T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLOREKTAL KANSERLİ RATLARDA TARANTULA CUBENSİS ALKOLİK EKSTRATI VE KAPESİTABİNİN BİRLİKTE KULLANIMDA APOPTOZ MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİ

Vet. Hek. Rahmi CANBAR

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ahmet Levent BAŞ

KONYA – 2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLOREKTAL KANSERLİ RATLARDA TARANTULA CUBENSİS ALKOLİK EKSTRATI VE KAPESİTABİNİN BİRLİKTE KULLANIMDA APOPTOZ MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİ

Vet. Hek. Rahmi CANBAR

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Levent BAŞ
İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi BAP koordinatörlüğü tarafından 19202080 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA – 2021

ÖNSÖZ

Kolon kanseri dünyada insanlarda en fazla gözlenen kanser türlerinden birisidir. Kesin bir tedavisi olmamakla birlikte, ilaç ve cerrahi yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak tedavide kullanılan ilaçların yan etkilerinin fazla olması kullanımını sınırlamaktadır. Bu yüzden bilim dünyası alternatif tedavi yöntemleri veya ilaçların yan etkilerini azaltmaya yönelik çalışmalar yapmaktadır.

Kapesitabin son zamanlarda kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılan 5-floroürasil (5-FU)'in prodrug şeklidir. 5-FU'ya göre kanser hücrelerine daha spesifik ve güvenli olduğu bildirilmektedir. 5-FU ile yapılan in vivo çalışmalar fazla sayıda olmasına rağmen, kapesitabinle deneysel kolon kanseri oluşturularak yapılan invivo çalışmalar sınırlıdır. Tarantula cubensis alkolik ekstraktı ise veteriner hekimlikte sıklıkla kullanılan homeopatik üründür. Yapılan literatür taramalarında kolon kanseri gelişimini yavaşlattığı belirtilmektedir. Ancak ilaç-ilaç etkileşimi, doz-konsantrasyon ilişkisi ve tedavi mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada ratlarda azoksimetan ile oluşturulmuş deneysel kolon kanseri modelinde, Tarantula cubensis alkolik ekstraktının kolon kanserindeki etkinliğinin mitokondriyal disfonksiyona bağlı apoptoz mekanizması üzerine etkinliği, kapesitabinle kombine kullanımda ilaç-ilaç etkileşimi ve kapesitaibinin deneysel dozda tedavi etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada ve doktora eğitimimde destek ve yardımlarını esirgemeyen başta danışmanım Prof. Dr. Ahmet Levent BAŞ ve Prof. Dr. Enver YAZAR olmak üzere Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Bu çalışmanın finansal desteğini sağlayan Selçuk Üniversitesi BAP birimine, doktora eğitimimde burs imkânı sağlayan YÖK 100/2000 "Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları" ve TÜBİTAK 2211-C "Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı" programına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR v

ÖZET vii

SUMMARY viii

1. GİRİŞ 1

1.1. Kolon Kanseri patofizyolojisi 1

1.1.1 Ülseratif Kolit (UK) ve Kolon Kanseri İlişkisi 4

1.2 Kolon Kanseri Teşhisi 6

1.3 Kolon Kanseri Tedavisi 6

1.4 Deney Hayvanlarında Kolon Kanser Modelleri 6

1.4.1 Kimyasal Ajanlarla Kolon Kanseri Modelleri 6

1.4.2 Genetik Kolon Kanseri Modelleri 7

1.5 Tarantula cubensis Alkolik Ekstraktı (TCAE) 7

1.6 Kapesitabin 9

1.7 Apoptoz Mekanizması 12

1.8 Aberrant Kriptal Foki 14

1.9 Hipotez ve Amaç 15

2. GEREÇ VE YÖNTEM 16

2.1 Hayvan Materyali 16

2.2 Deneysel Dizayn ve Hayvan Uygulamaları 16

2.3 Moleküler Analizler 18

2.3.1 Total RNA İzolasyonu 18

2.3.2 RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi 19

2.3.3 Revers Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu 19

2.3.4 Primer Dizaynı 20

2.3.5 Primerlerin Sulandırılması ve Primer Etkinliğinin Belirlenmesi 21
2.3.6 Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu 22
2.4 ACF Analizi 23
2.5 İstatiksel Analiz 23
3. BULGULAR 24
3.1 Hayvan Materyali 24
3.2 Gen Ekspresyon Analizlerinin Sonuçları 24
3.3 ACF ve Makroskobik Bulgular 29
3.4 Hayvan Ağırlıkları 32
4. TARTIŞMA 33
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 41
6. KAYNAKLAR 42
7. EKLER 51
8. TURNİTİN RAPORU 52
9. ÖZGEÇMİŞ 59

SİMGELER VE KISALTMALAR

5- FUH: 5,6-dihidro-5-floroürasil

5'-DFCR: 5'-deoksi-5'-florositidin

5'-DFUR: 5'-deoksi-5'-floroüridin

5-FU: 5-floroürasil

ACF: Aberrant kriptal foki

AIF: Apoptoz indükleyici faktör

ALP: Alkalen fosfataz

ALT: Alanin aminotransferaz

AOM: Azoksimetan

APAF-1: Apoptotic Protease Activating Factor-1

APC: Adenomatous polipozis coli

AST: Aspartat aminotransferaz

Bax: Bcl-2 associated X, apoptosis regulator

Bcl-2: Bcl-2 apoptosis regulator

Ca: Kalsiyum

CD: Crohn hastalığı

cDNA: Complementary DNA

Cox-2: Siklooksijenaz-2

DEPC-ddH_2O: Dietilpirokarbonatlı çift distile su

DMH: 1,2-dimetilhidrazin

DNA: Deoksiribonükleik asit

DPD: Dihidropirimidin dehidrojenaz

Endo – G: Endonukleaz-G

FBAL: Floro-beta-alanin

FDA: Gıda ve İlaç Ajansı

FDUMP: Florodeoksiüridin monofosfat

FUPA: Alpha-floro-beta-ureido-propiyonik asit

FUTP: Floroüridin trifosfat

GAPDH: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz

İBD: İnflamatuar bağırsak hastalığı

KRK: Kolorektal kanser

MCRC: Metastatik kolorektal kanser

MR: Magnetik resonans

mRNA: Mesajcı ribonükleik Asit

MTD: Maksimum tolere edilebilen doz

NFW: Nuclease-Free Water

PARP-1: Poli [ADP-riboz] polimeraz 1

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PSC: Primer sklerozankolanjit

RT-PZR: Real time polimeraz zincir reaksiyonu

SC: Supkutan

Smac: Second mitochondria-derived activator of kaspase

TBG: Tümör baskılayıcı gen

TCAE: Tarantula cubensis alkolik ekstraktı

UK: Ülseratif kolit

WNT: Wingless-related integration site

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kolorektal Kanserli Ratlarda Tarantula Cubensis Alkolik Ekstratı ve Kapesitabinin Birlikte Kullanımda Apoptoz Mekanizmaları Üzerine Etkisi

Rahmi CANBAR

Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/ KONYA-2021

Kolon kanseri dünyada sık rastlanan kanser türlerinden birisidir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların istenmeyen etkileri oldukça fazladır. Yapılan bu çalışmada veteriner hekimlikte homeopatik ürün olan Tarantula cubensis alkolik ekstraktı (TCAE) ve kanser tedavisinde kullanılan kapesitabinin deneysel kolon kanserinde etkileri araştırıldı. Çalışmada kullanılan 96 adet Winstar albino rat her grupta 12 adet olacak şekilde 8 gruba ayrıldı: Sağlıklı kontrol (K), kanser kontrol (KRK), sağlıklı TCAE (K + TCAE), kanser TCAE (KRK + TCAE), sağlıklı kapesitabin (K + kapesitabin), kanser kapesitabin (KRK + kapesitabin), sağlıklı kombine (K + TCAE+ kapesitabin) ve kanser kombine (KRK + TCAE + kapesitabin). Kanser gruplarının tamamına azoksimetan (AOM, 15 mg/kg, IP, 1 hafta ara ile 2 defa) uygulandı. TCAE gruplarına 15. haftadan itibaren 0.2 ml/rat (IP) 3 gün ara ile 4 hafta süresince uygulandı. Kapesitabin gruplarına 15. haftadan itibaren 40 mg/kg (PO, SID) dozunda 30 gün boyunca uygulandı. Kombine gruplarda her iki ilaç diğer gruplarda belirtilen doz ve uygulama yoluyla eş zamanlı uygulandı. 18 haftanın sonunda tüm ratlar ötanazi edilerek doku örnekleri alındı. Çalışmada Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile Bcl-2, Bax, Kaspas-3 (Kas-3) ve Kaspas-9 (Kas-9) genlerinin düzeyleri belirlendi. Ayrıca histopatolojik olarak aberrant kriptal foki (ACF) sayıları belirlendi. Yapılan çalışmanın sonucunda TCAE uygulamasının kanserli hayvanlarda kontrol grubuna benzer Bax/Bcl-2 oranına sahip olduğu, sağlıklı hayvanlarda bu oranın azaldığı ($P<0.05$) belirlendi. Kapesitabin uygulanan gruplarda ise Bax/Bcl-2 oranın azaldığı ($P<0.05$) gözlendi. Tüm gruplarda kas-3 değerinde istatistiki değişimler belirlenmedi ($P>0.05$). TCAE ve kapesitabinin kanserli hayvanlarda tek ve kombine kullanımında ACF sayısını azalttığı ($P<0.05$) tespit edildi.

Sonuç olarak kapesitabin uygulanan gruplarda Bax/Bcl-2 oranında azalma belirlenmekle birlikte, ACF sayısında da azalma belirlenerek paradoksal bir etki gözlendi. TCAE'ın kanserli hayvanlarda spesifik olarak azalan Bax/Bcl-2 oranı modüle edebileceği ve kapesitabinin 40 mg/kg dozunda deneysel olarak indüklenen kolon kanseri tedavisinde kullanılabileceği ifade edilebilir. Yapılacak olan çalışmalarda TCAE'nin etkinliğini belirlemek için farklı hücre içi yolaklarda çalışılması gerektiği önerilebilir

Anahtar Sözcükler: Azoksimetan, Kapesitabin, Kolorektal kanser, TCAE

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effects of Tarantula Cubensis Alcoholic Extrate and Capecitabine on Apoptosis Mechanisms in Colorectal Cancer Rats

Rahmi CANBAR

Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology

PhD THESIS /KONYA-2021

Colon cancer is one of the most common types of cancer in the world. The undesirable effects of drugs used in cancer treatment are quite high. In this study, the effects of Tarantula Cubensis Alcoholic Extract (TCAE), which is a homoepatic product in veterinary medicine, and capecitabine, which is used in cancer treatment, on experimental colon cancer were investigated. 96 winstar albino rats used in the study were divided into 8 groups, 12 in each group: healthy control (F), cancer control (CRC), healthy TCAE (C + TCAE), cancer TCAE (CRC + TCAE), healthy capecitabine (C + capecitabine), cancer capecitabine (CRC + capecitabine), healthy combined (C + TCAE + capecitabine) and cancer combined (CRC + TCAE + capecitabine). Azoxymethane (AOM, 15 mg/kg, IP, 2 times with 1 week interval) was administered to all cancer groups. On the other hand, 0.2 ml/rat (IP) was administered to the TCAE groups for 4 weeks, with an interval of 3 days, starting from the 15th week. Capecitabine groups were administered at a dose of 40 mg/kg (PO, SID) for 30 days starting from the 15th week. In the combined groups, both drugs were administered simultaneously at the dose and administration indicated in the other groups. At the end of 18 weeks, all rats were euthanized, and tissue samples were taken. In the study, the expressions of Bcl-2, Bax, Caspase-3 (Cas-3) and Caspase-9 (Cas-9) genes were determined by Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). In addition, aberrant cryptal seal (ACF) numbers were determined histopathologically. As a result of the study, it was determined that TCAE application had a similar Bax/Bcl-2 ratio to the control group in cancer animals, and this ratio was decreased in healthy animals ($P<0.05$). It was observed that Bax/Bcl-2 ratio decreased ($P<0.05$) in capecitabine administered groups. No statistical changes were found in Cas-3 value in all groups ($P>0.05$). It was determined that the single and combined use of TCAE and capecitabine in animals with cancer reduced the number of ACF ($P<0.05$).

As a result, although a decrease in the Bax/Bcl-2 ratio was detected in the capecitabine administered groups, a decrease in the number of ACF was also observed, and a paradoxical effect was observed. Specifically modulating the reduced Bax/Bcl-2 ratio in animals with cancer treated with TCAE may slow the development of cancer. Capecitabine at a dose of 40 mg/kg can be used in experimentally induced colon cancer. In future studies, it can be suggested that different intracellular pathways should be studied to determine the efficacy of TCAE.

Keywords: Azoxymethane, Capecitabine, Colorectal cancer, TCAE

1. GİRİŞ

Günümüzde kanser, ölüme yol açan en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Kanser türleri içinde kolorektal kanser (KRK) dünya genelinde görülme insidansı olarak üçüncü sırada yer alırken, özelikle erkeklerde mortalite oranında dördüncü sırada yer aldığı belirtilmektedir (Ferlay ve ark., 2019). Dünya çapında yapılan istatistiklerde, yılda yaklaşık 694 bin ölüme neden olduğu ve 1 milyondan fazla KRK vakasının belirlendiği bildirilmektedir (Vinson ve ark., 2016). KRK, ABD'de en yaygın üçüncü kanser türüdür. Hastalığın insidansının son yirmi yılda endoskopi ve dışkıda gizli kan testi gibi uygulamaların yaygınlaşmasıyla azaldığı belirtilmektedir. Tedavisinde ise çoğu kanser türünde olduğu gibi dokunun cerrahi rezeksiyonu veya ilaç tedavisi temel alınmaktadır. Bununla birlikte, gelişen bilimle yeni tedavi prosedürleri ortaya çıktığı ifade edilmektedir (Chen ve Huang, 2014).

Klinik çalışmalara göre çok sayıda tedavi prosedürü ve iyi bir destekleyici bakıma rağmen metastatik KRK'de ortalama 24-30 aylık hayatta kalma oranı olduğu bildirilmektedir. KRK'in kolon ve rektum içindeki primer tümör yerleşimleriyle karakterize olduğu rapor edilmektedir (Stintzing ve ark., 2017). Beşerî hekimlikte sık rastlanan KRK vakalarının, veteriner hekimlikte pet kliniğinde köpek ve kedilerde gözlendiği ifade edilmektedir (Aberdein ve ark., 2012; Arteaga ve ark., 2012; Herstad ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018)

1.1. Kolon Kanseri patofizyolojisi

Vogelstein ve Fearon (Fearon ve Vogelstein, 1990) (Şekil 1.1) KRK oluşumunda 4 temel mekanizmadan oluşan bir model tanımlamışlardır;

1- Tümör baskılayıcı genlerin (TBG) mutasyonel inaktivasyonu ve onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu şekillenmiş olmalıdır.

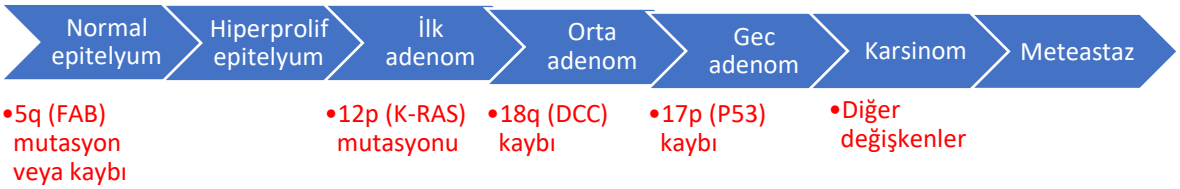
2- Malign bir tümörün gelişmesi için en az dört veya beş gendeki mutasyonların şekillenmesi gereklidir, ancak bu durum agresif olmayan tümörler için daha azdır.

3- Genetik değişiklikler genellikle belirli ve birbirleriyle ilgili sırayla meydana gelse de değişikliklerin toplam birikimi, tümörün biyolojik özelliklerinin belirlenmesinden sorumludur.

4- Bazı durumlarda, mutant TBG'ler heterozigot durumda mevcut olsa da bir fenotipik etki gösterdiği görülmektedir. Dolayısıyla, bazı TBG'ler hücresel düzeyde resesif olmayabilir.

Yapılan çalışmalar Vogelstein ve Fearon modelini doğrulamaktadır. Anormal kromozomal sayısı ve kromozomal yapısal değişikliklerin adenomatous spolipozis coli (APC), P53 ve SMAD4 gibi TBG'lerin fonksiyon kaybına yol açtığı ifade edilmektedir. Sporadik KRK'lerdeki bu değişiklikler onkogen mutasyonları ile somatik mutasyonların yaklaşık %80-85'ini oluşturduğu bildirilmektedir (Vinson ve ark., 2016).

Normal aktiviteleri malign fenotipe karşı olan APC, P53 ve SMAD4 gibi TBG'ler de meydana gelen kromozal değişiklere bağlı olarak genlerin instabil olması kanser hücrelerinin şekillenmesi için etkili bir mekanizma olduğu belirtilmektedir. KRK, normal fonksiyonu replikasyon sırasında kromozomal stabiliteyi korumak olan genleri inaktive edici mutasyonlara bağlı olarak geliştiği ifade edilmektedir. Özetle diğer kanser türlerinin aksine, KRK'de genellikle gen kopya sayısının veya genlerin mutasyona bağlı olarak çoğalması değil TBG'lerde meydana gelen mutasyonların gözlendiği bildirilmektedir (Markowitz ve Bertagnolli, 2009).

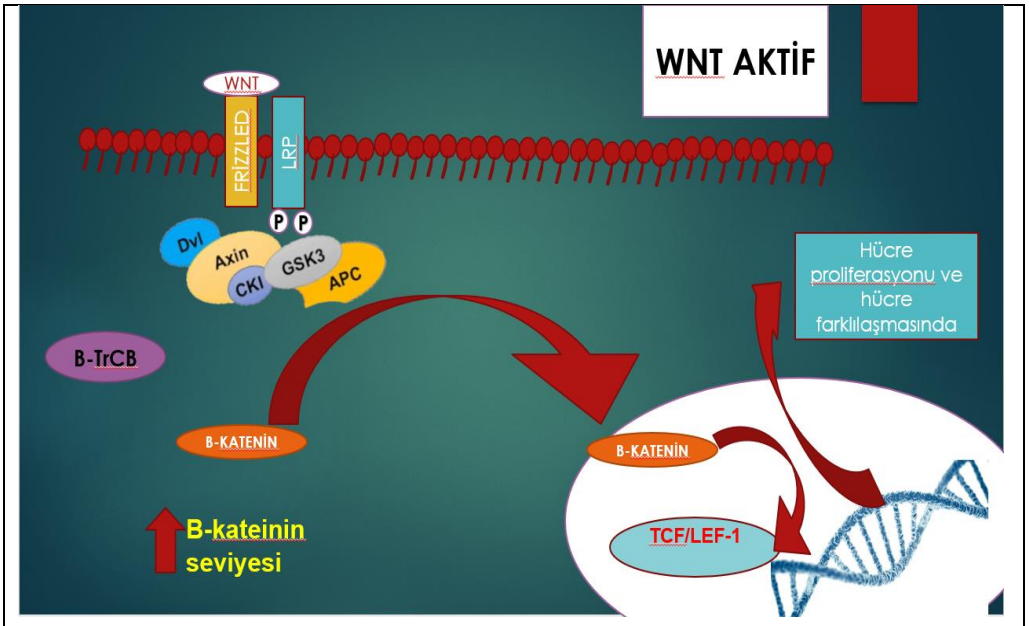


Şekil 1.1 Vogelstein ve Fearon'a göre kolon kanseri oluşum mekanizması.

KRK'nin oluşmasında onkogenler, TBG'ler ve DNA tamir mekanizmaları ile ilgili genlerdeki bozukluklara bağlı olarak ortaya çıktığı ifade edilmektir. Mutasyonun kökenine bağlı olarak KRK ise sporadik, kalıtsal ve familial olarak sınıflandırılmaktadır (Mármol ve ark., 2017).

Kolon kanserinin %90 oranında Wingless-related integration site (WNT) sinyal yolağında meydana gelen mutasyonlardan meydana geldiği, AXİN, GSK3B, CK1a ve APC'den oluşan yıkıcı protein kompleksinin inaktivasyonu veya APC başta olmak üzere komplekste proteinlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda B-kateinin yıkılmasının azaldığı belirtilmektedir (van Neerven ve Vermeulen, 2019). Birikim gösteren B-kateinin transkripsiyon faktör TCF/LEF-1 aktive ederek yolakta görev alan proteinler, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında görev alan genlerin transkripsiyonun arttığı ifade edilmektedir (Tanır ve Demirezen, 2009).

Yıkıcı kompleks aktif iken CK1a ve GSK3B tarafından B-kateinin fosforlanarak B-TrCP'ye tanıtıldığı ve sonrasında proteozamlarda parçalandığı, sonuç olarak tümör baskılayıcı etkinin ortaya çıktığı belirtilmektedir (Şekil1.2) (Ghosh ve ark., 2019).



Şekil 1.2 WNT yolagında kanser oluşum mekanizması

1.1.1 Ülseratif Kolit (UK) ve Kolon Kanseri İlişkisi

Ülseratif kolit (UK) ve kolon kanseri oluşma insidensi: İnflamatuar bağırsak hastalığı (IBD), ülseratif kolit (UK), Crohn hastalığı (CD) ve sınıflandırılamayan kolitin KRK geliştirme riskini arttırdığı bildirilmektedir. Bu tür vakalarda KRK ile ilişkili mortaliteyi azaltmak için profilaktik kolektominin yapılması savunan literatür bilgileri vardır (Shawki ve ark., 2018). KRK, IBD'nin en yıkıcı komplikasyonlarından biridir. KRK'nın IBD hastalarında %15'e kadar belirgin görülme riski olduğu ifade edilmektedir (Derikx ve ark., 2016).

UK hastalarda meydana gelen mortalitenin, %12'si hastalığın kendisine bağlı olarak, %10'nun ise KRK ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir. KRK'ye ait ölümler, UK tanısından ortalama 9 yıl sonra meydana geldiği rapor edilmektedir. Sporadik KRK'nin aksine, UK ilişkili KRK'nin patogenezi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. UK hastaları, sporadik KRK hastalarına göre ortalama 9 yıl içinde kanser geliştirme eğiliminde olduğu ifade edilmektedir (Viscido ve ark., 2001).

UK ve CD yapılan meta-analiz çalışmalarında;

1- UK'li hastalarda 10, 20 ve 30 yıllık hastalık süresinden sonra KRK riskinin sırasıyla %2, %8 ve %18 olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca çalışmada KRK görülme prevelansı %3.7 olarak belirlenmiştir (Eaden ve ark., 2001).

2- UK'li hastalarda KRK'nin kümülatif insidansı 20, 30 ve 40 yıllık hastalıklarda sırasıyla %2.5, %7.6 ve %10.8 olarak bildirilmektedir (Rutter ve ark., 2006).

3- UK'li hastalarda KRK'nin mutlak kümülatif sıklığı, 20 yıl sonra %7 olduğu CD olan hastalarda ise başlangıçtan 22 yıl sonra %8 olduğu ifade edilmektedir (Gillen ve ark., 1994).

4- CD'deki kümülatif KRK riski tanıdan 5, 15 ve 25 yıl sonra %0.3, %1.1 ve %2.3 olarak bildirilmektedir (Jess ve ark., 2006).

5- UK'li hastalarda neoplazi riskini 20 ve 30 yılda sırasıyla %7.7 ve %15.8 olarak belirtilmektedir (Farraye ve ark., 2010)

Ülseratif kolitle ilişkili kolon kanserinde risk faktörleri: Genç yaşlarda IBD ile ilişkili KRK oluşmasının daha fazla olduğu ve ailesinde KRK olan kişilerde, UK'nin KRK için risk teşkil ettiği bildirilmektedir. Ayrıca UK'li hastaların 8 yıldan sonra KRK oluşumun arttığı ifade edilmektedir (Itzkowitz ve Present, 2005; Baars ve ark., 2012).

UK hastalarında KRK için risk faktörleri arasında anatomik kapsam, genç yaştaki tanı, hastalık süresi, eşzamanlı primer sklerozan kolanjit (PSC) ve ailede KRK öyküsü bulunmaktadır. Ayrıca sigara kullanımı, psödopolit, kolonun sürekli iltihabı ve Back Wash İleiti de KRK için risk faktörü olduğu bildirilmektedir (Yashiro, 2014).

Ülseratif kolitle ilişkili kolon kanserinde patogenez: UK ilişkili KRK gözlenen hastalar, UK gözlenmeden şekillenen sporadik KRK gözlenen hastalara göre prognozun daha kötü olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca ilerleyen dönemlerde aynı tümör seviyesine sahip hastalar karşılaştırıldığında UK ile ilişkili KRK hastalarının prognozlarının çok daha kötüye gittiği bildirilmektedir (Yashiro, 2014). Sporadik KRK'de tipik olarak adenomatöz polipler gözlenmesine rağmen, UK ile ilişkili KRK'de düz displazi veya displazi ile ilişkili lezyon ve kitle alanları da gelişmektedir (Bruewer ve ark., 2003). KRK'in özellikle p53, APC ve Kras genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu şekillendiği ifade edilmektedir. Genel olarak sporodik KRK vakalarında APC'de meydana gelen mutasyonlar ve UK ilişkili KRK'de ise p53'te meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir. UK meydana gelen p53 allellerindeki mutasyonun enfektif yangılarda artan oksidatif stresle ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Hussain ve ark., 2000). Sporadik KRK ile ilişkili bazı moleküler UK ile ilişkili KRK ortaya çıkabilse de, p53 TBG'deki değişiklikler UK hastalarda daha erken ortaya çıkabileceği ve displaziden önce gelişebileceği bildirilmektedir. p53 anormallikleri sporadik KRK'nin patogenezinde daha geç şekillenmektedir (Brüwer ve ark., 2002)

1.2 Kolon Kanseri Teşhisi

KRK'nin teşhisinde yaygın olarak dışkıda gizli kan testi, high magnification skromoskopik kolonoskopi, baryum enema tomografik kolonografi, magnetik resonans (MR) (Labianca ve ark., 2010), fleksible sigmoidoskopi ve optik kolonoskopi (Labianca ve ark., 2010; The, 2014) kullanılmaktadır. Ayrıca biomarkerlar ve gen ekspresion profili gibi yöntemler KRK tanı ve teşhisinde kullanılabilmektedir (Mármol ve ark., 2017).

Kolorektal bölgeden yapılacak mikroskobik incelemede mukozada aberrant kriptal foki (ACF) olarak tanımlanan anormal kriptlerin gözlenmesi kolon kanserinin diagnostik biyobelirteci olarak kabul edilir (Yalçın ve ark., 2014; Corum ve ark., 2017).

1.3 Kolon Kanseri Tedavisi

Hastalığın tedavisinde 5-floroürasil (5-FU) bazlı kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. III. evre hastalarda, 5-FU ve cerrahi rezeksiyon yapılmasıyla birlikte ölüm riski %10-15, 5-FU ve oksaliplatin kombinasyonunda ise %20 oranında azaldığı ifade edilmektedir (Auclin ve ark., 2017). Tedavide kapesitabin + irinotekan, 5-FU+ lökovorin + oksaliplatin, 5-FU + lökovorin + irinotekan, irinotekan + oksaliplatin veya kapesitabin + oksaliplatin gibi tedavi prosedürleri kullanıldığı rapor edilmektedir (Stintzing ve ark., 2017).

1.4 Deney Hayvanlarında Kolon Kanser Modelleri

KRK çalışmalarında kullanılan hayvan modelleri genellikle iki kısma ayrılmaktadır. Bunlar KRK oluşturulan kimyasal ajanlarla indüklenen ve genetik olarak kolon kanserine yatkın olan deney hayvanları modellerdir.

1.4.1 Kimyasal Ajanlarla Kolon Kanseri Modelleri

Kimyasal ajanlar yaygın olarak kullanılan modellemedir ve kolona spesifik kanserojen olan 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ve onun metaboliti olan

azoksimetan (AOM) sıklıkla kullanılan kimyasallardır. DMH'ın sporadik KRK formlarını incelemek için tekrarlanabilir bir deney sistemi sağladığı, ancak AOM'ın stabilite ve etkinlik olarak DMH'ye göre daha avantajlı olduğu belirtilmektedir. AOM ile oluşturulan KRK'nin insanlarla benzer olduğu ifade edilmektedir (Rosenberg ve ark., 2008).

Ratlarda 15 mg/kg dozunda 1 hafta arayla 2 sefer AOM uygulandığında gruptaki hayvanların tamamında adenom gözlendiği, WNT sinyal yolağının aktif hale geldiği, B-katein, siklooksijenaz-2 (Cox-2) ve Ki-67 ekspresyonlarının arttığı rapor edilmektedir (Tan ve ark., 2014). İki veya 4 sefer AOM uygulanması sonrasında 6. haftada benzer sayıda kript odakları şekillenmesine rağmen 18. haftada 4 sefer uygulama yapılan grupta daha fazla sayıda kript odağı geliştiği bildirilmektedir (Bird ve Good, 2000).

1.4.2 Genetik Kolon Kanseri Modelleri

Etilnitrosourea ile tedavi edilen C57BL/6J (B6) erkek farelerinin, AKR/J (AKR) dişileriyle çiftleştirildiğinde ortaya çıkan soy hattında bağırsağın tamamında tümöre yol açan mutasyon şekillendiği bildirilmektedir (Moser ve ark., 1990). Yapılan başka bir çalışmada Pirc rat türünde APC geninde mutasyonların meydana geldiği ve yüksek frekansta kolon kanserinin kendiliğinden şekillendiği bildirilmektedir (Amos-Landgraf ve ark., 2007). KAD rat türünde ise KRK kendiliğinden şekillenmediği, ancak kanserojen kimyasal ajanlara duyarlılığının fazla olduğu belirtilmektedir (Yoshimi ve ark., 2009).

1.5 Tarantula cubensis Alkolik Ekstraktı (TCAE)

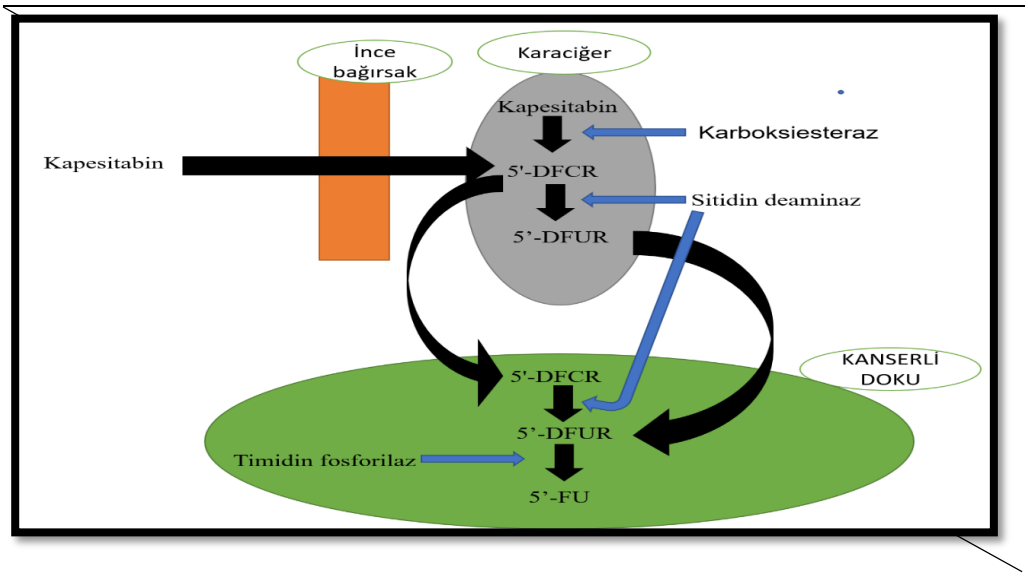
Homeopati, "benzeri benzerlerle tedavi edilmelidir" ilkesine göre çok düşük dozlu preparatlar kullanarak tedavi eden bir sistem olduğu ifade edilmektedir (O'Meara ve ark., 2002). Homeopati, yan etkilerinin azlığı, düşük maliyeti, kolay ulaşılabilirliği ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle 200 yılı aşkın süredir evrensel olarak kullanılan, zamanla test edilmiş, ampirik bir tedavi

sistemi olduğu ifade edilmektedir. Bu ilaçların aşırı seyreltmede ($>10^{400}$) de aktif olmaları bilim topluluğu tarafından kabul edilmesinin önünde aşılmaz engeller oluşturduğu belirtilmektedir. Bu yüzden bu ilaçların sadece plasebo etkisine sahip olduğu görüşüne yol açmaktadır (Nandy, 2015). Ancak homeopati ve plasebo kontrollü çalışmalar üzerine yapılan bir meta analiz çalışmasında, homeopatinin klinik etkilerinin tamamen plaseboya bağlı olduğu hipotezinin doğru olmadığı ifade edilmektedir (Linde ve ark., 1997). Homeopatik ilaçlar üretiminde kullanılan hammaddeler, özel bir yöntemle (potansiyalizasyon) işlenen bitki, mineral ve hayvanlardan (hayvan ve hastalık ürünlerinden) oluşmaktadır. Ham maddeler, ondalık ve yüzdelik oranlarla dilüe edildiği belirtilmektedir. Katılar laktoz ile toz haline getirilirken sıvılar ise su-alkol çözeltisi içinde ezilerek seyreltildiği bildirilmektedir (Bornhöft ve Matthiessen, 2011).

TCAE veteriner sahada kullanılan homeopatik üründür. Veteriner hekimlikte, genellikle kangren, septisemi, toksemi gibi durumlarda tedavi amacıyla kullanıldığı (Richardson-Boedler, 2002), oral lezyonların iyileşmesini (Albay ve ark., 2010) ve tendon kopmalarında onarımı hızlandırdığı rapor edilmektedir (Bonamin ve ark., 2015). Koyunlarda yapılan çalışmada antioksidan etki gösterdiği (Dik ve ark., 2014), invitro olarak kanser hücrelerini Kaspaz-3 yolağıyla apoptosize uğrattığı (Ghasemi-Dizgah ve ark., 2017), köpeklerde meme tümöründe klinik olarak olumlu etkilere neden olduğu (Gultekin ve Vural, 2007) ve bunu apoptosiz üzerinden yapabileceği (Gultiken ve ark., 2015), köpeklerde oral papillom tedavisinde başarılı olduğu (Icen ve ark., 2011) ve köpek meme adenokarsinomunda TCAE kullanımının Bcl-2 apoptosis regulator (Bcl-2) ve Ki-67 gen ekspresyonunu azalttığı ifade edilmektedir (Karayannopoulou ve Lafioniatis, 2016). Ayrıca mekanizması net olarak tanımlanamamakla birlikte, deneysel kolon kanserinde ACF ve polip oluşumunu azalttığı ifade edilmektedir (Er ve ark., 2019)

1.6 Kapesitabin

Kapesitabin, 1998 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Ajansı (FDA) tarafından onaylanan, timidilat sentazı inhibe etmek için seçilen bir ligand olan yeni oral adjuvan ve palyatif floropirimidin grubu ilaçların ön ilacıdır (Lou ve ark., 2016). Kapesitabin oral formulasyon şeklinde hazırlanmış KRK ve meme kanserlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-FU'e dönüşen prodrug olduğu belirtilmektedir (Midgley ve Kerr, 2009). Kapesitabin KRK ve meme kanserinde tek veya kombinasyon tedavi rejiminde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. Kapesitabin oral olarak alındıktan sonra bağırsaklardan hızlı bir şekilde emildiği ve sonrasında 5-FU'ya dönüştüğü rapor edilmektedir (Siddiqui ve ark., 2019). Safra yolu kanserlerinde kapesitabin kullanımının etkili olduğu ve yaşam kalitesinin arttırdığı ifade edilmektedir (Primrose ve ark., 2019). Atrasiklin, taksan veya her ikisini içeren standart neoadjuvan kemoterapiden sonra, adjuvan kapesitabin tedavisinin eklenmesi, patolojik testte rezidüel invazif hastalığı olan HER2 negatif meme kanserli hastalarda hastalıklı veya hastalıksız sağ kalımı uzatmada güvenli ve etkili olduğu belirtilmektedir (Masuda ve ark., 2017).



Şekil 1.2: Kapesitabinin üç aşamalı enzimatik aktivasyon işlemi

Kapesitabinin üç aşamalı bir enzimatik aktivasyon işleminden sonra etkin forma dönüştüğü belirtilmektedir (Şekil 1.2). Kapesitabin sırasıyla 5'-deoxy-5'-florositidin (5'-DFCR), 5'-deoksi-5'-florouridin (5'-DFUR) ve 5-florourasil (5-FU)'e dönüştüğü, sonrasında ise dihidro pirimidin dehidrojenaz tarafından floro-beta-alanin (FBAL) dönüşerek katabolize edildiği ifade edilmektedir (Midgley ve Kerr, 2009; Siddiqui ve ark., 2019). Ratlarda 5'-DFCR'den 5'-DFUR'a dönüşünde rol oynayan sitidin deamiaz enziminin maymunlara ve insanlara göre daha düşük seviyede olduğu belirtilmektedir (Shindoh ve ark., 2011). Ayrıca kapesitabinin tekrarlayan uygulamalarda enzim etkinliğinin ve metabolitlerinin plazma konsantrasyonlarının azaldığı ifade edilmektedir (Sakai ve ark., 2020).

Timidilat sentetaz deoksiüridin monofosfatın (dUMP) metillenerek deoksitimidin monofosfat'ın (dTMP) oluşumunda katalizör görevi olduğu belirtilmektedir. dTMP daha sonra fosforillenerek DNA sentezi için kullanılır. dTMP sentezinin DNA oluşumu için hız kısıtlayıcı bir basamak olduğu bildirilmektedir (Baskın ve Calıbaşı, 2011; Şeber, 2016). 5-FU'in timidin kinaz tarafından enzimatik dönüşümünde oluşan floro deoksiüridin monofosfat (FdUMP) timidin sentezinde hız sınırlayıcı basamak olan timidilat sentetazı inhibe ettiği ifade edilmektedir. Timidin olmadan deoksiribonükleik asit (DNA) sentezinin bozulduğu ve hücresel ölüm şekillendiği belirtilmektedir. Ayrıca, timidin fosforilaz (dThdPase) tarafından 5-FU'nun antimetaboliti olan floroüridin trifosfat (FUTP)'a dönüştürür. FUTP, ribonükleikasite (RNA) bağlanarak DNA sentezini inhibe ettiği ve bu şekilde hücreyi apoptozise uğrattığı ifade edilmektedir (Walko ve Lindley, 2005).

Böbrek yetmezliği olan kişilerde kapesitabin ve 5-FU'nun farmakokinetiği etkilenmezken %50'lik kreatinin klirensinin azalması 5'-DFUR ve FBAL'ın AUC seviyelerini %23 ve %109 artışa neden olduğu rapor edilmektedir (Poole ve ark., 2002). Kapesitabinden 5-FU'ya dönüşümden sonra dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) enzimi tarafından 5-FU, FUH2'ye ve ardından alphafluoro betaureido propionic acid (FUTA) ve FBAL'a katabolize edildiği ifade edilmektedir. Ayrıca FUH2, FUPA ve FBAL metabolitlerinin

antiproliferatif aktiviteye sahip olmadığı belirtilmektedir. Bu 3 aşamalı katabolik süreç, 5-FU'nun intravenöz olarak uygulandığında meydana gelenle aynı olduğu bildirilmektedir (Reigner ve ark., 2001).

5'-DFUR'dan 5-FU'ya dönüşümünü sağlayan dThdPase'ın, normal dokulara göre kanserli dokularda daha yüksek oranda bulunduğu belirtilmektedir. dThdPase enziminin kanserli dokularda yüksek oranda olması sayesinde, kapesitabinin 5-FU'ya daha etkili ve daha güvenli bir profile sahip olduğu belirtilmektedir (Miwa ve ark., 1998).

Kapesitabinin etkin formu olan 5-FU'e göre daha güvenli olduğu ve yan etkilerin gözlenme insidensinin daha az olduğu rapor edilmektedir. Bunun muhtemel mekanizmasının kapesitabinin 5-FU'e biyotransformasyonundan sorumlu olan üç enzimin, karaciğer ve tümör dokusunda ekspresyonunun daha fazla olması ve timidin fosforilaz enziminin tümör dokularında diğer dokulara göre yüksek miktarda olmasıyla açıklanabileceği belirtilmektedir (Schüller ve ark., 2000; Gross ve ark., 2003).

Kapesitabinin diyare, mide bulantısı, stomatit, hand−foot sendromu ve kusma gibi yan etkilere neden olduğu belirtilmektedir (Saif ve ark., 2008). Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından kapesitabinin kanserli hastalarda uygulama dozu 2500 mg/m^2/gün olarak belirtilmektedir. Ayrıca rat, fare ve maymunlarda 4 hafta süresince yapılan çalışmalarda maksimum tolere edilebilen dozun (MTD) sırasıyla 359, 198 ve 36 mg/kg/gün olduğu, ratlarda 26 hafta kapesitabin uygulandığında MTD'nin 180 mg/kg/gün olduğu ifade edilmektedir (EMA, 2005). Meme kanserli hastalarda yapılan çalışmada kapesitabinin dozu 2500 mg/m^2/gün olarak belirlense de 2000 mg/m^2/gün dozun daha güvenli olduğu ifade edilmektedir (Bajetta ve ark., 2005). Kapesitabin her 3 haftalık periyot içerisindeki 14 gün kullanılacak şekilde 2500 mg/m^2'lik bir dozda kullanılması gerektiği belir tilmektedir. Ancak bu doz seviyesinde toksisitenin arttığı bildirilmektedir. Bu yüzden metastatik kolorektal kanser (mCRC) için oksaliplatin ile kullanıldığında günde iki kez 850 veya 1000 mg/m^2'lik başlangıç dozlarında kullanımı önerilmektedir. Ayrıca monoterapide günde iki kez 1000–

1250 mg/m^2 kullanılması önerilmektedir. Rektum kanserlerinde ise eşzamanlı radyasyon tedavisiyle birlikte önerilen dozun günde iki kez 850 mg/m^2 olabileceği ifade edilmektedir (Hirsch ve Zafar, 2011).

Yapılan kaynak taramalarında deneysel kolon kanseri oluşturulmuş ratlarda tekrarlayan dozlarda kapesitabin uygulaması hakkında yeterli bilgiye erişilememektedir.

1.7 Apoptoz Mekanizması

Apoptoz; inflamasyon olmadan, genler tarafından düzenlenen, RNA, protein sentezi ve enerji harcanan, hücrelerin programlı bir şekilde ölerek, organizmada homeostazın sağlanmasında rol alan bir mekanizma olduğu bildirilmektedir. Apoptoz'un kaspazlar, apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) proteinleri ve Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından meydana geldiği ifade edilmektedir (Tomatır, 2003). DNA hasarına bağlı olarak p53 proteini aktif hale gelerek hücrede temelde 4 farklı programa yönlendirmektedir:

1) Hücre siklusunun durdurulması,
2) DNA hasarının tamiri,
3) Anjiyogenezin uyarılması ve hücre yaşlanmasının inhibisyonu
4) Bax, NOXA ve PUMA üzerinden hücrenin apoptosize yönlendirilmesidir (Toma-Jonik ve ark., 2019).

Apoptosizin son aşamasında hücre içi hayati öneme sahip proteinleri parçalayan sistein proteazların (Kaspaz) aktif hale geldiği ifade edilmektedir. Bcl-2, hücre ölümü ve yaşamını düzenleyen büyük bir protein ailesindendir. Bcl-2 familyası proteinleri mitokondri aracılı apoptotik yolakta önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Apoptosizi başlatan proapoptik proteinler BIM, BID, PUMA, NOXA, BAD, HRK, BMF ile BIK, antiapoptotik proteinlerin ise Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, A1/BFL-1 ile Bcl-B ve proapoptik proteinler ise Bax ve Bak olduğu ifade edilmektedir (Adams ve Cory, 2018).

Bcl-2 ailesi temelde 3 gruba ayrılmaktadır;

(a) Antiapoptotik veya prosurvival Bcl-2 proteinleri (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1): Proapoptotik Bcl-2 proteinlerini bağlayarak ve inhibe ederek hücre ölümünü baskılamaktadır.

(b) Proapoptotik efektör proteinler (Bax ve Bak): Mitokondriyal dış zar geçirgenliğini artırmaktadır.

(c) BH-3 proteinleri: Hücresel stresi algılamak ve apoptozu başlatmak için evrimleşmişlerdir. Yalnızca BH3 proteinleri, Bax ve Bak ile doğrudan etkileşime giriyor ve onu aktive ediyorlarsa "doğrudan aktivatörler" veya tiyapoptotik proteinleri bağlayıp doğrudan aktivatörleri onlardan uzaklaştırıyorlarsa "duyarlılaştırıcılar" olarak ayrıca sınıflandırılmaktadır (Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

Kaspazlar: Apoptik başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak iki kategoriye ayrıldığı rapor edilmektedir (Wu ve ark., 2014). Kaspazların intrinsik veya ekstrinsik apoptosiz yolaklarını tetiklenmesi ile biyolojik etkinlik gösterdiği belirtilmektedir. Bcl-2'nin intrinsik apoptosiz yolağından sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Kaspaz-9'un, yaşamsal hücresel proteinleri parçalayan ve hücresel yıkımı sağlayan efektör kaspazları (3, 6 ve 7) aktive ettiği bildirilmektedir (Adams ve Cory, 2018).

Mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak, sitokrom C ve apoptoz indükleyici faktör (AIF)'ın sitoplazmaya salındığı ve sitokrom C'nin aşağı yönlü kaspazları aktive ettiği, bunula birlikte Bcl-2 ailesinin ekspresyonunun azaldığı, Bax ve BAD ekspresyonun artmasıyla prokaspaz-9 ve prokaspaz-3'ün protein ekspresyonu arttığı ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra poli [ADP-riboz] polimeraz 1 (PARP 1) ekspresyonunun artmasının DNA kırılmalarını indüklediği bildirilmektedir (Wu ve ark., 2016). Sonuç olarak mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak apoptoz mekanizmaları devreye girmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda Kaspaz-3'ün otofajik ve apoptik sistemler arasında crostalktan sorumlu olduğu vurgulanmaktadır (Wu ve ark., 2014). Hücre iç dengenin (pH, kalsiyum (Ca^{++}), vb.), bozulmasına, yeterince growth faktör

alamama ve/veya DNA hasarına bağlı olarak apoptosiz mekanizmaları devreye girdiği ifade edilebilir. BID'ın proapoptik bir protein olduğu ve antiapoptik olan Bcl-2'yi inhibe, proapoptik olan BAD ve Bax'ın süper familyasını ise aktif hale getirerek hücreyi apoptosize yönlendirdiği ifade edilmektedir. BAD ve Bax apoptik olan Second mitochondria-derived activator of caspase (Smac), Endonukleaz-G (Endo-G), Ca^{++} ve AIF salınımını artırdığı ifade edilmektedir (Coşkun ve Özgür, 2014). IAP kaspaz 3 ve 9 inaktivasyonunu sağlayarak antiapoptik etkinlik gösterdiği belirtilmektedir (Adams ve Cory, 2001).

1.8 Anormal Kript Odağı (Aberrant crypt foci-ACF)

ACF kolona özgü kanserojen maddeler uygulanan rodentlerde kolonun metilen mavisiyle boyanmasıyla gözlenmiştir. İlk olarak 1987 yılında AOM uygulanan farelerde bildirilmektedir (Bird, 1987). 1991 yılında ise insan KRK hastalarının kolon dokusunun metilen mavisiyle boyanmasında benzer kriptlerin şekillendiği ve KRK erken tanısında önemli olacağı rapor edilmektedir (Pretlow ve ark., 1991).

ACF normal mukozanın üzerinde mikroskobik olarak yükselmiş, aşırı kalınlaşmış epitelden oluşan ve etrafındaki normal kriptlerden belirgin olarak ayrılan değişmiş lümen açıklıklarına sahip kriptlerden oluştuğu ifade edilmektedir (Alrawi ve ark., 2006). ACF'nin deneysel KRK çalışmalarında önemli bir parametre olduğu ifade edilmektedir. Hayvanlara karsinojenlerin uygulanma sıklığı, ACF'nin sayısını ve büyüme özelliklerini etkilediği belirtilmektedir. ACF'nin kolon karsinogenezine özgü olduğu sayısı ve büyüme özelliklerinin zamanla arttığı ifade edilmektedir (Bird ve Good, 2000). DMH ile indüklenen kolon kanserli ratlarda yapılan çalışmada, ACF'lerdeki 3'ten büyük kript sayısı 4. haftada 28.4 iken, 30. haftada 280.4 yükseldiği ifade edilmektedir (Rodrigues ve ark., 2002). AOM uygulanmış ratlara yağlı diyet uygulandığında %53 oranında ACF'lerin arttığı belirtilmektedir (Clapper ve ark., 2020).

1.9 Hipotez ve Amaç

Bu çalışmada TCAE (Ghasemi-Dizgah ve ark., 2017) ve kapesitabinin (Stintzing ve ark., 2017) bireysel olarak bazı kanser türlerinde etkili olduğu dikkate alındığında, KRK'li ratlarda TCAE'nin ve kapesitabin'in kombine kullanımda mitokondriyal disfonksiyona bağlı apoptoz ve ACF üzerine etkilerinin monoterapiye göre artacağı hipoteze edildi**.**

Günümüzde KRK türü beşerî hekimlikte başlıca ölüm nedenleri arasında bulunmakla birlikte veteriner hekimlikte pet hekimliğinde de ölüm nedenleri arasında bulunmaktadır. Tedavisinde cerrahi ve medikal uygulamalar bulunmakla birlikte, alternatif tedavi yöntemleri de uygulanmaktadır. Medikal amaçlı kemoterapötik ajan olarak kapesitabin sıklıkla kullanılır. Veteriner hekimlikte TCAE homeopati amaçlı birçok hastalıkta kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda kanser vakalarında da olumlu sonuçlar verdiği belirlenmektedir.

Bu çalışma deneysel kolon kanseri uygulanmış ratlarda kapasitabinin ve TCAE'nin kombine kullanımında ACF skoru ve Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Hayvan Materyali

Hayvan materyali: Araştırmada Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 96 adet erkek Wistar Albino ırkı (12-16 haftalık, 220-250 g) rat kullanıldı. Hayvanlar çalışma öncesi bir hafta adaptasyon süreci için bekletildi. Çalışma süresince hayvanlar polisulfon yapıdaki kafeslerde, 24±1^{o}C, %60 atmosferik nemli ve ışığın 12 saat aydınlık/12 saat karanlık sağlandığı ortamda barındırıldı. Yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak sağlandı.

2.2 Deneysel Dizayn ve Hayvan Uygulamaları

Metot: Çalışmada 96 adet erkek rat her grupta 12 hayvan olacak şekilde 8 gruba ayrıldı. Kanser gruplardaki hayvanlara azoksimetan (AOM) uygulandığı gün sağlıklı gruplardaki hayvanlara ise serum fizyolojik (SF) uygulandı.

1-Sağlıklı Kontrol (K, n:12): Hayvanlara 18 hafta boyunca herhangi bir ilaç veya kimyasal uygulaması yapılmadı ve negatif kontrol grubu olarak değerlendirildi.

2- Kanser Kontrol (KRK, n:12): Hayvanlara subkutan (SC) yolla 15 mg/kg dozunda bir hafta ara ile 2 uygulama şeklinde AOM (Azoxtmehane Sigma-Aldrich, Almanya) uygulandı.

3- Sağlıklı TCAE (K + TCAE, n:12): Hayvanlara 15. haftadan itibaren TCAE (Theranekron D6 enj®, Richter pharma AG, Avusturya) 0.2 ml/rat SC dozunda 3 gün ara ile 4 hafta uygulandı (Er ve ark., 2019).

4- Kanser TCAE (KRK + TCAE, n:12): AOM hayvanlara15 mg/kg SC dozunda bir hafta ara ile 2 sefer uygulandı. 15 haftadan itibaren TCAE 0.2 mL/rat SC dozunda 3 gün ara ile 4 hafta uygulandı.

5-Sağlıklı Kapesitabin (K + Kapesitabin, n:12): Hayvanlara 15 haftadan itibaren kapesitabin (Kapeda tablet, Koçak Farma, Türkiye) 40 mg/kg/gün dozunda gavaj yolu ile 4 hafta uygulandı.

6- Kanser Kapesitabin (KRK + Kapesitabin, n:12): Hayvanlara15 mg/kg SC dozunda bir hafta ara ile 2 uygulama şeklinde AOM uygulandı. 15 haftadan itibaren kapesitabin 40 mg/kg/gün dozunda gavaj yolu ile 4 hafta uygulandı

7-Sağlıklı Kombine (K + Kapesitabin + TCAE, n:12): Hayvanlara 15 haftadan itibaren TCAE 0.2 mL/rat SC dozunda 3 gün ara ile ve kapesitabin 40 mg/kg/gün dozunda gavaj yolu ile 4 hafta uygulandı.

8- Kanser Kombine (KRK + TCAE + Kapesitabin, n:12): Bu gruptaki hayvanlar SC yolla 15 mg/kg dozunda bir hafta ara ile 2 doz şeklinde AOM uygulandı. 15 haftadan itibaren TCAE 0.2 mL/rat SC dozunda 3 gün ara ile kapesitabin ise 40 mg/kg/gün dozunda gavaj yolu ile 4 hafta uygulandı.

Tüm gruplardaki hayvanların ilk AOM uygulanmadan önce ve ötanazi öncesinde ağırlıkları ölçüldü ve grupların toplam ağırlıkları kayıt altına alındı.

Gruplarda bulunan hayvanlar son uygulamadan 1 saat sonra ketamin (95 mg/kg, SC) + ksilazin (5 mg/kg, SC) anestezisine alınarak servikal dislokasyon yolu ile sakrifiye edildi. Sakrifikasyonu takiben tüm gruplardan kolon dokuları alındı. Elde edilen kolonlar uzunlamasına açılarak serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra proksimal, median ve distal bölgelerinden Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) analizi için doku örnekleri alınarak hemen sıvı nitrojen içerisinde dondurulduu ve –80°C'de muhafaza edildi. Geriye kalan doku parçası ise patolojik inceleme için %10 formaldehid ile fikse edildi.

2.3 Moleküler Analizler

RT-PZR analizi için tüm gruplardan rastgele 6 hayvana ait kolon dokuları kullanıldı. Tüm kolonu temsil etmesi amacıyla kolonun proksimal, distal ve median kısımlarından eşit miktarlarda örnekler alındı

2.3.1 Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için ticari bir firmanın total RNA izolasyon kiti (Biobasıc, ABD) kullanıldı. Ticari kit miRNA Extractor, RPE Soluon, RNase-free water, Spin Column TR with Collecon Tube, Components Spin Column MR with Collecon Tube ve Protocol'den oluşmaktadır.

Kit prosedürüne göre;

1. –80°C'de muhafaza edilen her 3 grup örnekten belirli miktarlarda doku alındı (toplam 60-90 mg) ve miRNA Extractor buffer bulunan ependorflara konularak el homojenizatörü (İsolab, Turkey) ile homojenize edildi. Sonrasında 5-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
2. Örneklere 0.2 ml kloroform eklenerek, 30 saniye süresince vortekslendi. Sonrasında 4°C'de 10 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüj edildi.
3. Süpernatant kısmı (yaklaşık 500 µl) temiz 1.5 ml RNaz içermeyen ependolflere aktarılarak, 1,5 katı hacimde (genellikle 750 µl) %100 etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
4. Çözelti Spin Column TR'ye aktarılarak, 12.000 × g'de 2 dakika santrifüje edildi. Altta kalan kısım atıldı.
5. Spin column TR'ye 0.5 ml RPE solüsyonu eklenerek, 12.000 × g'de 30 saniye santrifüje edildi ve altta kalan kısım atıldı. Bu işlem 2 sefer tekrarlandı.
6. Spin column TR yeni bir 1.5 ml ependorfa yerleştirilerek 50 µl RNaz free water eklenerek 2 dakika bekletildi. Sonrasında 12.000 × g'de 30 saniye santrifüje edilen RNA solüsyonu -80°C'de saklandı.

2.3.2 RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

Nanodrop yardımıyla RNA kalitesinin ve miktarının belirlenmesi

Total RNA'nın kalitesinin belirlenmesi amacıyla nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000c Spectro photo meters, ABD) kullanıldı. Cihaz RNA okuma modunda dietilpirokarbonatlı bidistile su (DEPC-ddH_2O) ile blank alındıktan sonra 2 µl Total RNA cihazın okuma yüzeyine konularak ölçüm yapıldı. RNA kalitesini belirlemek amacıyla A260/A280 ve A260/A230 oranları değerlendirildi. Oranlar sırasıyla 2±0.1 ve 1,8-2,2 arasında olan total RNA örneklerinin complementary DNA (cDNA)'ya çevrilmek üzere verileri kayıt altına alındı. Belirtilen oranların arasında olmayan total RNA'ların izolasyon işlemi yenilenerek ölçümler tekrarlandı.

2.3.3 Revers Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu

İzole edilen total RNA'lar için ticari bir firmanın cDNA kiti (Bio-Rad, ABD) kullanıldı. cDNA sentez kitine göre total RNA'dan 1 µg iScript reaksiyon karışımından 4 µL ve iScript Reverse Transkriptazdan 1 µL eklendi. Reaksiyon volümü DEPC-ddH_2O ile 20 µL'ye tamamlandı. Thermal Cycler (Bio-Rad, ABD) Tablo 2.1'e göre ayarlandı. Reaksiyon sonrasında örnekler -20 °C saklandı.

Tablo 2.1: Thermal Cycler cDNA sentez aşamasındaki ısı ve süreleri.

Aşamalar	Süre	Isı derecesi
Priming	5 dk	25 °C
Reverse transkripsiyon	20dk	46 °C
Reverse transkripsiyon inaktivasyonu	1dk	95 °C

2.3.4 Primerlerin belirlenmesi

Projede kullanılacak primerlerin (Rattus norvegicus BCL2 associated X, apoptosis regulator (Bax), Rattus norvegicus BCL2, apoptosis regulator (Bcl-2), Rattus norvegicus caspase 3 (Kas-3), Rattus norvegicus caspase 9 (Kas-9) ve glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA bilgileri ve dizileri literatürlerden alındı. Primerlere ait tüm bilgiler Tablo 2.2 ve Tablo 2.3'te sunuldu. Ayrıca çalışmada kullanılacak genlerin mRNA ve DNA dizi bilgileri Gen Bankası üzerinden (http://www. ncbi. nlm. nih. gov) kontrol edildi. Primerlerin mRNA sekansları Primer Blast (http://www. ncbi. nlm. nih. gov/tools/) ve Oligo7 primer dizayn programları ile kontrol edildi. Primerlerin dimer oluşturmamasına ve rat için istenilen bölge dışındaki bir bölgeyi çoğaltmamasına dikkat edildi. Tasarlanan PZR primerleri ticari firmadan (Oligomer Turkey) temin alındı.

Tablo 2.2 çalışmada kullanılan primerlerin referansları ve NCBI Accession No.

Gen İsmi	Referans	NCBI Accession No.
Bax	(Dik ve ark., 2018)	NM_017059.2
Bcl-2	(Dik ve ark., 2018)	NM_016993.1
Kas-3	(Chen ve ark., 2015)	NM_012922.2
1.Kas-9	(Chen ve ark., 2015; Liang ve ark., 2019; Wang ve ark., 2020)	NM_031632.1
2.Kas-9	(Yan ve ark., 2009)	
GAPDH	(Li ve ark., 2018)	NM_017008.3

Tablo 2.3. Primerlerin gen isimleri, simgeleri, dizileri ve ürün boyutları (bp).

Gen İsmi	Simgesi	Primer Dizisi	bp
Bax	Bax-F	GAGAGGTCTTCTTCCGTGTG	133
	Bax-R	ATCAGCTCGGGCACTTTAG	
Bcl-2	Bcl-2-F	TGGTACCTGCAGCTTCTTTC	131
	Bcl-2-R	ATCTCCAGTATCCCACTCGTAG	
Kas-3	Kas-3-F	GAGACAGACAGTGGAACTGACGATG	176
	Kas-3-R	GGCGCAAAGTGACTGGATGA	
1.Kas-9	1.Kas-9-F	CTGAGCCAGATGCTGTCCCATA	148
	1.Kas-9-R	GACACCATCCAAGGTCTCGATGTA	
2.Kas-9	2.Kas-9-F	AGCCAGATGCTGTCCCATAC	148
	2.Kas-9-R	CAGGAACCGCTCTTCTTGTC	
GAPDH	GAPDH-F	ACGGCAAGTTCAACGGCACAG	146
	GAPDH-R	GACGCCAGTAGACTCCACGACA	

2.3.5 Primerlerin Sulandırılması ve Primer Etkinliğinin Belirlenmesi

Ticari firmadan gelen liyofilize primerler 100 pMol/µL oranında olacak şekilde DEPC-ddH_2O ile sulandırıldı. Her genin forward ve revers primerleri 1/1 oranında karıştırılarak primer alt stoğu hazırlandı. Tüm primerler -20°C'de saklandı.

Çalışmadaki tüm cDNA örneklerinden 2 µL alınarak cDNA havuzu oluşturuldu. cDNA havuzu 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 oranında dilüe edildi. Her primer için RT-PZR (Bio-Rad, ABD) yapılarak primer etkinliği hesaplandı.

2.3.6 Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT-PZR için her gruptan 6 hayvana ait dokulardan elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Proje kapsamında kapesitabin ve TCAE'nin tek ve/veya kombine kullanımda Bax, Bcl-2, Kas-3 ve Kas-9 genleri üzerine etkileri değerlendirildi. Bu amaç doğrultusunda çift iplikçikli DNA'ya bağlanabilen Syber Green (BioRad, iTaq™ universal SYBR® Green, ABD) kullanıldı. Bu amaçla GAPDH geni housekeeping olarak seçildi. Çalışma için gerekli PZR karışımı Tablo 2.4'te belirtildi. RT-PZR için uygulanan prosedür ise Tablo 2.5'te belirtildi. Optik ölçümler her döngüde 72°C uzama safhasından sonrasında cihaz (Bio-Rad, ABD) tarafından otomatik olarak belirlendi. En son safhada ise erime eğrisi (melting curve) oluşturmak için 65-95 °C arasında her siklusta 0,5°C artırımlar yapılarak optik ölçümler yapıldı. Negatif kontrol için Nuclease-Free Water (NFW) konuldu. RT-PZR'da kontrol amacıyla hem cDNA mix hem de PZR karışımı üzerinden optik ölçümler yapıldı.

Tablo 2.4: PZR karışımın hazırlanması.

SYBR green	5 µL
Örnek cDNA	100 ng
Reverse ve forward Primer	500 nM
NFW	10 µL'ye tamamlandı

Tablo 2.5: RT-PZR protokolü.

	Polimeraz aktivasyonu	Amplifikasyon (40 döngü)			Meltcurve analizi
		Denaturasyon	Annealing		
Sıcaklık	95°C	95 °C	Primer TM	72°C	65-95 °C arasında 0,5 °C artarımlar
Süre	30 sn	15 sn	30 sn	30 sn+ optik ölçüm	

2.4 ACF Analizi

Hayvanlar ötanazi edildikten sonra kolon dokuları serum fizyolojikle yıkandı. Sonrasında %10'luk formaldehit ile fikse edilerek metilen mavisi (%0,2) ile boyandı. ACF skoru, ışık mikroskobu (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) altında değerlendirildi. ACF skoru her rat kolonunda rastgele 50 ACF sayıldı ve skorlandı. Skor 1: 1–3 kript, skor 2: 4–6 kript, skor 3: 7–9 kript ve skor 4: ≥ 10 kript (Kristiansen, 1996; Al-Henhena ve ark., 2015).

2.5 İstatiksel Analiz

Yapılan RT-PZR sonuçları GAPDH housekeeping geni ile normalize edildi. Normalizasyon sonrasında $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ formülüyle (Livak ve Schmittgen, 2001) kat artışı hesaplandı. Genlerdeki kat artışları ve hayvan ağırlıkları ANOVA ve posthoc test olarak Tukey's testi ile değerlendirildi. ACF'lerdeki kript sayı ve skorları ise Mann-Withney U testi ile değerlendirildi (SPSS 22.0). Çalışmanın önemlilik derecesi $p<0.05$ olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1 Hayvan Materyali

Çalışma sırasında, KRK+TCAE grubunda 1 hayvan öldü ve KRK+TCAE grubu 11 hayvan üzerinden devam etti. Ölen hayvanın nekropsisinde kanser veya ilaca bağlı herhangi bir semptom görülmedi.

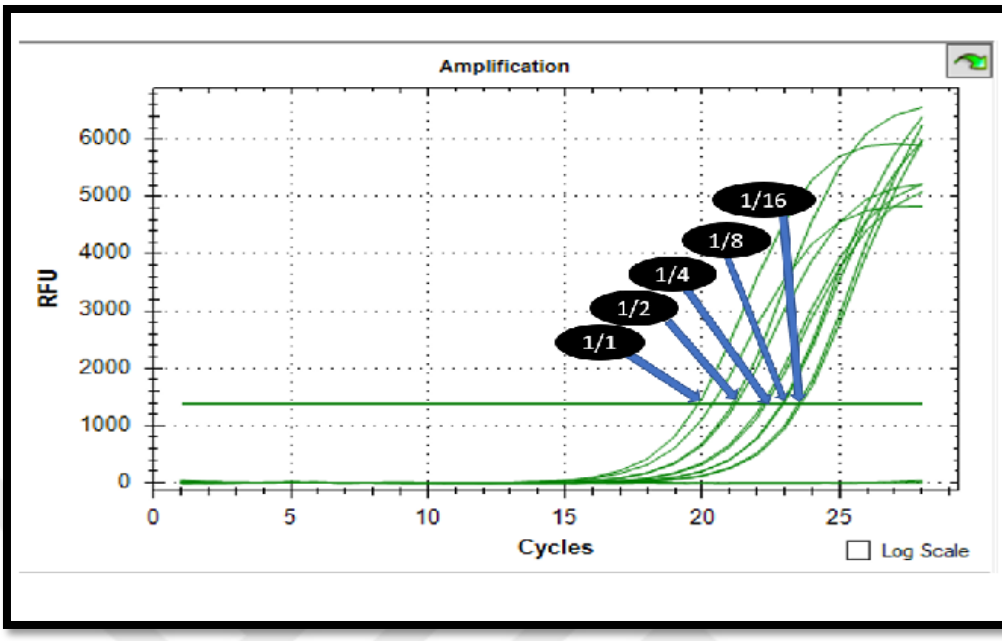
3.2 Gen Ekspresyon Analizlerinin Sonuçları

3.2.1 Primer etkinliğinin belirlenmesi

Her cDNA örnekten 2 µL alınarak çalışmayı temsil etmesi amacıyla cDNA havuzu oluşturuldu. Pool 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 oranlarında sulandırılarak seri dilüsyonları hazırlandı. Her primer için RT-PZR yapıldı (Şekil 3.1).

Dilusyonların okunduğu cycle threshold (ct) değerlerinden lineer bir doğru oluşturacak şekilde grafik çizildi ve grafiğin eğimi primerlerin etkinliğinin belirlenmesinde kullanıldı. Primer etkinlikleri $10^{-(1/Eğim)}$ formülü kullanılarak hesaplandı ve Tablo 3.1'de sunuldu. GAPDH, Bax, Bcl-2 ve Kas-3 için sırasıyla 2.23, 2.04, 1,83 ve 1,96 olarak hesaplandı. Her 2 Kas-9 primeri için yapılan primer etkinliği analizlerinde melting curve analizlerinde primerlerin aynı bölgeyi çoğaltmadığı belirlendi. Bununla ilgili melting curve (erime eğrisi) analiz grafikleri Grafik 3.1 de sunuldu. Kas-9 geni yukarıda belirtilen soruna bağlı olarak çalışmadan çıkarıldı ve çalışma Bax, Bcl-2 ve Kas-3 üzerinden değerlendirildi.

Sekil 3.1: Temsili primer etkinliğinin belirlenmesinde aplifikasyon eğrisi.

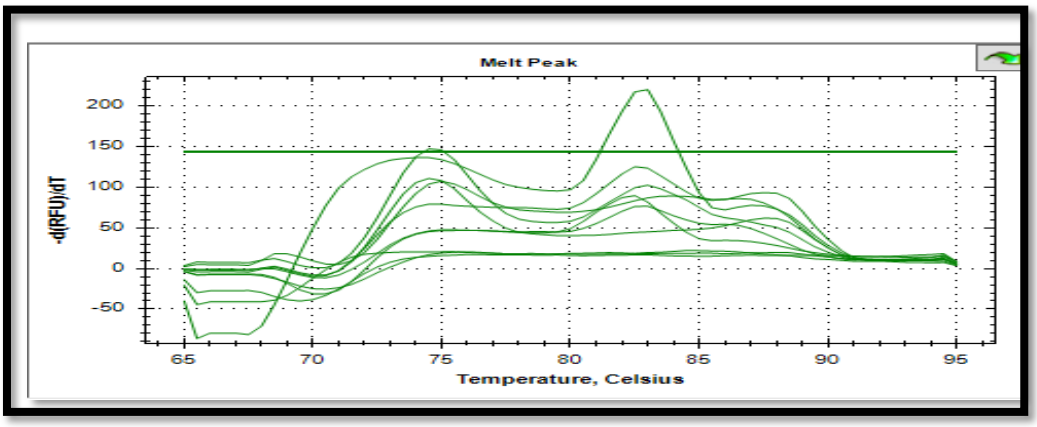


Tablo 3.1: çalışmada kullanılan primer etkinlikleri.

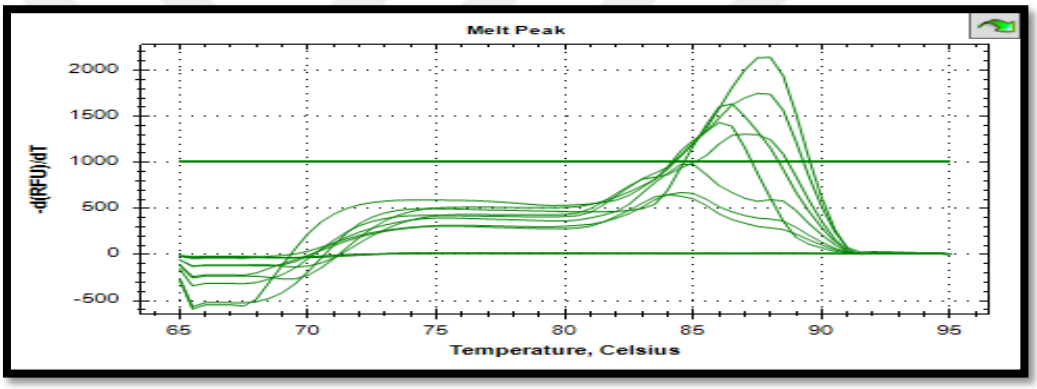
Primeler	Eğim	R^2	Primer etkinliği
GAPDH	-3,010	0,973	2,15
BAX	-3,24	0,9908	2,04
BCL2	-3,8202	0,9841	1,83
Kas3	-3,7305	0,9928	1,96
Kas9	-	-	-

Primer etkinlikleri $10^{-(1/Eğim)}$ formülüyle hesaplandı.

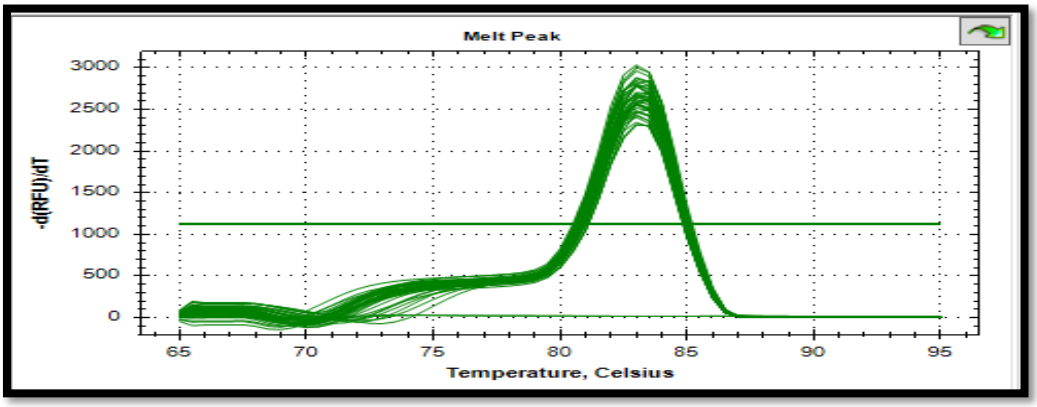
Grafik 3.1. Melting curve analizlerinde hatalı çıkan primerler ve istenilen melt curve görüntüsü.



A



B



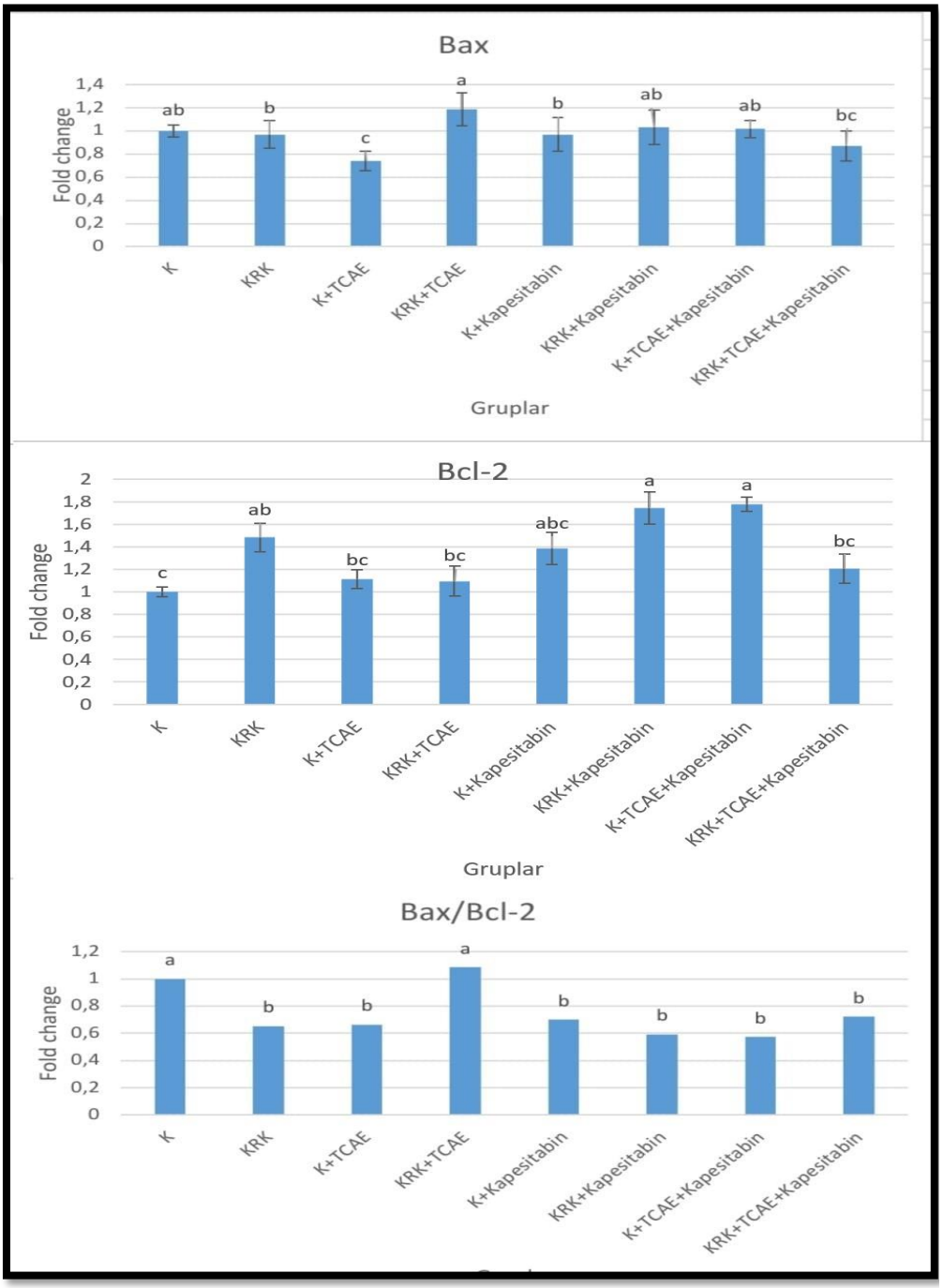
C

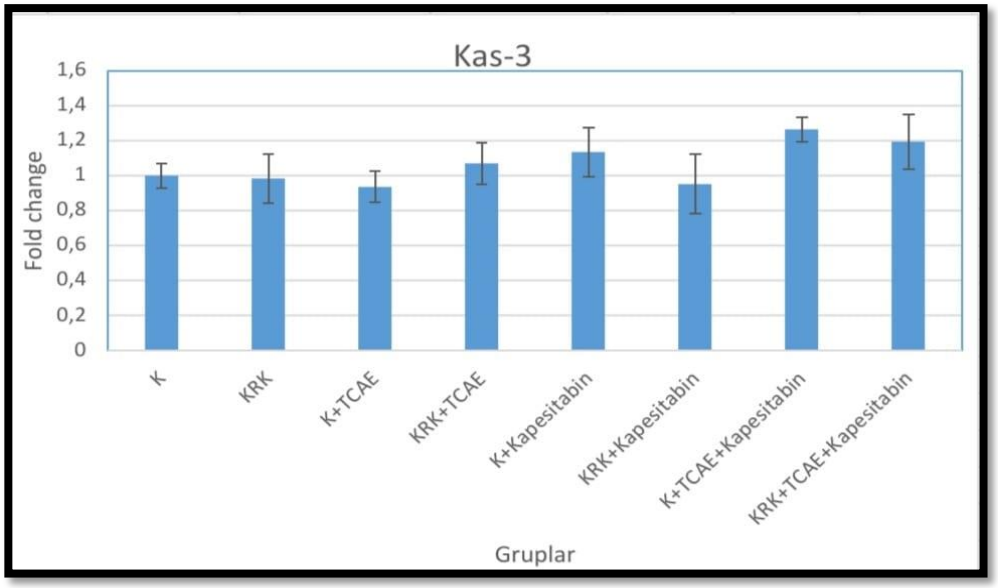
A:1. Kas-9, B: Kas-9 C: istenilen melt curve grafiği.

3.2.2 Bax, Bcl-2 ve Kas-3 RT-PZR sonuçları

Oluşturulan cDNA'lardan yapılan RT-PZR sonuçları ve Bax/Bcl-2 oranları kat artışı şeklinde Grafik 3.2 de sunuldu.

Grafik 3.2: RT-PZR sonuçlarına göre katlanma oranları ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ±SE of Mean of log).





K: Sağlıklı kontrol, KRK: Kanser kontrol, K + TCAE: Sağlıklı TCAE, KRK + TCAE: Kanser TCAE, K + Kapesitabin: Sağlıklı kapesitabin, KRK + Kapesitabin: Kanser kapesitabin, K + Kapesitabin + TCAE: Sağlıklı kombine, KRK + TCAE + Kapesitabin: Kanser kombine. [a, b, c]: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir ($P<0.05$).

Yapılan bu çalışmada Bax ekspresyonunun K grubuna göre K + TCAE grubunun daha az KRK+ TCAE grubunun ise daha fazla kat artışı olduğu bulundu ($P<0.05$, Grafik 3.2). Ayrıca KRK ve K + Kapesitabin gruplarının K + TCAE göre yüksek KRK + TCAE grubuna göre ise düşük olduğu gözlendi ($P<0.05$, Grafik 3.2). KRK + TCAE + Kapesitabin grubunun ise KRK + TCAE grubuna göre daha az ve KRK + Kapesitabin, K + Kapesitabin + TCAE gruplarının K + TCAE grubuna göre daha yüksek kat artışı elde edildi ($P<0.05$, Grafik 3.2).

Bcl-2 geninde ise K grubuna göre KRK, KRK + Kapesitabin ve K + Kapesitabin + TCAE gruplarında artışların meydana geldiği belirlendi ($P<0.05$, Grafik 3.2). Ayrıca KRK + Kapesitabin ve K + Kapesitabin + TCAE gruplarındaki artışların K + TCAE, KRK + TCAE ve KRK + TCAE + Kapesitabin gruplarından da fazla olduğu gözlendi ($P<0.05$, Grafik 3.2). Kas-3 geninde ise gruplar arasında istatistiki fark belirlenmedi ($P>0.05$, Grafik 3.2).

Bax/Bcl-2 oranın ise K grubuna göre KRK + TCAE hariç tüm gruplarda azaldığı belirlendi (P<0.05, Grafik 3.2).

3.3 ACF ve Makroskobik Bulgular

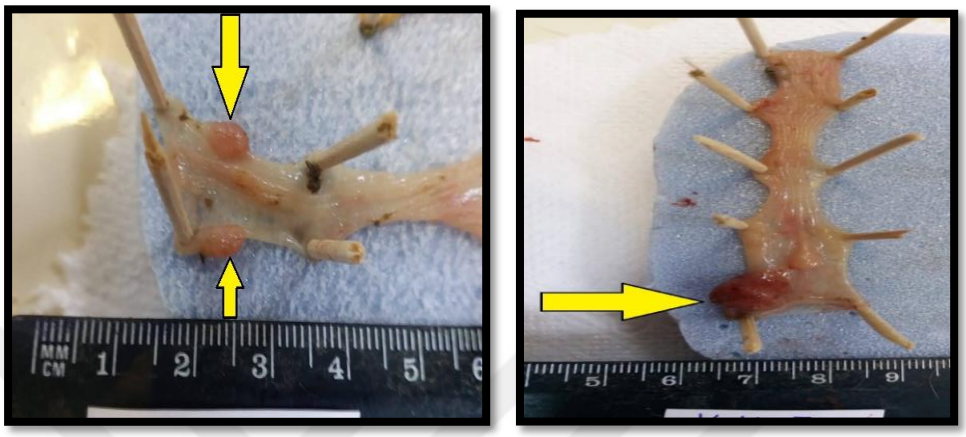
Bu çalışmada sağlıklı gruplardaki ratların kolon dokusunda ACF gözlenmedi. Ancak AOM uygulanan tüm gruplarda ACF gözlendi. Bu çalışmada metilen mavisiyle boyanan kolon dokularında ACF skorları ve ACF'yi oluşturan kript (Şekil 3.3) sayıları Tablo 3.2'de sunuldu. Skorlama her rat kolonunda 50 adet ACF sayılarak yapıldı. KRK grubuna göre tedavi gruplarının hepsinde ACF'leri oluşturan kript sayısının benzer oranda azaldığı tespit edildi (P<0.05, Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Gruplar arasındaki ACF sayıları.

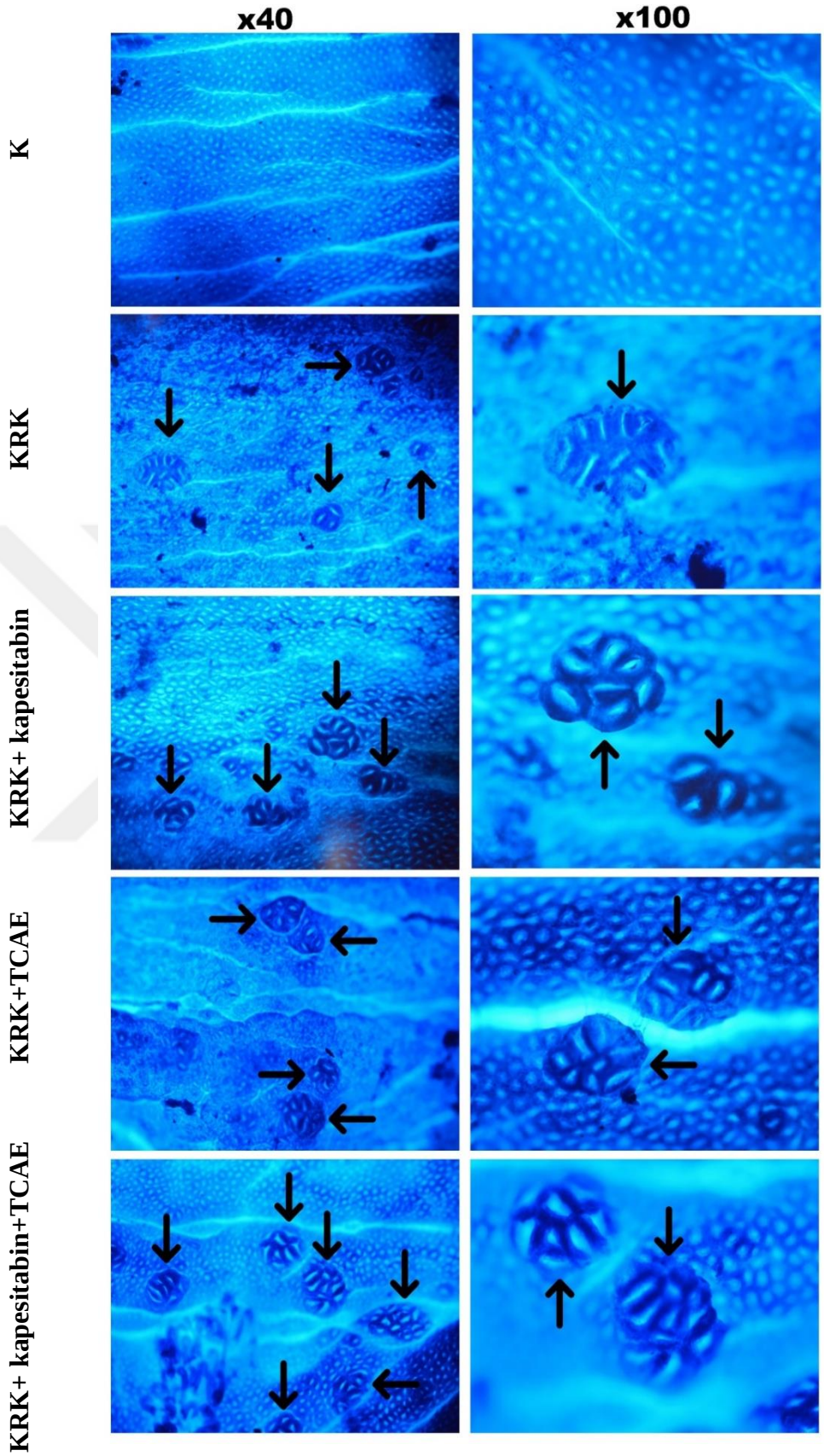
Grup	KRK	KRK + TCAE	KRK + Kapesitabin	KRK + TCAE + Kapesitabin
Skor median (Mean±SE)	2^a (2.31±0.05)	2^b (1.79±0.05)	2^b (1.71±0.04)	2^b (1.72±0.04)
Kript sayısı median (mean±SE)	5^a (5.85±0.15)	4^b (4.54±0.15)	4^b (4.30±0.15)	4^b (4.19±0.15)

KRK: Kanser kontrol, KRK + TCAE: Kanser TCAE, KRK + Kapesitabin: Kanser kapesitabin, KRK + TCAE + Kapesitabin: Kanser kombine. $^{a, b}$: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (P<0.05).

Yapılan çalışmadaki kanser gruplarındaki bazı hayvanlarda çıplak gözle gözlenebilen kanser polipleri tespit edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Farklı gruplarda gözlenen kanser polipleri (sarı ok; kanser polip).



Şekil 3.3: Metilen mavisi ile boyanmış kolon dokusunda ACF (oklar) ve kript görünümü.

3.4 Hayvan Ağırlıkları

Tüm gruplardaki hayvanların ilk AOM uygulanmadan önce ve ötanazi öncesinde ağırlıkları ölçüldü ve grupların toplam ağırlıkları kayıt altına alındı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Hayvanların canlı ağırlıkları (mean±SE).

Gruplar	Başlangıç	Bitiş
K	269,16±9,92	552,91±14,47[a]
K + TCAE	273,16±6,29	510,16±13,79[ab]
K + Kapesitabin	271,83±3,90	557,66±14,67[a]
K + TCAE + Kapesitabin	270,00±0,69	534,00±15,52[ab]
KRK	268,66±12,09	504.83±12.49[ab]
KRK + TCAE	272,83±7,72	481,09±15,86[b]
KRK + Kapesitabin	272,33±5,23	508,50±21,56[ab]
KRK+TCAE+ Kapesitabin	270,66±2,58	506,58±19,06[ab]

K: Sağlıklı kontrol, KRK: Kanser kontrol, K + TCAE: Sağlıklı TCAE, KRK + TCAE: Kanser TCAE, K + Kapesitabin: Sağlıklı kapesitabin, KRK + Kapesitabin: Kanser kapesitabin, K + Kapesitabin + TCAE: Sağlıklı kombine, KRK + TCAE + Kapesitabin: Kanser kombine. [a,] [b]:Aynı satırdaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir ($P<0.05$).

İstatistiki olarak grupların ağırlıkları değerlendirildiğinde çalışma başlangıcında gruplarda fark yoktur ($P>0.05$, Tablo 3.3). Araştırmanın sonunda ise diğer gruplara göre KRK + TCAE grubunun ağırlığının, sağlıklı kontrol ve sağlıklı kapesitabin gruplarına göre düşük olduğu belirlendi ($P<0.05$, Tablo 3.3).

4. TARTIŞMA

Kanser günümüzün en önemli ölüm nedenleri arasındadır. KRK'nin ise dünyada en fazla gözlenen kanser türlerinden biri olarak ve ciddi mortaliteye neden olduğu bilinmektedir (Ferlay ve ark., 2019). KRK tedavisinde cerrahi ve medikal uygulamalar yapılmaktadır (Chen ve Huang, 2014). Genel tedavinin yanı sıra bazı alternatif tedavi seçenekleri üzerinde de araştırmalar sürdürülmektedir (Er ve ar., 2019)

Yapılan bu çalışmada deneysel kolon kanserinde Bax, Bcl-2, Kas-3 ve Kas-9 genlerinin mRNA ekspresyonları değerlendirildi. Değerlendirilmede Kas-9 genin melt curve analizinde farklı noktalarda pik verdiği ve bu durumda sağlıklı sonuçlar alınmadığı için çalışmadan çıkartıldı (Grafik 3.1). SYBR Green kullanılarak yapılan çalışmanın özgünlüğünü kontrolü için melt curve analizi kullanıldığı belirtilmektedir (Villalon ve ark., 2014). PZR cihazlarının farklı yazılımlara sahip olmasına bağlı olarak melt curve analizinde çizilen grafiğin cihaza bağlı olarak değişebileceği bildirilmektedir. PZR çalışmalarında melt curve grafiğinde pik noktalarının aynı yerde olmasının önemli olduğu ifade edilmektedir (Nicholson ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda farklı tür bakterilerin melt curve analizi grafiğinde farklı noktalarda pik vermesine bakılarak ayrımının yapılabileceği (Westerman ve ark., 2012) ve Leishmania türlerinin ayrımının yapılmasında melt curve analizinden faydalanıldığı belirtilmektedir (Tsukayama ve ark., 2013). SYBR Green kullanılarak yapılan çalışmaların dezavantajlarından birisi primer dimerlerinin oluşması olduğu ifade edilmektedir. Bu durumun melt curve analizinde çift pik noktasının gözlenmesine neden olabileceği belirtilmektedir (Tiwawech ve ark., 2008; Prada-Arismendy ve Castellanos, 2011). Primer dimerlerin daha düşük sıcaklıklarda denatüre olduğu ve buna bağlı olarak çift pik oluşumunda 1. pik noktasının primer dimeri olabileceği bildirilmektedir. Bu durumun yapılan çalışmaya ait verilerin güvenirliğini azalttığı ifade edilmektedir (Villalon ve ark., 2014). SYBR Green ile yapılan özellikle virüs çalışmalarının hassasiyetini değerlendirmek amacıyla örneklerin 10 katlık seri dilüsyonu hazırlanıp melt curve analizi yapıldığında hepsinin melting değerlerinin aynı olması gerektiği

belirtilmektedir (Chai ve ark., 2013). Yapılan literatür taramalarında melt curve analizinin PZR analizinde önemli bir kontrol noktası olduğu, farklı melting noktalarının tespiti farklı gen bölgelerinin çoğaltıldığı anlamına geldiği ifade edilmektedir. Yapılan mevcut çalışmada tüm koşullar standart olmasına rağmen farklı melting noktaları tespit edildiği için Kas-9 çalışmadan çıkartıldı. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda bu durumun dikkate alınması gerektiği ifade edilebilir.

Mevcut araştırmada K ve KRK + TCAE grubu Bax/Bcl-2 mRNA oranın benzer ($P>0.05$) olduğu belirlenirken, diğer grupların ise K grubuna göre düşük olduğu tespit edildi ($P<0.05$, Grafik 3.2). Bax geninin proapoptik olduğu, Bcl-2 geninin ise antiapoptik olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca her 2 genin mitokondriyal disfoksiyona bağlı Kas-3 aracılı apoptozda etkin oldukları belirtilmektedir (Adams ve Cory, 2018; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018). Meme kanseri üzerine yapılan çalışmada normal ve kanserli dokularda Bcl-2 genlerinin ekspresyonunun aynı olduğu, ancak proapoptik olan Bax geninin normal dokulara göre daha az ekspire olduğu bildirilmektedir. Bu durumun kanserin patogenezinde etkili olabileceği ifade edilmektedir (Bargou ve ark., 1995). Genlerin mRNA seviyelerinin zamana bağlı olarak değişebileceği, C6 hücre kültürünün Ru2Cl (Ibp)4 ile maruziyeti sonucunda Bax mRNA seviyesinin 6. ile 24. saatlerde arttığı, ancak 72. saatte ise 0. saatteki seviyesine benzer olduğu ifade edilmiştir. Bcl-2 seviyesinin ise 24. saatte istatistiki olarak arttığı, ilerleyen saatlerde ise kontrol grubuna yakın değerlere düştüğü belirtilmektedir (Benadiba ve ark., 2010). Hücre kültürü çalışmasında nisin uyguladıktan 24 saat sonra Bax/Bcl-2 oranının hem mRNA hem de protein düzeyinde arttığı ifade edilmiştir (Ahmadi ve ark., 2017). Flavanolun normal hücrelerde Bax/Bcl-2 oranını azaltırken, prostat kanseri hücre hatlarında ise arttırdığı ifade edilmektedir. Ayrıca Bax ve Bcl-2 ekspresyon oranlarının farklı hücre hatlarında farklı olabileceği ve flavanolun etkisinin değiştiği bildirilmektedir (Lewandowska ve ark., 2013). Kanser hücre kültüründe 5-FU uygulamasından 24 saat sonrasında mRNA düzeyinde Bax ekspresyonunun değişmediği, ancak Bcl-2'nin ekspresyonun azaldığı belirtilmektedir (Novak ve ark., 2016). Kanser hücre hatlarında 5-FU, N-asetilsistein ve/veya E vitaminin

tek başına kullanıldığında Bax ekspresyonunu artmadığı, ancak kombine kullanımda arttığı ifade edilmektedir (Adeyemo ve ark., 2001). Andrographolide'in HCT116/5-FUR hücrelerinde Bax protein seviyelerinin zamana ve doza bağlı olarak yükselebildiğini ve mRNA seviyesinin değişmediği ifade edilmektedir (Wang ve ark., 2016). Meme kanseri hücre hattında dosetaksel ve kapesitabin veya siklofosfamid, metotreksat ve FU uygulaması sonrasında sağlıklı dokulara göre antiapoptotik olan Bcl-2A1 ekspresyonunun arttığı belirtilmektedir (Albogami ve ark., 2021). Kolon kanseri hücre hattında ise miR 206 geninin doğrudan Bcl-2 ile ilişkili olduğu ve 5-FU'ya karşı direnç gelişmesinde rol oynadığı ifade edilmektedir (Meng ve Fu, 2018). DMH kullanılarak yapılan kolon kanseri çalışmasında ratlarda Bax/Bcl-2 protein oranının artmasının apoptozu tetiklediği belirtilmektedir (Sharma ve ark., 2018). AOM'la kanser oluşturulan ratlarda, fasulyenin sindirilmeyen kısmı ile yapılan çalışmada kanserli gruba göre Bax ekspresyonunun arttığı, ancak Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı belirtilmektedir (Haydé ve ark., 2012). Sağlıklı ratlarda 80 mg/kg dozda 1 hafta 5-FU kullandığında Bax proteinin arttığı, buna karşın Bcl-2 proteinin azaldığı ifade edilmektedir (Wang ve ark., 2015). İnsanlarda yapılan çalışmada düşük Bax/Bcl-2 mRNA oranına sahip kişilerin, 5-FU bazlı tedavilerde hayatta kalma oranının arttığı belirtilmektedir (Katkoori ve ark., 2010). Metotraksat ve 5-FU alan ileri KRK'li hastalarda Bax ve p53 protein ekspire olmayan bireylerde ilaca %40 daha iyi yanıt alındığı belirtilmektedir (Paradiso ve ark., 2001). Yapılan literatür taramalarında Bax ve Bcl-2 mRNA seviyelerinin zamana ve kullanılan hücre kültürüne göre farklı olabileceği ve insanlarda yapılan çalışmalarda da düşük Bax/Bcl-2 oranına sahip bireylerin 5-FU bazlı tedavilerde prognozun daha iyiye gittiği anlaşılmaktadır. Mevcut araştırmada TCAE'nin tek başına kullanımda sağlıklı hayvanlarda Bax/Bcl-2 oranını azalttığı, ancak kanserli hayvanlarda tersi etki gösterdiği belirlendi ($P<0.05$). Ayrıca kapesitabinin tek ve TCAE birlikte kullanımında Bax/Bcl-2 oranını kontrol grubuna göre azalttığı, parodoksal veya feedback bir etkinin ortaya çıktığı gözlendi ($P<0.05$, Grafik 3.2). Yapılan bu çalışmada Bax/Bcl-2 mRNA oranın, KRK + TCAE grubu hariç diğer gruplarda azaldığı belirlenmekle birlikte Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ilaca bağlı değişimi belirlenemedi. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda kullanılan ilaçların etkinliğinin ortaya konulması

amacıyla Bax ve Bcl-2 proteinlerin değişiminin belirlenmesinin gerekli olduğu ayıca kapesitabin uygulanan gruplarda ortaya çıkan etkinin göz önünde bulundurulmasının gerekli olduğu ifade edilebilir.

Yapılan mevcut çalışmada gruplar arasında Kas-3 mRNA ekspiresyonunda istatistiki fark alınmadı (P>0.05, Grafik 3.2). Kas-3'ün Kas-9 tarafından aktive edilerek, hücresel yıkımı sağladığı bilinmektedir (Adams ve Cory, 2018). 5-FU'ya dirençli hücre hattında 50 uM 5-FU uygulandığında, Kas-3 protein oranının değişmediği belirtilmektedir (Li ve ark., 2010). AOM'la indüklenen rat kanser modelinde tedavi grubunda Bax ve Kas-3 ekspresyonunun arttığı, ancak Bcl-2 ekspresyonunun azalarak apoptozun arttığı ifade edilmektedir (Hernández-Salazar ve ark., 2013). Yapılan farklı çalışmada egzersiz yaptırılan DMH ile indüklenen kolon kanserli ratlarda, Bax/Bcl-2 ve Kas-3 protein oranının arttığı bildirilmektedir (Ghazizadeh Darband ve ark., 2020). Kanserli ratlara *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria bifidum ve Bifidobacteria infantum* uygulamasının Kas-3 mRNA seviyesini azalttığı, ancak farklı bir yoldan kanser gelişimini engellediği bildirilmektedir (Kuugbee ve ark., 2016). DMH ile indüklenen kolon kanserli ratlarda, ellagik asit uygulamasının Bax ekspresyonu ve Kas-3 aktivasyonunun artmasının apoptozu tetiklediği belirtilmektedir (Umesalma ve Sudhandiran, 2011). Yapılan literatür taramalarında Kas-3'ün, Bax ile aynı yönde Bcl-2 ise ters yönde hareket ettiği anlaşılmaktadır. Yapılan bu çalışmada ise Bax/Bcl-2 mRNA oranında değişiklik gözlense de Kas-3 mRNA seviyesinin değişmediği tespit edildi (P>0.05, Grafik 3.2). Yapılacak olan bundan sonraki çalışmalarda farklı zaman dilimlerinde örneklemeler yapılarak, Kas-3 mRNA ve protein ilişkisinin beraber değerlendirilmesi dikkate alınabilir.

Yapılan mevcut çalışmada TCAE ve kapesitabin uygulamasının kanserli hayvanlarda ACF sayısını azalttığı (P<0.05,), ancak kombine kullanımda her ne kadar ayrı ayrı kullanımlarına benzer şekilde ACF sayısını azaltsa da sinerjik bir etkileşim gözlenmediği belirlendi (P>0.05, Tablo 3.2). ACF'nin kolon kanserinde diagnostik belirteç olduğu, bulguların insanlarda ve deneysel kanser modellerinde birbirine benzediği ifade edilmektedir (Pretlow ve ark., 1991; Bird

ve Good, 2000). AOM ile indüklenen rat KRK modelinde AOM uygulamasından önce farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda üzüm suyu uygulamasının ACF sayısında değişikliğe neden olduğu, TNF-α ile NF-Kb arasında pozitif korelasyon olduğu ve kanserin patogenezi ile ilişkili olabileceğini belirtilmektedir (de Lima Pazine Campanholo ve ark., 2015). Kanser hücreleri verilerek oluşturulan deneysel kanser modelinde, IL-2 uygulamasının antiproliferatif etki gösterdiği ve metastazların büyük ölçüde azaldığı ifade edilmektedir (Caporale ve ark., 2007). AOM ile ratlarda KRK oluşturulan modelde 5-FU'nun, monoterapide ACF sayılarını azalttığı ve kolon mukozasının kalınlığında azalmaya neden olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca vitamin D3 ile kombine kullanımında sinerjik etki göstererek ACF sayılarını tek başına kullanımına göre daha çok azalttığı belirtilmiştir (Refaat ve ark., 2015). AOM ile indüklenen KRK'li ratlara 5-FU verilmesinin, ACF ve kript sayısını azalttığı, ayrıca 5-FU'nun kanser grubuna göre süperoksid dismutaz, glutasyon peroksidaz ve katalaz seviyelerinin yükselttiği ve malondialdehid seviyesini azalttığı rapor edilmektedir (Zorofchian Moghadamtousi ve ark., 2015). Farelerde AOM ile indüklenen kanser çalışmasında metforminin veya 5-FU uygulamasının ACF sayısını azalttığı ifade edilmektedir (Abd ve ark., 2014). Yapılan bu çalışmada TCAE'nın literatür bilgilere benzer olarak ACF'lerdeki kript sayısını azalttığı belirlenmiştir. Kapesitabinin ise produgu olduğu 5-FU'ya ait etkilere benzer etkililer göstermiştir. TCAE'nın ve kapesitabinin tek ve kombine kullanımlarında benzer tedavi etkinliğine sahip olduğu, ancak kombine kullanımda sinerjik etkinliğin gözlenmediği ifade edilebilir.

Yapılan literatür taramalarında kapesitabinin KRK'li ratlarda kullanımı hakkında yeterli bilgiye erişilememiştir. Yapılan bu çalışmada 40 mg/kg dozunda 30 gün boyunca günde 1 sefer gavaj yoluyla kapesitabin uygulandı. Bu doz seviyesinde kapesitabinin tek başına ve TCAE ile kombine kullanımında ACF oranlarının benzer olduğu gözlendi ($P<0.05$, Tablo 3.2). DMH kullanılarak yapılan in siliko çalışmada kapesitabinin kanserli hayvanlarda kapesitabinin antitümör etkinliğinin doza bağımlı olabileceği ve tümör büyümesini engellemek için 500 µmol/kg dozun üstünde kullanımına ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (Sakai ve ark., 2021). DMH kullanılarak oluşturulmuş rat

modelinde 2 hafta boyunca 10 mg/kg dozunda intraperitonal kapesitabin uygulaması sonrasında, KRK grubuna göre yaklaşık %12 daha fazla ağırlık kazandığı, ACF sayısını azalttığı ve ACF'lerdeki kript sayısını azalttığı bildirilmektedir (Dudhipala ve Puchchakayala, 2018). Ayrıca AOM uygulamasıyla ratların COX-2, β-katein ve WNT'nin mRNA ekspresyonlarını arttırdığı, 5-FU ve vitamin D3'ün tek ve kombine kullanımda bu genleri baskıladığı ifade edilmektedir (Refaat ve ark., 2015). Kapesitabin 1 ay boyunca gavaj yoluyla 40 mg/kg dozlarında ratlarda kullanıldığında korneal toksisiteye neden olduğu ifade edilmektedir (Elwan ve Kassab, 2017). Yapılan başka çalışmada ise 30 mg/kg dozunda 14 gün boyunca ratlara gavaj yoluyla kapesitabin uygulamasının aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), üre, kreatinin ve biluribin değerlerinin arttırdığı ifade edilmektedir. (Olayinka ve ark., 2017). El-Gerbed (2015) yaptığı çalışmada ise günlük 32 mg /kg dozda gavaj yolla kapesitabin uygulamasının AST, ALT, ALP değerlerini ve PCNA labeling testine göre karaciğer hücrelerinin bölünme hızını arttırdığı ifade edilmektir. Ratlarda 40 mg/kg dozunda kapesitabin 1 ay süresince gavaj yoluyla kullanımında testisler de toksik etkilerinin gözlendiği bildirilmektedir (El-Ghawet ve Gadallah, 2015). Yapılan bu çalışmada kullanılan doz seviyesi öngörüsel tedavi dozudur. Ancak kanserli ratlarda ACF skorunu azalttığı ($P<0.05$, Tablo 3.2) ve kanser prognozun iyiye gittiği gözlendi. Ayrıca paradoksal veya feedback bir etki olarak Bax/Bcl-2 mRNA oranının kontrol grubuna göre azaldığı belirlendi ($P<0.05$, Grafik 3.2). Bu etkinin özellikle Bcl-2 geninde meydana gelen artışlardan kaynaklandığı gözlendi ($P<0.05$, Grafik 3.2). Deneysel kolon kanseri modellerinde kapesitabinin tedavi dozu hakkında farklı dozlar ve örnekleme zamanları belirlenerek daha fazla çalışma yapılmasının gerekli olduğu ifade edilebilir.

Yapılan bu çalışmada TCAE'nın deneysel kolon kanserli ratlarda aberrant kript sayısını azalttığı ($P<0.05$, Tablo 3.2) ve kanserin prognozunun daha iyiye gittiği gözlendi. Buna ek olarak sağlıklı hayvanlarda Bax/Bcl-2 mRNA oranını azaltırken kanserli hayvanlarda arttırdığı belirlendi ($P<0.05$, Grafik 3.2). Yapılan literatür taramalarında 2 farklı kanser hücre hattında yapılan çalışmada TCAE'nin hücresel yapışmayı bozduğu, konsantrasyona bağlı olarak

ölüm oranının arttığı, kanserli hücre hattında daha fazla sitotoksik olduğu ve Kas-3 proteini üzerinden apoptozu tetiklediği ifade edilmektedir (Ghasemi-Dizgah ve ark., 2017). Er ve ark. (2017) MCF-7 meme kanseri hattında TCAE'nin IL-6 ve IL-10 seviyelerinde dalgalanmaya neden olurken, TNF-α ve TGFβ seviyelerinde artışa neden olduğunu belirtmektedir. Ayrıca TCAE'nın konsantrasyona ve zamana bağlı olarak MCF-7 hücrelerinin çoğalması üzerinde engelleyici bir etki gösterdiği ifade edilmektedir. Mide kanser hücre hattında yapılan çalışmada ise TCAE'ya bağlı hücre ölümünün kanser hücrelerine spesifik olmadığı, sağlıklı hücrelerde de ölümlerin gözlendiği ifade edilmektedir. Ayrıca hücre hatlarındaki ölümün, ekstraksiyon işlemi sırasında kullanılan etanolle ilişkili olabileceği de bildirilmektedir (Yenigun ve ark., 2021). Yapılan farklı BİR hücre kültürü çalışmasında ise Tarantula cubensis zehrinin sağlıklı hücrelerde kanserli hücrelere göre daha az sitotoksik olduğu ifade edilmektedir (İlhan, 2021). Er ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada AOM'la oluşturulmuş KRK rat modelinde TCAE uygulamasının ACF sayısını azalttığı, ayrıca kontrol grubuna göre tüm kanser gruplarında IL-2 ve IL-10 seviyelerinin daha yüksek olduğu, TCAE uygulamasının ise PGE-2 seviyesini kanserli ratlarda arttığı belirtmektedir. AOM'la oluşturulmuş rat kanser modelinde TCAE'nin kolonda midkin, TGF-β, VEGF, AFP, COX-2, IGF ve Kas-3 düzeylerindeki artışları baskıladığı ifade edilmektedir (Dik ve ark., 2021). Yapılan bu çalışmada kontrol grubuna göre sağlıklı ratlarda TCAE'nin Bax/Bcl-2 mRNA oranını azalttığı, kanserli hayvanlarda ise bu oranı değiştirmediği bulundu. Ancak bu oranın Bax geni üzerinden düzenlendiği ve kanserli hayvanlarda Bax geninin ekspresyonunu artırdığı belirlendi ($P<0.05$, Grafik 3.2). Buna ek olarak kapesitabinle kombine kullanımında Bcl-2 genini sağlıklı hayvanlarda arttırdığı gözlendi ($P<0.05$ Grafik 3.2). Literatür bilgilerle tutarlı olarak TCAE'nin kanser hücrelerine spesifik olabileceği ve kanserli hayvanlarda Bax geni üzerinden apoptozu tetikleyebileceği ya da kanserin gelişmesinde önemli olan düşük Bax ekspresyonunu arttırarak kanser gelişimini yavaşlatabileceği ifade edilebilir. Ancak yapılacak çalışmalarda Bax ve Bcl-2 proteinlerinin belirlenmesi de dikkate alınabilir.

Yapılan bu çalışmada tüm gruplardaki hayvanların ağırlıkları AOM

uygulaması ve ötanazi öncesi kayıt altına alındı. İstatistiki olarak grupların ağırlıkları değerlendirildiğinde çalışma başlangıcında gruplarda fark alınmadı ($P>0.05$ Tablo 3.3). Ancak hayvanlar ötenaziden önce alınan ağırlıklarda istatistiki olarak diğer gruplara göre kanser + TCAE grubunun ağırlığının daha az olduğu ($P<0.05$, Tablo 3.3), AOM uygulanan grupların tamamında istatistiki fark alınmasa da ağırılıkların düşük olduğu belirlendi. Yapılan literatür taramalarında AOM uygulanan ratlarda hayvan ağırlıklarının azaldığı, ancak istatistiki olarak önemli olmadığı belirtilmektedir (Corum ve ark., 2017). Er ve ark. (2019) yaptığı çalışmada AOM uygulanan ratlarda kontrol gruplarına göre ağırlıklarının düşük olduğu, ancak istatistiki fark olmadığı bildirilmektedir. Sonuç olarak AOM'la yapılan kolon kanseri çalışmalarında hayvan ağırlıklılarının kontrol gruplarına göre daha düşük olabileceği ifade edilebilir

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada 5-FU'nun prodrugu olan kapesitabin ve TCAE'nin AOM ile indüklenen kolon kanserli ratlarda etkinliği, ve etki tipi belirlenmeye çalışıldı. TCAE etkinliği moleküler olarak incelendiğinde sağlıklı ve kanserli hayvanlarda farklı etkinlikler gösterebilmektedir. Ancak TCAE'nın kanserde azalan Bax geni ekspresyonunu arttırarak kanser gelişimini yavaşlatabileceği ifade edilebilir. Sağlıklı hayvanlardan farklı olarak kanserli hayvanlarda apoptoz mekanizmalarına etkimesi dikkat çekicidir ve bu alanda çalışmaların arttırılması ilacın etki mekanizmasını anlamada yardımcı olabilir. Ancak kanserin farkşo dönemlerdeki etkinliği ve farklı hücre içi yolaklarda etkinliğinin belirlenmesi gerekmektedir.

Kapesitabin ratlarda 40 mg/kg dozda 30 gün süresince günde 1 defa gavaj şeklinde kullanıldığında paradoksal veya feedback bir etkisini olabileceği ifade edilebilir. Moleküler analizlerde her ne kadar apoptozu indüklemediği gözlense de kolon kanserinin diagnostik belirteci olan ACF skorlarını azaltmaktadır. Ayrıca farklı doz seviyelerinde KRK'li hayvanlarda negatif kontrollü çalışmalar yapılarak sitotoksik etki ve sağlıklı hayvanlarda toksik etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir.

TCAE ve kapesitabinin kombine kullanımda etki artışı gözlenmemiştir. Bu durum ilaç-ilaç etkileşiminden kaynaklı olabilir. Ayrıca her iki ilaç için farklı doz konsantrasyonlarında daha fazla in vivo çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Abd, A. H., Hussein, A. G. ve Mahmood, A. S., 2014, Efficacy of intraperitoneal administration of metformin and 5-fluoruracil in prevention of induced colorectal aberrant crypt foci in mice, *Int J Parmacy Phrmaceut Sci*, 6, 305-308.

Aberdein, D., Munday, J., Howe, L., French, A. ve Gibson, I., 2012, Widespread mismatch repair expression in feline small intestinal lymphomas, *Journal of comparative pathology*, 147 (1), 24-30.

Adams, J. M. ve Cory, S., 2001, Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family, *Trends in biochemical sciences*, 26 (1), 61-66.

Adams, J. M. ve Cory, S., 2018, The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets, *Cell death and differentiation*, 25 (1), 27.

Adeyemo, D., Imtiaz, F., Toffa, S., Lowdell, M., Wickremasinghe, R. ve Winslet, M., 2001, Antioxidants enhance the susceptibility of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil by augmenting the induction of the bax protein, *Cancer letters*, 164 (1), 77-84.

Ahmadi, S., Ghollasi, M. ve Hosseini, H. M., 2017, The apoptotic impact of nisin as a potent bacteriocin on the colon cancer cells, *Microbial pathogenesis*, 111, 193-197.

Al-Henhena, N., Khalifa, S. A., Ying, R. P. Y., Hassandarvish, P., Rouhollahi, E., Al-Wajeeh, N. S., Ali, H. M., Abdulla, M. A. ve El-Seedi, H. R., 2015, Chemopreventive effects of Strobilanthes crispus leaf extract on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat colon, *Scientific reports*, 5 (1), 1-13.

Albay, M. K., Şahinduran, Ş., Kale, M., Karakurum, M. Ç. ve Sezer, K., 2010, Influence of Tarantula cubensis extract on the treatment of the oral lesions in cattle with bluetongue disease, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 593-596.

Albogami, S. M., Asiri, Y., Asiri, A., Alnefaie, A. A. ve Alnefaie, S., 2021, Effects of neoadjuvant therapies on genetic regulation of targeted pathways in ER+ primary ductal breast carcinoma: A meta-analysis of microarray datasets, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29 (7), 656-659.

Alrawi, S. J., Schiff, M., Carroll, R. E., Dayton, M., Gibbs, J. F., Kulavlat, M., Tan, D., Berman, K., Stoler, D. L. ve Anderson, G. R., 2006, Aberrant crypt foci, *Anticancer research*, 26 (1A), 107-119.

Amos-Landgraf, J. M., Kwong, L. N., Kendziorski, C. M., Reichelderfer, M., Torrealba, J., Weichert, J., Haag, J. D., Chen, K.-S., Waller, J. L. ve Gould, M. N., 2007, A target-selected Apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (10), 4036-4041.

Arteaga, T. A., McKnight, J. ve Bergman, P. J., 2012, A review of 18 cases of feline colonic adenocarcinoma treated with subtotal colectomies and adjuvant carboplatin, *Journal of the American Animal Hospital Association*, 48 (6), 399-404.

Auclin, E., Zaanan, A., Vernerey, D., Douard, R., Gallois, C., Laurent-Puig, P., Bonnetain, F. ve Taieb, J., 2017, Subgroups and prognostication in stage III colon cancer: future perspectives for adjuvant therapy, *Annals of Oncology*, 28 (5), 958-968.

Baars, J., Kuipers, E., Van Haastert, M., Nicolaï, J., Poen, A. ve Van Der Woude, C., 2012, Age at diagnosis of inflammatory bowel disease influences early development of colorectal cancer in inflammatory bowel disease patients: a nationwide, long-term survey, *Journal of gastroenterology*, 47 (12), 1308-1322.

Bajetta, E., Procopio, G., Celio, L., Gattinoni, L., Della Torre, S., Mariani, L., Catena, L., Ricotta, R., Longarini, R. ve Zilembo, N., 2005, Safety and efficacy of two different doses of capecitabine in the treatment of advanced breast cancer in older women, *Journal of Clinical Oncology*, 23 (10), 2155-2161.

Bargou, R. C., Daniel, P. T., Mapara, M. Y., Bommert, K., Wagener, C., Kallinich, B., Royer, H. D. ve Dörken, B., 1995, Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-α expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis, *International journal of cancer*, 60 (6), 854-859.

Benadiba, M., Dos Santos, R. R. P., de Oliveira Silva, D. ve Colquhoun, A., 2010, Inhibition of C6 rat glioma proliferation by [Ru2Cl (Ibp) 4] depends on changes in p21, p27, Bax/Bcl2 ratio and mitochondrial membrane potential, *Journal of inorganic biochemistry*, 104 (9), 928-935.

Baskın, Y. ve Calıbaşı, G., 2011, Kanser hastalarında farmakogenetik uygulamaları ve farmakoekonomi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68 (3), 152-164.

Bird, R. P., 1987, Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings, *Cancer letters*, 37 (2), 147-151.

Bird, R. P. ve Good, C. K., 2000, The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer, *Toxicology letters*, 112, 395-402.

Bonamin, L. V., Cardoso, T. N., de Carvalho, A. C. ve Amaral, J. G., 2015, The use of animal models in homeopathic research–a review of 2010–2014 PubMed indexed papers, *Homeopathy*, 104 (04), 283-291.

Bornhöft, G. ve Matthiessen, P., 2011, Homeopathy in healthcare: effectiveness, appropriateness, safety, costs, *Goslar, Germany*, Springer Science & Business Media, p. 10-12.

Bruewer, M., Krieglstein, C. F., Utech, M., Bode, M., Rijcken, E., Anthoni, C., Laukoetter, M. G., Schuermann, G. ve Senninger, N., 2003, Is colonoscopy alone sufficient to screen for ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma?, *World journal of surgery*, 27 (5), 611-615.

Brüwer, M., Schmid, K. W., Senninger, N. ve Schürmann, G., 2002, Immunohistochemical Expression of P53and Oncogenes in Ulcerative Colitis-associated ColorectalCarcinoma, *World journal of surgery*, 26 (3), 390-396.

Caporale, A., Brescia, A., Galati, G., Castelli, M., Saputo, S., Terrenato, I., Cucina, A., Liverani, A., Gasparrini, M. ve Ciardi, A., 2007, Locoregional IL-2 therapy in the treatment of colon cancer. Cell-induced lesions of a murine model, *Anticancer research*, 27 (2), 985-989.

Chai, Z., Ma, W., Fu, F., Lang, Y., Wang, W., Tong, G., Liu, Q., Cai, X. ve Li, X., 2013, A SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for simple and rapid detection and differentiation of highly pathogenic and classical type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus circulating in China, *Archives of virology*, 158 (2), 407-415.

Chen, S. ve Huang, E. H., 2014, The colon cancer stem cell microenvironment holds keys to future cancer therapy, *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 18 (5), 1040-1048.

Chen, S., Peng, H., Rowat, A., Gao, F., Zhang, Z., Wang, P., Zhang, W., Wang, X. ve Qu, L., 2015, The effect of concentration and duration of normobaric oxygen in reducing caspase-3 and-9 expression in a rat-model of focal cerebral ischaemia, *Brain research*, 1618, 205-211.

Clapper, M. L., Chang, W.-C. L. ve Cooper, H. S., 2020, Dysplastic aberrant crypt foci: biomarkers of early colorectal neoplasia and response to preventive intervention, *Cancer prevention research*, 13 (3), 229-240.

Corum, O., Ozdemir, O. ve Yazar, E., 2017, Halofuginone may suppresses azoxymethane-induced serum tumor necrosis factor-a synthesis and aberrant crypt foci progression in rat colon, *Indian Journal of Animal Research*, 51 (6), 1120-1124.

Coşkun, G. ve Özgür, H., 2014, Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20 (3), 145-158.

de Lima Pazine Campanholo, V. M., Silva, R. M., Silva, T. D., Neto, R. A., Paiotti, A. P. R., Ribeiro, D. A. ve Forones, N. M., 2015, Oral concentrated grape juice suppresses expression of NF-kappa B, TNF-α and iNOS in experimentally induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (3), 947-952.

Derikx, L. A., Nissen, L. H., Smits, L. J., Shen, B. ve Hoentjen, F., 2016, Risk of neoplasia after colectomy in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis, *Clinical gastroenterology and hepatology*, 14 (6), 798-806. e720.

Dik, B., Er, A. ve Çorum, O., 2014, Koyunlarda Tarantula cubensis alkolik ekstraktının (Theranekron®) serum tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerine etkisi, *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 30 (2), 068-071.

Dik, B., Sonmez, G., Faki, H. E. ve Bahcivan, E., 2018, Sulfasalazine treatment can cause a positive effect on LPS-induced endotoxic rats, *Experimental animals*, 67 (4), 403-412.

Dik, B., Coskun, D. ve Er, A., 2021, Protective Effect of Nerium Oleander Distillate and Tarantula Cubensis Alcoholic Extract on Cancer Biomarkers on Colon and Liver Tissues of Rats with Experimental Colon Cancer, *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*.

Dudhipala, N. ve Puchchakayala, G., 2018, Capecitabine lipid nanoparticles for anti-colon cancer activity in 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon cancer: preparation, cytotoxic, pharmacokinetic, and pathological evaluation, *Drug development and industrial pharmacy*, 44 (10), 1572-1582.

Eaden, J., Abrams, K. ve Mayberry, J., 2001, The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis, *Gut*, 48 (4), 526-535.

El-Gerbed, M., 2015, hepatoprotective effect of vitamin c on Capecitabine-induced liver injury in rats, *Egypt. J. Exp. Biol.(Zool.)*, 11 (1), 61-69.

El-Ghawet, H. A. ve Gadallah, A. A., 2015, Amelıoratıng Role Of Jambolan Of Capecıtabıne Induced Testıcular Damage Of Rats *Egypt. J. Exp. Biol. (Zool.)*, 11(1): , 15 – 21.

Elwan, W. M. ve Kassab, A. A., 2017, The potential protective role of hesperidin against capecitabine-induced corneal toxicity in adult male albino Rat. Light and electron microscopic study, *Egyptian Journal of Histology*, 40 (2), 201-215.

EMA, 2005, xeloda, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/xeloda-epar-scientific-discussion_en.pdf: [30.04.2021].

Er, A., Corum, O., Corum, D., Hitit, M., Donmez, H. ve Guzeloglu, A., 2017, Alcoholic extract of Tarantula cubensis induces apoptosis in MCF-7 cell line, *Biomedical Research (0970-938X)*, 28 (8).

Er, A., Ozdemir, O., Coskun, D., Dik, B., Bahcivan, E., Faki, H. E. ve Yazar, E., 2019, Effects of Tarantula cubensis alcoholic extract and Nerium oleander distillate on experimentally induced colon cancer, *Revue de Medecine Veterinaire* (170), 15-21.

Farraye, F. A., Odze, R. D., Eaden, J. ve Itzkowitz, S. H., 2010, AGA medical position statement on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 138 (2), 738-745.

Fearon, E. R. ve Vogelstein, B., 1990, A genetic model for colorectal tumorigenesis, *cell*, 61 (5), 759-767.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D., Piñeros, M., Znaor, A. ve Bray, F., 2019, Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods, *International journal of cancer*, 144 (8), 1941-1953.

Ghasemi-Dizgah, A., Nami, B. ve Amirmozafari, N., 2017, Tarantula cubensis venom (Theranekron®) selectively destroys human cancer cells via activating caspase-3-mediated apoptosis, *Acta Medica International*, 4 (1), 74.

Ghazizadeh Darband, S., Saboory, E., Sadighparvar, S., Kaviani, M., Mobaraki, K., Jabbari, N. ve Majidinia, M., 2020, The modulatory effects of exercise on the inflammatory and

apoptotic markers in rats with 1, 2-dimethylhydrazine-induced colorectal cancer, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 98 (3), 147-155.

Ghosh, N., Hossain, U., Mandal, A. ve Sil, P. C., 2019, The Wnt signaling pathway: a potential therapeutic target against cancer, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1443, 54-74.

Gillen, C., Walmsley, R., Prior, P., Andrews, H. ve Allan, R., 1994, Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis, *Gut*, 35 (11), 1590-1592.

Gross, E., Seck, K., Neubauer, S., Mayr, J., Hellebrand, H., Ratanaphan, A., Lutz, V., Stockinger, H. ve Kiechle, M., 2003, High-throughput genotyping by DHPLC of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene implicated in (fluoro) pyrimidine catabolism, *International journal of oncology*, 22 (2), 325-332.

Gultekin, N. ve Vural, M., 2007, The effect of tarantula cubensis extract applied in pre and post-operative period of canine mammary tumors, *J Istanbul Vet Sci*, 2 (1), 13-23.

Gultiken, N., Guvenc, T., Kaya, D., Agaoglu, A. R., Ay, S. S., Kucukaslan, I., Emre, B., Findik, M., Schäfer-Somi, S. ve Aslan, S., 2015, Tarantula cubensis extract alters the degree of apoptosis and mitosis in canine mammary adenocarcinomas, *Journal of veterinary science*, 16 (2), 213-219.

Haydé, V.-C., Ramón, G.-G., Lorenzo, G.-O., Dave, O. B., Rosalía, R.-C., Paul, W. ve Guadalupe, L.-P., 2012, Non-digestible fraction of beans (Phaseolus vulgaris L.) modulates signalling pathway genes at an early stage of colon cancer in Sprague–Dawley rats, *British Journal of Nutrition*, 108 (S1), S145-S154.

Hernández-Salazar, M., Guevara-González, R. G., Cruz-Hernández, A., Guevara-Olvera, L., Bello-Pérez, L. A., Castaño-Tostado, E. ve Loarca-Piña, G., 2013, Flaxseed (Linum usitatissimum L.) and its total non-digestible fraction influence the expression of genes involved in azoxymethane-induced colon cancer in rats, *Plant foods for human nutrition*, 68 (3), 259-267.

Herstad, K. M. V., Moen, A. E. F., Gaby, J. C., Moe, L. ve Skancke, E., 2018, Characterization of the fecal and mucosa-associated microbiota in dogs with colorectal epithelial tumors, *PloS one*, 13 (5), e0198342.

Hirsch, B. R. ve Zafar, S. Y., 2011, Capecitabine in the management of colorectal cancer, *Cancer management and research*, 3, 79-89.

Hussain, S. P., Amstad, P., Raja, K., Ambs, S., Nagashima, M., Bennett, W. P., Shields, P. G., Ham, A.-J., Swenberg, J. A. ve Marrogi, A. J., 2000, Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease, *Cancer research*, 60 (13), 3333-3337.

Icen, H., Sekin, S., Simsek, A., Kochan, A. ve Tunik, S., 2011, The efficacy of Tarantula cubensis extract (Theranekron) in treatment of canine oral papillomatosis, *Asian J Anim Vet Adv*, 6, 744-749.

ilhan, S., 2021, Can a Veterinary Drug be Repurposed for Human Cancers?: Cytotoxic Effect of Tarantula cubensis Venom on Human Cancer Cells, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11 (3), 1763-1769.

Itzkowitz, S. H. ve Present, D. H., 2005, Consensus conference: colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease, *Inflammatory bowel diseases*, 11 (3), 314-321.

Jess, T., Loftus Jr, E. V., Velayos, F. S., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., Smyrk, T. C., Schleck, C. D., Tremaine, W. J., Melton III, L. J. ve Munkholm, P., 2006, Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from olmsted county, Minnesota, *Gastroenterology*, 130 (4), 1039-1046.

Karayannopoulou, M. ve Lafioniatis, S., 2016, Recent advances on canine mammary cancer chemotherapy: A review of studies from 2000 to date, *breast cancer research*, 29 (32), 43.

Katkoori, V. R., Suarez-Cuervo, C., Shanmugam, C., Jhala, N. C., Callens, T., Messiaen, L., Posey III, J., Bumpers, H. L., Meleth, S. ve Grizzle, W. E., 2010, Bax expression is a candidate prognostic and predictive marker of colorectal cancer, *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 1 (2), 76.

Kristiansen, E., 1996, The role of aberrant crypt foci induced by the two heterocyclic amines 2-amino-3-methyl-imidazo [4, 5-f] quinoline (IQ) and 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) in the development of colon cancer in mice, *Cancer letters*, 110 (1-2), 187-192.

Kuugbee, E. D., Shang, X., Gamallat, Y., Bamba, D., Awadasseid, A., Suliman, M. A., Zang, S., Ma, Y., Chiwala, G. ve Xin, Y., 2016, Structural change in microbiota by a probiotic cocktail enhances the gut barrier and reduces cancer via TLR2 signaling in a rat model of colon cancer, *Digestive diseases and sciences*, 61 (10), 2908-2920.

Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A. ve Gatta, G., 2010, Colon cancer, *Critical reviews in oncology/hematology*, 74 (2), 106-133.

Lewandowska, U., Szewczyk, K., Owczarek, K., Hrabec, Z., Podsedek, A., Koziołkiewicz, M. ve Hrabec, E., 2013, Flavanols from evening primrose (Oenothera paradoxa) defatted seeds inhibit prostate cells invasiveness and cause changes in Bcl-2/Bax mRNA ratio, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (12), 2987-2998.

Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S. ve Kuwano, H., 2010, Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model, *European journal of cancer*, 46 (10), 1900-1909.

Li, P., Jiang, H., Wu, H., Wu, D., Li, H., Yu, J. ve Lai, J., 2018, AH6809 decreases production of inflammatory mediators by PGE2–EP2–cAMP signaling pathway in an experimentally induced pure cerebral concussion in rats, *Brain research*, 1698, 11-28.

Liang, S., Wang, Y. ve Liu, Y., 2019, Dexmedetomidine alleviates lung ischemia-reperfusion injury in rats by activating PI3K/Akt pathway, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23 (1), 370-377.

Linde, K., Clausius, N., Ramirez, G., Melchart, D., Eitel, F., Hedges, L. V. ve Jonas, W. B., 1997, Are the clinical effects of homoeopathy placebo effects? A meta-analysis of placebo-controlled trials, *The Lancet*, 350 (9081), 834-843.

Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *methods*, 25 (4), 402-408.

Lou, Y., Wang, Q., Zheng, J., Hu, H., Liu, L., Hong, D. ve Zeng, S., 2016, Possible pathways of capecitabine-induced hand–foot syndrome, *Chemical research in toxicology*, 29 (10), 1591-1601.

Markowitz, S. D. ve Bertagnolli, M. M., 2009, Molecular basis of colorectal cancer, *New England Journal of Medicine*, 361 (25), 2449-2460.

Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E. ve Rodriguez Yoldi, M., 2017, Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer, *International journal of molecular sciences*, 18 (1), 197.

Masuda, N., Lee, S.-J., Ohtani, S., Im, Y.-H., Lee, E.-S., Yokota, I., Kuroi, K., Im, S.-A., Park, B.-W. ve Kim, S.-B., 2017, Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy, *New England Journal of Medicine*, 376 (22), 2147-2159.

Meng, X. ve Fu, R., 2018, miR-206 regulates 5-FU resistance by targeting Bcl-2 in colon cancer cells, *OncoTargets and therapy*, 11, 1757.

Midgley, R. ve Kerr, D. J., 2009, Capecitabine: have we got the dose right?, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6 (1), 17.

Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I. ve Ishitsuka, H., 1998, Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue, *European journal of cancer*, 34 (8), 1274-1281.

Moser, A. R., Pitot, H. C. ve Dove, W. F., 1990, A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse, *Science*, 247 (4940), 322-324.

Nandy, P., 2015, A review of basic research on homoeopathy from a physicist's point of view, *Indian Journal of Research in Homoeopathy*, 9 (3), 141-151.

Nicholson, P., Rawiwan, P. ve Surachetpong, W., 2018, Detection of Tilapia lake virus using conventional RT-PCR and SYBR green RT-qPCR, *Journal of Visualized Experiments*, 141, e58596.

Novak, M., Žegura, B., Baebler, Š., Štern, A., Rotter, A., Stare, K. ve Filipič, M., 2016, Influence of selected anti-cancer drugs on the induction of DNA double-strand breaks and changes in gene expression in human hepatoma HepG2 cells, *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (15), 14751-14761.

O'Meara, S., Wilson, P., Bridle, C., Wright, K. ve Kleijnen, J., 2002, Homoeopathy, *Quality & safety in health care*, 11 (2), 189.

Olayinka, E. T., Ola, O. S., Ore, A. ve Adeyemo, O. A., 2017, Ameliorative effect of caffeic acid on capecitabine-induced hepatic and renal dysfunction: Involvement of the antioxidant defence system, *Medicines*, 4 (4), 78.

Paradiso, A., Simone, G., De Lena, M., Leone, B., Vallejo, C., Lacava, J., Dellapasqua, S., Daidone, M. ve Costa, A., 2001, Expression of apoptosis-related markers and clinical outcome in patients with advanced colorectal cancer, *British journal of cancer*, 84 (5), 651-658.

Peña-Blanco, A. ve García-Sáez, A. J., 2018, Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis, *The FEBS journal*, 285 (3), 416-431.

Poole, C., Gardiner, J., Twelves, C., Johnston, P., Harper, P., Cassidy, J., Monkhouse, J., Banken, L., Weidekamm, E. ve Reigner, B., 2002, Effect of renal impairment on the pharmacokinetics and tolerability of capecitabine (Xeloda) in cancer patients, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 49 (3), 225-234.

Prada-Arismendy, J. ve Castellanos, J. E., 2011, Real time PCR. Application in dengue studies, *Colombia Médica*, 42 (2), 243-258.

Pretlow, T. P., Barrow, B. J., Ashton, W. S., O'Riordan, M. A., Pretlow, T. G., Jurcisek, J. A. ve Stellato, T. A., 1991, Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa, *Cancer research*, 51 (5), 1564-1567.

Primrose, J. N., Fox, R. P., Palmer, D. H., Malik, H. Z., Prasad, R., Mirza, D., Anthony, A., Corrie, P., Falk, S. ve Finch-Jones, M., 2019, Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study, *The Lancet Oncology*, 20 (5), 663-673.

Refaat, B., El-Shemi, A. G., Kensara, O. A., Mohamed, A. M., Idris, S., Ahmad, J. ve Khojah, A., 2015, Vitamin D3 enhances the tumouricidal effects of 5-Fluorouracil through multipathway mechanisms in azoxymethane rat model of colon cancer, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34 (1), 1-15.

Reigner, B., Blesch, K. ve Weidekamm, E., 2001, Clinical pharmacokinetics of capecitabine, *Clinical pharmacokinetics*, 40 (2), 85-104.

Richardson-Boedler, C., 2002, The brown spider Loxosceles laeta: source of the remedy Tarentula cubensis?, *Homeopathy*, 91 (03), 166-170.

Rodrigues, M. A. M., Silva, L., Salvadori, D. M. F., De Camargo, J. ve Montenegro, M., 2002, Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35 (3), 351-355.

Rosenberg, D. W., Giardina, C. ve Tanaka, T., 2008, Mouse models for the study of colon carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 30 (2), 183-196.

Rutter, M. D., Saunders, B. P., Wilkinson, K. H., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M. A., Williams, C. B., Price, A. B., Talbot, I. C. ve Forbes, A., 2006, Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis, *Gastroenterology*, 130 (4), 1030-1038.

Saif, M. W., Katirtzoglou, N. A. ve Syrigos, K. N., 2008, Capecitabine: an overview of the side effects and their management, *Anti-cancer drugs*, 19 (5), 447-464.

Sakai, S., Kobuchi, S., Ito, Y. ve Sakaeda, T., 2021, A Physiologically Based Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Model for Capecitabine in Colorectal Cancer Rats: Simulation of Antitumor Efficacy at Various Administration Schedules, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 46 (2), 301-315.

Sakai, S., Kobuchi, S., Ito, Y. ve Sakaeda, T., 2020, Assessment of pharmacokinetic variations of capecitabine after multiple administration in rats: a physiologically based pharmacokinetic model, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 85 (5), 869-880.

Shindoh, H., Nakano, K., Yoshida, T. ve Ishigai, M., 2011, Comparison of in vitro metabolic conversion of capecitabine to 5-FU in rats, mice, monkeys and humans-toxicological implications, *The Journal of toxicological sciences*, 36 (4), 411-422.

Schüller, J., Cassidy, J., Dumont, E., Roos, B., Durston, S., Banken, L., Utoh, M., Mori, K., Weidekamm, E. ve Reigner, B., 2000, Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 45 (4), 291-297.

Sharma, S. H., Kumar, J. S., Chellappan, D. R. ve Nagarajan, S., 2018, Molecular chemoprevention by morin–A plant flavonoid that targets nuclear factor kappa B in experimental colon cancer, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 100, 367-373.

Shawki, S., Ashburn, J., Signs, S. A. ve Huang, E., 2018, Colon cancer: inflammation-associated cancer, *Surgical Oncology Clinics*, 27 (2), 269-287.

Siddiqui, N. S., Godara, A., Byrne, M. M. ve Saif, M. W., 2019, Capecitabine for the treatment of pancreatic cancer, *Expert opinion on pharmacotherapy*, 20 (4), 399-409.

Stintzing, S., Tejpar, S., Gibbs, P., Thiebach, L. ve Lenz, H.-J., 2017, Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes, *European journal of cancer*, 84, 69-80.

Şeber, E. S., 2016, Metastatik Kolorektal Kanserinde Timidin Kinaz Aktivite Düzeylerinin Prognostik Önemi, *Int J Basic Clin Med*, 4(3): 126-33, 126-133.

Tan, B. L., Esa, N. M., Rahman, H. S., Hamzah, H. ve Karim, R., 2014, Brewers' rice induces apoptosis in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats via suppression of cell proliferation and the Wnt signaling pathway, *BMC complementary and alternative medicine*, 14 (1), 304.

Tanır, H. G. ve Demirezen, Ş., 2009, Wnt Sinyal Yolunun Biyolojisi ve Bu Yolda Görev Alan Biyomoleküller, *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 29 (5), 1292-1297.

The, L., 2014, Toward better control of colorectal cancer, *Lancet (London, England)*, 383 (9927), 1437.

Tiwawech, D., Chindavijak, S., Karalak, A., Ishida, T. ve Jarratwisrutpom, Y., 2008, Detection of GSTM1 Polymorphism in Patient with Nasopharyngeal Carcinoma by Real-Time PCR, *Siriraj Medical Journal*, 60 (1), 23-27.

Toma-Jonik, A., Vydra, N., Janus, P. ve Widłak, W., 2019, Interplay between HSF1 and p53 signaling pathways in cancer initiation and progression: non-oncogene and oncogene addiction, *Cellular Oncology*, 1-11.

Tomatır, A. G., 2003, Apoptoz: Programlı hücre ölümü, *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 23 (6), 499-508.

Tsukayama, P., Núñez, J. H., De Los Santos, M., Soberón, V., Lucas, C. M., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., Ore, M., Baldeviano, G. C. ve Edgel, K. A., 2013, A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis, *PLoS neglected tropical diseases*, 7 (1), e1956.

Umesalma, S. ve Sudhandiran, G., 2011, Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway, *European journal of pharmacology*, 660 (2-3), 249-258.

van Neerven, S. M. ve Vermeulen, L., 2019, The interplay between intrinsic and extrinsic Wnt signaling in controlling intestinal transformation, *Differentiation*, 108, 17-23.

Villalon, E., Schulz, D. J. ve Waters, S. T., 2014, Real-time PCR quantification of gene expression in embryonic mouse tissue, In: Mouse Molecular Embryology, Eds: Springer, p. 81-94.

Vinson, K. E., George, D. C., Fender, A. W., Bertrand, F. E. ve Sigounas, G., 2016, The N otch pathway in colorectal cancer, *International journal of cancer*, 138 (8), 1835-1842.

Viscido, A., Bagnardi, V., Sturniolo, G., Annese, V., Frieri, G., D'arienzo, A., Papi, C., Riegler, G., Corrao, G. ve Caprilli, R., 2001, Survival and causes of death in Italian patients with ulcerative colitis A GISC nation-wide study, *Digestive and liver disease*, 33 (8), 686-692.

Walko, C. M. ve Lindley, C., 2005, Capecitabine: a review, *Clinical therapeutics*, 27 (1), 23-44.

Wang, H., Zhu, J., Jiang, L., Shan, B., Xiao, P., Ai, J., Li, N., Qi, F. ve Niu, S., 2020, Mechanism of Heshouwuyin inhibiting the Cyt c/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 pathway in spermatogenic cell apoptosis, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20 (1), 1-14.

Wang, J., Wang, T., Sun, Y., Feng, Y., Kisseberth, W., Henry, C., Mok, I., Lana, S., Dobbin, K. ve Northrup, N., 2018, Proliferative and Invasive Colorectal Tumors in Pet Dogs Provide Unique Insights into Human Colorectal Cancer, *Cancers*, 10 (9), 330.

Wang, W., Guo, W., Li, L., Fu, Z., Liu, W., Gao, J., Shu, Y., Xu, Q., Sun, Y. ve Gu, Y., 2016, Andrographolide reversed 5-FU resistance in human colorectal cancer by elevating BAX expression, *Biochemical pharmacology*, 121, 8-17.

Wang, Y., Tian, X., Liang, L., Wang, Y., Wang, R., Cheng, X., Yan, Z., Chen, Y. ve Qi, P., 2015, Mechanistic study on triptorelin action in protecting from 5-FU-induced ovarian damage in rats, *Oncology research*, 22 (5-6), 283.

Westerman, L. J., Stel, H. V., Schipper, M. E., Bakker, L. J., Neefjes-Borst, E. A., van den Brande, J. H., Boel, E. C., Seldenrijk, K. A., Siersema, P. D. ve Bonten, M. J., 2012, Development of a real-time PCR for identification of Brachyspira species in human colonic biopsies, *PloS one*, 7 (12), e52281.

Wu, H., Che, X., Zheng, Q., Wu, A., Pan, K., Shao, A., Wu, Q., Zhang, J. ve Hong, Y., 2014, Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis, *International journal of biological sciences*, 10 (9), 1072.

Wu, Y.-J., Wong, B.-S., Yea, S.-H., Lu, C.-I. ve Weng, S.-H., 2016, Sinularin induces apoptosis through mitochondria dysfunction and inactivation of the pI3K/Akt/mTOR pathway in gastric carcinoma cells, *Marine drugs*, 14 (8), 142.

Yalçın, A. S., Attallah, W., Yılmaz, A. M. ve Aktan, A. Ö., 2014, Free radicals, whey proteins and colorectal cancer, *Marmara Medical Journal*, 27 (1-6).

Yan, X., Feng, C., Chen, Q., Li, W., Wang, H., Lv, L., Smith, G. W. ve Wang, J., 2009, Effects of sodium fluoride treatment in vitro on cell proliferation, apoptosis and caspase-3 and

caspase-9 mRNA expression by neonatal rat osteoblasts, *Archives of toxicology*, 83 (5), 451-458.

Yashiro, M., 2014, Ulcerative colitis-associated colorectal cancer, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20 (44), 16389.

Yenigun, V. B., Azzawri, A. A., Acar, M. S., Kaplan, M. B., Ucar, V. B., Tastekin, D. ve Acar, H., 2021, Alcoholic extract of Tarantula cubensis (Theranekron®) induce autophagy on gastric cancer cells, *Experimental Biomedical Research*, 4 (2), 89-98.

Yoshimi, K., Tanaka, T., Takizawa, A., Kato, M., Hirabayashi, M., Mashimo, T., Serikawa, T. ve Kuramoto, T., 2009, Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel Apc mutant rat, *Cancer science*, 100 (11), 2022-2027.

Zorofchian Moghadamtousi, S., Rouhollahi, E., Karimian, H., Fadaeinasab, M., Firoozinia, M., Ameen Abdulla, M. ve Abdul Kadir, H., 2015, The chemopotential effect of Annona muricata leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of acetogenin annomuricin E in HT-29 cells: a bioassay-guided approach, *PloS one*, 10 (4), e0122288.