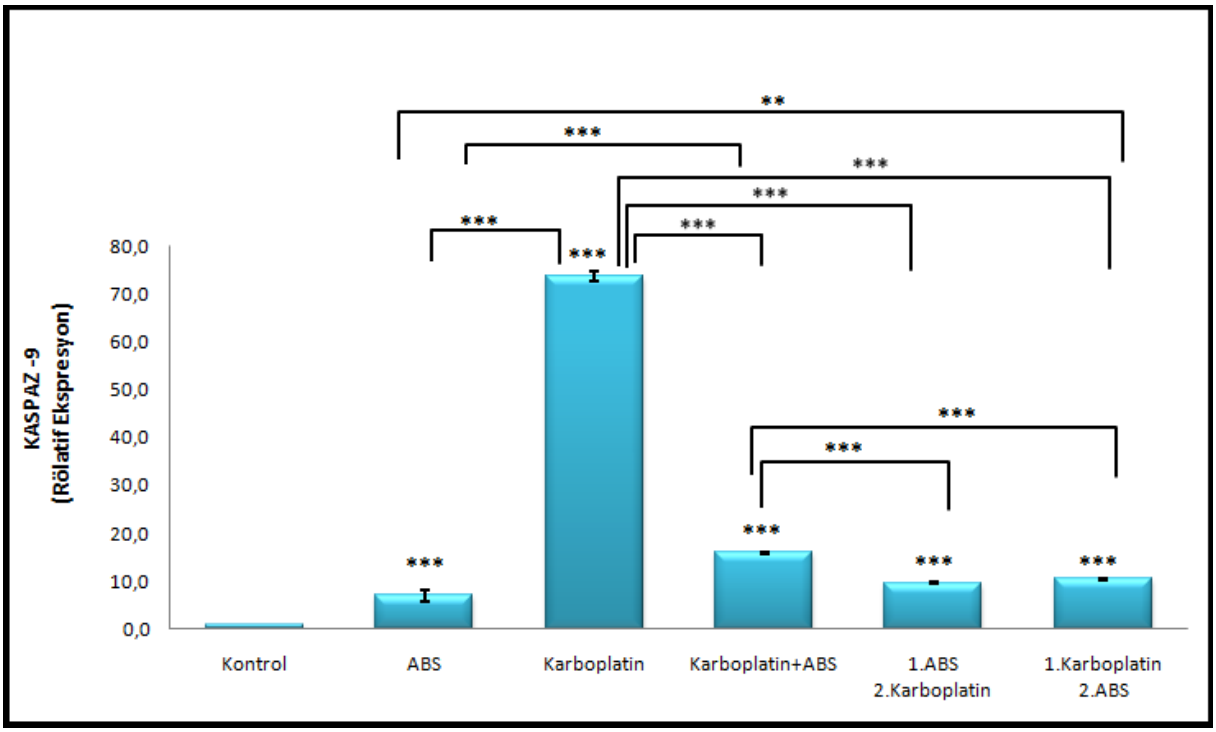


Şekil 60. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının Bcl-2 gen ifadesi üzerine etkisi

Kaspaz-9 Gen İfadesi

MCF-7 hücre hatlarında; endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı RT-PCR analizi sonuçlarına göre, kombine halinde uygulanan ABS, karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakselin kaspaz-9 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve karboplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı kaspaz-9 gen ifadesinde, en belirgin artışın tek başına karboplatin uygulanmasında kontrole göre 73,7±1,04 kat olarak belirlendiği, bunu aynı anda ABS+karboplatin uygulanması kontrole göre 15,9±0,16 kat, önce karboplatin sonra ABS uygulaması 10,5±0,18 kat, önce ABS sonra karboplatin uygulaması 9,6±0,17 kat, tek başına ABS uygulamasında ise 6,95±1,2 kat artarak takip ettiği saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 61). Grupların da kendi arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiş ($p<0.01$, $p<0.0001$), ancak karboplatinin tek başına arttırdığı ifadeyi ABS uygulamasının azalttığı ve kombinasyonlardaki artışın tek başına karboplatin uygulamasına göre önemli derecede azaldığı gözlenmiştir.

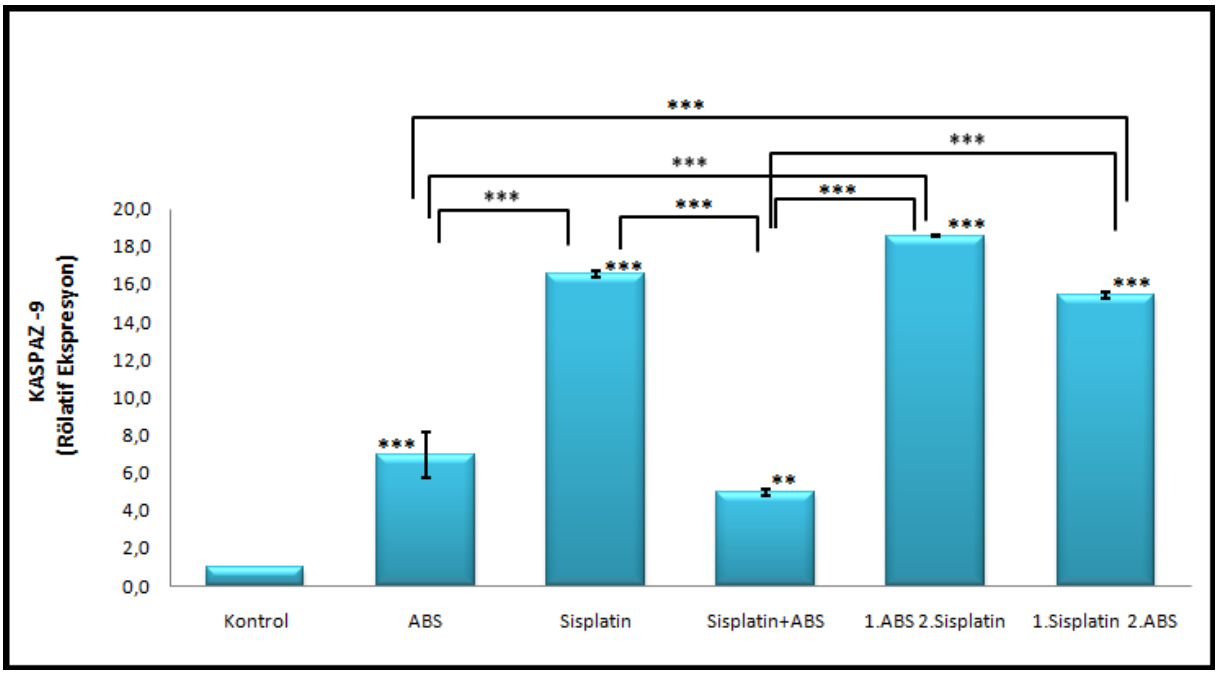


**: $p<0.01$, ***: $p<0.0001$, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 61. ABS-karboplatin kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve sisplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı kaspaz-9 gen ifadesinde, en belirgin artışın önce ABS sonra sisplatin

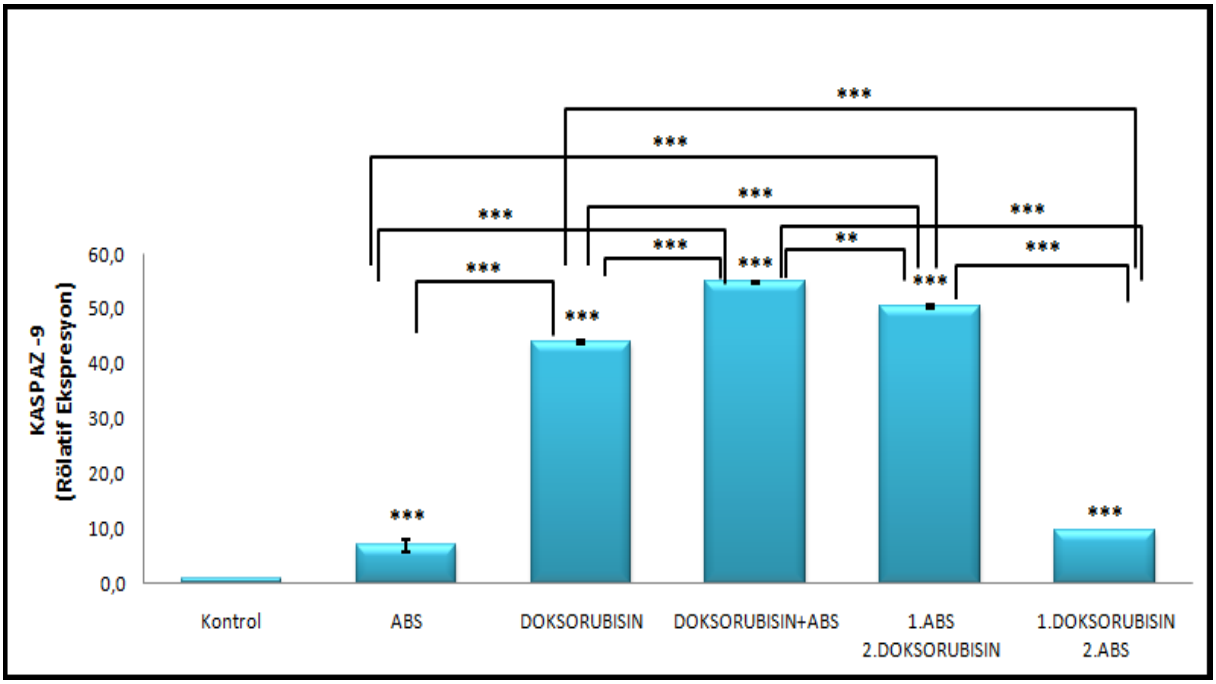
uygulanmasında kontrole göre 18,5±0,03 kat olarak belirlendiği, bunu tek başına sisplatin uygulanmasının kontrole göre 16,5±0,17 kat, önce sisplatin sonra ABS uygulamasının 15,4±0,17 kat, tek başına ABS uygulamasının 6,95±1,2 kat ($p<0.0001$), aynı anda ABS+sisplatin ugulamasının 4,94±0,19 kat artarak kontrole göre ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu gözlenmiştir (Şekil 62). Gruplarında kendi arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir ($p<0.0001$).



**: $p<0.01$, ***: $p<0.0001$, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 62. ABS-sisplatin kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkisi

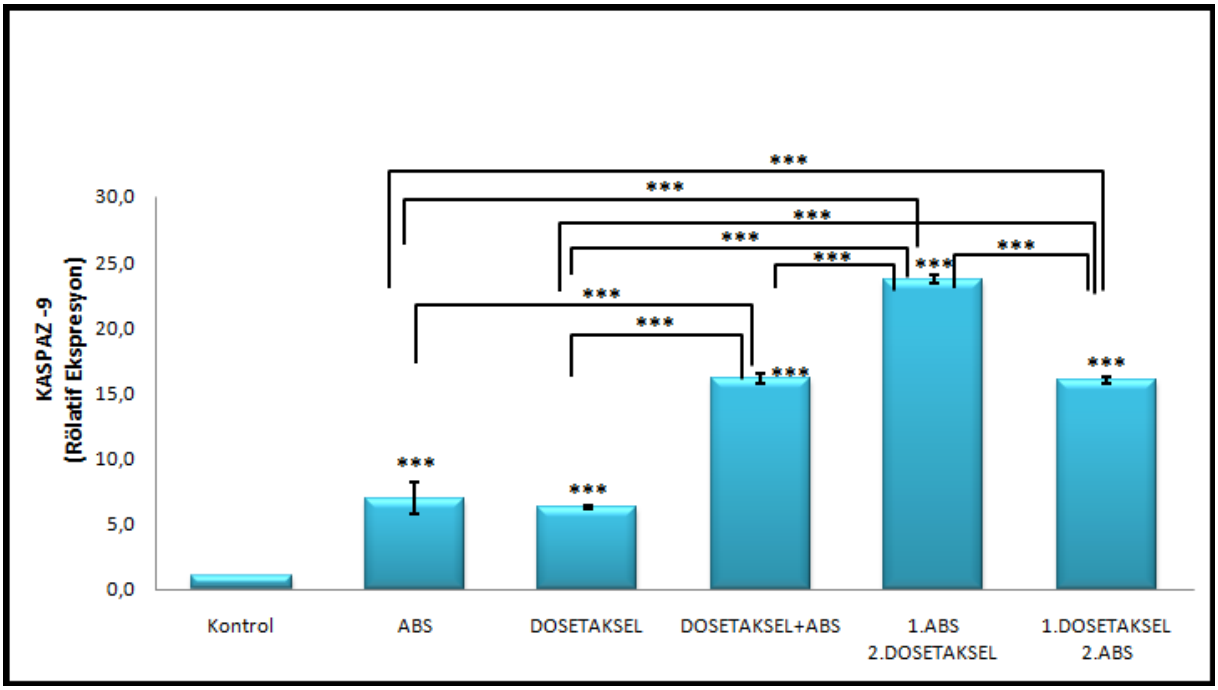
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve doksorubisinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı kaspaz-9 gen ifadesinde, en belirgin artışın aynı anda doksorubisin+ABS uygulanmasında kontrole göre 54,9±0,12 kat olarak belirlendiği, bunu önce ABS sonra doksorubisin uygulamasının kontrole göre 50,5±0,32 kat, tek başına doksorubisin uygulamasının 43,96±0,26 kat, önce doksorubisin sonra ABS uygulamasının 9,7±0,03 kat, tek başına ABS uygulamasının ise 6,95±1,2 kat ile takip ettiği saptanmış olup kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 63). Grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir ($p<0.01$, $p<0.0001$).



**: p<0.01, ***: p<0.0001, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 63. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve dosetakselin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı kaspaz-9 gen ifadesinde, en belirgin artışın önce ABS sonra dosetaksel uygulanmasında kontrole göre 23,7±0,36 kat olarak belirlendiği, bunu aynı anda ABS+dosetaksel uygulamasının kontrole göre 16,1±0,36 kat, önce dosetaksel sonra ABS uygulamasının 16,02±0,28 kat, tek başına ABS uygulamasının 6,95±1,2 kat ve tek başına dosetaksel uygulamasının 6,27±0,12 kat ile takip ettiği saptanmış olup kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 64). Grupların kendi arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiş ($p<0.0001$) ve birlikte kombinasyonlarının tek başlarına olan uygulamalarına göre gen ifadesini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir.



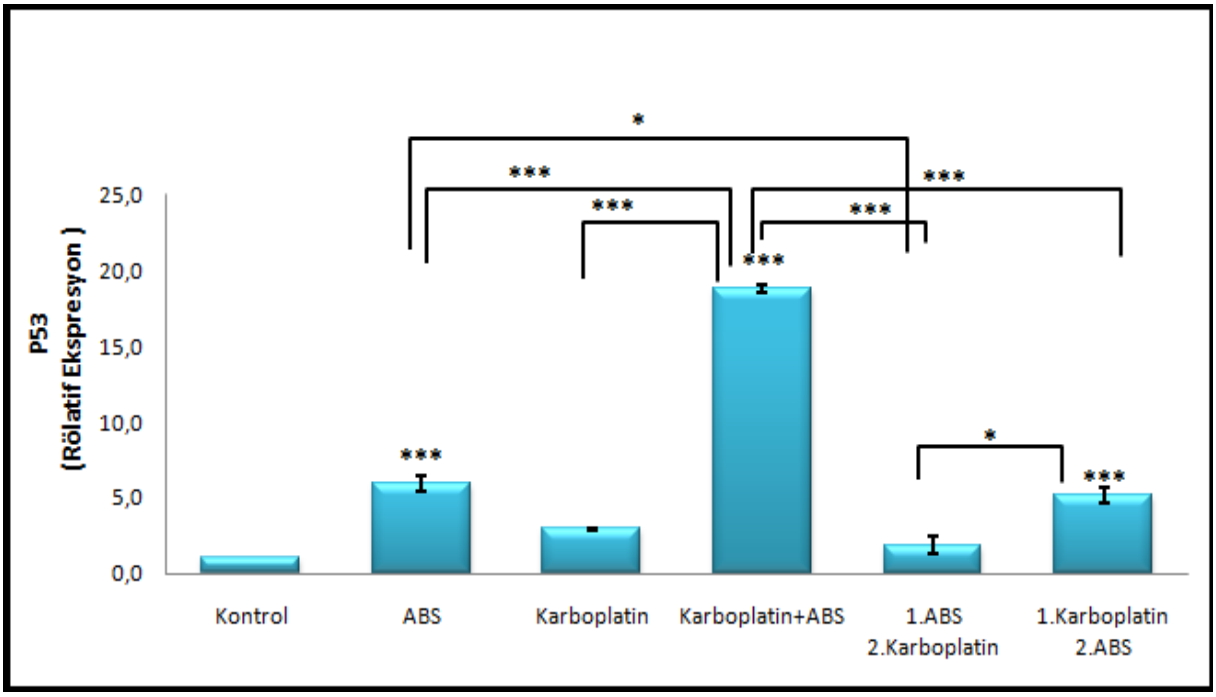
***: p<0.0001, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 64. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkisi

P53 Gen İfadesi

MCF-7 hücre hatlarında; endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı RT-PCR analizi sonuçlarına göre, kombine halinde uygulanan ABS, karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakselin p53 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler verilmiştir.

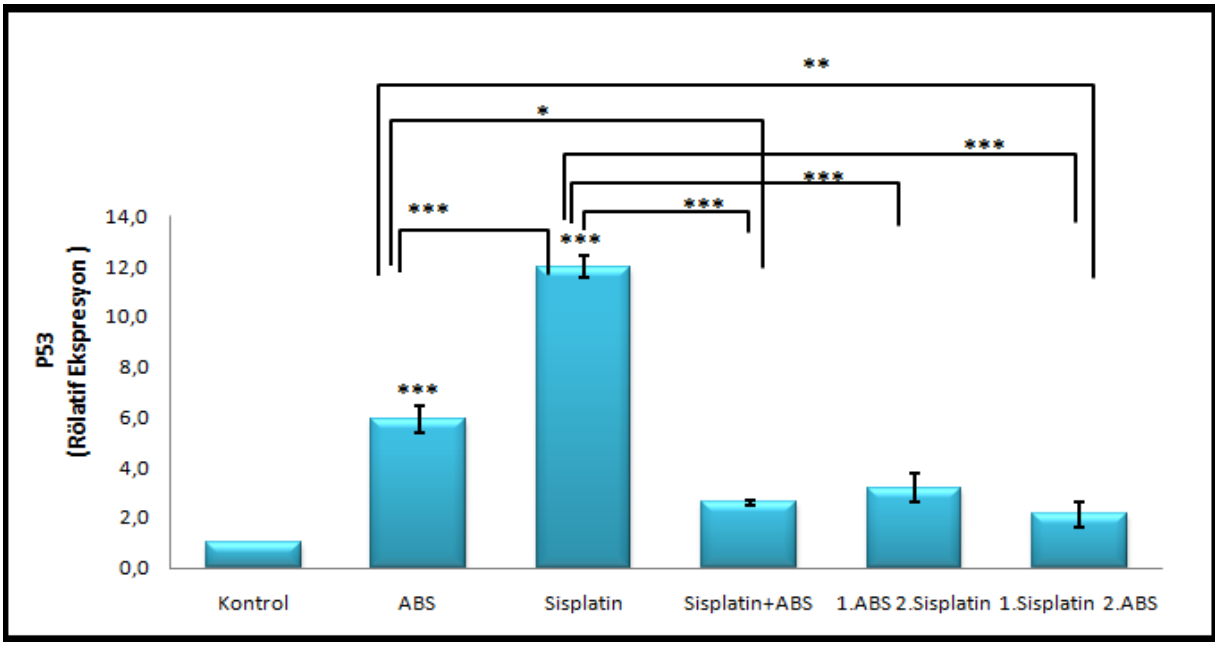
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve karboplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı p53 gen ifadesinde, en belirgin artışın aynı anda ABS+karboplatin uygulanmasında kontrole göre 18,76±0,3 kat olarak belirlendiği, bunu tek başına ABS uygulamasının kontrole göre 5,93±0,54 kat ve önce karboplatin sonra ABS uygulamasının da 5,2±0,5 kat ile takip ettiği saptanmış olup kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 65). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p\geq0.05$), ama grupların kendi arasında özellikle aynı anda ABS+karboplatin uygulamasının diğer gruplara göre ($p<0.0001$) istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir.



*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.0001, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 65. ABS-karboplatin kombinasyonlarının p53 gen ifadesi üzerine etkisi

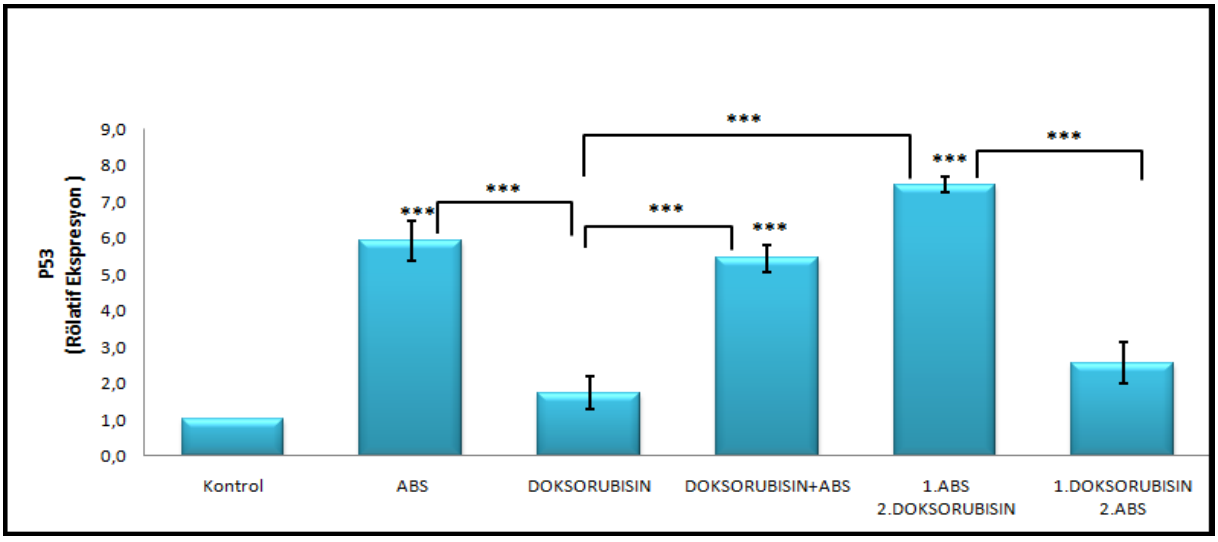
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve sisplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı p53 gen ifadesinde, en belirgin artışın tek başına sisplatin uygulanmasında kontrole göre 11,97±0,42 kat olarak belirlendiği bunu tek başına ABS uygulamasının kontrole göre 5,93±0,54 kat ile takip ettiği saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 66). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p\geq0.05$), ama grupların kendi arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir. Tek başına uygulamalarında, hem ABS hem de sisplatin kontrole göre anlamlı artış gösterirken, kombinasyonlarının p53 gen üzerine etkisinda azalma olduğu gözlenmiştir.



*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.0001, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 66. ABS-sisplatin kombinasyonlarının p53 gen ifadesi üzerine etkisi

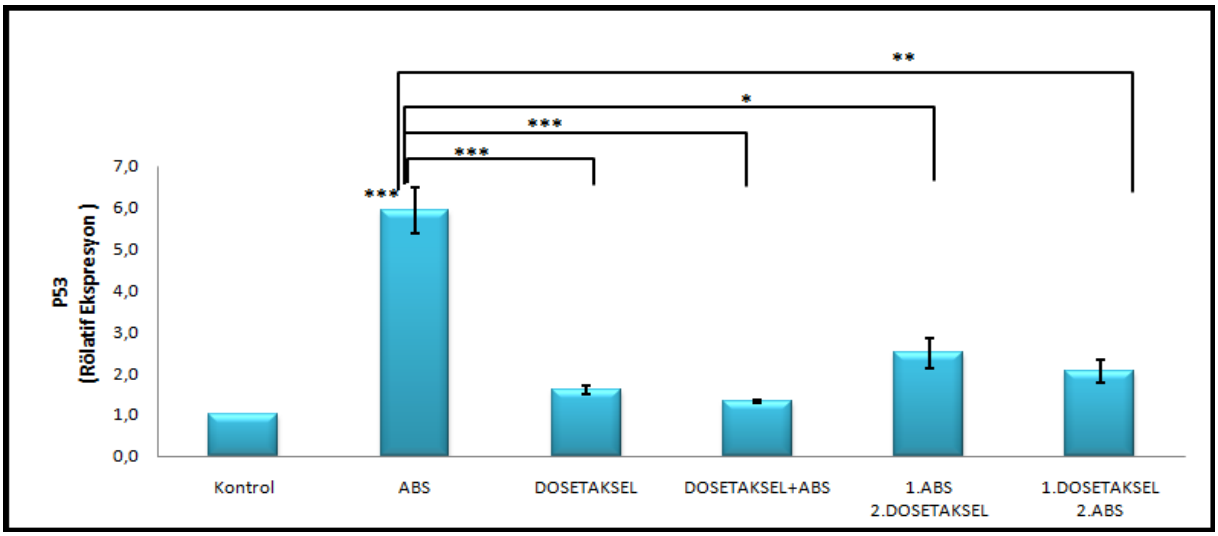
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve doksorubisinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı p53 gen ifadesinde, en belirgin artışın önce ABS sonra doksorubisin uygulanmasında kontrole göre 7,47±0,2 kat olarak belirlendiği, bunu tek başına ABS uygulamasının kontrole göre 5,93±0,54 kat ve aynı anda ABS+doksorubisin uygulamasının kontrole göre 5,45±0,37 kat ile takip ettiği saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 67). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p\geq0.05$), ama grupların kendi arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu gözlenmiştir. Şekil 67'ye bakıldığında, tek başına doksorubisin uygulamasının gen üzerinde anlamlı bir artışa sebep olmadığı, ancak ABS ile birlikte uygulanmalarında gen ifadesini arttırdığı belirlenmiştir.



***: p<0.0001, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 67. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının p53 gen ifadesi üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve dosetakselin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı p53 gen ifadesinde, en belirgin artış tek başına ABS uygulamasında kontrole göre 5,93±0,54 kat ile saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 68). Diğer uygulama gruplarında ise, kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı ($p\geq0.05$), ama tek başına ABS uygulamasında diğer uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.0001$). Şekil 68'e bakıldığında, dosetaksel uygulamasının ABS'yi baskıladığı ve kombinasyonlarda istatistiksel olarak önemli bir artışın olmadığı gözlenmiştir ($p\geq0.05$).



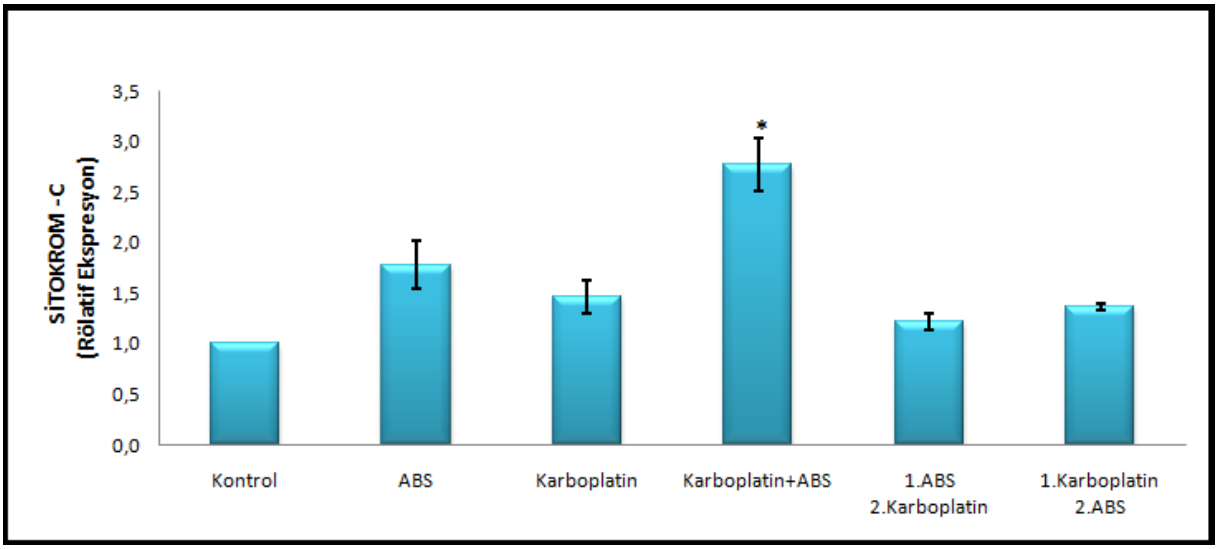
*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.0001, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 68. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının p53 gen ifadesi üzerine etkisi

Sitokrom-C Gen İfadesi

MCF-7 hücre hatlarında; endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı RT-PCR analizi sonuçlarına göre, kombine halinde uygulanan ABS, karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakselin sitokrom-c gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler verilmiştir.

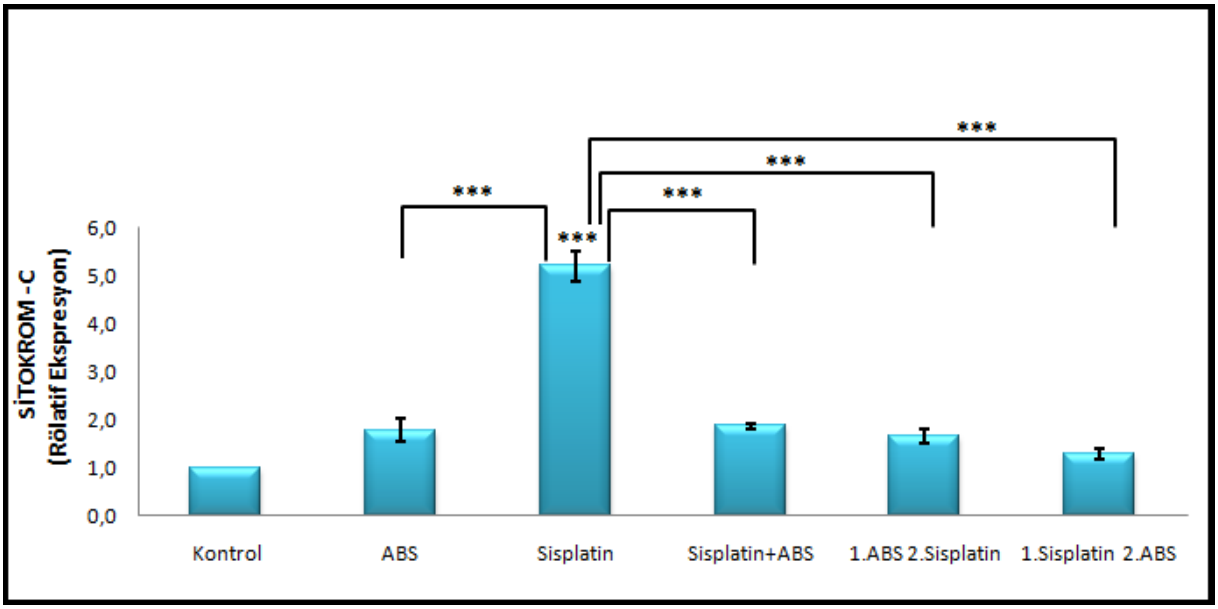
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve karboplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı sitokrom-c gen ifadesinde, en belirgin artışın aynı anda ABS+karboplatin uygulanmasında kontrole göre 2,78±0,3 kat olarak saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p<0.05) (Şekil 69). Diğer uygulama gruplarında ve grupların kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı (p≥0.05) gözlenmiştir.



*: p<0.05, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 69. ABS-karboplatin kombinasyonlarının Sitokrom-c gen ifadesi üzerine etkisi

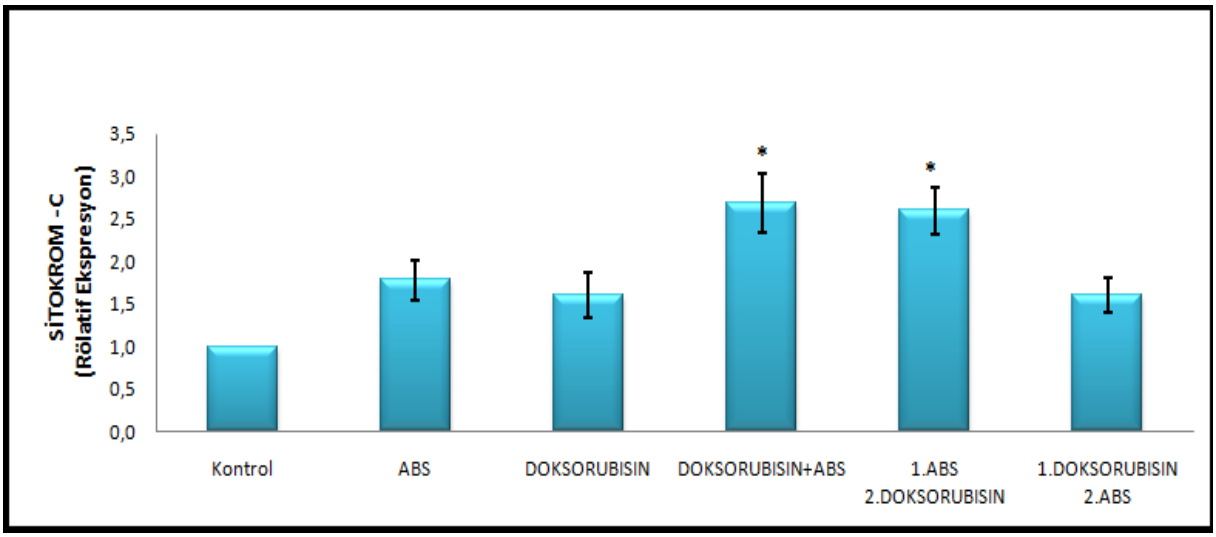
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve sisplatinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı sitokrom-c gen ifadesinde, en belirgin artış tek başına sisplatin uygulanmasında kontrole göre 5,18±0,3 kat olarak saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p<0.0001) (Şekil 70). Diğer uygulama gruplarında kontrole göre anlamlı bir farkın olmadığı (p≥0.05), ancak tek başına sisplatin uygulamasının diğer uygulama gruplarıyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu gözlenmiştir (p<0.0001). Tek başına sisplatin uygulaması anlamlı bir artış yapmış olsa da, ABS uygulaması sisplatinin etkisini baskı altına almış ve kombinasyonlarında kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmemiştir (p≥0.05).



***: p<0.0001, kontrol grubuna göre ve gruplar arasında karşılaştırma

Şekil 70. ABS-sisplatin kombinasyonlarının Sitokrom-c gen ifadesi üzerine etkisi

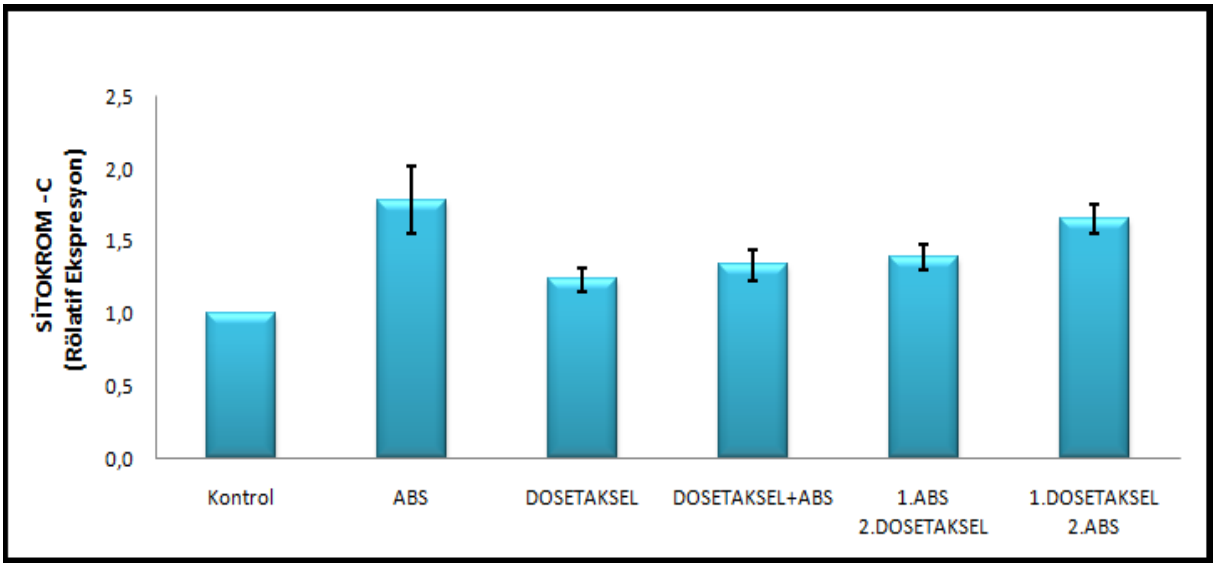
Analiz sonuçlarına göre; ABS ve doksorubisinin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı sitokrom-c gen ifadesinde, en belirgin artışın aynı anda ABS+doksorubisin uygulanmasında kontrole göre 2,7±0,3 kat olarak, bunu önce ABS sonra doksorubisin uygulamasının 2,6±0,3 kat ile takip ettiği saptanmış olup, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.05) gözlenmiştir (Şekil 71). Diğer uygulama gruplarında ve grupların kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı (p≥0.05) belirlenmiştir.



*: p<0.05, kontrol grubuna göre karşılaştırma

Şekil 71. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının Sitokrom-c gen ifadesi üzerine etkisi

Analiz sonuçlarına göre; ABS ve dosetakselin tek ve kombine olarak uygulamasının yapıldığı sitokrom-c gen ifadesinde, bütün uygulama gruplarında kontrole göre bir miktar artışın olduğu, ancak istatistiksel olarak uygulamaların tek başına ve kendi aralarında istatistiksel olarak bir farkın olmadığı ($p \geq 0.05$) gözlenmiştir (Şekil 72).



Şekil 72. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının Sitokrom-c gen ifadesi üzerine etkisi

TARTIŞMA

Kanser, yayılan ve tahrip edici bir yapıya sahip ve kökeni olan bölgeden çeşitli organlara yayılma potansiyeli olan bir hastalıktır. Bu hastalık, 2014'te Amerika Birleşik Devletleri'nde sunulan 585.720 ölümle sonuçlanan kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyadaki ikinci ölüm nedenidir (170-172). Cerrahi müdahele, kemoterapi ve radyoterapi gibi agresif tedaviler kanserin ilerleyişini kontrol etmek için olağan metotlar arasında bulunur ve malignan evrelerinin tedavisinde tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde kullanılır (170,173). Bunların arasında kemoterapi; komplikasyonları ve sistemik yan etkileri nedeniyle çoğunlukla tolere edilemeyen en agresif tedavilerden biridir. Bu nedenle, mümkün olan en az yan etkiye sahip etkili tedavileri bulmak isteyen araştırmalara olan ilgi artmaktadır. Bu da doğal kaynak kökenli maddelerin, güvenli ve toksik olmayan antitümör ve antiproliferatif etkileri üzerine çalışmalar yapılmasına yol açmıştır (170,174-176)

Yeni ilaçlara duyulan ihtiyaç, doğal kaynaklı olan ajanların olası antikanser özelliklerini değerlendirecek çalışmaları doğurmuştur. Çeşitli biyoaktiviteye sahip doğal ürünler, farmasötik potansiyeli olan yeni etkenler için önemli bir kaynak haline gelmiştir. Tümör büyümesini, anjiyogenezi ve yan etkileriyle birlikte metastazları inhibe etme özelliklerine sahip olan bitki özleri, antikanser terapötik etkenler olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (177). Bu aktivitenin büyük kısmı, kanserojenleri inaktive etme, anjiyogenezi inhibe etme, hücre çoğalmasını durdurma veya apoptozu indükleme kapasitesini gösteren bu özütlerin temel bileşenleri olan flavonoidlerden kaynaklanmaktadır (10,177).

Meme kanseri kemoterapisinin en büyük sorunu, kullanılan sitotoksik ilaçların toksisitesidir (177,178). Bununla birlikte, bitkiler ve bitkilerden türetilmiş ürünlerin kanserin tedavisinde ve sürecinde etkili ve güvenli olduklarının etkisi ortaya konulmuştur. Birçok

doğal ürün ve analogları, güçlü antikanser bileşenleri olarak tanımlanmıştır (178,179).

ABS'nin bileşenlerinin ferdi olarak birçok biyolojik aktivitelerinin yanı sıra, farklı da olsa özgün kanser hücre dizileri üzerinde antiprolifertatif etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Her ne kadar ferdi antikanser aktivitesinden bahsedilecek olsa da, entofarmokolojik olarak bitkiler ya bir karışım halinde ekstre edilerek ya da ferdi ekstratların karışımları hazırlanarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Hemen her doğal madde, ferdi aktivite belirteci olarak fonksiyonel testlerden geçmştir. Doğal madde araştırmalarının yeni hedefi ise etnofarmokolojik formüllerde hazırlanma sırasında gelişen kimyasal reaksiyonlarda veya sonrasında spontan olarak gelişen kimyasal reaksiyonlarda meydana gelebilecek aktif molaküllerin tespit edilmesidir. Toksisitesi azaltılmış ve etkinliği arttırılmış antikanser tedavisi geliştirilmesine yönelik çalışmalarımız içerisinde ABS'yi hedeflememizin nedeni ise, her ne kadar hemostatik olarak bu karışım üzerinde birçok çalışma bulunsa da, bazı kanser hastalarının aldıkları konvansiyonel tedavi sırasında kullandıkları bitkisel ekstrat karışım ABS ile olumlu yanıtlar aldıkları ile ilgili duyumlarımızdır. ABS ile ilgili bu ilk adım çalışmasında, önce ABS'nin *in vitro* antikanser aktivitesinin varlığının belirlenmesi, takibinde konvansiyonel antikanser ilaçlarla etkileşiminin in vivo çalışma öncesi değerlendirilmesi ve muhtemel potansiyel fonksiyonunun hücre ölüm şekli ve apoptik gen ekspresyonları ile moleküler düzeyde irdelenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak MCF-7 hücrelerinde ABS, karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakselin tek olarak uygulamalarında LD_{50} değerleri belirlenmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında, hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz LD_{50}, ABS için 13 µL, karboplatin için 63.14 µM, sisplatin için 2.85 µM, dosetaksel için 9.3 µM, doksorubisin için 5.1 µM olarak belirlenmiştir.

ABS ile ilgili yapılan çalışmalarda; farklı konsantrasyonlarda ABS'nin insan lenfosit kültürü üzerindeki sitotoksik etkisinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında %5 dilüsyon oranında ABS'de 2.12±0.12 µM ve %12,5 dilüsyon oranında ABS'de 2,62±0.1 µM (180), yapılan başka bir çalışmada ABS'nin mycobacterium tuberculosis izolatlarına karşı *in vitro* etkinliği araştırılırken, bulunan $MİK_{50}$ değeri (minimum inhibisyon konsantrasyonu) 10.94 µg/ml olarak saptanmıştır (181). Çalışmamızda ABS LD_{50} dozu, 13 µL olarak bulunmuştur. Çalışmamız, ABS'nin solid kanserler üzerindeki etkisinin ve konvansiyonel ilaçlarla etkileşimini irdelemesi açısından ilktir (Şekil 20).

Karboplatinin LD_{50} dozu, *in vitro* olarak meme kanseri üzerine yapılan çalışmada 50 µg/ml (182), MCF-7 hücrelerinde ilaç birikimi ve ROS seviyelerindeki artışa karboplatinin toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada 250 µM (183), meme kanserinde karboplatin

duyarlılığının araştırıldığı başka bir çalışmada 24 saatlik inhibisyon sonrası 224.4 µM, 72 saatlik inhibiyon sonrası ise 8.6 µM (184) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda karboplatin düzeyi 63.14 µM olarak (Şekil 21) belirlemiştir. Sisplatinin LD_{50} dozu, meme kanseri hücrelerinde zoledronik asitle sisplatinin etisinin araştırıldığı çalışmada 8 µM (185), küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinde fototerapi ve sisplatinin sinerjistik etkisinin araştırıldığı çalışmada 1.25 µM (186), p53 geni üzerinde apigenin ile sisplatinin sitotoksik etkisinin araştırıldığı MCF-7 hücrelerinde 5 µM (187) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda sisplatin LD_{50} dozu 2.85 µM olarak (Şekil 22) bulunmuştur. Doksorubisin LD_{50} dozu, meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada 2,5 µg/ml (188), insan meme karsinom hücrelerinde doksorubisinin sitotoksik etkisinin ve üzüm çekirdeği ekstratının sinerjitik antikanser etkisinin araştırıldığı çalışmada 25-100 nM (189), doksorubisinin damnakantal ile kombinasyonunun meme kanseri hücresine etkisinin araştırıldığı çalışmada 0.55±0.02 µg/mL (190) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda doksorubisinin LD_{50} dozu 5.1 µM olarak (Şekil 23) belirlenmiştir. Dosetaksel LD_{50} dozu, microrna-3646'nın gsk-3β/β-catenin sinyalizasyon yolunda insan meme kanseri hücrelerindeki dosetaksel direncine katkısının araştırıldığı çalışmada 45.58 µM (191), insan serumu paraoksonaz-1 faaliyetini azaltmak için antikanser ajanlarının kullanıldığı bir çalışmada 0.665 mM (192), prostat kanser hücrelerinde dosetaksel sitotoksisitesi üzerine glufosfamidin kemomodülatör etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada PC-3 hücrelerinde 3.08±0.4 nM ve LNCaP hücrelerinde 1.46±0.2 nM (193) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda dosetaksel LD_{50} dozu 9.3 µM olarak (Şekil 24) bulunmuştur. Bulduğumuz sonuçlar; farklı hücre tipleri ve uygulama sürelerinde uygulanması nedeniyle, değişiklik göstermekle birlikte literatür verileriyle uyum göstermektedir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında ABS ile kemoterapi ilaçlarının etkileşiminin belirlenmesi için; ABS kemoterapi ilaçlarından önce, kemoterapi ilaçlarından sonra ve kemoterapi ilaçlarıyla aynı anda olmak üzere uygulamaları yapılmıştır.

ABS ile karboplatin etkileşimini araştırdığımızda; önce ABS sonra karboplatin kombinasyonunda 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 15,75 µM konsantrasyonda karboplatinin hücre canlılığına etkisi %65,38 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %18,2 oranında saptanmış (Şekil 25) ve kombinasyon en iyi 1/4LD_{50}'ye denk gelen değerlerde kuvvetli sinerjizm göstermiş olup (Tablo 4), CI değeri 0.11134 olarak hesaplanmıştır. Önce karboplatin sonra ABS kombinasyonunda yine 1/4LD_{50}'ye denk gelen değerlerde çok kuvvetli sinerjizm göstermiş olup, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,32 oranında saptanmış (Şekil 26) ve CI değeri 0.08874 olarak hesaplanmıştır (Tablo 5). Aynı anda karboplatin+ABS

kombinasyonunda 1/4LD_{50}'ye denk gelen değerlerde kuvvetli sinerjizm göstermiş olup, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %22,52 oranında saptanmış (Şekil 27) ve CI değeri 0.14883 olarak hesaplanmıştır (Tablo 6).

ABS ile sisplatinin etkileşimlerini araştırdığımızda; önce ABS sonra sisplatin kombinasyonunda 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 0,712 µM konsantrasyonda sisplatinin hücre canlılığına etkisi %83,07 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %23,15 oranında saptanmış (Şekil 28) ve kombinasyon en iyi 1/4LD_{50}'ye denk gelen değerlerde kuvvetli sinerjizm göstermiş olup, CI değeri 0.19713 olarak hesaplanmıştır (Tablo 7). Önce sisplatin sonra ABS kombinasyonunda yine 1/4LD_{50}'ye denk gelen değerlerde kuvvetli sinerjizm göstermiş olup, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %21,16 oranında saptanmış (Şekil 29) ve CI değeri 0.17297 olarak hesaplanmıştır (Tablo 8). Aynı anda sisplatin+ABS kombinasyonunda yine 1/4LD_{50}'ye denk gelen değerlerde kuvvetli sinerjizm göstermiş olup, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,36 oranında saptanmış (Şekil 30) ve CI değeri 0.11103 olarak hesaplanmıştır (Tablo 9).

ABS ile doksorubisinin etkileşimlerini araştırdığımızda; önce ABS sonra doksorubisin kombinasyonunda 1/4LD_{50}'ye denk gelen 3,25 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %61,51 ve 1,25 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %74,28 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %15,13 oranında saptanmış (Şekil 31) ve kombinasyon en iyi 1/4LD_{50}'ye denk gelen değerlerde çok kuvvetli sinerjizm göstermiş olup (Tablo 10), CI değeri 0.09297 olarak hesaplanmıştır. Önce doksorubisin sonra ABS kombinasyonunda 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,3125 µM konsantrasyonda doksorubisinin hücre canlılığına etkisi %86,2 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %38,12 oranında saptanmış (Şekil 32) ve kombinasyon en iyi 1/16LD_{50}'ye denk gelen değerlerde çok kuvvetli sinerjizm göstermiş olup (Tablo 11), CI değeri 0.10034 olarak hesaplanmıştır. Aynı anda doksorubisin+ABS kombinasyonunda yine 1/16LD_{50}'ye denk gelen değerlerde çok kuvvetli sinerjizm göstermiş olup, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %31,61 oranında saptanmış (Şekil 33) ve CI değeri 0.07113 olarak hesaplanmıştır (Tablo 12).

ABS ile dosetakselin etkileşimlerini araştırdığımızda; önce ABS sonra dosetaksel kombinasyonunda 1/16LD_{50}'ye denk gelen 0.81 µl ABS'nin hücre canlılığına etkisi %87,77 ve 0,58 µM konsantrasyonda dosetakselin hücre canlılığına etkisi %74,63 olurken, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %31,27 oranında saptanmış (Şekil 34) ve kombinasyon en iyi 1/16LD_{50}'ye denk gelen değerlerde çok kuvvetli sinerjizm göstermiş olup

(Tablo 13), CI değeri 0.06457 olarak hesaplanmıştır. Önce dosetaksel sonra ABS kombinasyonunda yine 1/16LD_{50}'ye denk gelen değerlerde çok kuvvetli sinerjizm göstermiş olup, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %26,38 oranında saptanmış (Şekil 35) ve CI değeri 0.04746 olarak hesaplanmıştır (Tablo 14). Aynı anda dosetaksel+ABS kombinasyonunda yine 1/16LD_{50}'ye denk gelen değerlerde çok kuvvetli sinerjizm göstermiş olup, bu dozların kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi %25,27 oranında saptanmış (Şekil 36) ve CI değeri 0.04412 olarak hesaplanmıştır (Tablo 15).

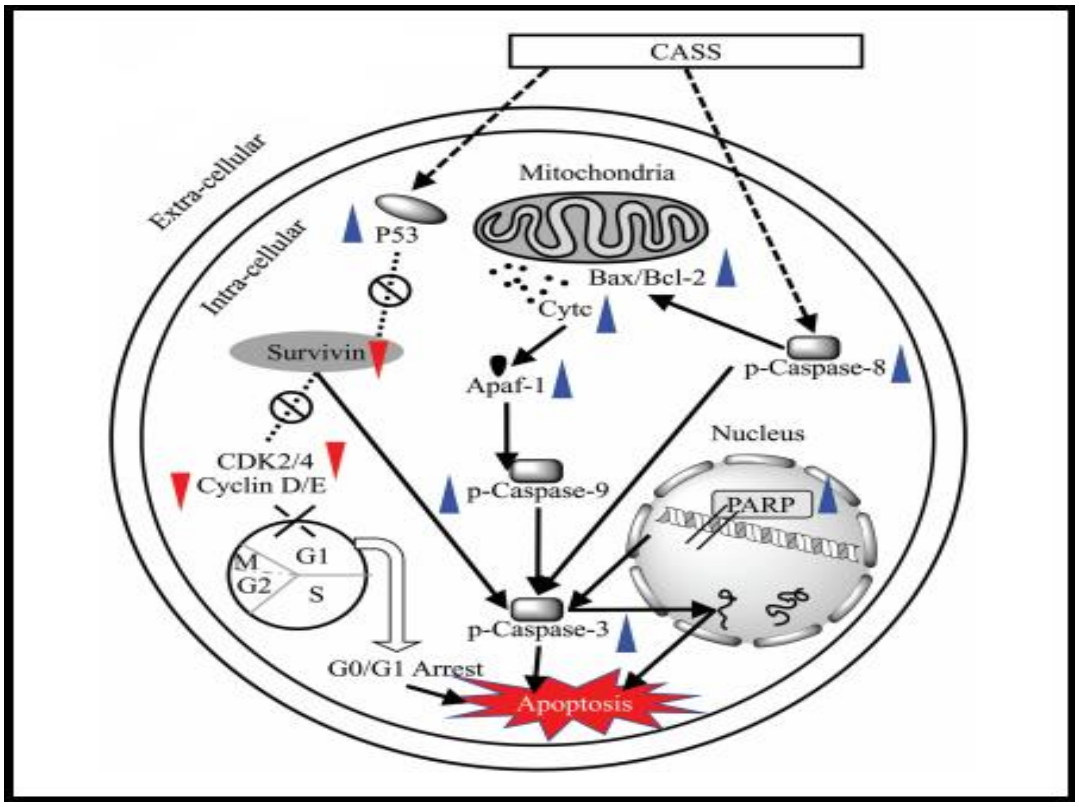
MTT sonuçlarına göre; yukarıda belirtilen doz gruplarının en etkili sonuçları verdikleri ve en iyi sinerjistik etkiye sahip olan gruplar olup, önce ABS'nin sonra ilaçların, önce ilaçların sonra ABS'nin ve aynı anda ABS+ilaçlar şeklinde yapılan kombinasyonlardan tek başına yapılan uygulamalara göre çok daha etkili sonuçlar alındığı gösterilmiştir. MTT sonuçları sonucunda; CompuSyn programından çıkan verilere göre CI değerleri baz alınarak kombinasyonlarda en kuvvetli sinerjizmin görüldüğü değerler dikkate alındığında, gen ifadesi üzerinde yaptığımız deneylerden elde edilen sonuçlar ile anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır.

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, mutasyon, DNA hasarı veya anormal çoğalma gösteren hücreleri uzaklaştıran önemli bir hücresel koruma mekanizmasıdır. DNA hasarı, onkogen ekspresyonları ve hipoksi gibi farklı stres türleri apoptotik sinyal yollarını indükleyebilir. Bu yolaklardaki en önemli faktörlerden biri, p53 tümör süpressör proteinidir (194). Aktivasyon üzerine, stres uyarımları ile p53, hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır ve hücrelerde ya hücre döngüsünün durması ya da apoptozis gerçekleşir. P21'den p53'e doğru olan aktivasyon, hücre döngüsünün G1 fazında durdurulması ile sonuçlanır (194). Ayrıca p53'e bağımlı apoptoz sırasında, p21'in p53'e transkripsiyonunun Myc tarafından bastırılabileceği gösterilmiştir (194). Diğer yandan, p21'in farklı stres tipleri ve çeşitli hücresel bağlamlarda apoptozu p53'den bağımsız olarak uyardığına dair kanıtları vardır (194).

Apoptozis sürecinin diğer önemli bir kontrol noktası, pro-apoptotik (Bax) ve anti-apoptotik (Bcl-2) üyelerin oranıdır. Kaspaz yolu ve mitokondriyal disfonksiyon bu kontrol noktasının akış yolunda bulunur. Bu nedenle, bu iki molekül arasındaki oranın apoptozu belirlemek için değişimlerini bulmak önemlidir (194).

Mitokondriden sitozole serbest bırakılan sitokrom c, apoptozis sürecinin yürütülmesini tetikler (195,196). Apoptozom yolağını kontrol eden önemli adımlardan biri, sitokrom c'nin salınmasıdır. Hem enerji hem de kaspazdan bağımsız olarak görülen, hızlı ve muhtemelen geri döndürülemez bir süreçtir (195). Sitokrom çekirdekte apositokrom c olarak kodlanır ve olgun protein haline gelmek için heme ile birleştiği mitokondrinin dış zarı boyunca taşınır

(195). Sitokrom c, mitokondrinin dış ve iç zarları arasındaki boşlukta bulunur. Bcl-2 ailesi üyeleri, sitokrom c salınımının düzenlenmesinde görevlidir. Bu proteinler, dış veya iç mitokondriyal membrandaki geçirgenlik porlarını etkiler ve böylece hiperpolarizasyon ve geçirgenlik geçişini indüklemiş olurlar (195). Sitozolden serbest bırakılan sitokrom-c, prokaspaz-9 ve apaf-1 kompleksi ile apoptozom molekülünü oluşturur ve kaspaz-9 aktif hale gelir. Aktif kaspaz-9'da, sırayla çeşitli hücresel proteinleri parçalayarak apoptotik sinyali yayan yürütücü kaspaz-3, -6 ve -7'yi parçalayıp aktive eder (Şekil 73) (195-197).



Şekil 73. Örnek olarak Hela hücrelerinde güçlü bir polisakarit fraksiyonunun (CASS) bir seri yolaklarla hücre döngüsü ve apoptozis üzerine nasıl etkileyeceğinin bizim etkisini araştırdığımız genlerdeki gösterimi (197)

MCF-7 hücrelerine ABS ile karboplatinin kombinasyonlarının yapıldığı uygulamada; kombine olarak yapılan uygulamanın tek başına yapılan uygulamalara göre tümör süpresör genlerden olan p53 gen ifadesinde istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirdiği görülmektedir. En etkili kombinasyon, aynı anda ABS+karboplatin uygulamasında kontrole göre 18.8 kat artış ile görülmektedir (Şekil 65). Bunu takiben tek başına ilaç uygulanması Bax ve Bcl-2 geninde önemli bir artışa sebep olmazken, ABS ve karboplatinin kombinasyon halinde uygulanması sonucu içsel apoptoz yolağı aktivatörü olan tümör süpressör gendeki

artış, anti-apoptotik protein olan Bcl-2 gen ifadesinde önemli bir artışa sebep olmazken pro-apoptotik Bax'ın ifadesinde ise kontrole göre en iyi kombinasyon artışı 3.8 kat ile gözlenmiştir (Şekil 49). Bax/Bcl-2 oranındaki bu artış, mitokondri membran potansiyelini bozarak sitozele salınacak olan sitokrom-c seviyesinin artmasına neden olur. Yine ABS ve karboplatinin kombine halinde uygulanması, ilaçların tek başına uygulanmalarına ve kontrole göre sitokrom-c gen ifadesinde bir artış göstermiştir. Salınan sitokrom c, sitozolde apaf-1 geni ve kaspaz 9 ile apoptozom molekülünü oluşturarak kaspaz kaskadını aktif hale getirir. Elimizdeki en anlamlı bulgulardan biri, içsel apoptoz yolağında kaspaz kaskadının aktivatörü olan kaspaz 9 gen ifadesinin ABS ve karboplatin uygulamalarında hem tek başına hem de kombine uygulamalardaki etkileri istatistiksel olarak çok anlamlı olmasıdır (Şekil 61). Sonuç olarak; ABS ve karboplatin kombinasyonları, apoptotik protein olan Bcl-2 hariç diğer genlerin hepsinde istatistiksel olarak, anlamlı bir artış göstermiştir. Tali görüntü tabanlı sitometri sonuçlarına baktığımızda ABS ve karboplatinin tek başına ve kombine uygulamalarında kontrole göre içsel apoptoz yolağını indüklediği ancak tek başına apoptoza götürme oranlarının kombine uygulamalara göre daha yüksek bir artış göstermesi, kombinasyon uygulamalarının tek başına uygulamalara göre hücrede daha çok sitotoksik etkiyi arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Buna göre ABS'nin MCF-7 hücrelerinde karboplatin ile kombine edilmesi sonucunda karboplatinin, ABS'nin apoptotik etkinliğini azalttığı söylenebilir. Literatürde ABS'nin ilaç kombinasyonlarıyla ilgili çalışma olmaması, kombinasyonların apoptotik etkisinin neden azaldığı yönünde daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.

Kanser hücre hatlarında karboplatinin tek başına ve farklı ajanlarla kombine edildiğinde apoptotik ölümü tetiklediği ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmakta ve bu çalışmalar bulgularımızı destekler niteliktedir. Yapılan çalışmalara bakıldığında; platin tedavisi ile yumurtalık kanseri üzerine yapılan bir çalışmada tedavi yapıldıktan sonra p53 protein agregasyonunun arttığı bulunmuştur (198). İnsan akciğer kanseri hücrelerinde Curcumin ile karboplatinin sinerjizminin apoptoz ve metastaz üzerine etkisine bakılan bir *in vitro* çalışmada; Curcumin ve karboplatin kombinasyonunun hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9'un açık bir şekilde bölünmesine yol açtığını, bunun da kombinasyon tedavisinin antiproliferatif etkisinin apoptozun indüksiyonu yoluyla sağlandığını düşündürmüş ve buna ek olarak, proapoptotik gen p53, p21 ve Bax'ın ekspresyonu Curcumin ve karboplatin kombinasyonu ile artış gösterirken, antiapoptotik gen Bcl-2 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (199).

Yapılan başka bir çalışmada; sulforafen-karboplatin kombinasyonunun insanda küçük

hücreli olmayan akciğer karsinomunda uygulandığında mitokondriyal membran potansiyelinin ve hücre döngüsünün durdurulması ile sinerjitik olarak apoptozu arttırdığı ve kombinasyon tedavisinin Bcl-2'nin ekspresyonunu inhibe ederek, Bax, sitokrom c, apoptozu indükleyici faktör, kaspaz-9 ve -3 ve bölünmüş poli ADP riboz polimerazın ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir (200).

MCF-7 hücrelerine ABS ile sisplatinin kombinasyonlarının yapıldığı uygulamada; tek başına ABS ve sisplatin uygulamasının kombine olarak yapılan uygulamalara göre tümör süpressör genlerden olan p53 gen ifadesinde istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirdiği görülmektedir. Tek başına sisplatin uygulaması, kontrole göre 11.9 kat artış ile kendini göstermektedir (Şekil 66). Bunu takiben tek başına ve kombine halinde ilaç uygulanmasında Bax (Şekil 50) ve Bcl-2 geninde önemli bir artış görülmemesine rağmen (Şekil 58), proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki dengeye bağlı olan apoptozis Bax gen ifadesinin kontrole göre daha fazla artmasıyla apoptozis lehine bozulmuştur. Bcl-2 gen ailesinde oluşan bu değişimin sonuçlarından biri membran potansiyelini bozarak sitozele sitokrom-c salınmasıdır. Sitokrom c salınımı; kontrol ve kombine uygulamalara göre tek başına sisplatin uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.0001$) (Şekil 70). Çalışmamızda p53 gen ifadesinde görüldüğü gibi apaf-1 gen ifadesindeki en önemli artışta tek başına sisplatin uygulamasında olmuştur (Şekil 54). Elimizdeki en anlamlı bulgulardan biri, sitoplazmada sitokrom c ve apaf 1'le birlikte apoptozom molekülünü oluşturarak içsel apoptoz yolağında kaspaz kaskadının aktivasyonunu sağlayan kaspaz 9 gen ifadesinde ABS ve sisplatinin hem tek başına hem de kombine halindeki olan etkileri istatistiksel olarak çok anlamlıdır ($p<0.0001$) (Şekil 62). Sonuç olarak, ABS ve sisplatin kombinasyonları proapoptotik genlerin hepsinde anlamlı bir artış göstermiştir. Tali görüntü tabanlı sitometri sonuçlarına baktığımızda; sisplatinin tek başına uygulanması ölen hücrelerin yarısını nekroza yarısını da apoptoza sürüklemiştir. ABS ile kombinasyonu sonucunda ise kombine gruplarda (aynı anda uygulanan kombinasyon hariç) nekroz oranı düşmüş ve apoptoza giren hücre artmıştır. Apoptozun indüklendiği en iyi kombinasyon kaspaz-9 gen ifadesinde, en anlamlı artış gösteren önce ABS sonra sisplatin uygulaması olup apoptozis ile uyumlu bir gen ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Her ne kadar sisplatin ABS'nin apoptotik etkinliğini azaltmış olsa da, tek başına sisplatin uygulanması yerine kombinasyon halinde uygulanmasının apoptozu arttırdığı görülmektedir.

Kanser hücre hatlarında sisplatinin tek başına ve farklı ajanlarla kombine edildiğinde apoptotik ölümü tetiklediği ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmakta ve bu çalışmalar bulgularımızı destekler niteliktedir. WP1130'un küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde

A549 ve HCC827 hücrelerinde sisplatin ile birlikte olan gen ifadesi üzerindeki etkisine bakıldığında; sisplatinin WP1130 ile birlikte uygulanmasının sisplatinin direncini zayıflattığı ve tek başına sisplatin uygulamasına göre p53 ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (201).

Melatonin, mTOR ve ERCC1 ifadelerinin düzenlenmesi yoluyla sisplatin kaynaklı HepG2 hücre ölümü üzerine etkisini araştırıldığı çalışmada, sisplatinin melatonin ile birlikte uygulanması, tek başına sisplatin uygulanmasına göre hücre canlılığını ve Bcl-2 gen ifadesini arttırdığı ve aynı zamanda Bax/Bcl-2 oranını azalttığı bulunmuştur (202).

ATM / Chk2 yolu aracılığıyla metil metansülfonat ve ultraviyole duyarlı gen klonu 81'in feedback regülasyonunun MCF-7 hücreleri üzerinde sisplatine direncine katkısının araştırıldığı çalışmada; MCF-7 hücrelerinde sisplatinin apoptoz etkinliği kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ve MCF-7 hücrelerinde sisplatinin hücre canlılığı oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Sonuçlar, sisplatinin hücre apoptozunu etkili bir şekilde uyarabildiğini ve hücre canlılığını doz bağımlı bir şekilde inhibe edebildiğini göstermiştir (203).

Sildenafilin apoptozu indükleyerek, proliferasyon ve anjiyogenezin inhibisyonu ile sisplatinin antitümör aktivitesine katkısı üzerine yapılan çalışmada; Sildenafil ve sisplatin tedavisi, tümör hacminde kontrol grubuna kıyasla belirgin bir düşüş göstermiş ve sisplatin ile sildenafil kombinasyon halinde uygulandığında tek başlarına ve kontrol grubuna kıyasla tümör hacminde daha fazla düşme göstermişlerdir (204).

Berberinin sisplatin ile kombinasyon halinde DNA kopmaları ve kaspaz-3 bağımlı apoptozun indüksiyonu yoluyla meme kanserinde hücre büyümesinin araştırıldığı çalışmada; berberin MCF-7 hücrelerini zamana ve doza bağımlı olarak sisplatine duyarlı hale getirmiş ve kombine olarak uygulanmalarından sonra hücresel pro-apoptotik kaspaz-3 ve bölünmüş kaspaz-3 ile kaspaz-9 gen ifadeleri artmış ve anti-apoptotik Bcl-2 gen ifadesi azalmıştır (205).

Hypericum perforatum'un biyoaktif bileşeni olan hiperisinin MCF-7 hücre dizisi üzerindeki sitotoksik ve apoptojenik etkisinin araştırıldığı çalışmada; hiperisinin etkisi sisplatin ile beraber değerlendirilmiş ve her ikisi de hücrelere uygulandıktan sonra apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olduğu ve p53 seviyesini arttırırken Bcl-2 ekspresyon seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (206).

İnsan meme kanserinin MCF-7 hücrelerinde proliferasyon, apoptoz ve epitelyal mezenşimal geçiş üzerine sisplatin ile birlikte ginsenosid bileşiği K'nın etkilerinin araştırıldığı çalışmada; birlikte kombinasyonlarının tek yapılan uygulamalarına göre, apoptozis oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur (207).

MCF-7 hücrelerine ABS ile doksorubisinin kombinasyonlarının yapıldığı

uygulamada; kombine olarak yapılan uygulamanın tek başına yapılan uygulamalara göre p53 gen ifadesinde istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirdiği görülmektedir. En etkili kombinasyon, aynı anda ABS+doksorubisin uygulamasında kontrole göre 7.8 kat artış ile görülmüştür (Şekil 67). Bunu takiben, Bcl-2 familyası proteinleri intrinsik yolda çok önemli rol oynamaktadır. Bcl-2 ailesinin üyeleri, antiapoptotik ve proapoptotik olmak üzere iki gruba ayrılır. ABS ve doksorubisin uygulamasında, ilaçların kombine halinde uygulamalarının yapıldığı durumlarda hem Bax (Şekil 51) hem de Bcl-2 gen ifadesinde artış gözlenmiştir (Şekil 59). İki gende görülen bu artış, Bax/Bcl-2 oranını apoptoz inhibisyonu yönünde bozup, mitokondiriyal apoptoz yolağını baskılayabilir. Ancak bütün ilaç kombinasyonlarında olduğu gibi, çalışmamızdaki en anlamlı bulgulardan biri, kaspaz 9 gen ifadesinde görülmektedir. ABS ve doksorubisinin uygulamalarında, hem tek başına hem de kombine etkileri istatistiksel olarak çok anlamlıdır (Şekil 63). En önemli artış, aynı anda ABS+doksorubisin uygulamasında 54.9 kat artış ile görülmektedir. Sonuç olarak; ABS ve doksorubisin kombinasyonları en etkili olarak proapoptotik olan p53 ve kaspaz kaskadının başlatıcısı olarak görülen kaspaz 9'da istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiş ve genlerdeki bu artış Tali görüntü tabanlı sitometre testi sonuçları ile paralellik göstermiş olup (aynı anda uygulanan kombinasyon hariç), tek başına doksorubisin uygulamasına göre apoptotik hücre oranı artmış ve mitokondiriyal apoptoz yolağını indükleyerek, hücreyi apoptoza götürebilme yolunda etkili bir sonuç vermiştir.

Kanser hücre hatlarında doksorubisinin tek başına ve farklı ajanlarla kombine edildiğinde, apoptotik ölümü tetiklediği ile ilgili birçok çalışma bulunmakta ve bu çalışmalar bulgularımızı destekler niteliktedir. Luteolinin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde doksorubisin ile olan etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmada; doksorubisinin luteolin ile olan kombinasyonunun tek başına olan uygulamasına göre hücre canlılığını ve Bcl-2 gen ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur (208).

Anti-apoptotik survivin geninin vahşi tip p53 tarafından transkripsiyonel baskılanmasının araştırıldığı bir çalışmada, MCF-7 hücrelerine doksorubisinle tedavi uygulandıktan sonra p53 geninde artış gözlenmiştir (209).

Yapılan başka bir çalışmada; üzüm çekirdeği ekstraktı ve konvansiyonel sitotoksik ajan doksorubisinin insan meme karsinom hücrelerine karşı sinerjistik antikanser etkilerinin araştırıldığı durumda, üzüm çekirdeği ektstratı ve doksorubisinin tek başına uygulanması yerine kombinasyon halinde uygulanmasının, hücredeki apoptoz oranını arttırdığı bulunmuştur (189).

MCF-7 hücrelerine ABS ile dosetakselin kombinasyonlarının yapıldığı uygulamada;

ABS ve dosetakselin p53 genindeki kombine halinde uygulamaları, kontrol grubuna göre bir artışa sahip olsa da en iyi artış, tek başına ABS uygulamasında görülmüştür (Şekil 68). Kombine olan uygulamalarda hücre apoptozise doğru yöneldiyse bunun sebebi, apoptotik sinyal yolaklarının en önemlilerinden biri p53 tümör süpresör proteini olmasına rağmen p21'in p53'den bağımsız olarak farklı stres tipleri ve çeşitli hücresel bağlamlarda hücreyi apoptoza yönlendirmesi olabilir. Bunu takiben tek başına ve kombine halinde ilaç uygulanmasında, önce dosetaksel sonra ABS uygulaması hariç Bax (Şekil 52) ve Bcl-2 geninde önemli bir artış görülmemesine rağmen (Şekil 60), proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki dengeye bağlı olan apoptozis, yalnızca önce dosetaksel sonra ABS uygulamasında Bax gen ifadesinin kontrole göre daha fazla artmasıyla, apoptozis lehine bozulmuştur. Apoptozise giden yolda, içsel yolaktaki diğer gen sitokrom c'dir. Sitokrom c'nin sitozole salınmasıyla, apaf 1 ve kaspaz 9 ile birlikte apoptozom molekülünü oluştururlar. ABS ve dosataksel kombinasyonlarında, sitokrom c ve apaf 1 gen ifadesinde kontrole göre bir artış gözlenmiştir (Şekil 56). Çalışmamızdaki en anlamlı bulgulardan biri, kaspaz kaskadının aktivasyonunu sağlayan kaspaz 9 gen ifadesinde, ABS ve dosetakselin hem tek başına hem de kombine halindeki olan etkileri istatistiksel olarak çok anlamlıdır (Şekil 64). Bu gen ifadesinde kontrole göre 23.7 kat ile en önemli artış önce ABS sonra dosetaksel uygulamasında gözlenmiştir ($p<0.0001$). Sonuç olarak, ABS ve dosetaksel kombinasyonları proapoptotik ve antiapoptotik genlerde bir artış göstermiş, istatistiksel olarak en önemli artışta kaspaz 9 gen ifadesinde meydana gelmiştir. Tali görüntü tabanlı sitometri sonuçlarına baktığımızda, tek başına dosetaksel uygulamasının kontrolden sonra en çok canlı hücreye sahip grup olduğu görülmektedir. Bu da, uygulanan tedavi ile apoptoza gitmesini istediğimiz kanserli hücrenin ilaca direnç geliştirmesiyle hücrenin apoptoza gitmeyip çoğalmaya devam etmesi yönünde seyreder (210). Tek başına dosetaksel uygulamalarında canlı hücre sayısı azalırken, hem nekroza hemde apoptoza giden hücre sayısı artmıştır. Bu durum baz alınarak, dosetakselin ABS'nin etkinliğini baskıladığı ve tek başına dosetaksel uygulanması yerine kombinasyon halinde uygulamanın daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Önce dosetaksel sonra ABS uygulaması apoptoza götüren en etkili kombinasyon olurken, Bax gen ifadesinde gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı gen artışıylada uyumludur. Buna göre, ABS'nin MCF-7 hücrelerinde tek başına dosetaksel yerine kombine halinde uygulanmasının apoptotik etkinliğini arttırdığı söylenebilir.

Kanser hücre hatlarında dosetakselin, tek başına ve farklı ajanlarla kombine edildiğinde apoptotik ölümü tetiklediği ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmakta ve bu çalışmalar bulgularımızı destekler niteliktedir. İnsan meme kanserlerinde dosetaksel tedavisi

için öngörülen faktörlerle ilgili yapılan çalışmalarda Bcl-2 ekspresyonu ile dosetaksel uygulanması arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (211,212).

Bazı yolaklar aracılığıyla resveratrol ve dosetaksel kombinasyonunun hücre döngüsünün durması ve apoptozis üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada; kombine ilaç tedavisinin C4-2B hücrelerinde p53 düzeyini arttırdığı, P53 yolağının aktivasyonu üzerine, pro-apoptotik protein olan Bax arterken, anti-apoptotik protein olan Bcl-2 azalmıştır. Bununla birlikte DU145 hücrelerinde, kombine tedavinin etkisi p53'ün aktivasyonuna yansımamış ancak Bax gen ifadesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (213).

Aşırı duyarlı MDA-MB-435 ve yüksek dirençli NCI-ADR-RES insan meme kanseri hücrelerinde paklitaksel ve dosetakselin hücre ölümü üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada; her iki hücre tipinin taksellerle tedavisinde p53 geninde önemli bir değişim olmazken, kaspaz 9 gen ifadesi artmıştır. Sitokrom c ise dirençli NCI-ADR-RES hücrelerinde sitozele serbest bırakılırken, duyarlı MDA-MB-435 hücrelerinde mitokodride kaldığı bulunmuştur (214).

MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan bitkisel kaynaklı bir çalışmada; *Artocarpus communis*' in yapısında yer alan bir flavonoid olan Artonin E'nin, bu hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. MCF-7 hücreleri Artonin E ile tedavi edildikten sonra, kaspaz 9 aktivitesi doza bağlı olarak belirgin şekilde artmıştır. Yine aynı çalışmada, MCF-7 hücrelerinde apoptozis ve hücre döngüsündeki genlerin ekspresyonundaki değişiklik mRNA seviyesinde belirlenmiş ve Bcl-2 geninde azalma gözlenirken, sitokrom c, Bax ve p21 genlerindeyse anlamlı olarak artış olduğu bulunmuştur. Bu genlerde artışın oluşması Artonin E'nin mitokondriyal yolla MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediğinin kanıtıdır (215).

Ankaferd Blood Stopper ile yapılan ve insan lösemi hücrelerinde apoptoz ve PAR1 ile EPCR ekspresyonunun araştırıldığı çalışmada; Bcl-2 ve Bax ekspresyonu sonuçları, ABS tedavisiyle ilgili herhangi bir değişiklik göstermemiş, apoptoz uyarımında uygulamanın konsantrasyonuna ve süresine bağlı olarak, PAR1'i ve p53'ten bağımsız p21'in düzenlenmesiyle ABS'nin farklı derecelerde apoptoz indüksiyonundan sorumlu olduğunu ortaya koymuşlardır (193).

Sonuç olarak, Tali görüntü tabanlı sitometride MCF-7 hücrelerinde genel olarak kombinasyon tedavisinin (önce ABS sonra karboplatin kombinasyonu hariç) hücre canlılığını arttırdığı ve birlikte kombinasyonların ABS'nin etkinliğini azalttığı görülmüştür. Ancak bu etki, gen ekspresyonu çalışmasında kombinasyonların hücre canlılığını azalttığı yönünde gözlenmiştir. Bu durum da birlikte kombinasyon uygulamalarının daha çok sitotoksik etkiyi arttırdığı, apoptozda ise çok belirgin artışların olmadığı gözlenmiştir. Kombine edilecek her

iki ilacın dozları, verilme zamanı, düzeyi ve tedavi aralıkları gibi kombinasyon koşullarının farklı olması, farklı derecelerde aditif / sinerjitik etkilerinin görülmesine neden olabilir.

Çalışmamız; insan meme kanser modeli olan MCF-7 hücreleri üzerine, ABS'nin tek ve konvensiyonel ilaçlarla birlikte kombine halinde uygulamasının yapıldığı ilk çalışmadır. Literatürde ABS'nin başka maddeler ile kombine halinde verildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışma sonuçları çok değerlidir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler; ABS'nin *in vitro* antikanser aktivitesinin varlığının belirlenmesi ve konvansiyonel antikanser ilaçlarla etkileşimininin in vivo çalışmalar ile de desteklendiği takdirde, meme kanseri tedavisine kullanılabileceğini düşündürtmektedir.

SONUÇLAR

Bu çalışma, Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (TÜTAGEM) gerçekleştirilmiştir. Ankaferd Bloodstopper kanama durdurucunun *in vitro* meme kanseri hücrelerinin çoğalmaları üzerine olan etkisinin, kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyonunun araştırılması amaçlanan bu çalışma sonucunda;

1) MTT testi yapılan MCF-7 hücrelerinde; ABS, karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakselin doza bağlı hücre canlılığını azalttığı saptandı.

2) MTT testi yapılan MCF-7 hücrelerinde; ABS'nin karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel ile olan kombinasyonlarının, doza bağlı hücre canlılığını azalttığı saptandı.

3) MCF-7 hücrelerinde; ABS'nin karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel ile olan kombinasyonlarının, tedavi sonucunda p53 gen ifadesini anlamlı olarak arttırdığı saptandı.

4) MCF-7 hücrelerinde; ABS'nin karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel ile olan kombinasyonlarının, tedavi sonucunda Bax gen ifadesini anlamlı olarak arttırdığı saptandı.

5) MCF-7 hücrelerinde; ABS'nin karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel ile olan kombinasyonlarının, tedavi sonucunda Bcl-2 gen ifadesinde bir artış gözlendi.

6) MCF-7 hücrelerinde; ABS'nin karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel ile olan kombinasyonlarının, tedavi sonucunda Apaf-1 gen ifadesinde bir artış gözlendi.

7) MCF-7 hücrelerinde; ABS'nin karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel ile olan kombinasyonlarının, tedavi sonucunda Sitokrom-c gen ifadesinde bir artış gözlendi.

8) MCF-7 hücrelerinde; ABS'nin karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel ile olan kombinasyonlarının, tedavi sonucunda Kaspaz-9 gen ifadesini anlamlı olarak arttırdığı saptandı.

9) MCF-7 hücrelerinde; ABS'nin karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetaksel ile olan kombinasyonlarının, tedavi sonucunda Tali görüntü tabanlı sitometri sonucunda tek başlarına olan tedaviden daha etkili olduğu saptandı.

10) MCF-7 hücrelerinde; ABS'nin Tali görüntü tabanlı sitometri sonucunda, hücreyi apoptoza götüren en etkili madde olduğu vurgulanmıştır.

ÖZET

Dünya genelinde meme kanseri, kadınlarda görülen kanser tipleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Tedavisinde, tek bir ilaç yerine çoklu ilaç kombinasyonlarının kullanımının daha etkili olduğu yapılan bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ankaferd Bloodstoper (ABS)'in oluşumunda yer alan bitkilerin antikanser etkisi, yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir. Meme kanserinin tedavisinde kullanılan ilaçlardan bazıları; karboplatin, sisplatin, doksorubisin ve dosetakseldir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın amacı, öncelikle ABS'nin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde, hücre canlılığı üzerindeki etkisini *in vitro* olarak değerlendirmektir. Sonrasında, ABS'nin rutin olarak klinikte kullanılan belirlediğimiz kemoteröpatik ilaçlarla kombinasyonlarının, hücre canlılığı üzerine etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmalarımız, ABS'nin kültür ortamına eklenmesinin hücre canlılığını doz bağımlı bir şekilde azalttığını göstermiştir. MCF-7 hücreleriyle yaptığımız MTT testi sonuçlarından elde ettiğimiz verilere göre; kemoteröpatik ilaçların ABS ile birlikte uygulanması, kümülatif bir etki göstererek hücre canlılığını ayrı ayrı uygulamalarına göre daha çok azaltmıştır. ABS'nin bu ilaçlarla kombinasyonunun mitokondiriyal yolaktaki genler üzerine etkisi araştırılmış ve ayrı ayrı uygulamalarına göre kombinasyonların Bax, P53 ve Kaspaz-9 gen ifadelerini istatistiksel olarak arttırdığı saptanmıştır. Tali görüntü tabanlı sitometri analizinin sonucunda, ABS'nin apoptotik etkisinin, bu çalışmada kullanılan konvansiyonel ilaçlara kıyasla üstün olduğu gözlenmiş ve kemoterapötik ilaçların tek başına kullanılması yerine, ABS ile kombinasyonları gen ifadesi üzerindeki etkiyi arttırmıştır. Ancak, şu anda kliniktede kullanılan bu antikanser kemoterapötiklerinin kombinasyonu, ABS'nin apoptotik etkisini azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: ABS, meme kanseri, MCF-7, ilaç kombinasyonu

THE EFFECT OF ANKAFERD BLOODSTOPER ON İN VİTRO PROLİFERATİON OF BREAST CANCER CELLS

SUMMARY

Breast cancer is the leading cancer type seen diagnosed among women in worldwide. Using combination of multiple drugs instead of single drug for treatment has been proven to be more affective by various studies. Anticancer activity of each individual herbal constituent of Ankaferd Bloodstoper (ABS) has been shown in many reports. Some of the drugs used in the treatment of breast cancer are carboplatin, cisplatin, doxorubicin and docetaxel. In this study, our primer aim was to assess the *in vitro* cell viability reducing effect of ABS on MCF-7 human breast cancer cells. Our second aim was yo evaluate the afficiacy of combinations of ABS with conventional chemotherapeutic drugs, which are routinely used clinically, based on *in vitro* cellular viability. Our studies indicated that ABS addition to culture medium results in decreased cell viability in a dose-dependent fashion. According to the our results obtained from MTT test using MCF-7 cells, co-administration of chemothrapeutic drugs with ABS showed various levels of synergistic anticancer activities when compared with individual treatments. In our studies, combination of ABS with these drugs showed an effect on the apoptotic mitochondrial pathway genes and it has been found that the combinations statistically increase Bax, P53 and Caspase-9 gene expressions of MCF-7human breast cancer cells. Our result of Tali image based cytometry analysis showed that the apoptotic effect of ABS was superior comparing the conventional drugs used in this study. Combination of these currently clinically used anticancer chemotherapeutics blunted the apoptotic effect of ABS.

Key Words: ABS, breast cancer, MCF-7, drug combination

KAYNAKLAR

1. Xiao W, Meng-Yao W, Min J, Qiaoming Z, Xiaojie B, Meng-Dan X, et al. TNF-α sensitizes chemotherapy and radiotherapy against breast cancer cells. Cancer Cell Int (2017);17:13.

2. Sandoo A, Kitas GD, Carmichael AR. Breast cancer therapy and cardiovas- cular risk: focus on trastuzumab. Vasc Health Risk Manag 2015;11:223–8.

3. Lian L, Li W, Li ZY, Mao YX, Zhang YT, Zhao YM, et al. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell-induced platelet aggregation using a combination of antiplatelet drugs. Oncol Lett 2013;5(2):675–80.

4. Li W, Liang RR, Zhou C, Wu MY, Lian L, Yuan GF, et al. The association between expressions of Ras and CD68 in the angiogenesis of breast cancers. Cancer Cell Int 2015;15(1):17.

5. Shou LM, Zhang QY, Li W, Xie X, Chen K, Lian L, et al. Cantharidin and norcantharidin inhibit the ability of MCF-7 cells to adhere to platelets via protein kinase C pathway-dependent downregulation of alpha2 integrin. Oncol Rep 2013;30(3):1059–66.

6. Majeed W, Aslam B, Javed I, Khaliq T, Muhammad F, Ali A,et al. Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment. Asian Pacific J Cancer Prev 2014;15(8):3353–8.

7. Li Y, Wang J, Lin F, Yang Y, Chen SS. A Methodology for Cancer Therapeutics by Systems Pharmacology-Based Analysis: A Case Study on Breast Cancer-Related Traditional Chinese Medicines. PLoS One 2017;Jan 9;12(1):e0169363.

8. Redeker NS, Lev EL, Ruggiero J. Insomnia, fatigue, anxiety, depression, and quality of life of cancer patients undergoing chemotherapy. Sch Inq Nurs Pract 2000;14(4):275-90; discussion 291-8.

9. Song HM, Park GH, Koo JS, Jeong HJ, Jeong JB. Vitex rotundifolia Fruit Extract Induces Apoptosis Through the Downregulation of ATF3-Mediated Bcl-2 Expression in Human Colorectal Cancer Cells. Am J Chin Med 2017;3:1-15.

10. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. Int J Cell Biol 2010;2010:214074.

11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011:4;144(5):646-74

12. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res 2011;30:87.

13. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. CA Cancer J Clin 2005;55:178-194

14. myweb.sabanciuniv.edu/dgozuacik

15. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell 2004, 116(2):205-219.

16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70.

17. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev 1999;13:1899-1911.

18. Xu H, Zhao X, Liu X, Xu P, Zhang K, Lin X. Antitumor effects of traditional Chinese medicine targeting the cellular apoptotic pathway. Drug Des Devel Ther 2015;9:2735-44.

19. Beyazit Y, Kurt M, Kekilli M, Goker H, Haznedaroglu IC. Evaluation of hemostatic effects of Ankaferd as an alternative medicine. Altern Med Rev 2010;15:329-36.

20. 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;15:46.

21. Liu T, Liu X, Li W. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy. Oncotarget 2016;7(26):40800-15.

22. Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. Front Pharmacol 2013:14;4:28.

23. Pythoud C, Rothenberger S, Martinez-Sobrido L, de la Torre JC, Kunz S. Lymphocytic choriomeningitis virus differentially affects virus-induced type I IFN response and mitochondrial apoptosis mediated by RIG-I/MAVS. J Virol 2015;89:6240-50.

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

25. Yang G, Li X, Lin X, Wang L, Li J, Song X, et al. Traditional chinese medicine in cancer care: a review of case series published in the chinese literature. Evid Based Complement Alternat Med 2012;2012:751046.

26. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. Front Bioeng Biotechnol 2016 Feb;12;4:12.

27. Doğan AL, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. Hacettepe Tıp Dergisi 2004;35:34-42.

28. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature 2001;411:355-65.

29. Asirvatham AJ, Magner WJ, Tomasi TB. miRNA regulation of cytokine genes. Cytokine 2009;45(2):58-69.

30. Koletsas N, Koletsa T, Choidas S, Anagnostopoulos K, Touloupidis S, Zaramboukas T, et al. Immunohistochemical Investigation of HER/AKT/mTOR Pathway and Cellular Adhesion Molecules in Urothelial Carcinomas. Patholog Res Int 2017;2017:6794150.

31. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. Endocr Relat Cancer 2001;8:11-31.

32. Ejskjaer K, Sørensen BS, Poulsen SS, Forman A, Nexø E, Mogensen O. Expression of the epidermal growth factor system in endometrioid endometrial cancer. Gynecol Oncol 2007;104:158-167.

33. Knight T, Irving JA. Ras/Raf/MEK/ERK pathway activation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic targeting. Front Oncol 2014;4:160.

34. Cseh B, Doma E, Baccarini M. "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. FEBS Lett 2014;588:2398-2406.

35. https://www.biooncology.com/pathways/mapk.html

36. Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Bäsecke J, et al. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. Leukemia 2011;25:1080-94.

37. Shepherd C, Puzanov I, Sosman JA. B-RAF inhibitors: an evolving role in the therapy of malignant melanoma. Curr Oncol Rep 2010;12:146-52.

38. Çoban ZD, Güran Ş. Hücre içi sinyal iletimi mekanizmalarının kanser tanı ve tedavisindeki rolü. Cumhuriyet Tıp Derg 2013;35: 302-310.

39. Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). Int J Oncol 2003;22(3):469-80.

40. Hatashita M, Taniguchi M, Baba K, Koshiba K, Sato T, Jujo Y, et al. Sinodielide A exerts thermosensitizing effects and induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in DU145 human prostate cancer cells via the Ras/Raf/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. Int J Mol Med 2014:Feb;33(2):406-14.

41. Clark GJ, Der CJ. Ras proto-oncogene activation in human malignancy. Cellular Cancer Markers, Totowa, NJ, Humana Press 1995;17-52.

42. Martinelli E, Morgillo F, Troiani T, Ciardiello F. Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK. Cancer Treat Rev. 2017;53:61-69.

43. http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855

44. http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_of_death_statistics

45. http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/108-t%C3%BCrkiyede-kanser-kayitcigi.html

46. Wu X, Ye Y, Barcenas CH, Chow WH, Meng QH, Chavez-MacGregor M,et al. Personalized Prognostic Prediction Models for Breast Cancer Recurrence and Survival Incorporating Multidimensional Data. J Natl Cancer Inst 2017;109(7).

47. WHO, Dünya Kanser Raporu 2008. (Ed.). P. Boyle, B. Levin, Lyon 2008.

48. Natalia B, Sonja H, Thilo D. Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle. Hered Cancer Clin Pract 2013;11,12.

49. Emens LA, Jaffee EM. Leveraging the activity of therapeutic cancer vaccines with cytotoxic chemotherapy. Cancer Res 2005;65,8059-64.

50. Aydıntuğ S. Meme kanserinde erken tanı. Sted 2004;13(6):226-228.

51. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-57.

52. Jaafar H, Abdullah S, Murtey MD, Idris FM. Expression of Bax and Bcl-2 in tumour cells and blood vessels of breast cancer and their association with angiogenesis and hormonal receptors. Asian Pac J Cancer Prev 2012;13(8):3857-62.

53. Sarvothaman S, Undi RB, Pasupuleti SR, Gutti U, Gutti RK. Apoptosis: role in myeloid cell development. Blood research 2015;50(2),73-79.

54. Monteiro MEL, Xavier AR, Azeredo VB. Diet and liver apoptosis in rats: a particular metabolic pathway. Nutr Hosp 2017;34(2):463-468.

55. Cieply B, Carstens RP. Functional roles of alternative splicing factors in human disease. Wiley Interdiscip Rev RNA 2015:May-Jun;6(3):311-26.

56. Liu, Ting, Xin Liu, Wenhua Li. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy. Prostate 35 2016;36.

57. Kumar M, Kaur V, Kumar S, Kaur S.. Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer. Cytotechnology 2016;68(4):531-63.

58. Nancy A, Lazebnik T, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998; 281(5381):1312-1316.

59. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5(6).

60. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nature reviews Cancer 2002;2:277-288.

61. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. International journal of molecular sciences 2015;16:2942-2955.

62. Schrader K, Huai J, Jöckel L, Oberle C, Borner C. Non-caspase proteases: triggers or amplifiers of apoptosis? Cell Mol Life Sci 2010;67:1607-8.

63. Alayev A, Salamon RS, Sun Y, Schwartz NS, Li C, Yu JJ et al. The combination of rapamycin and resveratrol causes apoptosis and reduces growth of TSC2-deficient xenograft tumors. Am J Respir Cell Mol Biol 2015;6:36-42.

64. Bhardwaj A, Aggarwal BB. Receptor-mediated choreography oflife and death. J Clin Immunol 2003;23:317-32.

65. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci 1997;22:299-306

66. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. Oncogene 2003;22:8543-67.

67. Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. J Exp Med 2001;193:247-54.

68. Allombert-Blaise C, Tamiji S, Mortier L, Fauvel H, Tual M, Delaporte E, et al. Terminal differentiation of human epidermal keratinocytes involves mitochondriaand caspase-dependent cell death pathway. Cell Death Differ 2003;10:850-2.

69. Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. Proc Natl Acad Sci 2002;99:11025-30.

70. Wride MA. Lens fibre cell differentiation and organelle loss: many paths lead to clarity. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2011;366:1219-33.

71. Sordet O, Rébé C, Plenchette S, Zermati Y, Hermine O, Vainchenker W, et al. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. Blood 2002;100:4446-53.

72. Jain M, Sowmya K, Sridhara SU, Jain N, Khan S, Desai A. Apoptosis and its significance in oral diseases: An update. J Oral Dis 2013:1–11.

73. Korkmaz Ş. Mda-Mb-231 Ve Mcf-7 Insan Meme Kanseri Hücre Soylarinda Zeytin Yapraği Ekstresinin Anti-Kanser Ilaçlarla Kombinasyonunun Araştırılması (tez). Bursa: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2012.

74. Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer: Apoptosis in immune-mediated diseases. Asian Pac J Cancer Prev 2012;13:4873–8.

75. Soubrane C, Mouawad R, Antoine EC, Verola O, Gil-Delgado M, Khayat D. A comparative study of Fas and Fas-ligand expression during melanoma progression. Br J Dermatol 2000;143(2):307-12.

76. Fan Y, Yang F, Cao X, Chen C, Zhang X, Zhang X, et al. Gab1 regulates SDF-1-induced progression via inhibition of apoptosis pathway induced by PI3K/AKT/Bcl-2/BAX pathway in human chondrosarcoma. Tumour Biol 2016;37(1):1141-9.

77. Annamalai P, Thayman M, Rajan S, Raman L S, Ramasubbu S, Perumal P. Ethyl acetate extract from marine sponge Hyattella cribriformis exhibit potent anticancer activity by promoting tubulin polymerization as evidenced mitotic arrest and induction of apoptosis. Pharmacogn Mag 2015;11:345-55.

78. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. Oncogene 2008;27(Suppl 1):S2-19.

79. Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks. Blood Res 2015;50:73-9.

80. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. Cancer Res 1993;53:4701-14.

81. Papadopoulos EI, Yousef GM, Scorilas A. Gemcitabine impacts differentially on bladder and kidney cancer cells: distinct modulations in the expression patterns of apoptosis-related microRNAs and BCL2 family genes. Tumour Biol 2015;36:3197-207.

82. Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. Biochemical Journal 2015;469(3):325-346

83. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. Asian Pac J Cancer Prev 2015;16:2129-44.

84. Wang JH, Zhou WW, Cheng ST, Liu BX, Liu FR,Song JQ. Downregulation of Sprouty homolog 2 by microRNA-21 inhibits proliferation, metastasis and invasion, however promotes the apoptosis of multiple myeloma cells. Mol Med Rep 2015;12:1810-6.

85. http://www.abcam.com/tag/biochemicals

86. Aktuğ H. Apoptozis ve hücre döngüsü. Ege Tıp Derg 2014;53(1):60-64.

87. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: A mini review. Clin Pract 2004;58(12):1134-41.

88. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. Cancer Res 2000;60(14):3698-95.

89. Senderowicz AM, Sausville EA. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. J Natl Cancer Inst 2000;92(5):376-87

90. Hu B, Wang SS, Du Q. Traditional Chinese medicine for prevention and treatment of hepatocarcinoma: From bench to bedside. World journal of hepatology 2015;7(9), 1209.

91. Maryam Esmaeilbeig, Seyed Amin Kouhpayeh, Zahra Amirghofran. An Investigation of the Growth Inhibitory Capacity of Several Medicinal Plants From Iran on Tumor Cell Lines. Iran J Cancer Prev 2015;8(5):e4032.

92. Dickson MA, Schwartz GK. Development of cell cycle inhibitors for cancer therapy. Curr Oncol 2009;16:36–43.

93. Adhami VM, Aziz MH, Reagan-Shaw SR, Nihl M, Mukhtar H, Ahmad N. Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. Mol Cancer Ther 2004;3:933–40.

94. Kögel D, Fulda S, Mittelbronn M. Therapeutic exploitation of apoptosis and autophagy for glioblastoma. Anticancer Agents Med Chem 2010;10:438–49

95. Gao S, Li X, Ding X, Qi W, Yang Q. Cepharanthine Induces Autophagy, Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells. Cell Physiol Biochem. 2017;41(4):1633-48.

96. Demiralp DO, Haznedaroglu IC, Akar N. Functional proteomic analysis of Ankaferd Blood Stopper. Turk J Hematol 2010;27(2):70–7.

97. Haznedaroglu BZ, Beyazit Y, Walker SL, Haznedaroglu IC. Pleiotropic cellular, hemostatic, and biological actions of Ankaferd hemostat. Crit Rev Oncol Hematol 2012;83(1):21–34.

98. Haznedaroglu BZ, Haznedaroglu IC, Walker SL, Bilgili H, Goker H, Kosar A et al. Ultrastructural and morphological analyses of the in vitro and in vivo hemostatic effects of Ankaferd Blood Stopper. Clin Appl Thromb Hemost 2010;16:446-53.

99. Haznedaroglu IC. Molecular basis of the pleiotropic effects of Ankaferd Blood Stopper. IUBMB Life 2009;61:290.

100. Joshi SS, Benner EJ, Balmoori J, Bachi D. Amelioration of cytotoxic effects of idarubicin and 4HC on chang liver cells by a novelgrape seed proanthocyanidin extract Faseb J 1998:12(5);A774.

101. 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. J Int Med Res 2008;36:163-70.

102. Ray SD, Kumar MA, Bagchi D. A novel proanthocyanidin IH636 Grape Seed extract increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in Mouse liver. Arch Biochem Biophys 1999:369(1);42-58.

103. Nirmala JG, Narendhirakannan RT. Vitis vinifera peel and seed gold nanoparticles exhibit chemopreventive potential, antioxidant activity and induce apoptosis through mutant p53, Bcl-2 and pan cytokeratin down-regulation in experimental animals. Biomed Pharmacother 2017;89:902-17.

104. El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hathout AS, Hassan NS, Aly SE, Abdel-Wahhab MS. Antioxidant properties of Thymus vulgaris oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. Toxicol 2011;57:984–91.

105. Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between Thymus vulgaris and Pimpinella anisum essential oils and methanol extracts. J Ethnopharmacol 2008;116(3):403-6

106. Amirghofran A, Karimi MH. Cytotoxicity of Thymus vulgaris, Achillea millefolium and Thuja orientalis on growing cell lines. Mjırı 2001;15:149–54.

107. Lee SJ, Umano K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (Ocimum basilicum L.) and thyme leaves (Thymus vulgaris L.) and their antioxidant properties. Food Chem 2005;91:131–137.

108. Sheela ML, Ramakrishna, MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by Glycyrrhiza glabra. Int Immunopharmacol 2006;6:494

109. Francischetti IM, Monteiro RQ, Guimarães JA. Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibititor. Biochem Biophys Res Commun 1997;9;259-263.

110. Fuhrman B, Buch S, Vaya J, Belinky PA, Coleman R, Hayek T, Aviram, M. Licorice extract and its majorpolyphenol glabridin protect low- density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. Am J Clin Nutr 1997;66: 267-275.

111. Kimura Y, Okuda T, Okuda H. Effects of flavonoids isolated from licorice roots (glycyrrhiza inflata bat) on arachidonic acid metabolism and aggregation in human platelets. Phytother Res 1993;7:341-347.

112. Nagumo S, Fukuju A, Takayama M, Nagai M, Yanoshita R, Samejima Y. Inhibition of IysoPAF acetyltransferase activity by components of licorice root. Biol Pharm Bull 1999;22(10):1144-6.

113. Shibata S. Antitumor-promoting and anti-inflammatory activities of licorice pirinciples and their modified compounds, in Food Phytochemicals II: Teas, Spices and Herbs. In ACS symposium series (USA) 1994.

114. Vaya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constitues from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. Free Rad Biol Med 1997;23 302-313.

115. Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. Pigment Cell Res 1998;11(6):335-61.

116. Van Rossum TGJ, De Man RA. Glycyrrhizin as a potential treatment forchronic hepatitis C. Aliment Paharmacol Ther 1998;12(3):199-205

117. Palarmo M, Shackleton CH, Mantero f, Stewart PM. Urinary free cortisone and the assessment of 11 beta–hydroxysteroid dehydrogenase activity in man. Clin Endocrinol 1996;45(5):605-11.

118. Heikens J, Fliers E, Endert E, Ackermans M, Van Montfrans, G. Liquorice-induced hypertension: a new understanding of an old disease: case report and brief review. Neth J Med 1995;47:230-234.

119. Ghil, Sungho. Antiproliferative activity of Alpinia officinarum extract in the human breast cancer cell line MCF-7.Mol Med Rep 2013:1288-1292.

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

121. Lee CC and Houghton P: Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. J Ethnopharmacol 2005;100:237-243.

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

123. Ayan AK, Çalışkan Ö, Çırak C. Isırgan Otu (Urtica spp.)'nun Ekonomik Önemi ve Tarımı. Anadolu J Agr Sci 2006;21.3:357-363.

124. Sadegh F, Monireh G, Haleh AN. Urtica Dioica, An Emerauld in the Medical Kingdom. IBBJ 2016;2(1).

125. E Haouari M, Bnouham M, Bendahou M, Aziz M, Ziyyat A, Legssyer A, et al. Inhibition of rat platelet aggregation by Urtica dioica leaves extracts. Phytother Res 2006 Jul;20(7):568-72.

126. Konrad L, Muller HH, Lenz C, Laubinger H, Aumüller G, Lichius JJ.. Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (Urtica dioica) extract. Planta Med 2000;66, 44-7.

127. Testai L, Chericoni S, Calderone V, et al. Cardiovascular effects of Urtica dioica L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. J Ethnopharmacol 2002:81;105-9.

128. Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. Plant extractsfrom the stinging nettle (Urtica dioica) an antirheumaticremedy, inhibit the proinflammatory transcription factorNF-Kb. FEBS Lett 1999;442:89–94.

129. Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyyat A. Medicinalplants used in the treatment of diabetes in Morocco. IntJ Exp Diabetes Res 2002;10:33–50.

130. Ilhami G, Irfan OK, Munir O, Mehmet EB. Antioxidant,antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle(Urtica dioica L.). J Ethnopharmacol 2004;90:205–215

131. Legssyer A, Ziyyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Tahri A, Serhrouchni M, et al. Cardiovascularеffects of Urtica dioica L. in isolated rat heart and aorta. Phytother Res 2002;16:503–507.

132. Tahri A, Yamani S, Legssyer A, Aziz M, Mekhfi H, Bnouham M, et al. Acute diuretic,natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusionof aqueous extract of Urtica dioica. J Ethnopharmacol 2000;73:95–100.

133. Mekhfi H, El Haouari M, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, et al. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants.J Ethnopharmacol 2004;94:317–322.

134. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. Third row transition metals for the treatment of cancer. Phil.Trans.R.Soc 2015:20140185.

135. Goodsell DS. The molecular perspective: cisplatin. Stem Cells 2006;24,514–515.

136. Dasari S, Paul BT. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. European journal of pharmacology 2014:740;364-378.

137. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. Cancer Treat. Rev 2004:30;53–81.

138. Tsimberidou AM, Braiteh F, Stewart DJ, Kurzrock R. Ultimate fate of oncology drugs approved by the us food and drug administration without a randomized. Trial J Clin Oncol 2009:27;6243–6250.

139. Dhar S, Kolishetti N, Lippard SJ, Farokhzad OC. Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo. Proc Natl Acad Sci 2011:108;1850–1855.

140. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 2003:22;7265–7279.

141. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. Third row transition metals for the treatment of cancer. Phil Trans R Soc 2015;A373:20140185.

142. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer 2007;7:573-584.

143. Liu H, Zang C, Schefe JH, Schwarzlose-Schwarck S, Regierer AC, Elstner E, et al. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to the cytotoxic effect of carboplatin in breast cancer in vitro. Anticancer Res 2011;31(9):2713-22.

144. Martín M. Platinum compounds in the treatment of advanced breast cancer. Clin Breast Cancer. 2001;2(3):190-208.

145. Goodsell DS. The molecular perspective: cisplatin. Stem Cells 2006;24(3):514-5.

146. Natarajan G, Malathi R., Holler E. Increased DNA-binding activity of cis-1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (carboplatin) in the presence of nucleophiles and human breast cancer MCF-7 cell cytoplasmic extracts: activation theory revisited. Biochem Pharmacol 1999:58;1625–1629.

147. Hoekstra AV, Hurteau JA, Kirschner CV, Rodriguez GC. The combination of monthly carboplatin and weekly paclitaxel is highly active for the treatment of recurrent ovarian cancer. Gynecol Oncol 2009;115:377-381.

148. Hansen SN, Ehlers NS, Zhu S, Thomsen MB, Nielsen RL, Liu D, et al. The stepwise evolution of the exome during acquisition of docetaxel resistance in breast cancer cells. BMC Genomics 2016;17:442.

149. De Laurentiis M, Cancello G, D'Agostino D, Giuliano M, Giordano A, Montagna E, et al. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a metaanalysis of randomized trials. J Clin Oncol 2008;26:44–53.

150. Ghersi D, Wilcken N, Simes RJ. A systematic review of taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. Br J Cancer 2005;93:293–301.

151. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between differentpolychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women 852 in 123 randomised trials. Lancet 2012;379:432–44.

152. Fauzee NJ. Taxanes: promising anti-cancer drugs. Asian Pac J Cancer Prev 2011;12:837–51.

153. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature 1979;277:665–7.

154. Lelle M, Freidel C, Kaloyanova S, Tabujew I, Schramm A, Musheev M, et al. Overcoming drug resistance by cell-penetrating peptide-mediated delivery of a doxorubicin dimer with high DNA-binding affinity. Eur J Med Chem 2017;130:336-345.

155. Weiss RB. The Anthracyclines: Will We Ever Find a Better Doxorubicin. Semin Oncol 1992;19(6):670-86.

156. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity (Review). Pharmacol Rev 2004;56(2):185-229.

157. Janos N, Duxin S. Anthracyclines as effective anticancer drugs. Expert Opin Drug Dis 2006;(1):549-568.

158. Minotti G, Cairo G, Monti E.Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song?, FASEB J 1999;13(2):199-212.

159. Schlage P, Mezo G, Orbán E, Bosze S, Manea M. Anthracycline-GnRH derivative bioconjugates with different linkages: Synthesis, in vitro drug release and cytostatic effect. J Control Release 2011;156(2):170-8.

160. Sun LC, Coy DH. Somatostatin receptor-targeted anti-cancer therapy (review). Curr Drug Deliv 2011;8(1):2-10.

161. Leamon CP, Reddy JA. Folate-targeted chemotherapy. Adv Drug Deliv Rev 2004;56(8):1127-41.

162. Casi G, Neri D. Antibody-drug conjugates: Basic concepts, examples and future perspectives. J Control Release 2012;161(2):422-8.

163. Kratz F. Drug conjugates with albumin and transferrin, Expert Opin Ther Pat 2002;12:433-439.

164. Wang L, Xie S, Ma L, Chen Y, Lu W. 10-Boronic acid substituted camptothecin as prodrug of SN-38. Eur J Med Chem 2016;116:84-9.

165. Jiang Y, Li X, Hou J, Huang Y, Jia Y, Zou M, et al. Discovery of BC-01, a novel mutual prodrug (hybrid drug) of ubenimex and fluorouracil as anticancer agent. Eur J Med Chem 2016;121;649-657.

166. Chou TC. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. Pharmacol Rev 2006;58(3):621–81.

167. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 1986;89(2):271-7.

168. Horakova K, Sovcikova A, Seemannova Z, Syrova D, Busanyova K, Drobna Z, et al. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. Free Radic Biol Med 2001;30(6):650-64.

169. Esmaeilbeig M, Kouhpayeh SA, Amirghofran Z. An Investigation of the Growth Inhibitory Capacity of Several Medicinal Plants From Iran on Tumor Cell Lines. Iran J Cancer Prev 2015;8(5):e4032.

170. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. Ann Oncol 2014;25(8):1650–6.

171. American Cancer Society Cancer figures and facts. http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014.

172. Kuo CY, Chao Y, Li CP. Update on treatment of gastric cancer. J Chin Med Assoc 2014;77(7):345–53.

173. Ebrahimnezhad Darzi S, Amirghofran Z. Dichloromethane fraction of Melissa officinalis induces apoptosis by activation of intrinsic and extrinsic pathways in human leukemia cell lines. Immunopharmacol Immunotoxicol 2013;35(3):313–20.

174. Amirghofran Z, Malek-hosseini S, Gholmoghaddam H, Kalalinia F. Inhibition of tumor cells growth and stimulation of lymphocytes by Euphorbia species. Immunopharmacol Immunotoxicol 2011;33(1):34–42.

175. Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Ashouri E, Javidnia K. Antitumor activity and apoptosis induction in human cancer cell lines by Dionysia termeana. Cancer Invest 2007;25(7):550–4.

176. El-Ashmawy NE, Khedr NF, El-Bahrawy HA, Abo Mansour HE. Ginger extract adjuvant to doxorubicin in mammary carcinoma: study of some molecular mechanisms. Eur J Nutr. 2017;1-9.

177. Anampa J, Makower D, Sparano JA. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. BMC Med 2015;13:195.

178. Bukhari SN, Jantan I, Seyed MA (2015) Effects of plants and isolates of Celastraceae family on cancer pathways. Anticancer Agents Med Chem 2015;15(6):681–93.

179. Turk S, Malkan UY, Ghasemi M, Hocaoglu H, Mutlu D, Gunes G,et al. Growth inhibitory activity of Ankaferd hemostat on primary melanoma cells and cell lines. SAGE Open Med 2017;5:2050312116689519.

180. Mihmanli A, Ulker Z, Alpsoy L, Ezirganli S. Evaluation of cytotoxicity of a new hemostatic agent Ankaferd Blood Stopper using different assays. Hum Exp Toxicol 2012;(8):780-7.

181. Deveci A, Çoban AY, Çayci YT, Acicbe Ö, Fişgin NT, Akgüneş A ve ark. Bir Bitki Ekstresi Olan Ankaferd Blood Stopper®'in Mycobacterium tuberculosis İzolatlarına Karşı İn Vitro Etkinliği. Mikrobiyol Bul 2013;47(1):71-78.

182. Liu H, Zang C, Schefe JH, Schwarzlose-Schwarck S, Regierer AC, Elstner E, et al. The mTOR Inhibitor RAD001 Sensitizes Tumor Cells to the Cytotoxic Effect of Carboplatin in Breast Cancer In Vitro. Anticancer Res 2011 ;31(9):2713-22.

183. Pandey V, Chaube B, Bhat MK. Hyperglycemia regulates MDR1, drug accumulation and ROS levels causing increased toxicity of carboplatin and 5-fluorouracil in MCF-7 cells. J Cell Biochem 2011;112(10):2942-52.

184. Laranjo M, Carvalho MJ, Abrantes AM, Brito A, Torgal I, Oliveira CF, et al. In vitro susceptibility of triple negative breast cancer cells to docetaxel, epirubicin and carboplatin. Ejc supplements 2010;8(5):74-74.

185. Ibrahim T, Liverani C, Mercatali L, Sacanna E, Zanoni M, Fabbri F,et al. Cisplatin in combination with zoledronic acid: a synergistic effect in triple-negative breast cancer cell lines. Int J Oncol 2013;42(4):1263-70.

186. Chen YS, Peng YB, Yao M, Teng JP, Ni D, Zhu ZJ, et al. Cisplatin and photodynamic therapy exert synergistic inhibitory effects on small-cell lung cancer cell viability and xenograft tumor growth. Biochem Biophys Res Commun 2017 Apr 18.pii:S0006-291X(17)30765-9.

187. Liu R, Ji P, Liu B, Qiao H, Wang X, Zhou L, et al. Apigenin enhances the cisplatin cytotoxic effect through p53-modulated apoptosis. Oncol Lett 2017;13(2):1024-1030.

188. Yang J, Wu Y, Shen Y, Zhou C, Li YF, He RR, et al. Enhanced Therapeutic Efficacy of Doxorubicin for BreastCancer Using Chitosan Oligos accharide Modified Halloysite Nanotubes. ACS Appl Mater Interfaces 2016;8(40):26578-90.

189. Sharma G, Tyagi AK, Singh RP, Chan DC, Agarwal R. Synergistic anti cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. Breast Cancer Res Treat 2004;85(1):1-12.

190. Aziz MY, Abu N, Yeap SK, Ho WY, Omar AR, Ismail NH, et al. Combinatorial Cytotoxic Effects of Damnacanthal and Doxorubicin against Human Breast Cancer MCF-7 Cells in Vitro. Molecules 2016;21(9).pii:E1228.

191. Zhang X, Zhong S, Xu Y, Yu D, Ma T, Chen L, et al. MicroRNA-3646 Contributes to Docetaxel Resistance in Human Breast Cancer Cells by GSK-3β/β-Catenin Signaling Pathway. PLoS One 2016;11(4):e0153194.

192. Alim Z, Beydemir Ş. Some Anticancer Agents Act on Human Serum Paraoxonase-1 to Reduce Its Activity. Chem Biol Drug Des 2016;88(2):188-96.

193. Attia RT, Tolba MF, Trivedi R, Tadros MG, Arafa HM, Abdel-Naim AB. The chemomodulatory effects of glufosfamide on docetaxel cytotoxicity in prostate cancer cells. PeerJ 2016;29:4:e2168.

194. Mumcuoglu M, Akin DF, Ezer U, Akar N. Ankaferd Blood Stopper induces apoptosis and regulates PAR1 and EPCR expression in human leukemia cells. Egypt J Med Human Genet 2015;16(1): 19-27.

195. Charushila YK, Subodhini AA. Apoptosis Markers in Breast Cancer Therapy. Chapter Five. B. J Govt. Medical College, Pune, India.

196. Wu CC, Bratton SB. Caspase-9 swings both ways in the apoptosome. Mol Cell Oncol 2017:20;4(2):e1281865.

197. Zhang F, Shi JJ, Thakur K, Hu F, Zhang JG, Wei ZJ. Anti Cancerous Potential of Polysaccharide Fractions Extracted from Peony Seed Dreg on Various Human Cancer Cell Lines Via Cell Cycle Arrest and Apoptosis. Front Pharmacol 2017;8:102.

198. Yang-Hartwich Y, Soteras MG, Lin ZP, Holmberg J, Sumi N, Craveiro V, et al. p53 protein aggregation promotes platinum resistance in ovarian cancer. Oncogene 2015;34(27):3605-16.

199. Kang JH, Kang HS, Kim IK, Lee HY, Ha JH, Yeo CD, et al. Curcumin sensitizes human lung cancer cells to apoptosis and metastasis synergistically combined with carboplatin. Exp Biol Med 2015;240(11):1416-25.

200. Chatterjee S, Rhee YH, Ahn JC. Sulforaphene-Carboplatin Combination Synergistically Enhances Apoptosis by Disruption of Mitochondrial Membrane Potential and Cell Cycle Arrest in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma. J Med Food 2016;19(9):860-9.

201. Wang X, Bao Y, Dong Z, Chen Q, Guo H, Xiang C, et al. WP1130 attenuates cisplatin resistance by decreasing P53 expression in non-small cell lung carcinomas. Oncotarget 2017:7;16931.

202. Bennukul K, Numkliang S, Leardkamolkarn V. Melatonin attenuates cisplatin-induced HepG2 cell death via the regulation of mTOR and ERCC1 expressions. World J Hepatol 2014;6(4):230-42.

203. Lv J, Qian Y, Ni X, Xu X, Dong X. Feedback regulation of methyl methanesulfonate and ultraviolet-sensitive gene clone 81 via ATM/Chk2 pathway contributes to the resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. Tumour Biol 2017; 39(3):1010428317694307.

204. El-Naa MM, Othman M, Younes S. Sildenafil potentiates the antitumor activity of cisplatin by induction of apoptosis and inhibition of proliferation and angiogenesis. Drug Des Devel Ther 2016;10:3661-72.

205. Zhao Y, Jing Z, Li Y, Mao W Berberine in combination with cisplatin suppresses breast cancer cell growth through induction of DNA breaks and caspase-3-dependent apoptosis. Oncol Rep 2016;36(1):567-72.

206. Mirmalek SA, Azizi MA, Jangholi E, Yadollah-Damavandi S, Javidi MA, Parsa Y, et al. Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of Hypericum perforatum on the MCF-7 human breast cancer cell line. Cancer Cell Int 2016;16:3.

207. Zhang K, Li Y. Effects of ginsenoside compound K combined with cisplatin on the proliferation, apoptosis and epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells of human breast cancer. Pharm Biol 2016;54(4):561-8.

208. Sato Y, Sasaki N, Saito M, Endo N, Kugawa F, Ueno A. Luteolin attenuates doxorubicin induced cytotoxicity to MCF-7 human breast cancer cells. Biol Pharm Bull 2015;38(5):703-9.

209. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. J Biol Chem 2002;277(5):3247-57.

210. Sjöström J, Blomqvist C, von Boguslawski K, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malmström P, et al. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. Clin Cancer Res 2002;8(3):811-6.

211. Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, et al. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. Cancer Sci 2003Jan;94(1):15-21.

212. Noguchi S. Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers. Cancer Sci 2006;97(9):813-20.

213. Singh SK, Banerjee S, Acosta EP, Lillard JW, Singh R. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/ p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. Oncotarget 2017;8(10):17216-28.

214. Ehrlichová M, Koc M, Truksa J, Naldová Z, Václavíková R, Kovárr J. Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells. Anticancer Res 2005;25(6B):4215-24.

215. Etti IC, Rasedee A, Hashim NM, Abdul AB, Kadir A, Yeap SK, et al. Artonin E induces p53-independent G1 cell cycle arrest and apoptosis through ROS-mediated mitochondrial pathway and livin suppression in MCF-7 cells. Drug Des Devel Ther 2017Mar20;11:865-879.

RESİMLEMELER LİSTESİ

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1. Kanser hücreleri 3

Şekil 2. Kanserin yayılımı 5

Şekil 3. Onkogenler ve tümör supressör genlerin hücreye etkisi 6

Şekil 4. RAS proteini aktivasyonu ile aktif olan RAF/MEK/ERK sinyal iletim yolu 8

Şekil 5. Map kinazın yapmış olduğu etkiler.....9

Şekil 6. Seçilmiş AB ülkelerinde kanserden ölüm oranları.....10

Şekil 7. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri 11

Şekil 8. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri 11

Şekil 9. Fosfotidilserinin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne çıkarak makrofajlarca tanınması ve hücrenin fagosite edilmesi.....13

Şekil 10. Hücrenin apoptoza gidişi.....15

Şekil 11. Fas-fas ligand aracılı apoptozis.....17

Şekil 12. Apoptotik sinyal ile başlayan kaspaz kaskadı.....18

Şekil 13. p53 'ün etkileri.....19

Şekil 14. Sisplatinin moleküler ve kimyasal yapısı.....26

Şekil 15. Sisplatinin etki mekanizması; (i) hücresel alım, (ii) aktivasyon, (iii) DNA'nın platinlenmesi ve (iv) apoptozise giden hücresel yol.....27

Şekil 16. Karboplatinin kimyasal ve moleküler yapısı.....28

Şekil 17. MCF-7 hücrelerinin mikroskopta görünümü..... 31

Şekil 18. MTT testi uygulanmasından sonra MCF-7 hücrelerinde oluşan formazon kristallerinin görünümü 34

Şekil 19. MTT uygulanmasından sonra genel plate görünümü.....35

Şekil 20. MCF-7 hücre dizisinde ABS uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi 40

Şekil 21. MCF-7 hücre dizisinde Karboplatin uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi.....41

Şekil 22. MCF-7 hücre dizisinde Sisplatin'in uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi.....42

Şekil 23. MCF-7 hücre dizisinde Doksorubisin uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi.....43

Şekil 24. MCF-7 hücre dizisinde Dosetaksel'in uygulandıktan 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT metoduyla saptanan doz-% canlılık eğrisi.....44

Şekil 25. Önce ABS sonra karboplatin kombinasyonu 45

Şekil 26. Önce karboplatin sonra ABS kombinasyonu 47

Şekil 27. Aynı anda ABS+karboplatin kombinasyonu 49

Şekil 28. Önce ABS sonra sisplatin kombinasyonu 51

Şekil 29. Önce sisplatin sonra ABS kombinasyonu 53

Şekil 30. Aynı anda ABS+sisplatin kombinasyonu 55

Şekil 31. Önce ABS sonra doksorubisin kombinasyonu.....57

Şekil 32. Önce doksorubisin sonra ABS kombinasyonu.....59

Şekil 33. Aynı anda ABS+doksorubisin kombinasyonu 61

Şekil 34. Önce ABS sonra dosetaksel kombinasyonu.....63

Şekil 35. Önce dosetaksel sonra ABS kombinasyonu.....65

Şekil 36. Aynı anda ABS+dosetaksel kombinasyonu 67

Şekil 37. MCF-7 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Anneksin V ve Propidyum İyodür ile boyandıktan sonra saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi.

A:Kontrol, B: ABS, C: Karboplatin, D: Sisplatin, E: Doksorubisin, F: Dosetaksel Uygulaması.....69

Şekil 38. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Kontrol, B: ABS, C: Sisplatin uygulanması.....70

Şekil 39. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Karboplatin, B: Doksorubisin, C: Dosetaksel uygulanması 71

Şekil 40. MCF-7 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Anneksin V ve Propidyum İyodür ile boyandıktan sonra saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Önce ABS sonra karboplatin, B: Önce ABS sonra sisplatin, C: Önce ABS sonra doksorubisin, D: Önce ABS sonra dosetaksel uygulaması.....72

Şekil 41. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Önce ABS sonra karboplatin, B: Önce ABS sonra sisplatin uygulaması.....73

Şekil 42. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Önce ABS sonra doksorubisin, B: Önce ABS sonra dosetaksel uygulaması.....74

Şekil 43. MCF-7 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Anneksin V ve Propidyum iyodür ile boyandıktan sonra saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Önce karboplatin sonra ABS, B: Önce sisplatin sonra ABS, C: Önce doksorubisin sonra ABS, D: Önce dosetaksel sonra ABS uygulaması.....75

Şekil 44. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Önce karboplatin sonra ABS, B: Önce sisplatin sonra ABS uygulaması.....76

Şekil 45. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Önce doksorubisin sonra ABS, B: Önce dosetaksel sonra ABS uygulaması.....77

Şekil 46. MCF-7 hücre serisinde tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak anneksin V ve propidyum iyodür ile boyandıktan sonra saptanan canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. A: Aynı anda ABS+karboplatin, B: Aynı anda ABS+sisplatin, C: Aynı anda ABS+doksorubisin, D: Aynı anda ABS+dosetaksel uygulaması.....78

Şekil 47. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. annexin v (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A:Aynı anda ABS+karboplatin, B: Aynı anda ABS+sisplatin uygulaması.....79

Şekil 48. MCF-7 hücre hattında, tali sitometre canlı, apoptotik, hücre görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodür (kırmızı) floresan yoğunluğu. A: Aynı anda ABS+doksorubisin, B: Aynı anda ABS+dosetaksel uygulaması.....80

Şekil 49. ABS-karboplatin kombinasyonlarının Bax gen ifadesi üzerine etkisi 82

Şekil 50. ABS-sisplatin kombinasyonlarının Bax gen ifadesi üzerine etkisi 82

Şekil 51. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının Bax gen ifadesi üzerine etkisi..... 83

Şekil 52. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının Bax gen ifadesi üzerine etkisi..... 84

Şekil 53. ABS-karboplatin kombinasyonlarının APAF-1 gen ifadesi üzerine etkisi 85

Şekil 54. ABS-sisplatin kombinasyonlarının APAF-1 gen ifadesi üzerine etkisi 85

Şekil 55. ABS- doksorubisin kombinasyonlarının APAF-1 gen ifadesi üzerine etkisi..... 86

Şekil 56. ABS- dosetaksel kombinasyonlarının APAF-1 gen ifadesi üzerine etkisi..... 87

Şekil 57. ABS-karboplatin kombinasyonlarının Bcl-2 gen ifadesi üzerine etkisi..... 87

Şekil 58. ABS-sisplatin kombinasyonlarının Bcl-2 gen ifadesi üzerine etkisi..... 88

Şekil 59. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının Bcl-2 gen ifadesi üzerine etkisi 89

Şekil 60. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının Bcl-2 gen ifadesi üzerine etkisi 89

Şekil 61. ABS-karboplatin kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkisi 90

Şekil 62. ABS-sisplatin kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkisi 91

Şekil 63. ABS- doksorubisin kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkisi 92

Şekil 64. ABS- dosetaksel kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkisi 93

Şekil 65. ABS-karboplatin kombinasyonlarının p53 gen ifadesi üzerine etkisi 94

Şekil 66. ABS-sisplatin kombinasyonlarının p53 gen ifadesi üzerine etkisi 95

Şekil 67. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının p53 gen ifadesi üzerine etkisi 96

Şekil 68. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının p53 gen ifadesi üzerine etkisi 96

Şekil 69. ABS-karboplatin kombinasyonlarının Sitokrom-c gen ifadesi üzerine etkisi 97

Şekil 70. ABS-sisplatin kombinasyonlarının Sitokrom-c gen ifadesi üzerine etkisi 98

Şekil 71. ABS-doksorubisin kombinasyonlarının Sitokrom-c gen ifadesi üzerine etkisi 98

Şekil 72. ABS-dosetaksel kombinasyonlarının Sitokrom-c gen ifadesi üzerine etkisi 99

Şekil 73. Örnek olarak Hela hücrelerinde güçlü bir polisakarit fraksiyonunun (CASS) bir seri yolaklarla hücre döngüsü ve apoptozis üzerine nasıl etkileyeceğinin bizim etkisini

araştırdığımız genlerdeki gösterimi.....105

TABLOLAR **Sayfa No**

Tablo 1. Ampul ve tampon formda ABS içinde bulunma miktarları 22

Tablo 2. Sprey formda ABS içinde bulunma miktarları 22

Tablo 3. İki ilacın hücre kültürlerinde kombine kullanımının sinerjistik-aditif-antagonistik sitotoksik etkilerini belirlemede kullanılan CI değerleri.....30

Tablo 4. Önce ABS sonra karboplatin kombinasyonunun CI değerleri 46

Tablo 5. Önce karboplatin sonra ABS kombinasyonunun CI değerleri 48

Tablo 6. Aynı anda karboplatin+ABS kombinasyonunun CI değerleri.....50

Tablo 7. Önce ABS sonra Sisplatin kombinasyonunun CI değerleri.....52

Tablo 8. Önce Sisplatin sonra ABS kombinasyonunun CI değerleri.....54

Tablo 9. Aynı anda Sisplatin+ABS kombinasyonunun CI değerleri.....56

Tablo 10. Önce ABS sonra doksorubisin kombinasyonunun CI değerleri.....58

Tablo 11. Önce doksorubisin sonra ABS kombinasyonunun CI değerleri.....60

Tablo 12. Aynı anda doksorubisin+ABS kombinasyonunun CI değerleri 62

Tablo 13. Önce ABS sonra dosetaksel kombinasyonunun CI değerleri.....64

Tablo 14. Önce dosetaksel sonra ABS kombinasyonunun CI değerleri.....66

Tablo 15. Aynı anda dosetaksel+ABS kombinasyonunun CI değerleri 68

ÖZGEÇMİŞ

15 Ağustos 1988 tarihinde Edirne'de doğdum. İlköğrenimimi Şehit Öğretmen Aydın Yılmaz İlköğretim Okulu'nda, ortaöğrenimimi Uzunköprü Muzaffer Atasay Anadolu Lisesi'nde, üniversite öğrenimimi 2012 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. 2014 yılı Eylül ayında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2015 yılında Öğretim Elemanı Yetiştirme programı ile Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilm Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandım.

EKLER

Ek 1. Etik kurul raporu

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2015/113	
	PROTOKOL ADI	ANKAFERD BloodStopper Kanama Durdurucu'nun İn Vitro Meme Kanseri Hücrelerinin Çoğalmaları Üzerine Olan Etkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. İlker DIBIRDIK	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 10/11**	**Tarih:27.05.2015**	
	Fakültemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. İlker DIBIRDIK'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Çiğdem FİDAN'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu Değerlendirme Formunda belirtilen eksiklikler giderildikten yeniden değerlendirilmesine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	E	E☐ H☐	E☐ H☐	Mazeretli
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Hasan ÖMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	Mazeretli
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	Mazeretli
Doç. Dr. Salim DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	Mazeretli
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Prof. Dr. Koray ELTER Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	Mazeretli
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	Mazeretli
Prof. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E☐ H☒	E☒ H☐	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Recep YAĞIZ
Dekan