

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSERİ TEDAVİSİ İÇİN YENİ NANOTERAPÖTİK
MODALİTELERİN GELİŞTİRİLMESİ**

BAYRAM OĞUZ ÖZER

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İLKER DİBİRDİK

EDİRNE-2021

Bayram Oğuz ÖZER'in hazırladığı “**KOLON KANSERİ TEDAVİSİ İÇİN YENİ NANOTERAPÖTİK MODALİTELERİN GELİŞTİRİLMESİ**” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Prof. Dr. Abdullah OLGUN

.....

Prof. Dr. İlker DIBIRDIK

.....

Prof. Dr. Nuray ULUSU

.....

Doç. Dr. Gökhan KAÇAR

.....

Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK

.....

Tez Savunma Tarihi: 10/02/2021

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. İlker DIBIRDIK
Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

10/02/2021

Bayram Oğuz ÖZER

Doktora Tezi
Kolon Kanseri Tedavisi İçin Yeni Nanoterapötik Modalitelerin Geliştirilmesi
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Bu tez Dr. Dıbırdık ve talebelerinin antikanser aktiviteye sahip yeni kimyasal yapılar keşfine yönelik çalışmaları sırasında HT-29 insan kolon kanser modeli üzerinde etkili etnofarmakolojik bir ürünü keşfetmeleri üzerine kuruludur. Bu çalışmada ürünün majör kimyasal bileşenleri gallik asit, tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit, nadolol'ün antiproliferatif etkileri ve kemoterapötikler 5-florourasil, okzaliptatin ve setuksimab ile kombinasyon etkileri incelendi. Takibinde, sinerjistik ilaç kombinasyonlarının nanolipozomal formülasyonları geliştirildi ve antiproliferatif etkileri araştırıldı.

Gallik asit HT-29 hücre proliferasyonunu doz-bağımlı baskılamıştır. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün antiproliferatif etkileri gözlenmemiştir. Gallik asit'in, 5-florourasil veya okzaliptatin ile kombinasyonu sinerjistik antiproliferatif etki göstermiştir. Gallik asit ve 5-florourasil veya gallik asit ve okzaliptatin kombinasyonları, zaman-bağımlı ve sinerjistik olarak apoptozu indüklemiştir. Gallik asit ve 5-florourasil veya gallik asit ve okzaliptatin kombinasyonlarının nanolipozomal formülasyonları, serbest ilaç formlarından daha fazla antiproliferatif etki göstermiştir.

Çalışmamız, gallik asit'in kolon kanseri tedavisinde komplementer ajan olarak 5-florourasil veya okzaliptatin ile kullanılabilceğini gösteren literatürdeki ilk çalışmadır. İkili ilaç yüklü nanolipozomal formülasyonların, kolon kanseri tedavisi için umut vaat eden yeni nanoterapötik formülasyonlar olduğu görülmüştür. Söz konusu *in vitro* sonuçlar temelinde, *in vivo* çalışmaların tasarlanıp yürütülmesinin elde edilen sonuçlara önemli katkı sağlaması ve ileriki klinik çalışmalar için de bir temel oluşturması düşünülmektedir.

Yıl : 2021

Sayfa Sayısı : 153

Anahtar Kelimeler : Kanser, kolon adenokarsinoma, kemoterapi, ilaç geliştirme, kombinasyon tedavisi, kombinasyon indeksi, hücre proliferasyonu, HT-29 hücre hattı, nanotıp, lipozomal nanopartikül

Ph.D. Thesis

Development of New Nanotherapeutic Modalities for The Treatment of Colon Cancer

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

This thesis is established on the discovery of an ethnopharmacological product that is effective on HT-29 human colon cancer model during Dr. Dıbrdik and his student's studies to discover new chemical structures with anticancer activity. In this study, the antiproliferative effects of major chemical entities of this product gallic acid, thiofanox, sulfisomidine, triphenylphosphite, nadolol, and their combination with chemotherapeutics 5-fluorouracil, oxaliplatin, and cetuximab were examined. Following, nanoliposomal formulations of synergistic drug combinations were developed and their anti-proliferative effects were investigated.

Gallic acid suppressed the HT-29 cell proliferation in a dose-dependent manner. Anti-proliferative effects of thiofanox, sulfisomidine, triphenylphosphite, and nadolol were not observed. Combination of gallic acid with 5-fluorouracil or oxaliplatin showed a synergistic antiproliferative effect. Gallic acid and 5-fluorouracil or gallic acid and oxaliplatin combinations induced apoptosis synergistically and in a time-dependent manner. Nanoliposomal formulations of gallic acid and 5-fluorouracil or gallic acid and oxaliplatin combinations exhibited greater antiproliferative effects than free drug forms.

Our study is the first study in the literature showing that gallic acid can be used as a complementary agent in the treatment of colon cancer with 5-fluorouracil or oxaliplatin. Dual drug-loaded nanoliposomal formulations have been shown to be promising new nanotherapeutic formulations for the treatment of colon cancer. Based on these *in vitro* results, it is thought that the design and execution of *in vivo* studies will make a significant contribution to the obtained results and may form a basis for future clinical studies.

Year : 2021

Number of Pages : 153

Keywords : Cancer, colon adenocarcinoma, chemotherapy, combination therapy, drug development, combination index, cell proliferation, HT-29 cell line, nanomedicine, liposomal nanoparticles

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım için desteğini esirgemeyen Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalları öğretim üyesi kıymetli hocam sayın Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım için laboratuvar imkanlarından yararlanma fırsatı sunan Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tez çalışmalarım için destek sağlayan, Trakya Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri (TÜBAP, Proje no: 2017/222) birimine teşekkürü bir borç bilirim.

Desteklerinden dolayı kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Gökhan KAÇAR'a ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Yaşamım boyunca beni destekleyen, kıymetli babam sayın Tebernuş ÖZER'e kıymetli annem sayın Şengül ÖZER'e minnettarım. Doktora tezini, 19.11.2019 tarihinde vefat eden canım annem sayın Şengül ÖZER'e adıyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolon Kanseri	4
2.1.1. Kolon Kanserinde Genetik ve Epigenetik Değişiklikler	5
2.1.2. Kolon Kanserinin Tedavisi	9
2.2. Kanser Tedavisinde Etnofarmakolojik Kökenli Terapötik Modaliteler.....	10
2.3. Kanser Kombinasyon Tedavisi	11
2.3.1. Preklinik İlaç Kombinasyon Çalışmaları	12
2.3.2. İlaç-İlaç Etkileşimleri ve Kantitatif Analiz	12
2.4. İlaç Salım	19
2.4.1. Nano-Ölçekli İlaç Taşıyıcı ve Salım Sistemleri.....	19
2.4.2. Lipozomlar	20
2.5. Çalışmada Kullanılan Test Molekülleri	25
BÖLÜM 3	28
MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1. Hücre Kültürü.....	30
3.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi	30
3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması.....	30
3.1.3. Hücrelerin Dondurulması.....	30

3.1.4. Hücre Sayımı.....	30
3.2. Hücre Sayısının Optimizasyonu.....	31
3.3. Test Moleküllerinin ve Kemoterapötiklerin Çözeltilerinin Hazırlanması	31
3.4. MTT Hücre Proliferasyon Analizi	31
3.5. Test Moleküllerinin ve Kemoterapötiklerin Kombinasyon Etkilerinin İncelenmesi	32
3.6. İlaç Kombinasyonlarının CI Değerinin Hesaplanması	32
3.7. İlaç Kombinasyonlarının DRI Değerlerinin Hesaplanması	32
3.8. TALİ Görüntü-Temelli Sitometre Analizi	32
3.9. Apoptoz Yolağında Yer Alan Genlerin mRNA İfade Düzeylerinin RT-qPCR Tekniği ile İncelenmesi	33
3.10. Apoptoz Yolağında Yer Alan Genlerin Protein İfade Düzeylerinin Western Blotlama ile Belirlenmesi.....	34
3.11. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının Hazırlanması	34
3.11.1. İlaç Yüklü Olmayan Nanolipozomal Formülasyonların Hazırlanması.....	34
3.11.2. İlaç Yüklü Nanolipozomal Formülasyonların Hazırlanması	35
3.11.3. Yükleme Veriminin Hesaplanması	35
3.11.4. Nanolipozomal Formülasyonların Karakterizasyonu	36
3.11.4.1. Faz Kontrast İntert Mikroskop Görüntüleme	36
3.11.4.2. Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM)	36
3.11.4.3. Boyut ve Zeta Potansiyeli Ölçümü	36
3.11.5. Nanolipozomal Formülasyonların İlaç Salım Profillerinin İncelenmesi	36
3.11.6. Nanolipozomal İlaçların İn Vitro Antiproliferatif Etkilerinin İncelenmesi	37
3.12. Veri Analizi	37
BÖLÜM 4	38
SONUÇLAR	38
4.1. HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinin İntert Mikroskop Görüntüleri	38
4.2. Test Moleküllerinin ve Kemoterapötiklerin Antiproliferatif Etkileri	39
4.3. Test Moleküllerinin ve Kemoterapötiklerin Kombinasyon Etkileri	46
4.3.1. GA'in Kemoterapötikler ile Kombinasyon Etkileri.....	46
4.3.2. Tiyofanoks, Sülfisomidin, Trifenilfosfit ve Nadolol'ün Kombinasyon Etkileri... 55	
4.4. TALİ Görüntü-Temelli Sitometre Analizi	61

4.5. Sinerjistik İlaç Kombinasyonlarının Apoptoz Yolağında Yer Alan Genlerin mRNA İfade Düzeylerine Etkisi.....	64
4.6. Sinerjistik İlaç Kombinasyonlarının Apoptoz Yolağında Yer Alan Genlerin Protein İfade Düzeylerine Etkisi.....	73
4.7. Sinerjistik İlaç Kombinasyonlarının Nanolipozomal Formülasyonları	76
4.7.1. Nanolipozomal Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	76
4.7.2. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının Morfolojisinin İncelenmesi.....	76
4.7.3. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının Boyut, Zeta Potansiyeli ve PDI Değerleri	82
4.7.4. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının İlaç Salım Profilleri.....	83
4.7.5. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Proliferasyonuna Etkileri	85
BÖLÜM 5	91
TARTIŞMA	91
KAYNAKLAR	118
ÖZGEÇMİŞ	134
BİLİMSEL FAALİYETLER	135

SİMGELER DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
%	: Yüzde değer
μM	: Mikromol
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
$^{\circ}\text{C}$: Derece
®	: Tescilli marka

KISALTMALAR DİZİNİ

Bax	Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	B-hücreli lenfoma 2
CH	Kolesterol
CI	Kombinasyon indeksi
C225	Setuksimab
DPPC	Dipalmitoil fosfatidilkolin
DIABLO	Düşük PI'li doğrudan IAP bağlayıcı protein
DRI	Doz azalma indeksi
GA	Gallik asit
HSA	En yüksek tek ajan
IC₅₀	% 50 İnhibisyona yol açan doz
L-OHP	Okzaliplatin
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür
PBS	Tamponlanmış fosfat tuzu
PDI	Polidispersite indeksi
RT-qPCR	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SMAC	İkinci Mitokondriyal Kökenli Kaspaz Aktivatörü
5-FU	5-Florourasil

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Apoptoz yolağı.....	8
Şekil 2.2. Medyan-Etki denkleminin temeli.	14
Şekil 2.3. Medyan-Etki prensibi ile ilaç kombinasyonlarının analizi.	16
Şekil 2.4. Nano-ölçekli ilaç taşıyıcı ve salım sistemleri.	20
Şekil 2.5. Lipozomun şematik gösterimi.	21
Şekil 2.7. Tek tabakalı lipozomun oluşumu.....	24
Şekil 2.8. Çalışmada kullanılan test moleküllerinin kimyasal yapıları.....	27
Şekil 4.1. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü.....	38
Şekil 4.2. GA'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	39
Şekil 4.3. Sülfisomidin'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	40
Şekil 4.4. Tiyofanoks'un HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	41
Şekil 4.5. Trifenilfosfit'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	42
Şekil 4.6. Nadolol'ün HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	43
Şekil 4.7. 5-FU'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	44
Şekil 4.8. L-OHP'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	45
Şekil 4.9. C225'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	46
Şekil 4.10. GA ve 5-FU kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	47
Şekil 4.11. GA ve 5-FU kombinasyonunun farmakodinamik etkilerinin Chou-Talalay'ın kütle-eylem yasası temelli medyan-etki denklemi ile analizi.	48
Şekil 4.12. GA ve L-OHP kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	50
Şekil 4.13. GA ve L-OHP kombinasyonunun farmakodinamik etkilerinin Chou-Talalay'ın kütle-eylem yasası temelli medyan-etki denklemi ile analizi.....	51
Şekil 4.14. GA ve C225 kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	53

Şekil 4.15. GA ve C225 kombinasyonunun farmakodinamik etkilerinin Chou-Talalay'ın kütle-eylem yasası temelli medyan-etki denklemi ile analizi.	54
Şekil 4.16. GA ve 5-FU kombinasyonunun apoptoza etkisi.....	62
Şekil 4.17. GA ve L-OHP kombinasyonunun apoptoza etkisi.....	64
Şekil 4.18. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax mRNA ifade düzeyine etkisi.....	66
Şekil 4.19. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bcl-2 mRNA ifade düzeyine etkisi.	67
Şekil 4.20. GA ve 5-FU kombinasyonunun Kaspaz-8 mRNA ifade düzeyine etkisi.	68
Şekil 4.21. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax/Bcl-2 mRNA oranına etkisi.	68
Şekil 4.22. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax mRNA ifade düzeyine etkisi.....	70
Şekil 4.23. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bcl-2 mRNA ifade düzeyine etkisi.....	71
Şekil 4.24. GA ve L-OHP kombinasyonunun Kaspaz-8 mRNA ifade düzeyine etkisi....	72
Şekil 4.25. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax/Bcl-2 mRNA oranına etkisi.	72
Şekil 4.26. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8 protein ifade düzeyine etkileri.....	73
Şekil 4.27. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax/Bcl-2 protein oranına etkisi.	74
Şekil 4.28. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8 protein ifade düzeyine etkileri.....	75
Şekil 4.29. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax/Bcl-2 protein oranına etkisi.	75
Şekil 4.30. Boş DPPC:CH nanolipozomların faz kontrast invert mikroskop görüntüsü.	77
Şekil 4.31. Boş DPPC:CH nanolipozomların SEM görüntüsü.	77
Şekil 4.32. Boş DPPC:CH nanolipozomların boyut dağılımı.....	78
Şekil 4.33. DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların faz kontrast invert mikroskop görüntüsü.....	79
Şekil 4.34. DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların SEM görüntüsü.	80
Şekil 4.35. DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların boyut dağılımı.	80
Şekil 4.36. DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların faz kontrast invert mikroskop görüntüsü.....	81
Şekil 4.37. DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların SEM görüntüsü.....	81
Şekil 4.38. DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların boyut dağılımı.....	82
Şekil 4.39. GA ve nanolipozomal GA'in salım profili.	83
Şekil 4.40. 5-FU ve nanolipozomal 5-FU'in salım profili.....	84

Şekil 4.41. L-OHP ve nanolipozomal L-OHP'in salım profili.	85
Şekil 4.42. Serbest GA ve nanolipozomal GA'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri..	86
Şekil 4.43. Serbest 5-FU ve nanolipozomal 5-FU'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri..	87
Şekil 4.44. Serbest L-OHP ve nanolipozomal L-OHP'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri..	88
Şekil 4.45. Serbest GA ve 5-FU kombinasyonu ve nanolipozomal GA ve 5-FU kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri..	89
Şekil 4.46. Serbest GA ve L-OHP kombinasyonu ve nanolipozomal GA ve L-OHP kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri..	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. TNM sistemine dayanan kolon kanserin evrelemesi.	5
Çizelge 2.2. Kolon kanseri ile sıklıkla ilişkili tümör baskılayıcı genler ve onkogenler...6	
Çizelge 2.3. Kombinasyon indeksi aralığı ve tanımı.	17
Çizelge 2.4. Chou-Talalay temelli ilaç kombinasyonu çalışma tasarımı..	17
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.	28
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan gereçler.....	29
Çizelge 3.3. cDNA sentez bileşenleri.	33
Çizelge 3.4. RT-qPCR için kullanılan primerlerin ve bileşenlerin miktarı.	34
Çizelge 4.1. GA ve 5-FU kombinasyonundaki her bir bileşen için DRI değerleri.	49
Çizelge 4.2. GA'in kemoterapi ajanları ile ikili kombinasyon etkileri..	49
Çizelge 4.3. GA ve L-OHP kombinasyonundaki her bir bileşen için DRI değerleri.....	52
Çizelge 4.4. GA ve C225 kombinasyonundaki her bir bileşen için DRI değerleri.....	55
Çizelge 4.5. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün birinci yöntem ile incelenen ikili kombinasyon etkileri.	56
Çizelge 4.6. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün ikinci yöntem ile incelenen ikili kombinasyon etkileri.	57
Çizelge 4.7. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün birinci yöntem ile incelenen üç-bileşenli kombinasyon etkileri.....	58
Çizelge 4.8. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün ikinci yöntem ile incelenen üç-bileşenli kombinasyon etkileri.....	58
Çizelge 4.9. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün birinci yöntem ile incelenen dört-bileşenli kombinasyon etkileri.	59
Çizelge 4.10. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün ikinci yöntem ile incelenen dört-bileşenli kombinasyon etkileri.	59
Çizelge 4.11. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün kendi aralarındaki iki-, üç- ve dört-bileşenli kombinasyon etkileri.....	60
Çizelge 4.12. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün GA (4IC ₅₀) ile beş-bileşenli kombinasyon etkileri.	60

Çizelge 4.13. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'un GA (IC ₅₀) ile beş-bileşenli kombinasyon etkileri.	60
Çizelge 4.14. GA ve 5-FU kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine etkisinin TALİ görüntü-temelli sitometre ile incelenmesi.....	61
Çizelge 4.15. GA ve L-OHP kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine etkisinin TALİ görüntü-temelli sitometre ile incelenmesi.....	63
Çizelge 4.16. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax, Bcl-2, Kaspaz-8 ve Bax/Bcl-2 oranına etkilerine ait rölatif kat artışları.....	65
Çizelge 4.17. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax, Bcl-2, Kaspaz-8 ve Bax/Bcl-2 oranına etkilerine ait rölatif kat artışları.....	69
Çizelge 4.18. Nanolipozomal ilaç formülasyonlarının yükleme verimleri.	76
Çizelge 4.19. Nanolipozomal formülasyonların boyut, zeta potansiyeli ve PDI değeri.....	83

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kanser günümüzde önemli mortalite nedenlerinden biridir ve her geçen gün görülme sıklığı artan bir hastalık grubudur (Siegel, Miller, & Jemal, 2020). Globocan kanser verilerine göre 2018 yılında dünyada 880.792'si (% 9.2) kolon kanserinden olmak üzere 9.555.027 kişi kanser nedeni ile hayatını kaybetmiştir (Globocan, 2018). Aynı yıl, dünyada 1.849.518'i kolon kanseri olmak üzere 18.078.957 yeni kanser vakası ortaya çıkmıştır. 2040 yılında bu sayının yaklaşık 29.500.000 bulması öngörülmektedir (Who, 2018). Kolon kanseri, görülme sıklığı bakımından akciğer ve meme kanserinden sonra 3. sırada, kanser nedeni ölüm sıralamasında ise akciğer kanserinin ardından 2. sırada yer almaktadır. Globocan verilerine göre, Türkiye'de 2018 yılında kanser nedeni ile 116.710 kişi hayatını kaybetmiş ve 20.031'i (% 9.5) kolon kanseri olmak üzere toplam 210.537 yeni kanser vakası tespit edilmiştir. Türkiye'de kolon kanseri, kanser nedeni ölüm ve görülme sıklığı açısından 3. sırada yer almaktadır (Bray vd., 2018).

Kolon kanseri, iyi huylu poliplerin zamanla yüksek dereceli displazi ile agresif tümöre dönüşümü sonucunda oluşur (Vogelstein & Kinzler, 2002). Süreğen hücre yenilenme ve bağırsak epitelinin farklılaşma süreçleri, progenitor hücrelerini tümör hücrelerine dönüştüren genetik değişim ile bozulabilir. Bu değişiklik, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcıların inaktivasyonuna bağlı olarak aşamalı olarak gerçekleşir (Kheirlehid, Miller, & Kerin, 2013). Kolon kanserinin tedavisinde temel yöntem cerrahidir. Radyoterapi ve kemoterapi, kolon kanserinde kullanılan diğer tedavi seçenekleridir (Meyerhardt & Mayer, 2005). Kolon kanserinin tedavisi için cerrahi yöntemler tek başına veya kemoterapi ve radyoterapi ile kombinasyon şeklinde uygulanmaktadır. Cerrahi yöntemlerin temeli, tümürlü bölgenin kesilip çıkarılmasıdır. Kanserinin tekrarlama riski ve cerrahi sonrası mikroskopik düzeyde malign hücre kalıntıları

ciddi problemlerdir (Stein, Atanackovic, & Bokemeyer, 2011). Radyoterapide ise kanserli hücreler, spesifik frekansta ve şiddette iyonlaştırıcı radyasyon kullanılarak yakılır. Ancak, sağlıklı hücrelerin zarar görmesi ve radyasyon dağılımının tüm kanser hücrelerine eşit olmaması radyoterapinin kolon kanseri tedavisinde kullanımını sınırlamaktadır (Mayoclinic, 2018). Kemoterapi, kolon kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Kemoterapi, tek başına ve/veya cerrahi ve radyoterapi ile birlikte uygulanmaktadır. Tedavide kullanılan ajanlar, antineoplastik ilaçlardır ve çoğu antiproliferatif özelliğe sahiptir. Tek ajan ile tedavide, klinik yarar sınırlıdır. Monoterapi ile ilgili yaygın sorunlar arasında hücrel ve tümör seviyesinde ilaç direnci, ilacın penetrasyonunu ve etkinliğini engelleyen sert tümör mikroçevresi, tümör heterojenitesi ve doz sınırlayıcı toksisite bulunmaktadır. Muhtemel gelişebilecek ilaç direncini engellemek hedefinde dahil olmak üzere, düşük yan etki ile yüksek terapötik etki elde etmek için, ajanlar kombinasyon halinde uygulanır (Lazikani, Banerji, & Workman, 2012). Kombinasyon tedavisi, sinerjistik etkileşim ile yüksek terapötik etki elde edilmesine ve yan etkilerin azalmasına olanak sağlayabilir. Kolon kanserinde kombinasyon tedavi modaliteleri yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak sonuçlar hala yetersizdir ve kemoterapötik etkinlik yeteri kadar yüksek değildir. Farklı ilaçların ve/veya moleküllerin etki mekanizmalarına dayanarak, yeni terapötik modalitelerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

İlaçların düşük çözünürlüğü, vücutta erken parçalanma ve kontrollü salımının sağlanamaması terapötik modalitelerin geliştirilmesinde önemli problemlerdir. Bu sorunlar, nano-ölçekli taşıyıcı sistemler sayesinde büyük oranda aşılmıştır (Hare vd., 2017). Buradaki amaç, ilaçların taşıyıcı sistem içerisine yüklenmesi veya konjugasyonu ile etkinliği ve çözünürlüğü artırmak, erken parçalanmayı önlemek, hastalıklı bölgeye hedeflendirmek ve kontrollü salımın sağlanmasıdır (Koren & Torchilin, 2011). Taşıyıcı sistemlerden teranostik amaçlar için en önemlisi ve uygun olanı, lipozomlardır. Lipozomlar, boyutları 25 nm-2.5 µm arasında olan ve fosfolipit çift tabaka içeren biyoyumlu, immünolojik olmayan ve geri dönüşümlü nano-ölçekli veziküllerdir. Sitotoksik ajanların lipozomal formülasyonları, iyileştirilmiş farmakokinetik, düşük sistemik toksisite ve yüksek tümör/hücre içi salım nedeniyle potansiyel olarak daha etkili antikanser tedavi stratejilerinin temelini oluşturur. Lipozomlar sayesinde, düşük

çözünürlük, kısa yarı-ömür, zayıf biyo-yararlanım ve sağlıklı dokularda istenmeyen toksisite gibi çeşitli sorunlar büyük ölçüde çözülmüştür (Lian & Ho, 2001).

Doktora tezinin temeli, Dr. Dıbirdık ve talebelerinin çeşitli kanserlerin tedavisine yönelik yeni terapötik modalite geliştirme çalışmaları sırasında *in vitro* HT-29 insan kolon kanseri modelinde etnofarmakolojik bir ürün ile aldıkları sonuçlara dayanmaktadır (Fidan, 2017; Zenginer, 2017). Ürünün kimyasal içeriğinde bulunan gallik asit (GA), tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit, nadolol'ün antiproliferatif etkileri ve kemoterapötikler 5-florourasil (5-FU), okzaliptatin (L-OHP) ve setuksimab (C225) ile etkileşimlerinin irdelenerek fonksiyonel kombinasyonların özgün nanolipozomal formülasyonlarının geliştirilmesi bu tezin temel hedefidir.

Çalışmamızda ilk aşamada, GA, tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit, nadolol'ün antiproliferatif etkileri ve kemoterapötikler 5-FU, L-OHP ve C225 ile etkileşimleri *in vitro* incelendi. Takibinde, ilaç kombinasyonlarının kombinasyon indeksi (CI) ve doz azalma indeksi (DRI) değerleri hesaplandı. İkinci aşamada sinerjistik ilaç kombinasyonlarının apoptoza etkisi araştırıldı ve apoptoz yolağında rol oynayan genler B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 ilişkili X proteini (Bax), Kaspaz-8'in mRNA ve protein ifade düzeyleri sırasıyla gerçek zamanlı kantitatif polimer zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ve Western blotlama yöntemi ile belirlendi. Üçüncü aşamada, sinerjistik ilaç kombinasyonlarının nanolipozomal formülasyonları geliştirildi ve karakterize edildi. Takibinde, serbest ilaç kombinasyonları ve nanolipozomal formülasyonların HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) hücre proliferasyon analizi ile karşılaştırıldı.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Kanseri

Kolon kanseri, dünyada ve Türkiye’de en yaygın üçüncü kanser türüdür ve kanser nedenli ölüm sıralamasında üçüncü sırada yer almaktadır. Kolon kanserinin büyük bir kısmının, kolon veya rektum’un mukoza tabakası içindeki kanserli olmayan epitel hücrelerinin anormal büyümesinden başladığı bilinmektedir. Kolon kanserin prognozunu değerlendirmek ve tedavi protokolünü belirlemek için, Amerikan Kanser Ortak Komitesi TNM sistemine dayanan kolon kanseri evrelemesini belirlemiştir (T=primer tümör; N=bölgesel lenf düğümleri; M=uzak metastaz) (Çizelge 2.1) (Hari vd., 2013). Beş evre vardır ve standart tedavi, farklı aşamalar arasında değişiklik gösterebilir.

Evre 0’da (karsinoma in situ), kolon epitel hücreleri anormal büyür, kolon mukozasında prekanseröz lezyonlar veya kanser oluşur. Bu polipler, lokal eksizyon veya rezeksiyon yoluyla cerrahi olarak çıkarılabilir. Lokalize evrelerde (evre I ve II), primer tümör çoklu tabakalara yayılır ancak kolon duvarı içinde sınırlıdır. Kolon segmentinin cerrahi rezeksiyonu standart tedavidir. Evre III’te kanser, kolon duvarına nüfuz etmiş ve yakındaki lenf düğümlerine veya dokularına yayılır. Tedavi seçenekleri arasında, tümörün tekrarlamaması için cerrahi olarak çıkarılması ve takibinde kemoterapi bulunur. Evre IV’te ise, kanser uzak lenf düğümlerine yayıldığında veya karaciğer, akciğer, yumurtalık veya tekrarlayan tümörler gibi uzak organlarda metastaz oluştuğunda, etkilenen organların cerrahi yöntemler ile çıkarılması gerekir. Kemoterapi, ameliyat öncesi veya sonrası verilebilir. Radyoterapi ve hedefe yönelik tedavi, hasta sağ-kalımı iyileştirmek veya semptomları hafifletmek için kullanılabilir.

Çizelge 2.1. TNM sistemine dayanan kolon kanserin evrelemesi.

Primer tümör (T)	
TX	Primer tümörün olmaması
T0	Primer tümör için hiçbir delil yoktur
Tis	Karsinoma insitu (intraepitelyal ve intramural)
T1	Tümör submukozayı invaze eder
T2	Tümör muskularis propriayı invaze eder
T3	Tümör muskularis propriadan geçerek subserozaya veya periton ile kaplı olmayan perikolik veya perirektal dokuya invazedir
T4	Tümör diğer organları veya yapıları invaze eder veya visseral peritonu perforer eder
Bölgesel lenf nodları (N)	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
N0	Bölgesel lenf nodlarında metastaz yoktur
N1	Perikolik veya perirektal lenf nodlarına 1-3 metastaz
N2	Perikolik veya perirektal lenf nodlarına ≥ 4 invazyon
Uzak metastaz	
MX	Uzak metastaz varlığı değerlendirilememiştir
M0	Uzak metastaz yoktur
M1	Uzak metastaz vardır

2.1.1. Kolon Kanserinde Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

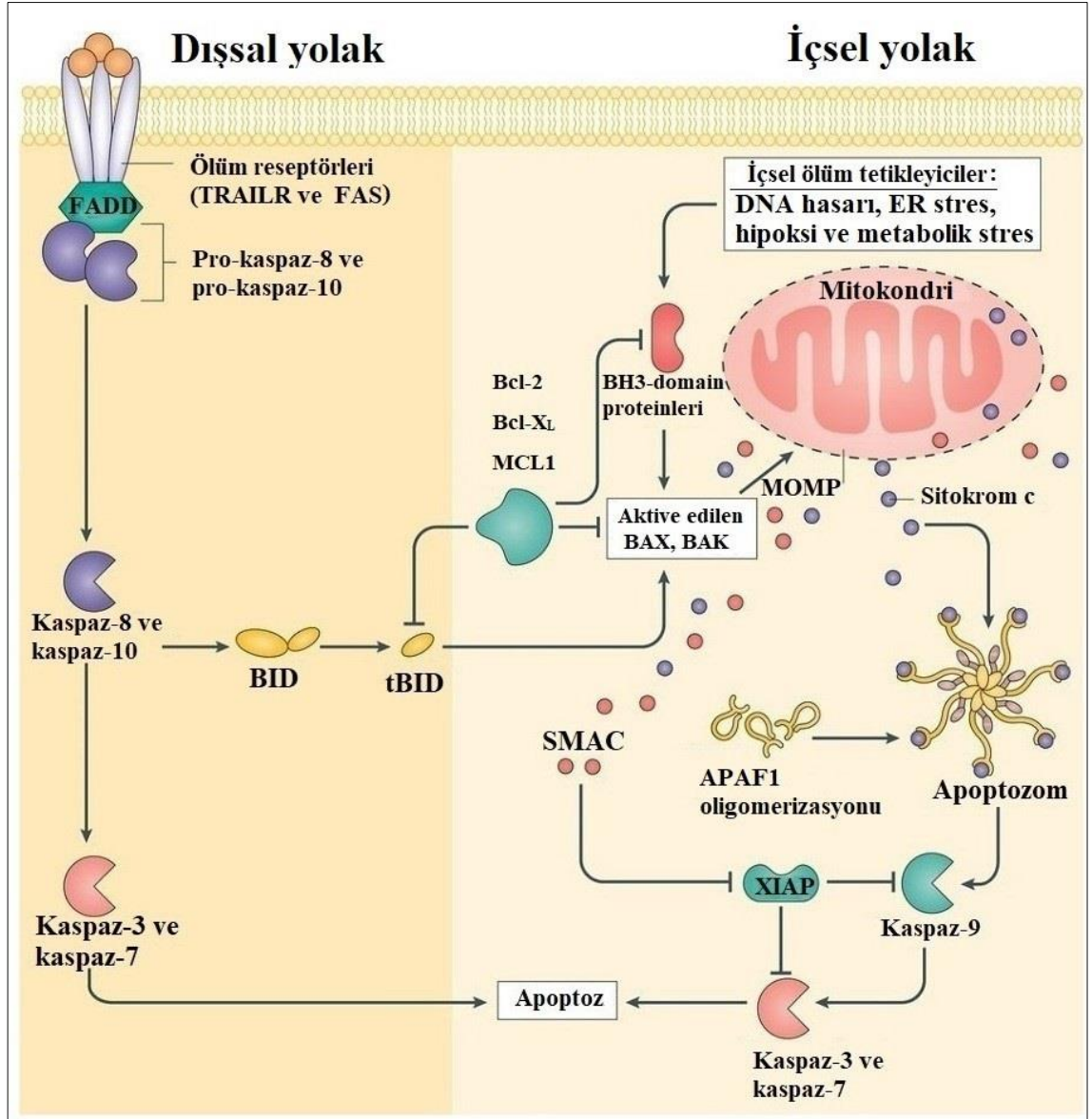
Kolon tümörü gelişimi sırasında, epitel kanser hücrelerinde bazı gen mutasyonlarının ve epigenetik değişikliklerin meydana geldiği bulunmuştur. Bu değişiklikler, hücre proliferasyonu ve sağ-kalımda rol oynayan moleküler yolların düzensizliğine yol açar. Bu genetik değişiklikler, kolon kanserinin oluşumu, gelişmesi, invazyon, metastaz ve anjiyogenez dahil olmak üzere her aşamada rol oynar (Hanahan & Weinberg, 2011). Kolon kanseri ile sıklıkla ilişkili tümör baskılayıcı genler ve onkogenler, Çizelge 2.2’de özetlenmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Kolon kanseri ile sıklıkla ilişkili tümör baskılayıcı genler ve onkogenler (Munteanu & Mastalier, 2014).

Gen	Sıklık (%)	Kusur nedeni	Değerlendirme
APC	85	β -katenin onkoproteininin indirgenmemesine bağlı olarak Wnt sinyalinin aktivasyonu. İnaktive edici mutasyon, mitoz sırasında iğ mikrotübüllerinin düzenlenmesinde kayba neden olur.	FAP'de germ-line mutasyonu ve sporadik kolon kanserinin % 85'inde somatik inaktivasyon.
MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	15-25	Onkojenik mutasyonların birikmesine ve tümör baskılayıcılarda ifade kaybına yol açan DNA tek-nükleotid yanlış-eşleşme onarım hatası. Mutasyonun inaktive edilmesi, nükleotid tekrarları içindeki iplik kaymasının onarım yeteneğini bozar.	Kalıtısal non-polipozis kolon kanserinde germ-line mutasyonu; epigenetik sessizleştirme, tümör MLH1 protein ekspresyonunun kaybına neden olur.
TP53	35-55	17p'de heterozigotluk kaybı ile eşleştirilmiş missense mutasyonlarını inaktive eden ve hücre döngüsü düzenlenmesinden sorumlu bir proteinin kodlanması. İnaktive edici mutasyon, hücre döngüsü tutuklanmasının düzenlenmesinde kayba ve hücre ölümüne neden olur.	Li-Fraumeni sendromunda germ-line mutasyonu. İnaktivasyon, adenomların kötü huylu dönüşümü ile çakışabilir. Kolon tümörlerinde, p53 mutasyon insidansı % 54'tür.
TGFBR2	25-30	Büyümenin engellenmesi ve apoptoza aracılık eden sinyal yollarından sorumlu reseptör; yanlış eşleşme-onarım hataları olan hastalarda TGFBR2 kodlama dizisi içinde poliA tekrarında mutasyon ile veya kinaz bölgesinin inaktive edici mutasyonu ile etkisiz hale getirilir.	Mikrosatellit instabilitesi olan tümörlerin %90'ından çoğunda ve mikrosatellit stabil kolon kanserlerin % 15'inde mutasyon mevcuttur.
KRAS	35-45	KRAS G-proteinini, PI3K-PDK1 PKB ve RAF-MEK-ERK1/2 sinyal yollarının aktivasyonu ile sonuçlanan kodlanması, hücre sağ-kalımı ve apoptozun baskılanmasının teşvik edilmesi.	Kardiyo-fasio-kutanöz sendromda germline mutasyonu. KRAS mutasyonu, adenom-karsinom dönüşümünde erken aşamada ortaya çıkar.
SMAD4	10-35	SMAD2 ve SMAD3 ile birlikte TGF- β yolağının bileşenleri; SMAD4 ve SMAD2, kolon kanserinde sıklıkla heterozigotluk kaybı olan kromozom 18q üzerinde bulunur; homozigot delesyon veya mutasyonla inaktive edilmiştir.	Ailesel juvenil polipozisdeki germ-line mutasyonları, kolon kanseri riskini otuz ila kırk yılda % 60'a kadar çıkarmaktadır.
PTEN	10-15	Mutasyonu etkisiz hale getiren fonksiyon kaybıyla PI3K yolağının aktivasyonunun teşvik edilmesi, hücre sağ-kalım sinyali ve apoptozun baskılanmasıyla sonuçlanır.	Kolon kanseri riskinin % 10 arttığı, yüksek meme kanseri riski taşıyan Cowden sendromunda germ-line mutasyonu.
BRAF	8-12	KRAS mutasyonunun biyolojik sonuçlarına benzer, RAF-MEK-ERK1/2 yolağı üzerinden sinyal iletiminin aşağı akış medyatörü olan BRAF serin-treonin kinazdaki mutasyonun aktivasyonu.	Hiperplastik polipoz ile ilişkili, KRAS gibi serrated adenomlarda artan insidans, kardiyo-fasio-kutanöz sendromda germ-line mutasyonu.

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, çok hücreli organizmalarda stresi yönetmek ve doku homeostazını korumak için gerekli hücrel bir süreçtir.

Apoptoz, tümör oluşumuna karşı korunma mekanizmasıdır (Hanahan & Weinberg, 2011) ve regüle edilen bir dizi biyokimyasal olay tarafından düzenlenir. Stres sinyallerinin işlenmesi ve memelilerde hücre ölümünden sorumlu, dışsal ve içsel yolak olarak tanımlanan iki apoptoz yolağı vardır. Dışsal yolak, pro-apoptotik ligandların hücre yüzey ölüm reseptörlerine bağlanması ile ilişkilidir. Dışsal yolakta Kaspaz-8 önemli rol oynar. Ölüm reseptörleri, ligand bağlanması için hücre dışı alanını ve efektör aracılı sinyal iletimi için hücre içi ölüm bölgesini içerir. Pro-apoptotik ligandlar, büyük sitokin tümör nekroz faktör ailesine aittir. Bu ligandlar hücre yüzeyinde bulunur veya hücre dışı boşluğa salgılanır (Ashkenazi, 2008). Pro-apoptotik ligandlar reseptörlerine bağlandığında, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 ile birlikte adaptör proteininin katılımı sonucunda ölüm indükleyici sinyal kompleksi oluşur. Ölüm indükleyici sinyal kompleksi oluşumu, Kaspaz-8 ve kaspaz-10 işlenmesi ve aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 aktivasyonunun takibinde sitoplazmaya salım gerçekleşir, efektör kaspazlar aktive olur ve apoptoz indüklenir (Şekil 2.1) (Ashkenazi, 2008).



Şekil 2.1. Apoptoz yolağı.

İçsel apoptoz yolağı, DNA hasarı, işlevsiz onkogenler veya büyüme faktörlerinin yokluğu gibi hücrel stresler tarafından tetiklenir. İçsel yolak, Bax ve Bcl-2 gibi Bcl-2 protein ailesi üyeleri ve mitokondri tarafından düzenlenir (Adams & Cory, 2007). Bax ve Bcl-2, tümör gelişmesinde ve/veya mitokondriyal disfonksiyon tarafından tetiklenen içsel apoptoz yolağının inhibisyonunda önemli rol oynayan Bcl-2 protein ailesinin temel üyeleridir. Mitokondriyal disfonksiyon tarafından tetiklenen içsel apoptoz yolağında Bcl-2 proteinlerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Dolayısıyla, Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki denge hücrel süreçlerde önemlidir. Bax proteini, mitokondriyal dış zarın geçirgenleştirilmesini sağlayarak hücre ölümünü

tetikler. Bcl-2 proteini ise, Bax aktivitesini inhibe ederek apoptozu önler (Hector & Prehn, 2009; Khodapasand, Jafarzadeh, Farrokhi, Kamalidehghan, & Houshmand, 2015; Mohan vd., 2012; Yang, Sales, Fuller, Seifalian, & Winslet, 2009; Yip & Reed, 2008). Bcl-2 proteinleri, iki farklı şekilde hücrenin hayatta kalmasına katkıda bulunur. Bunlar; apoptozun aktivasyonu için gerekli adaptörlerin inhibisyonu ve apoptozun karakteristiği olan nükleer ve hücre parçalanmasına yol açan kaspazların yarılmasıdır. Örneğin, DNA hasarı sonucunda tümör baskılayıcı gen p53 aktive olur. p53, Bax ve Bak proteinlerinin aktivasyonu için BH3 proteinlerinin ekspresyonunu indükleyerek ölüm sinyalini iletir. Bu durum, mitokondriyal dış membran geçirgenliğine ve sitokrom *c*, ikinci mitokondriyal kökenli kaspaz aktivatörü/düşük PI'li doğrudan apoptoz inhibitör bağlayıcı protein (SMAC/Diablo), proapoptotik mitokondriyal serin proteaz Omi/HtrA2, apoptoz-indükleyici faktör ve endonükleaz G dahil olmak üzere çeşitli mitokondriyal apoptotik proteinlerin salınmasına yol açar (Vousden & Prives, 2009). Sitokrom *c* apoptozom oluşumunu, SMAC/Diablo ve HtrA2/Omi aracılığı ile kaspaz-9 aktivasyonunu tetikler. SMAC/Diablo ve HtrA2/Omi, apoptoz inhibitörlerini antagonize eder. Apoptoz-indükleyici faktör ve endonükleaz G, DNA'nın degradasyonunu indükler (Joza vd., 2001; Wang, Yang, Chai, Shi, & Xue, 2002). Ölüm indükleyici sinyal kompleksinin ekspresyon seviyeleri düşük olan hücrelerde Kaspaz-8 bağımlı Bid yarılması sonucunda, Bax/Bak ve mitokondri yolu ile apoptotik sinyal iletimini artırmak için tBid oluşur (Şekil 2.1) (Adams & Cory, 2007).

2.1.2. Kolon Kanserinin Tedavisi

Kolon kanserinin tedavisinde kullanılan stratejiler cerrahi, adjuvan radyoterapi veya kemoterapiden oluşur. Cerrahi, kolon kanserinin her evresi için standart tedavidir (Meyerhardt & Mayer, 2005). Evre II veya ileri evre kolon kanser vakalarında cerrahi tedaviyi genellikle adjuvan radyoterapi, kemoterapi, hedefli tedavi ve immünoterapi modaliteleri takip eder. Kolon kanserinin kemoterapötik tedavisinde 5-FU, L-OHP, irinotekan ve kapesitabin sıklıkla kullanılır. 5-FU, temel biyosentez reaksiyonlarını inhibe eder ve genetik bilginin bulunduğu DNA ve RNA ile etkileşimi düzeyinde etkisini gösterir. 5-FU, kolon, meme, sindirim sistemi ve çeşitli kanserlerin tedavisinde 40 yıldan fazla bir süredir yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir antimetabolit ve primidin analogu ilaç ailesi üyesi olarak 5-FU'nin sitotoksikite mekanizması, floro nükleotitlerin DNA ve

RNA ile hatalı eşleşmesine ve timidilat sentazın inhibisyonuna atfedilir (Longley, Harkin, & Johnston, 2003).

L-OHP, okzalot grubu ihtiva eden üçüncü nesil 1,2-diaminosikloheksan platinyum bazlı antineoplastik yapıdır. L-OHP'in etki mekanizması, kesin olarak bilinmemektedir. Platin türevi bileşiklerin sitotoksik etkilerini DNA eklentileri oluşturarak gösterdikleri düşünülmektedir (Raymond, Chaney, Taamma, & Cvitkovic, 1998). DNA'da meydana gelen platin eklentileri, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engeller. L-OHP'in floropirimidinler ile kombinasyon tedavisinde kullanımı onaylıdır. Bu ajanların en az iki-bileşenli kombinasyonları tedavi için kullanılır. Trifluridin ve tipirasil kombinasyonu da klinik onaylıdır.

Kemoterapi ilaçları, hedefli ajanlar ile kombinasyon halinde de kullanılmaktadır. Sağlıklı proliferatif hücrelere yan etkilerden dolayı, klinik ortamlarda bu kemoterapötik ajanlar genellikle FOLFOX (5-FU, L-OHP, folik asit), FOLFIRI (5-FU, irinotekan veya folik asit), FOLFOXIRI (5-FU, L-OHP, irinotekan ve folik asit), CapeOx veya CAPOX (L-OHP ve kapesitabin) (Kelland, 2007) gibi klinik onaylı kombinasyonlar halinde verilir. Kolon kanserinde yararlanan epidermal büyüme faktörü reseptörüne (C225 ve panitumumab) veya vasküler endotel büyüme faktörüne hedefli (bevacizumab, ramucirumab ve ziv-aflibercept) monoklonal antikolar geliştirilmiştir. Kinaz inhibitörü regorafenib de ileri evre kolon kanser tedavisinde kullanılmaktadır.

C225, kolon kanser tedavisi için klinik onaylı insan immünoglobulin G1 içeren kimerik anti-epidermal büyüme faktörü reseptörü monoklonal antikordur. C225, epidermal büyüme faktörü reseptörüne seçici olarak bağlanır ve endojen ligand bağlanmasını inhibe eder (Mendelsohn & Baselga, 2003). C225, Bax/Bcl-2 oranını değiştirerek ve apoptotik kaspazların ekspresyonunu artırarak kanser hücrelerinde apoptozu indükler. C225, otokrin büyüme faktörlerinin ve anjiyogenik faktörlerin salgılanmasını azaltır (Reynolds & Wagstaff, 2004).

2.2. Kanser Tedavisinde Etnofarmakolojik Kökenli Terapötik Modaliteler

Doğa, birçok etnofarmasötik ajanın ve ilaç aktif bileşenlerinin kaynağıdır. Örneğin; *Thymus vulgaris* (Menhali vd., 2015), *Glycyrrhiza glabra* (Sharma vd., 2017), *Vitis vinifera* (Asl & Hosseinzadeh, 2016), *Alpinia officinarum* (Ding, Yang, Feng, & Xian, 2019) ve *Urtica dioica* (Kardan vd., 2020) bitki ekstraktlarının antikanser etkileri

rapor edilmiştir. Etnofarmakoloji, halk ilaçlarının tanımı, gözlemi ve biyolojik aktivite araştırmasını kapsayan disiplinler arası ve multidisipliner bir alandır (Cordell & Colvard, 2005). Etnofarmakolojik çalışmalar temelinde doğal kaynaklardan terapötik molekül keşfi, mevcut tedavi sistemlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynar. Çok sayıda molekül, geleneksel tıpta kullanımlarına dayalı olarak doğal kaynaklardan izole edilmiş ve etkileri bildirilmiştir (Efferth vd., 2017). Etoposid, paklitaksel ve irinotekan klinik onaylı etnofarmasötik kökenli ajanların önemli örnekleridir (Heinrich, 2010).

Etnofarmasötik kökenli ürünlerin bir kısmı, kanser kombinasyon tedavisinde etkinlik göstermiştir (Pezzani vd., 2019). Bu moleküller, kemoterapötik ajanların etkilerinin artırılması ve tedavi kaynaklı yan etkilerin azaltılması hedefleri doğrultusunda yeni terapötik modalite geliştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılır. Doğal polifenollere örnek olarak kurkumin, kersetin ve apigenin verilebilir. Doğal bitki kökenli polifenollerin önemli bir çoğunluğunun *in vitro* ve *in vivo* anti kolon kanser özellikleri rapor edilmiştir (Alam, Almoyad, & Huq, 2018). Bu moleküllerin kombinasyon tedavi modalitelerindeki etkileri de bildirilmiştir (Rejhova, Opattova, Čumová, Slíva, & Vodička, 2018). Etnofarmasötik kökenli ajanlar kemoterapi ilaçları ile birlikte uygulandığında sinerjistik ilaç etkileşimleri ile yüksek terapötik etki sağlayabilir.

2.3. Kanser Kombinasyon Tedavisi

Antikanser ilaçların bir kısmı intravenöz uygulamalarda, özellikle kemik iliği ve gastrointestinal sistem olmak üzere sağlıklı dokularda yan etkilere yol açan, spesifik olmayan biyolojik dağılım göstermektedir. Dolayısı ile gastrointestinal sistem ve kemik iliği gibi proliferatif indeksi yüksek olan dokular üzerindeki yan etkiler hasta için önemli risk oluşturur. Konvansiyonel kemoterapötik stratejilerin bu sınırlamaları, sıklıkla sub-optimal dozaj, tedavi aksaması veya kesilmesi ve hastanın tedaviye cevabının azalmasıyla sonuçlanır (Pinto, Moreira, & Simões, 2011).

İki veya daha fazla ajan kombinasyon halinde uygulandığında yüksek terapötik etki elde edilmekte ve yan etkiler azalmaktadır. Kombinasyon tedavisinde, ilaçlar arasında sinerjistik veya additif etkileşim sonucunda yüksek terapötik etki elde edilmesi hedefdir. Kombinasyon tedavisi normal hücrelerde toksik etkileri önleyebilir, kanser hücrelerinde sitotoksik etkileri daha anlamlı hale getirebilir, tümör gelişimini/oluşumunu, invazyonu ve metastazı engelleyebilir ve ilaç direnci gelişimini en aza indirebilir (Kemp,

Shim, Heo, & Kwon, 2016). Kombinasyon rejimlerinde kullanılan ilaçların seçilmesinde, temel olarak kanserli ve sağlıklı hücreler arasındaki farklılığa bağlı kuramsallıklar yön gösterici olarak değerlendirilir.

2.3.1. Preklinik İlaç Kombinasyon Çalışmaları

Preklinik ilaç kombinasyon çalışmaları, her ilacın maksimum tolere edilebilen dozlarında birlikte uygulanarak en yüksek etkinliğin elde edilebileceği varsayımına dayanan kombinasyon kemoterapi protokollerinin daha rasyonel tasarımına imkan sağlar (Pinto vd., 2011). Preklinik ilaç kombinasyon çalışmalarının tasarımı yapılırken, ilaç konsantrasyonu, uygulama süresi, yöntemi ve ilaç etkileşimlerini analiz etmek için kullanılan istatistiksel metot gibi çeşitli faktörler dikkate alınır. Kombinasyon kemoterapisinde ilaç oranına bağlı etkilerin değerlendirilmesi, yaygın olarak hücre kültürü sistemlerinde yapılır. Tümör kaynaklı hücre dizileri ile yapılan *in vitro* deneyler, kanserin moleküler mekanizmalarını araştırmak için en önemli kaynaktır. Hücre kültürü sistemleri, avantajlıdır. *In vitro* hücre kültür modellerinin avantajlarına örnek olarak; çeşitli insan tümör hücre dizilerinin kullanılabilmesi, kültür koşullarının esnekliği ve protein/nükleik asit miktar tayininin kolaylığı verilebilir (Pinto vd., 2011).

2.3.2. İlaç-İlaç Etkileşimleri ve Kantitatif Analiz

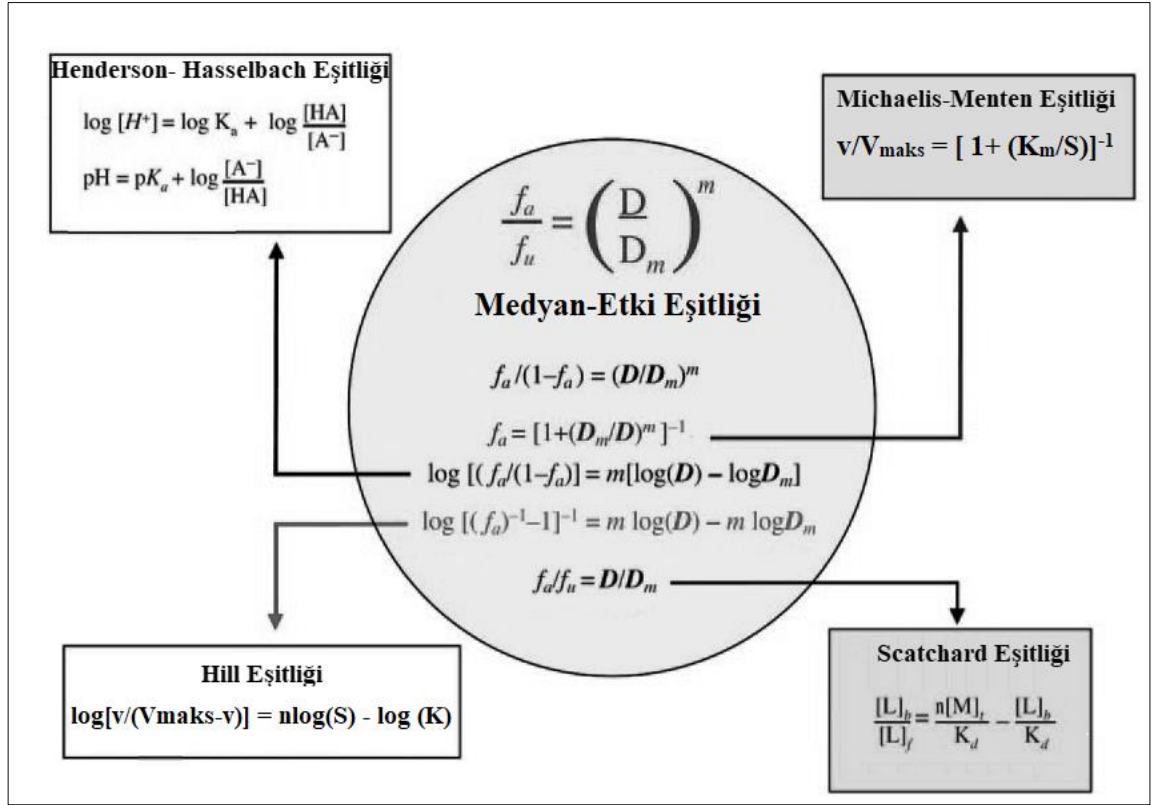
İlaç kombinasyonları, konsantrasyon, uygulama süresi veya programına bağlı olarak sinerjistik, antagonistik veya additif olabilir. Sinerjizm, additif etki ve antagonizm, ilaçların bireysel etkilerin toplamına göre sırasıyla daha büyük, eşit ve daha küçük olması şeklinde tanımlanır (Pemovska, Bigenzahn, & Furga, 2018). Kombinasyon etkisi, ilaçların bireysel etkilerinin toplamından daha büyük olduğunda, ilaç kombinasyonu sinerjistik olarak adlandırılır. Bir ilaç, diğer bir ilacın etkinliğini maskeleyemediği veya artırmadığı durumlarda ilaç kombinasyonu additiftir. Bu durum etkileşimsizlik olarak da bilinir ve temelde, ilaç kombinasyonu sinerjiye yol açmadığında beklenen veya ölçülen etkiyi gösterir. Kombinasyon etkisi, ilaçların bireysel etkilerinden daha düşük olduğu durumda ilaç kombinasyonu antagonistik olarak tanımlanır.

İlaç kombinasyonlarının analizi ve CI değerinin hesaplanması amacıyla, Chou-Talalay'ın Medyan-Etki denklemi, Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli ve en yüksek tek

ajan (HSA) yaklaşımı yaygın olarak kullanılır (Fouquier & Guedj, 2015). Medyan-Etki denklemi, Dr. Chou ve Dr. Talalay tarafından kütle-eylem yasası ilkesinden yararlanılarak çeşitli reaksiyon mekanizmaları ve farklı inhibisyon türleri için Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch ve Scatchard denklemlerinden matematiksel tümevarım ve tümden-gelim yolları ile türetilmiştir (Şekil 2.2) (Chou, 2010). Medyan etki denklemi birleşik bir teoridir. Denklem, ilaç kombinasyonlarının analizi ve CI değerinin hesaplanması amacıyla literatürde yaygın olarak kullanılan ve çok sayıda atıf almış bir yöntemdir (Chou, Shapiro, Fu, Chou, & Merzenich, 2019). Medyan-Etki denklemi, Eşitlik 2.1’de verilmiştir.

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m} \right)^m \quad \text{Eşitlik 2.1}$$

Eşitlik 2.1, ilacın dozunu ve etkisini ilişkilendirir (Chou, 2006). Eşitlik 2.1’de D; ilacın dozu, f_a ; ilaç dozunun etkisi ve f_u ; ise ilaç dozundan etkilenmeyen kısımdır ($f_u = 1-f_a$). D_m , % 50 inhibisyona yol açan medyan-etki (IC_{50} , ED_{50} veya LD_{50}) dozu ve m , doz-etki eğrisini gösteren kinetik katsayıdır. $m=1$, >1 ve <1 sırasıyla hiperbolik, sigmoidal ve düz-sigmoidal doz-etki eğrisini ifade eder (Chou, 2011).



Şekil 2.2. Medyan-Etki denkleminin temeli (Chou, 2006).

Medyan-Etki denklemi, mekanizma-temelli (örneğin; Michaelis-Menten) ve etki-temelli denklemlerden köken alır ve ilaç etkilerinin boyutsuz olarak ölçülmesine olanak sağlar. Denklem, etkilerin oranı (E_d , $(1-E_d)$ veya f_a ve f_{ua}) ve dozların oranından (gerçek doz d , medyan doz M) oluşur. Doz ve etkinin tanımlanmış parametreler ile değiştirilebileceği kanıtlanmıştır (Chou, 2006). Medyan-Etki denklemi, mekanistik analiz yoluyla türetilmiş olmasına rağmen mekanizmaya-öзgü sabitler yerine sadece doz ve etkiyi boyutsuz oranlarda ilişkilendirir. Medyan-Etki denkleminde m eğim değeri, D_m ise x eksenini kesen noktanın anti-logaritmasıdır. m ve D_m değerleri biliniyorsa, herhangi bir etki (f_a) seviyesi için doz (D) veya herhangi bir doza karşılık gelen etki belirlenebilir. Bir başka ifade ile, m ve D_m değerleri biliniyorsa doz-etki eğrisi belirlenebilir. Medyan-Etki denklemi, eşitliğin her iki tarafının logaritması alınarak doğrusallaştırılabilir. $\log (f_a/f_{ua})$ ile $\log d$ arasındaki düz çizgi, Hill grafiğini verir.

Şekil 2.2’de gösterildiği gibi, Medyan-Etki denkleminin yeniden düzenlenmesi ve/veya logaritmasının alınması biyomedikal bilimlerdeki dört temel yaygın denklem Michaelis-Menten (birinci dereceden enzim kinetiği, $m=1$), Hill eşitliği (oksijen-hemoglobin etkileşimi ($m=n$)) gibi yüksek miktarda biyolojik reseptörlerde birincil ligand

etkileşimi), Scatchard denklemi (ligand reseptör bağlanması ve ayrışması) ve Henderson-Hasselbalch (pH-iyonizasyonu) denkleminin ortaya çıkmasına neden olur. Medyan-Etki dozu (D_m), Michaelis-Menten denklemindeki K_m değerine (yarı-doygunluk), Hill denklemindeki K değerine (yarı-etkileşim), Henderson-Hasselbach eşitliğindeki pK_a değerine (yarı-iyonizasyon) ve Scatchard denklemindeki K_d değerine (yarı-bağlanma ve -ayrışma) karşılık gelir (Chou, 2006).

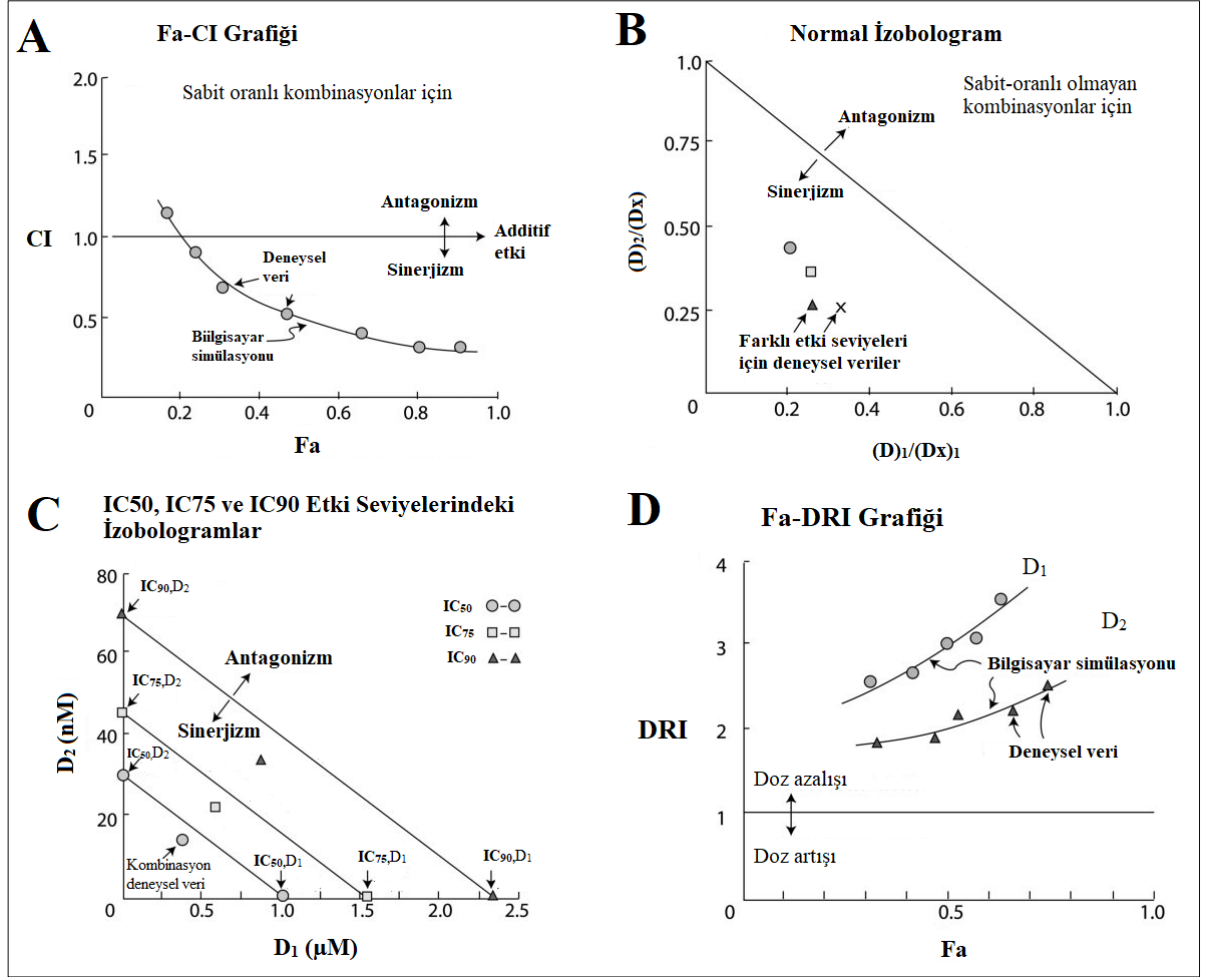
Medyan-Etki denklemi, çoklu ilaç kombinasyonlarının analizinde kullanılabilir. n sayıda bileşenden oluşan ilaç kombinasyonlarının analizi, Medyan-Etki prensibi ile yapılabilir (Chou, 2011). Tek ilaç için geliştirilmiş olan medyan-etki denklemi, çoklu ilaçlara genişletilebilir. Bu amaçla, ikili-ilaç kombinasyonlarının analizi, sinerjizm veya antagonizmanın nicel tayini için CI terimi ve Eşitlik 2.2 tanımlanmıştır.

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1 \times \left[\frac{f_a}{1-f_a} \right]^{\frac{1}{m_1}}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2 \times \left[\frac{f_a}{1-f_a} \right]^{\frac{1}{m_2}}} \quad \text{Eşitlik 2.2}$$

$(D_x)_1$ ve $(D_x)_2$, % x inhibisyon için gereken D_1 ve D_2 dozlarıdır. $(D_x)_1$ ve $(D_x)_2$ değerleri, doz-etki denkleminde hesaplanabilir. Paydadaki dozların toplamı, $(D)_1 + (D)_2$, sistemi % x oranında inhibe eder. Eşitlik 2.2'de CI değerinin <1 , $=1$ ve >1 , olması sırasıyla sinerjizm, additif etki ve antagonistik etkileşimi ifade eder (Chou, 2006).

Medyan-Etki prensibi sayesinde CI teoremi, izobologram, DRI denklemi ve poligonogram yaklaşımı geliştirilmiştir (Şekil 2.3). F_a -CI grafiğindeki, x -ekseni etki seviyelerini (f_a) y -ekseni ise CI değerlerini gösterir (Şekil 2.3A). F_a -log (CI) grafiği, F_a -CI grafiğindeki büyük ölçekli noktaları küçülterek additif etki eksenini ($CI=1$) ile simetrik hale getirir. Medyan-Etki denklemi, ilaç-ilaç etkileşimlerinin kantitatif olarak tespit edilmesini sağlayan CI-izobologram denkleminin temelidir. İzobologram eğrisi, ilaçların dozlarını temel alır (Şekil 2.3B). CI grafiği ise etki-temelli bir grafikdir. Her iki yaklaşımın prensibi, CI teoremine dayanır. İzobologram iki boyutludur ve ikili ilaç kombinasyonları için uygundur (Chou, 2006). İzobologram grafiği, ilaçların kombinasyon etkisi olarak çizilir. Her ilacın bireysel etkileri, eksenlerden belirlenebilir. İzobologram, IC_{50} (IC_{75} veya IC_{90}) ve bu etkiyi elde etmek için ilacın hangi konsantrasyonunun gerekli olduğunu gösterir (Şekil 2.3C). F_a -DRI grafiği, kombinasyondaki her bir ilaç için belirtilen etki seviyelerinde DRI değerini gösterir (Şekil 2.3D). F_a -DRI grafiğindeki DRI değerleri, ilaç

kombinasyonlarındaki her bir bileşen için olumlu doz azalmasının gerçekleşip gerçekleşmediğini ifade eder.



Şekil 2.3. Medyan-Etki prensibi ile ilaç kombinasyonlarının analizi (Chou, 2006).

Dr. Chou tarafından, sinerjizm veya antagonizmanın dereceleri tanımlanmıştır (Çizelge 2.3). Sinerjizm için CI değeri, 0 ile 1 aralığındadır. Antagonizm için bu değer, 1 ile sonsuz aralığındadır (Chou, 2006). Log(CI), CI grafiğinin simetrik olarak gösterilmesine imkan sağlar (additif etki için F_a -log (CI) grafiğinde, $\log (CI)=0$; sinerjizm için $CI = 0.1$ ve 0.01 , $\log (CI) = -1$ ve -2 'yi verir, antagonizma için $CI = 10$ ve 100 sırası ile $\log (CI)=1$ ve 2 'yi verir) (Çizelge 2.3). Sinerjistik ve/veya antagonistik etkileşimin derecesi, ilaç kombinasyonunun farklı doz ve/veya etki seviyelerinde farklı olabilir.

Çizelge 2.3. Kombinasyon indeksi aralığı ve tanımı (Chou, 2011).

CI: Kombinasyon indeksi

CI aralığı	Log10 (CI) aralığı	Sınıflandırma
< 0.1	< -1	Çok güçlü sinerjizm
0.1 - 0.3	(- 1) – (- 0.52)	Güçlü sinerjizm
0.3 - 0.7	(- 0.52) – (- 0.15)	Sinerjizm
0.7 - 0.85	(- 0.15) – (- 0.07)	Orta sinerjizm
0.85 - 0.9	(- 0.07) - (- 0.05)	Az sinerjizm
0.9 - 1.1	(- 0.05) – (0.04)	Additif etki
1.1 - 1.2	0.04 – 0.08	Az antagonizm
1.2 - 1.45	0.08 – 0.16	Orta antagonizm
1.45 - 3.3	0.16 – 0.52	Antagonizm
3.3 - 10	0.52 - 1	Güçlü antagonizm
>10	>1	Çok güçlü antagonizm

Dr. Chou, medyan etki prensibi ilaç kombinasyon çalışmalarının tasarımı için moleküllerin ve/veya kemoterapötiklerin IC₅₀ doz katlarının temel alınmasını önerir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Chou-Talalay temelli ilaç kombinasyonu çalışma tasarımı (Chou, 2006).
IC₅₀: %50 inhibisyona neden olan doz, F_a: İlaç inhibisyon etkisi.

		İlaç A					
		0	0.25 x (IC ₅₀)A	0.5 x (IC ₅₀)A	1 x (IC ₅₀)A	2 x (IC ₅₀)A	4 x (IC ₅₀)A
İlaç B	0	Kontrol	(F _a) _A	(F _a) _A	(F _a) _A	(F _a) _A	(F _a) _A
	0.25 x (IC ₅₀)B	(F _a) _B	(F _a) _{A,B}				
	0.5 x (IC ₅₀)B	(F _a) _B		(F _a) _{A,B}			
	1 x (IC ₅₀)B	(F _a) _B			(F _a) _{A,B}		
	2 x (IC ₅₀)B	(F _a) _B				(F _a) _{A,B}	
	4 x (IC ₅₀)B	(F _a) _B					(F _a) _{A,B}

Medyan-Etki prensibi temelinde, DRI terimi tanımlanmıştır (Chou, 2006). Medyan-Etki denkleminin yeniden düzenlenmesi, kombinasyonlardaki her ilacın DRI değerinin hesaplanmasına olanak sağlar. İstenilen veya olumlu doz azalması DRI (>1), terapötik uygulamalarda toksisitenin azalmasına neden olur. DRI, kombinasyonda yer

alan her bir ilacın dozunun, belirli bir etki seviyesinde kaç kat azaltılabileceğinin bir ölçüsüdür. DRI, düşük dozda konakçıya karşı toksisitenin azaldığı ve terapötik etkinliğin korunduğu durumlarda klinik olarak önemlidir. $DRI > 1$ istenen durum olmasına rağmen, additif etki ve/veya antagonistik etkileşimlerde de DRI değeri 1'den büyük olabilir. DRI değerinin $= 1$, > 1 ve < 1 olması sırasıyla herhangi bir doz azalmasının gerçekleşmediğini, istenilen (olumlu) doz azalması ve istenmeyen (olumsuz veya negatif) doz azalmasının gerçekleştiğini gösterir (Chou vd., 2019). Daha büyük DRI değeri, verilen terapötik etki için daha fazla doz azalmasını ifade eder. n sayıda bileşenden oluşan ilaç kombinasyonlarındaki her bir bileşen için DRI değerleri Chou-Talalay metodu ile hesaplanabilir. Dr. Chou ve ekibi, ilaç etkileşim parametrelerinin belirlenmesini sağlayan yazılım (CompuSyn) geliştirmiştir. Bu yazılım, doz-etki eğrisi, medyan-etki grafiği, CI grafiği, izobologram, DRI grafiği ve poligonogramı gösterir.

HSA, ilaç kombinasyonunun etkisinin (E_{AB}) bileşenlerin bireysel etkilerinden (E_A ve E_B) daha fazla olduğu varsayımına dayanmaktadır. HSA modelinde pozitif etkinin önemi, kombinasyon etkisini en yüksek tekli ajan'ın etkisi ile karşılaştıran istatistiksel analizin p değeri ile ifade edilir. HSA yaklaşımı, anlamların farkından ziyade, farklılıkların önemini ifade eder. Kombinasyonda yer alan ajanların bireysel etkilerine kıyasla, ilaç kombinasyonunun üstünlüğüne dair kanıt sağlar. HSA modeli, kombinasyonda yer alan ilaçların bireysel etkilerine kıyasla pozitif bir ilaç kombinasyonunun etkisini gösterir. Bu yöntem ilaç kombinasyon etkisini en yüksek tekli ajanın etkisi ile karşılaştırır, ancak bireysel ilaçlardan beklenen additif etkiye kıyasla üstün bir kombinasyon etkisini başarılı bir şekilde gösteremez (Fouquier & Guedj, 2015). HSA yaklaşımı, en az bir ilacın tek ajan olarak etkisiz olduğu durumlarda sınırlı kanıtlar sağlar. HSA modelinde sıklıkla yanlış-pozitif sonuç gözlemlendiği için, bu yöntem önerilmemektedir (Vlot, Aniceto, Menden, Merzenich, & Bender, 2019).

Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli, ilaç etkilerinin olasılıksal süreçlerin sonuçları olduğu ve ilaçların birbirlerini etkilemediği, ancak her birinin ortak bir sonuca katkıda bulunduğu varsayımına dayanır. Olasılık olarak ifade edilen kombinasyon etkisi, olasılıksal bağımsızlık için ortak formül tarafından verilen beklenen additif etki ile karşılaştırılır (Fouquier & Guedj, 2015). İlaç kombinasyonları analizi Eşitlik 2.3 ve Eşitlik 2.4 temelinde yapılır. Eşitlik 2.3 ve Eşitlik 2.4'de E_A ; A ilacının etkisini, E_B ; B ilacının etkisini ve E_{AB} ise AB kombinasyonunun etkisini ifade eder. Model, ilaçların

kombinasyon etkilerini değerlendirmek için literatürde yaygın olarak kullanılır. Ancak, Bliss istatistiksel bağımsızlık modelinin bazı sınırlamaları mevcuttur. Bliss modeline göre, ilaç kombinasyonlarının analizi için kullanılan yöntemler ilaçların etki mekanizmalarından bağımsız olmalıdır. Model, ilaçların üstel doz-etki eğrilerine sahip olduğunu varsayar ve 0 ve 1 arasında değişen olasılıklar olarak ifade edilen etkiler için geçerlidir (Foucquier & Guedj, 2015).

$$\text{Bliss tahmini C değeri} = E_A + E_B - (E_A \times E_B) \quad \text{Eşitlik 2.3}$$

$$\text{EOB Skoru} = E_{AB} - \text{tahmini C değeri} \quad \text{Eşitlik 2.4}$$

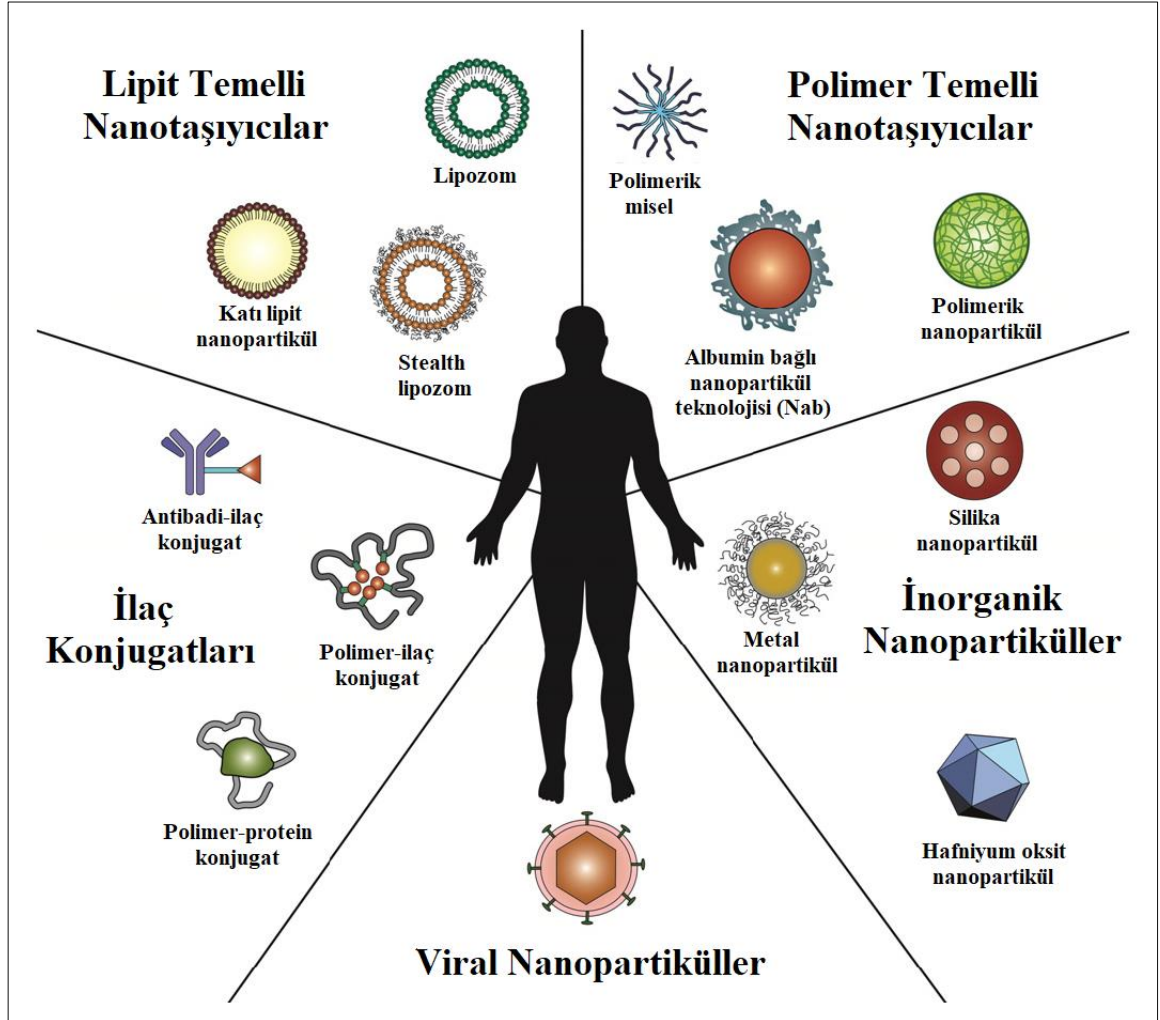
2.4. İlaç Salım

İlaç salımı, bir ilacın vücuttaki biyo-yararlılığını artırmak için önemlidir. İlaç salımı, sürekli salınım tasarımı, biyokimyasal ajanların makrofajlardan korunması ve ilaçların spesifik bölgeye hedeflenmesi gibi farklı konuları kapsar (Uhrich, Cannizzaro, Langer, & Shakesheff, 1999). İlaç salım sistemlerinin amaçlarından biri, terapötik etkiyi üst düzeye çıkarmak ve aynı zamanda yan etkileri en aza indirmektir. Bu sistemler, ilacın farmakokinetiğini değiştirir ve vücuttaki biyolojik dağılımını geliştirir. İdeal ilaç salım sistemi, biyo-uyumluluk, hazırlama kolaylığı, düşük maliyet ve yüksek yükleme verimi gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Kontrollü salım sistemleri, uzun süre etkili ilaç konsantrasyonunu elde etmek için tasarlanmıştır. Etkili bir ilaç salımı amaçlayan nano-ölçekli çeşitli salım sistemleri ve formülasyonlar geliştirilmiştir (Şekil 2.4).

2.4.1. Nano-Ölçekli İlaç Taşıyıcı ve Salım Sistemleri

Nano-ölçekli taşıyıcı sistemler, terapötik ajanların formülasyonuna odaklanır. Kargo görevi gören nano-ölçekli taşıyıcı sistemler sayesinde ilaç dağıtımı kolaylaşmakta ve etkinliği artmaktadır (Lammers, Hennink, & Storm, 2008; Zhu, Li, Liu, Chen, & Xi, 2012). Bu sistemler, ilaçların çözünürlüğünü artırır ve yarı-ömürünü uzatır. İlaç taşıyıcı sistemlerin bir kısmının klinik kullanımı onaylıdır. Nano-ölçekli ilaç taşıyıcı ve salım sistemleri, sinerjistik ilaç kombinasyonlarının aynı anda tek platformda taşınmasına ve kontrollü salımına olanak sağlar (Kemp vd., 2016). Lipit-temelli nano-taşıyıcılar, ilaç

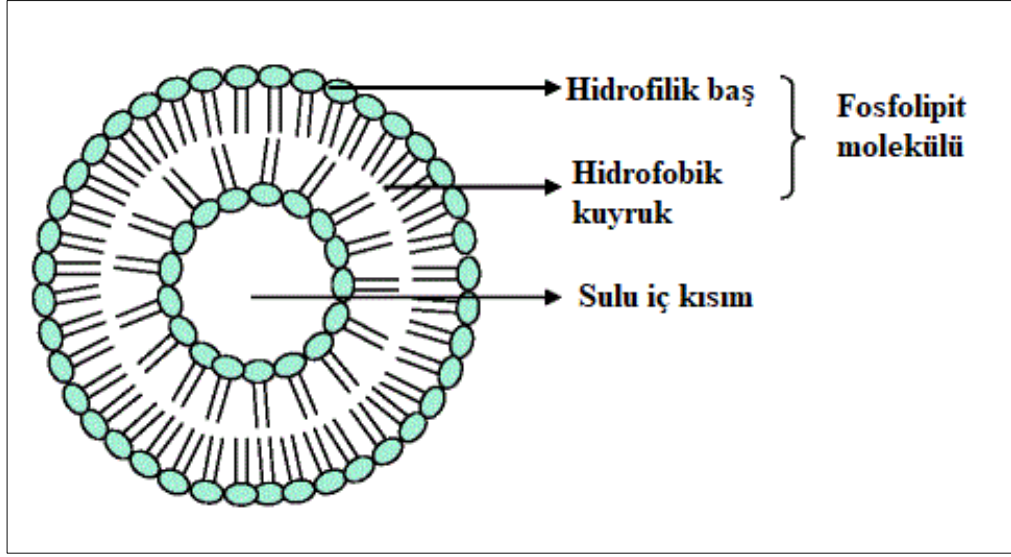
konjugatları, viral nanopartiküller, inorganik nanopartiküller ve polimer-temelli nano-taşıyıcılar terapötik veya tanı amaçlı formülasyon geliştirmek için kullanılan sistemlerden bazılarıdır (Şekil 2.4) (Wicki, Witzigmann, Balasubramanian, & Huwyler, 2015).



Şekil 2.4. Nano-ölçekli ilaç taşıyıcı ve salım sistemleri (Wicki vd., 2015).

2.4.2. Lipozomlar

Lipozomlar, merkezde sulu bölgesi olan ve katmanlı fosfolipitlerin bileşimi ile meydana gelen kolloidal yapıların kendinden düzenlenmesi sonucu oluşan küresel veziküller veya keseciklerdir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Lipozomun şematik gösterimi (Swaminathan & Ehrhardt, 2011).

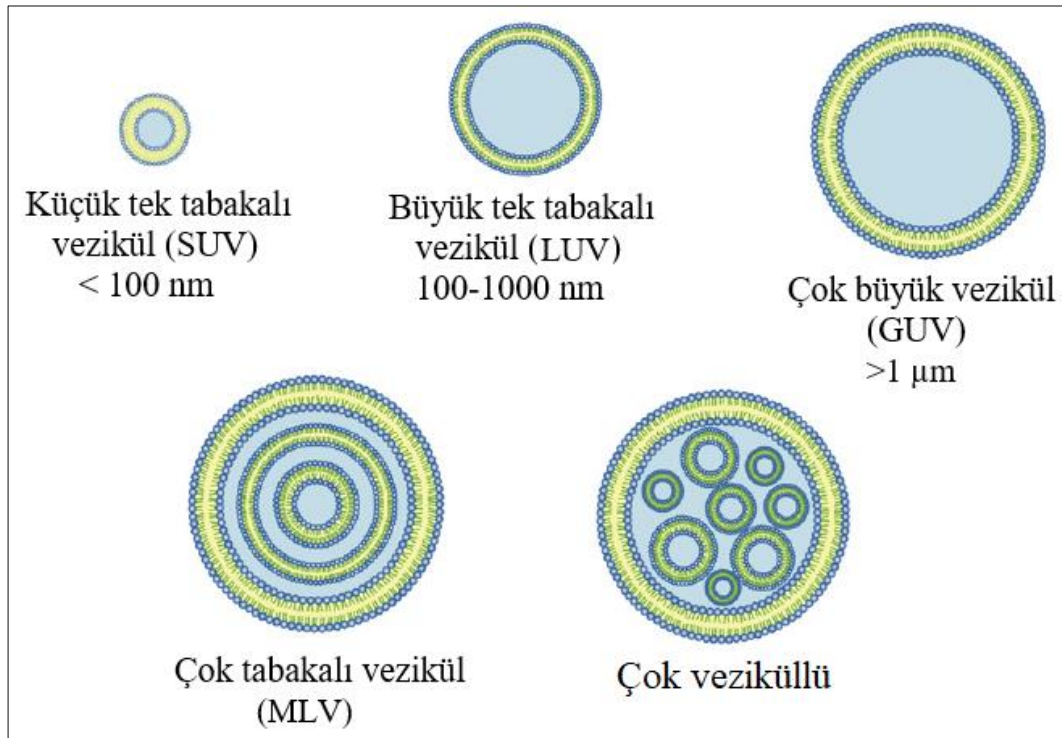
Lipozomlar, yapı ve özellik bakımından hücre membranına benzer ve fosfolipit yapısından dolayı hücre membranı ile etkileşim içerisindedirler (Torchilin, 2005). Lipozomlar, hidrofobik ve hidrofilik ilaçları enkapsüle edebilme, enkapsülünmüş ilacı degradasyondan korumak, ilaçların biyo-dağılımını artırmak ve sistemik toksisiteyi azaltmak, biyo-parçalanabilirlik ve -uyumluluk özelliklerinden dolayı kanser tedavisi için ideal ve güvenli nano-ölçekli ilaç taşıyıcılarıdır (Meng vd., 2011; Pattni, Chupin, & Torchilin, 2015). Lipozomal formülasyonlar bir ilacın terapötik etkisini artırabilir. Geneleksel lipozomal formülasyonlar, ilaçların hedefli bölgede kontrollü salımının sağlanması ve yüksek terapötik etki elde etmek için çeşitli ligandlar ile modifiye edilebilirler (Torchilin, 2005).

Lipozomlar, lipit çifte tabaka içinde sulu çekirdek oluşturmak üzere kendi etrafını çevreleyen fosfolipitlerden oluşur. Lipozomların yapısında hidrofobik ve hidrofilik olmak üzere iki kısım bulunur. Fosfolipit yapısındaki fosfat ve kolin grupları hidrofilik kısmını oluştururken, hidrofobik bölge ise hidrokarbon zincirlerinden meydana gelir (Barani & Montazer, 2008). Lipozomlar 25 nm - 2.5 µm boyut aralığındadır (Vahed, Salehi, Davaran, & Sharifi, 2017). Lipozomlar boyut, çift-tabaka sayısı ve bileşimlerine göre sınıflandırılır (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Lipozomların tabaka sayısı, boyut ve bileşime göre sınıflandırılması (Pattni vd., 2015). nm: nanometre.

Tabaka ve boyuta göre sınıflandırma	Bileşime göre sınıflandırma
Küçük tek tabakalı veziküller; 20-100 nm	Geleneksel lipozomlar
Büyük tek tabakalı veziküller; >100 nm	Uzun dolaşım süreli lipozomlar
Çok büyük tek tabakalı veziküller; >1000 nm	Katyonik lipozomlar
Oligolamellar veziküller; 100-1000 nm	Uyaran duyarlı (pH, sıcaklık, manyetik alan) lipozomlar
Çok tabakalı veziküller; >500 nm	İmmünelipozomlar

Lipozomlar, tabaka yapısı ve büyüklüklerine göre tek tabakalı veziküller ve çok tabakalı veziküller olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Tek tabakalı veziküller ise, küçük tek tabakalı veziküller, büyük tek tabakalı veziküller, oligolamellar veziküller ve çok büyük veziküller olmak üzere sınıflandırılır (Şekil 2.6).

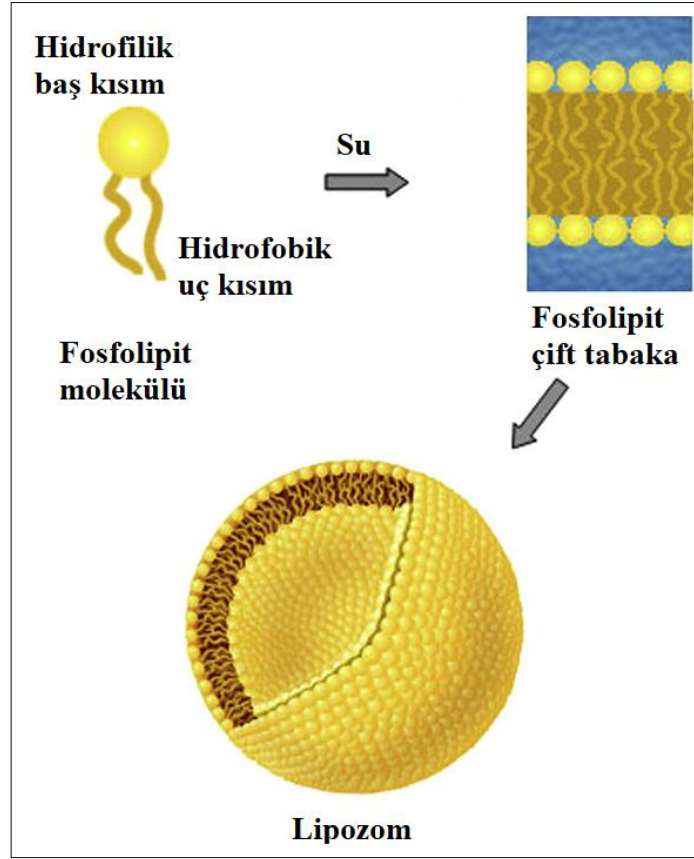


Şekil 2.6. Lipozomların boyut ve tabaka yapısına göre sınıflandırılması (Vahed vd., 2017).

Tek tabakalı lipozomlarda hidrofilik bölgeyi çevreleyen fosfolipit tek tabaka bulunur. Çok tabakalı lipozomlar ise, soğan-tipi yapıya sahiptir (Şekil 2.6) (Vahed vd., 2017). Çok tabakalı veziküller, tabakalar arasındaki itici hidrasyon kuvvetleri ile van

der Waals ve elektrostatik çekim kuvvetleri arasındaki dengenin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Küçük tek tabakalı veziküller, çapları yaklaşık 200-500 Å olan veziküllerdir. Bu veziküller, büyüklükleri ve çeşitli özellikleri bakımından farklılıklar gösterir. Büyük ve çok tabakalı lipozomlar, lipozom içerisinde lipozom olarak tanımlanır.

Dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC) ve benzeri yarı-sentetik, sentetik ve doğal fosfolipitler lipozomal formülasyonların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılır (Sugikawa, Kadota, Yasuhara, & Ikeda, 2016). Lipozomlarda, lipit çift-tabakayı stabilize etmek için genellikle kolesterol kullanılır. Lipozom sentezi sırasında kolesterolün kullanılmasının temel sebepleri veziküllerin kararlılığını artırmak, lipit çift tabakanın akışkanlığını düzenlemek, fosfolipitlerin açıl zincirlerinin kristallenmesini önlemek ve lipit membranın geçirgenliğini azaltmaktır (Daraee, Etemadi, Kouhi, Alimirzalu, & Akbarzadeh, 2016). Kolesterol, kolesterol/fosfolipit oranı 1:1 veya 2:1 olacak şekilde lipozomal formülasyon yapısına katılabilir. Lipozom üretiminin ilk aşamasında, fosfolipit molekülleri kendiliğinden bir araya gelerek çift-tabakayı oluşturur. Hidrofobik bileşikler membran içerisine hapsolür. Takibinde, çift-tabakalı yapının uç kısımları kendi etrafını sararak ve kenetlenerek lipozomları oluşturur. Lipozom kesecikleri, sulu fazın bir kısmının çevresini sarar ve sulu fazdaki hidrofilik bileşikler buraya hapsolür (Şekil 2.7) (Thompson, Couchoud, & Singh, 2009).



Şekil 2.7. Tek tabakalı lipozomun oluşumu.

Lipozomal formülasyon hazırlamak için, Bangham metodu, donma-çözme, süpersonik irridasyon metodu, ters-faz evaporasyon yöntemi ve deterjan diyaliz metodu yaygın olarak kullanılır (Pattni vd., 2015). Ters-faz evaporasyon metodunda, çift katmanlı kesecik oluşturma potansiyeline sahip polar lipitler kaynama noktası düşük organik bir çözücünde (dietil eter, isopropil eter, kloroform ya da metanol gibi) çözülürler. Çözücü buharlaştırıldıktan sonra lipit ince-film elde edilir. Takibinde, ilaç içeren su fazı organik faza eklenir ve karışım su banyosunda karıştırılarak sonikasyon işlemine tabi tutulur. Oluşan emülsiyonda hidrofilik baş gruplar su ile temas içerisinde. Yağ asidi zincirleri ise organik çözücü ile temas halindedir. Çözücü düşük basınç altında buharlaştırıldığında, suda dağılmış ve viskoz jel halinde lipit kesecikleri kalır. Oluşan çok katmanlı yapıların sonikasyonu, ekstrüzyonu veya homojenizasyonu ile tek katmanlı lipozomlar üretilir. Organik çözücü tamamen uzaklaştırmak için sistem nitrojen gazına maruz bırakılabilir. Lipit ince-film hidrasyon yöntemine kıyasla, bu yöntemde yükleme verimi daha yüksektir. Çözücü diyaliz, santrifüj veya bir kolon yardımı ile uzaklaştırılır.

2.5. Çalışmada Kullanılan Test Molekülleri

Dr. Dıbirdık ve talebeleri tarafından, çeşitli kanserlerin tedavisine yönelik yeni terapötik modalite geliştirme çalışmaları sırasında etnofarmakolojik bir ürün keşfedilmiştir (Fidan, 2017; Zenginer, 2017). Ürünün kimyasal içeriğinde GA, tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit, nadolol bulunduğu belirlenmiştir. Doğal ve küçük molekül ağırlıklı trifenolik bileşik GA (Şekil 2.8A), antioksidan ve antiproliferatif polifenolik asittir (Bai vd., 2021). GA, çeşitli biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip fitokimyasal olarak doğada yaygın olarak bulunur. GA'nın antikanser etkileri rapor edilmiştir (Badhani, Sharma, & Kakkar, 2015). Bu etkinin, molekülün antioksidan özelliğinden ziyade antikanser ve apoptoz indükleyici özelliklerinden sorumlu olan gallat bileşiklerinin pro-oksidan etkisi olduğu düşünülmektedir. GA'nın paklitaksel (Aborehab & Osama, 2019), paklitaksel ve karboplatin (Aborehab, Elnagar, & Waly, 2021), asparajinaz (Sourani, Shirzad, Shirzad, & Pourgheysari, 2017), trimidoks (Madlener vd., 2007) ve doksorubisin (Subramanian vd., 2015) gibi kemoterapötik ve antikanser moleküllerin etkilerini artırıcı özellikleri bildirilmiştir.

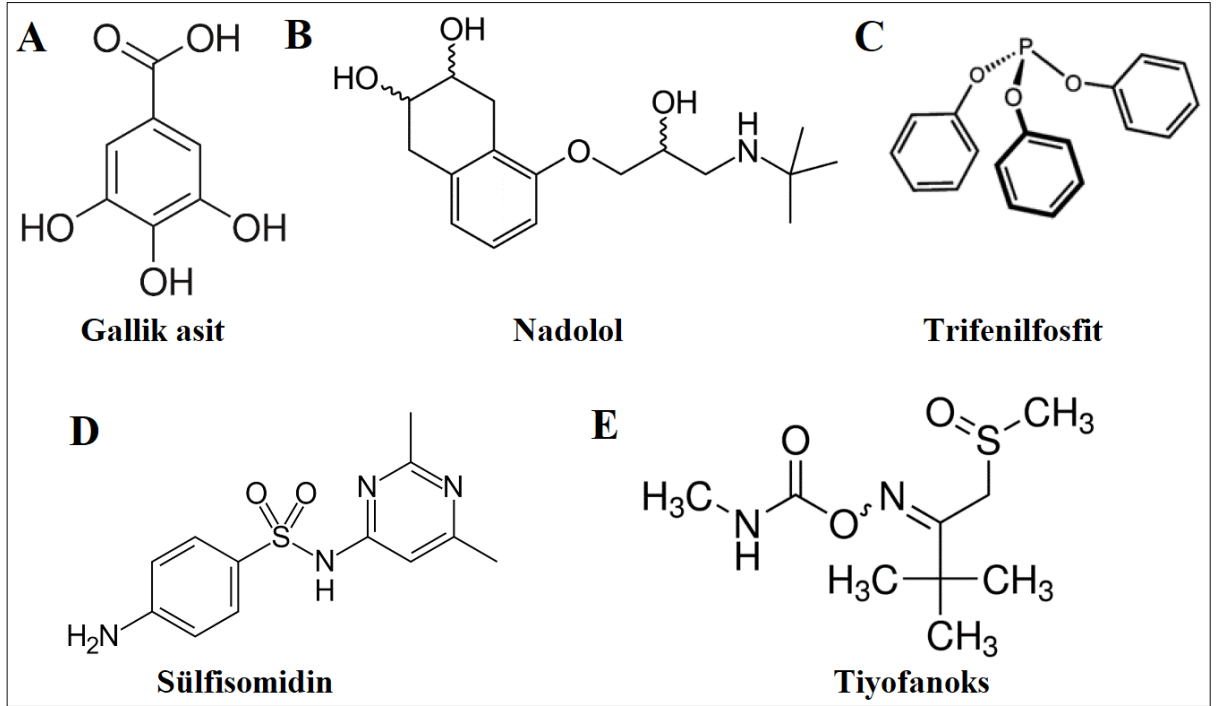
Nadolol (Şekil 2.8B), seçici olmayan β -adrenerjik reseptör antagonisttir (Zaidi vd., 2020). Nadolol, anjina pektoris ve hipertansiyon tedavisinde kullanılır (Misaka, Miyazaki, Fukushima, Yamada, & Kimura, 2013). β -blokörlerin kalp, solunum ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanımı yaygındır (Nagaraja, Sadaoui, Lutgendorf, Ramondetta, & Sood, 2013). β -blokörlerin temel hedefi β -adrenoreseptörlerdir. β -blokörler, β -adrenerjik reseptör aracılı sinyal iletimini bloke ederek etki gösterirler. β -adrenerjik sinyalizasyonun, kanserin oluşumuna ve ilerlemesine katkıda bulunan biyolojik süreçlerde yer aldığı bulunmuştur (Ji, Chen, Xiao, Zheng, & Li, 2012). Çeşitli kanser modellerinde yapılan çalışmalar, β -blokör alan hastaların sağ-kalımlarının, nüks ve metastaz oranlarının düşük olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, adrenerjik aktivasyonun apoptozu modüle ettiğini, anjiyogenez ve diğer kanser belirtilerini desteklediğini ve bu etkilerin β -blokörler tarafından baskılanabileceğini gösteren prelinik çalışmalar ile desteklenmektedir (Nagaraja vd., 2013). Çalışmalar, bazı β -blokörlerin antikanser etkilerinin bulunduğunu göstermiştir (Ji vd., 2012). Nadolol'un yaygın kanser türlerinde antiproliferatif özelliğinin olup olmadığı bilinmemektedir.

Trifenilfosfit (Şekil 2.8C), fosfit-temelli organik bileşiktir. Trifenilfosfit, fosforik asit ve fenol'ün esteridir ve organometalik kimyada ligand olarak kullanılır. Trifenilfosfit,

nörotoksik etkiye sahiptir ve esteraz inhibitörüdür (Donia, 2003). SH-SY5Y hücrelerinde 1 mM trifenilfosfit'in zaman-bağımlı olarak apoptozu tetiklediği ve kaspaz-3 aktivasyonunu zaman-bağımlı olarak artırdığı bildirilmiştir (Carlson, Jortner, & Ehrich, 2000). Trifenilfosfit'in SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon-bağımlı mitokondriyal hiperpolarizasyona neden olduğu rapor edilmiştir (Carlson & Ehrich, 1999). Ancak, trifenilfosfit'in kolon kanseri hücrelerindeki etkileri rapor edilmemiştir.

Sülfisomidin (Şekil 2.8D), sülfonamid türevi antibakteriyeldir ve üriner enfeksiyonlarda kullanılır. Sülfonamidler, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Sülfonamidler, anti-karbonikanhidraz enzim aktivitesi ve hücre döngüsünün G1 fazında durdurulması gibi etkilere sahiptir. Çeşitli sülfonamid türevlerinin farklı tümör modellerindeki sitotoksik etkileri rapor edilmiştir (Mirian vd., 2011). Ancak, sülfisomidin'in görülme sıklığı yüksek kanser türlerindeki etkileri hakkında bir çalışma bulunmamaktadır.

Tiyofanoks (Şekil 2.8E), karbamat türevi sentetik insektisittir. Tiyofanoks, asetilkolin esteraz enzim aktivitesini inhibe eder (Chin, Tallant, Duane, & Sullivan, 1980). Karbamat türevlerinin sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Soloneski, Kujawski, Scuto, & Larramendy, 2015). Ancak, tiyofanoks'un kanser hücrelerindeki etkileri bilinmemektedir.



Şekil 2.8. Çalışmada kullanılan test moleküllerinin kimyasal yapıları.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, gereçler ve temin edilen marka sırasıyla Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Malzeme Adı	Marka
McCoy’s 5A	WISENT
MTT	Acros Organics
Dimetil sülfoksit	Fisher
Tripsin-EDTA çözeltisi	WISENT
Tamponlanmış fosfat tuzu (PBS) tableti	Bioshop
Fetal Sığır Serum	Thermo Fisher Scientific
Penisilin-streptomisin	Thermo Fisher Scientific
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich
GA	Merck
Sülfisomidin	TCI
Tiyofanoks	Sigma-Aldrich
Nadolol	Sigma-Aldrich
Trifenilfosfit	Acros
5-FU	Koçak Farma
McCoy’s 5A	WISENT
L-OHP (Eloxatin®)	Sanofi-Aventis
C225 (Erbix®)	Merck
Dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC)	CHEMIMPEX
Apoptozis Kit (Annexin V-PE)	BioVision (K203-25)
Kolesterol	Acros
Kloroform	ISOLAB
Etanol	Sigma-Aldrich
RIPA Liziz tamponu	Thermo Fisher Scientific
SUREPAGE 4-12% BT Jel 1.0 MM10W	Genscript
Bolt Mops SDS Running Buffer 20 X	Thermo Fisher Scientific
Bolt Sample Reducing Agent (SRA) 10X	Thermo Fisher Scientific
Bolt Loading Dye Sample (LDS) Buffer 4X	Genscript
Magicmark XP Western Std.	Genscript
Pre-stained Protein Standard	Abmgood (G623)
Iblot Transfer Stacks PVDF Regular	Thermo Fisher
Rabbit Monoclonal Bax Primer antibody	Novus Biologicals
Rabbit Monoclonal Bcl-2 Prime antibody	Novus Biologicals
Rabbit Monoclonal Caspase-8 (Pro and Active)	Novus Biologicals
Rabbit Monoclonal β -Actin Primer antibody	Novus Biologicals
WesternBreeze™ Chemiluminescent Kit	Thermo Fisher Scientific
PureLink RNA Mini Kit	Applied Biosystems
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan gereçler.

%5 CO ₂ 'li İnkübatör	Thermo Fisher Scientific
Inverted faz kontrast mikroskop	OLYMPUS (CKX53)
Steril Çalışma Kabini	Thermo Fisher Scientific
Hemositometre	ISOLAB
Santrifüj cihazı	DLab
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific™ Multiskan™ GO
Sitometre	Invitrogen
Vorteks	ISOLAB
Döner buharlaştırıcı	Heidolph
Hassas tartı	SHIMADZU
Manyetik karıştırıcı	ISOLAB
Su banyosu	Daihan Scientific
Saf su cihazı	Millipak® (0.22 µm filter) Merck
Ultrasonik banyo	Wisd
-80 °C soğutucu	Wisd
Buzdolabı	Arçelik
SEM Analiz Cihazı	Jeol
Partikül boyut analiz cihazı	Malvern Instruments
Zeta potansiyeli analiz cihazı	Malvern Instruments
Kemilüminesans görüntüleme cihazı	Bio-Rad
Cam balon	ISOLAB
TALİ Cellular Analysis Slides	Invitrogen
Serolojik pipet	ISOLAB (CAPP®)
Mikro pipet ucu	ISOLAB
96 kuyucuklu mikro plaka	NEST
Falkon tüp	İldam Kimya
Hücre flasksı	NEST
Pipetleme rezervuarı	ISOLAB
Cryo tüp	NEST
Çok kanallı mikro pipet	ISOLAB (CAPP®)
Mikro pipet	ISOLAB (CAPP®)
Pipet tabancası	ISOLAB
Mini jel elektroforez tankı	Invitrogen
Blotlama bihazı	Invitrogen
Membran çalkalayıcı	Thermo Fisher Scientific
The QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR cihazı	Applied Biosystems
384 kuyucuklu PCR array plate	Applied Biosystems
96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems
İnkübatör	Thermo Fisher Scientific

3.1. Hücre Kültürü

HT-29 insan kolon kanseri (ATCC®HTB-38TM) hücrelerinin kültürü, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'nun protokolüne göre yapıldı. Deneylerde besiyeri olarak McCoy's 5A, % 10 fetal sıgır serum ve % 1 penisilin-streptomisin içeren karışım hazırlandı.

3.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi

Muhafaza edilen HT-29 insan kolon kanseri hücreleri, 37 °C'deki su banyosunda çözdürüldü. Hücreler falkon tüpe alınarak besiyeri ilave edildi ve santrifüj yapıldı. Hücre pelleti, besiyeri ile süspanse edildi. Süspansiyon flaska aktarıldı ve hücreler 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda çoğalmaya bırakıldı. Besiyeri değiştirmek için kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler fosfat tuzu tamponu (PBS) ile yıkandı. Flaska besiyeri eklendi ve hücreler, 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde çoğalmaya bırakıldı.

3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması

Besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Flaska Tripsin-EDTA ilave edildi ve hücreler 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Hücreler falkon tüpe alınarak besiyeri ilave edildi ve santrifüj yapıldı. Takibinde, hücre pelleti besiyeri ile süspanse edilerek flaska aktarıldı ve hücreler, 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda çoğalmaya bırakıldı.

3.1.3. Hücrelerin Dondurulması

Çoğalan HT-29 insan kolon kanser hücreleri tripsinize edildi ve hücre sayımı yapıldı. Hücre pelleti, % 5 dimetil sülfoksit içeren besiyeri ile süspanse edildi. HT-29 hücreleri cryo tüplere aktarılarak muhafaza edildi.

3.1.4. Hücre Sayımı

Hücre sayımı, hemositometre ile yapıldı. Bu amaçla, kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. PBS aspire edildi, flaska Tripsin-EDTA ilave edildi ve

hücreler 37 °C’de % 5 CO₂’li ortamda inkübe edildi. Hücreler falkon tüpe alınarak besiyeri ilave edildi ve santrifüj yapıldı. Hücre pelleti, besiyeri ile süspense edildi. Hücre ve tripan mavisi çözeltisinden alınarak hemositometre üzerine damlatıldı ve ortalama canlı hücre sayısı belirlendi.

3.2. Hücre Sayısının Optimizasyonu

HT-29 insan kolon kanser hücreleri 96 kuyucuklu mikropalakaya $5 \times 10^3 - 10^4$ hücre/ml olacak şekilde artan sayıda ekildi ve 37 °C’de % 5 CO₂’li ortamda inkübasyona bırakıldı. Mikroplakanın yüzeyindeki hücre yoğunluğu incelendi ve besiyeri değiştirildi. Mikroplaka, 37 °C’de % 5 CO₂’li ortamda inkübe edildi. Kuyucuklardaki HT-29 insan kolon kanseri hücreleri faz kontrast invert mikroskop ile görüntülendi ve hücre sayımı yapıldı. Her kuyucuk için hücre canlılığı tespit edildi. Kuyucukların yüzeyini en az % 90 oranında kaplayan ve proliferasyonun yüksek olduğu hücre sayısının 2.5×10^4 hücre/ml olduğu belirlendi ve çalışmalarda bu ekim dozu kullanıldı.

3.3. Test Moleküllerinin ve Kemoterapötiklerin Çözeltilerinin Hazırlanması

Test moleküllerinin ve kemoterapötiklerin çözeltileri, MTT hücre proliferasyon analizlerinden önce hazırlanarak steril membran filtreden geçirildi. Dimetil sülfoksit derişimi % 0.1’in altında tutuldu.

3.4. MTT Hücre Proliferasyon Analizi

Test moleküllerinin ve kemoterapötiklerin antiproliferatif etkileri, MTT hücre proliferasyon analizi ile incelendi. Çoğalan HT-29 insan kolon kanser hücreleri tripsinize edildi ve santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti, besiyeri ile süspense edildi ve hücre sayımı yapıldı. 2.5×10^4 hücre/ml oranında hücre, 96 kuyucuklu mikropalakaya ekildi ve inkübe edildi. İlaç uygulaması yapıldı ve mikroplaka 37 °C’de % 5 CO₂’li ortamda inkübe edildi. Kültür ortamı uzaklaştırıldı ve besiyeri ilave edildi. Mikroplaka, 37 °C’de % 5 CO₂’li ortamda inkübe edildi ve takibinde MTT hücre proliferasyon analizi yapıldı. Bu amaçla, besiyeri uzaklaştırıldı ve MTT uygulaması yapıldı. Mikroplaka, 37 °C’de % 5 CO₂’li ortamda inkübe edildi. MTT uzaklaştırıldı ve dimetil sülfoksit ilave edildi. 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

3.5. Test Moleküllerinin ve Kemoterapötiklerin Kombinasyon Etkilerinin İncelenmesi

Test moleküllerinin ve kemoterapötiklerin kombinasyon etkilerinin incelenmesi amacıyla, IC₅₀ değerleri baz alındı. Nadolol, sülfisomidin, tiyofanoks ve trifenilfosfit için, 1.563-100 µM doz aralığı belirlendi. İlaç uygulamasının ardından, kültür ortamı uzaklaştırıldı ve besiyeri eklendi. 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda, Bölüm 3.4'te belirtildiği gibi MTT hücre proliferasyon analizi yapıldı.

3.6. İlaç Kombinasyonlarının CI Değerinin Hesaplanması

GA'in kemoterapötikler ile kombinasyon etkilerinin incelenmesi amacıyla medyan-etki denklemi kullanıldı. Nadolol, sülfisomidin, tiyofanoks ve trifenilfosfit'in kombinasyon etkilerinin incelenmesi amacıyla Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli kullanıldı. Bliss modeli ile CI değerlerinin hesaplanması için Bölüm 2 Genel Bilgiler başlığı altında belirtilen Eşitlik 2.3 ve Eşitlik 2.4 kullanıldı. Medyan-Etki denklemi ile CI değerlerinin hesaplanması amacıyla CompuSyn yazılımı kullanıldı.

3.7. İlaç Kombinasyonlarının DRI Değerlerinin Hesaplanması

İkili ilaç kombinasyonlarındaki bileşenlerin her biri için DRI değerleri, medyan-etki prensibi temel alınarak CompuSyn yazılımı ile hesaplandı.

3.8. TALİ Görüntü-Temelli Sitometre Analizi

İlaç kombinasyonlarının apoptotik etkileri, ticari kit ve görüntüleme cihazı (TALİ görüntü-temelli sitometre) kullanılarak belirlendi. HT-29 insan kolon kanseri hücreleri flasklara ekildi, 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde çoğalmaya bırakıldı ve takibinde ilaç uygulaması yapıldı. Kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler tripsin ile inkübe edildi. Hücreler falkon tüpe alınarak santrifüj edildi. Hücreler, Annexin V bağlanma tamponu ile süspanse edildi, Annexin V-PE ve SYTOX Green Dye ile karıştırılarak inkübe edildi. Apoptotik, ölü ve canlı hücre oranı TALİ görüntü-temelli sitometre ile belirlendi.

3.9. Apoptoz Yolağında Yer Alan Genlerin mRNA İfade Düzeylerinin RT-qPCR Tekniğı ile İncelenmesi

HT-29 insan kolon kanseri hücreleri flasklara ekildi, hücreler 37 °C’de % 5 CO₂’li inkübatörde çoğalmaya bırakıldı ve takibinde ilaç uygulaması yapıldı. Kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. 600 µl liziz tamponu ilave edildi ve 15 dakika inkübe edildi. Homojenat, mikrosantrifüj tüpe aktarıldı ve 12.000 g devirde + 4 °C’de santrifüj edildi. Supernatant, mikrosantrifüj tüpe alındı ve % 70’lik etil alkol eklenerek vorteks yapıldı. Karışım, spin kolona aktarıldı ve santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen kısım uzaklaştırıldı. Spin kolona yıkama tamponu I konuldu ve santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen kısım uzaklaştırıldı. Spin kolona yıkama tamponu II konuldu ve santrifüj edildi. Bu aşama iki kez tekrarlandı. Spin kolon, mikrosantrifüj tüpe yerleştirildi ve nükleaz içermeyen su, kolona pipetlendi. Santrifüj sonrası RNA karışımı elde edildi. Örneklerin RNA konsantrasyonları belirlendi ve takibinde, RNA konsantrasyonları eşitlenerek Çizelge 3.3’de belirtildiğı gibi her bir örnek için karışım hazırlandı (Çizelge 3.3). Takibinde, cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.3. cDNA sentez bileşenleri.

Bileşen	Miktar
10X RT tamponu	2.0 µl
25X dNTP karışımı	0.8 µl
10X RT Random Primerler	2.0 µl
Revers Transkriptaz	1.0 µl
Nükleaz içermeyen su	4.2 µl
Toplam hacim	10 µl
Bir örneklilik reaksiyon karışımı RNA + Su + Karışım	20 µl

Elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak RT-qPCR deneyi yapıldı. Bu amaçla, Çizelge 3.4’te belirtilen miktarlardaki bileşenler, her bir reaksiyon için hazırlandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. RT-qPCR için kullanılan primerlerin ve bileşenlerin miktarı.

Bileşen	Miktar
SYBR® green master karışım	6.0 µl
F primer	0.3 µl
R primer	0.3 µl
cDNA	2.0 µl
Nükleaz içermeyen su	3.4 µl

3.10. Apoptoz Yolağında Yer Alan Genlerin Protein İfade Düzeylerinin Western Blotlama ile Belirlenmesi

Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8'in protein ifade düzeylerindeki değişimler Western blotlama tekniği ile belirlendi. β -Aktin, kontrol olarak kullanıldı. HT-29 insan kolon kanseri hücreleri flasklara ekildi ve 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. Takibinde ilaç uygulaması yapıldı. Ardından, kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Protein izolasyonu yapıldı ve konsantrasyonlar belirlendi. Protein konsantrasyonları eşitlenerek denatürasyon gerçekleştirildi. Denatürasyon amacıyla, her bir örnek için karışım (protein ve su, LDS ve SRA) hazırlandı ve numuneler denatüre edildi. Elektroforez tank tampon ile dolduruldu ve Bis-Tris jel sabitlendi. Protein standartlar ve örnekler jel kuyularına pipetlendi. Sabit potansiyelde yürütme yapıldı ve jele yüklenen proteinler, Iblot cihazı ile PVDF membrana aktarıldı. Membran üzerine bloklama çözeltisi ilave edildi ve inkübasyon sonunda, tampon ve saf su ile yıkama yapıldı. Takibinde, membran primer antikor ile inkübe edildi. Yıkama yapıldı ve membran sekonder antikor ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yıkama yapıldı ve membran, kemilüminesans substrastlar yardımıyla görüntülendi.

3.11. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının Hazırlanması

3.11.1. İlaç Yüklü Olmayan Nanolipozomal Formülasyonların Hazırlanması

Nanolipozomal formülasyonlar, ters-faz evaporasyon yöntemi ile hazırlandı. Bu amaçla, dipalmitoil fosfatidilkolin:kolesterol (DPPC:CH) (mol/mol, 60:40 veya 70:30) kloroformda çözüldü. Takibinde, kloroform döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılarak lipit

ince-film elde edildi. Lipit ince-film eldesi tekrarlandı. Cam balona kloroform ve sulu faz (pH=7.4; PBS) eklendi. Formülasyon, su banyosunda karıştırıldı ve sonikasyona maruz bırakıldı. Kloroform, döner buharlaştırıcı ile vakum altında uzaklaştırıldı ve sonikasyon yapıldı. Formülasyon membran filtreden geçirildi ve DPPC:CH olarak adlandırıldı.

3.11.2. İlaç Yüklü Nanolipozomal Formülasyonların Hazırlanması

İlaç yüklü nanolipozomal formülasyonların hazırlanması amacıyla, Bölüm 3.11.1’de belirtilen yöntem izlendi. GA, 5-FU, L-OHP, GA ve 5-FU, GA ve L-OHP yüklü lipozomal formülasyon hazırlamak amacıyla sulu faz olarak sırasıyla GA (1 mg/ml), 5-FU (1 mg/ml), L-OHP (1 mg/ml), GA ve 5-FU (1 mg/ml), GA ve L-OHP (1 mg/ml) içeren PBS kullanıldı. Takibinde, kloroform, döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. 10000 RPM devirde santrifüj yapıldı ve yüklenmeyen ilaç uzaklaştırıldı. Takibinde, nanoformülasyonlar, PBS ile süspansiyon edilerek membran filtreden geçirildi. Hazırlanan GA, 5-FU, L-OHP, GA ve 5-FU, GA ve L-OHP yüklü nanolipozomal formülasyonlar sırasıyla DPPC:CH@GA, DPPC:CH@5-FU, DPPC:CH@L-OHP, DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP olarak adlandırıldı.

3.11.3. Yükleme Veriminin Hesaplanması

Yükleme verimini (enkapsülasyon etkinliği) hesaplamak amacıyla, ilk aşamada GA, 5-FU ve L-OHP’in UV-spektrofotometre ile maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyları belirlendi ve takibinde GA, 5-FU ve L-OHP’e ait kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Nanolipozomal formülasyonlar santrifüj edildi ve formülasyonun üst fazının optik yoğunluğu spektrofotometre ile ölçüldü. Ardından, ilaç yüklü nanolipozomal formülasyonların absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans değerleri ve kalibrasyon grafiğinden yararlanarak, yüklenen ilaç miktarı belirlendi. Takibinde, her bir formülasyon için enkapsülasyon etkinliği hesaplandı. Bu amaçla, Eşitlik 3.1 kullanıldı.

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği} = \frac{\text{Yüklenen ilaç miktarı}}{\text{Başlangıçta eklenen ilaç miktarı}} \times 100$$

Eşitlik 3.1

3.11.4. Nanolipozomal Formülasyonların Karakterizasyonu

3.11.4.1. Faz Kontrast İvert Mikroskop Görüntüleme

Nanolipozomal formülasyonların morfolojisi faz kontrast invert mikroskop ile incelendi. Nanolipozomal formülasyonlar, PBS ile seyreltildi. Formülasyon, lam üzerine damlatıldı ve üzerine lamel yerleştirildi. Takibinde, görüntüleme yapıldı.

3.11.4.2. Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM)

Nanolipozomal formülasyonların morfolojisi aynı zamanda, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile de incelendi. Ölçümler, Boğaziçi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi, Test Analiz Biriminde yapıldı. SEM analizi için, numune alüminyum eklenti üzerine yerleştirildi ve yüzey bir püskürtme kaplayıcı kullanarak altın parçacıkları ile kaplandı. Nanolipozomların morfolojik analizi, 15 kV ve 750 mA'da SEM ile belirlendi.

3.11.4.3. Boyut ve Zeta Potansiyeli Ölçümü

Nanolipozomal formülasyonların boyut, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi (PDI) değerlerinin ölçümü Boğaziçi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi, Test Analiz Biriminde yapıldı. Nanolipozomal formülasyonların partikül boyutu, Zetasizer Nano ZS ile incelendi. 25 °C'de ölçüm yapıldı ve ölçümden önce, nanolipozomal formülasyonlar seyreltildi. Ölçümler, 90 °C'lik algılama açısında yapıldı ve boyut hesaplandı.

3.11.5. Nanolipozomal Formülasyonların İlaç Salım Profillerinin İncelenmesi

Nanolipozomal formülasyonların salım profilleri, diyaliz torbası yöntemi ile belirlendi. Formülasyonlar santrifüj edildi ve PBS içinde süspanse edildi. Süspanسیون ve aynı konsantrasyondaki standart ilaç PBS ortamında çözündürüldü ve diyaliz torbası içerisine aktararak PBS ortamına yerleştirildi. Belirlenmiş zaman aralıklarında, numune çekildi ve tampon ilave edildi. UV spektrofotometre ile numunelerin absorpsiyon değerleri ölçüldü. Takibinde, PBS ortamına salınan ilaç konsantrasyonu hesaplandı.

3.11.6. Nanolipozomal İlaçların İn Vitro Antiproliferatif Etkilerinin İncelenmesi

GA ve 5-FU, GA ve L-OHP ikili ilaç yüklü formülasyonlar için her birinin konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde nanolipozomal formülasyonlar hazırlandıktan sonra 10000 RPM devirde 30 dakika + 4 °C santrifüj yapıldı ve yüklenmeyen ilaç uzaklaştırıldı. Takibinde, nanolipozomal formülasyonlar besiyeri ile süspanse edildi. Aynı deney koşullarında, GA ve 5-FU için veya GA ve L-OHP için konsantrasyon 200 µM olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. 1:1 oranında seyreltme ile 1.563-200 µM doz aralığında ilaç çözeltileri hazırlandı ve nanoformülasyonlar HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine uygulandı. Bölüm 3.4'te belirtildiği gibi MTT hücre proliferasyon analizi gerçekleştirildi.

3.12. Veri Analizi

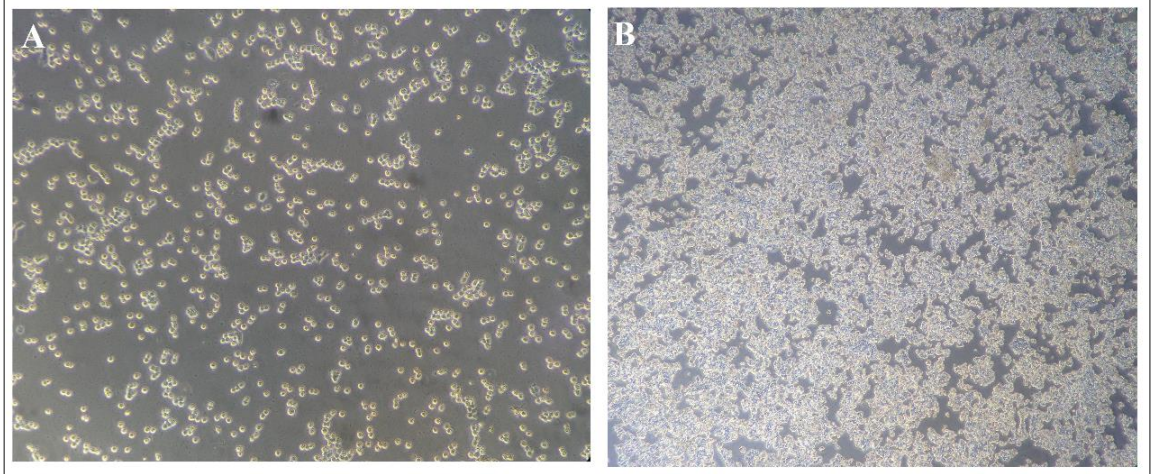
Deneysel verilerin istatistiksel analizleri, SPSS (Windows, versiyon 25; SPSS Inc., Chicago, IL, A.B.D.) yazılımı kullanıldı. Bu amaçla, deney gruplarının kıyaslanması ve istatistiksel olarak farklılığın belirlenmesi amacıyla One-way ANOVA testi ve takibinde Bonferroni post-testi ile yapıldı. Sonuçlar, en az 3 paralel çalışmanın ortalaması±standart hata olarak ifade edildi ve istatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ olarak kabul edildi. Kemoterapötiklerin ve test moleküllerinin IC₅₀ değerleri, SPSS yazılımı kullanılarak Probit analizi ile hesaplandı. İlaç kombinasyonlarının analizi CompuSyn yazılımı (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, A.B.D.) ve Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli ile yapıldı. Western blotlama deneylerinin sonucu, Image J yazılımı (Image J, NIH Image) kullanılarak analiz edildi.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1. HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinin İvert Mikroskop Görüntüleri

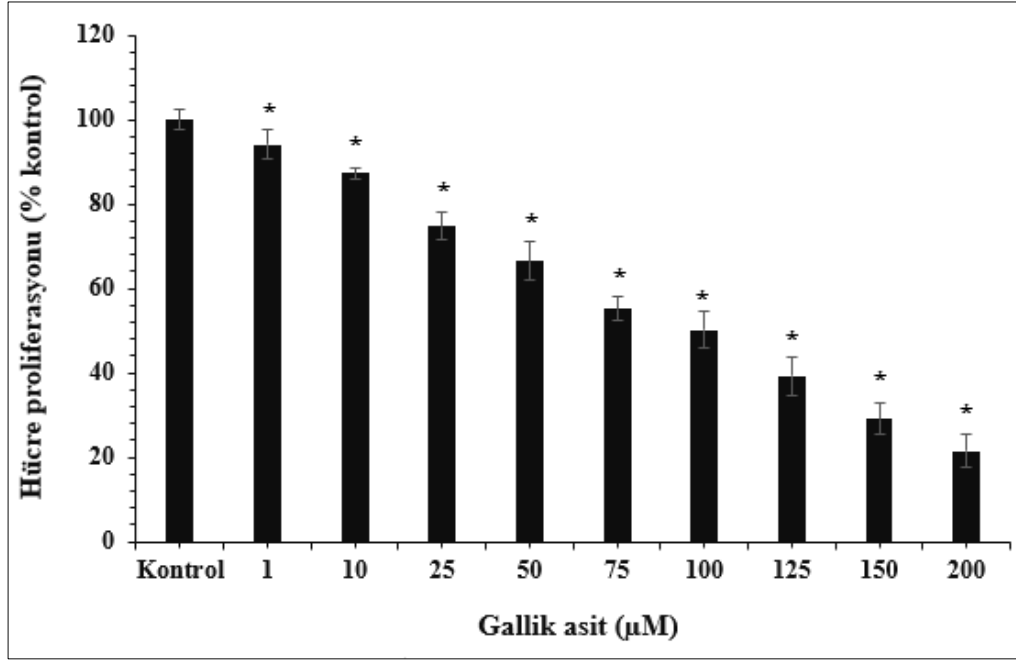
HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin flask yüzeyine tutunmaları, canlılıkları ve flask yüzeyinin ne kadarını kapladıkları invert mikroskop ile gözlemlendi. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin pasajlama işleminden 6-8 saat süre sonunda flask yüzeyine tutunmaya başladığı ve hızlı çoğaldığı tespit edildi. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin ilk tutunmaya başladıktan sonraki (24. Saat) ve en az % 90 yoğunluğa ulaşmış (96. Saat), flask yüzeyini kaplamış durumları görüntülendi (Şekil 4.1A-B).



Şekil 4.1. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü. 24 saat inkübasyon sonunda hücrelerin görüntüsü A, 96 saat inkübasyon sonunda hücrelerin görüntüsü B.

4.2. Test Moleküllerinin ve Kemoterapötiklerin Antiproliferatif Etkileri

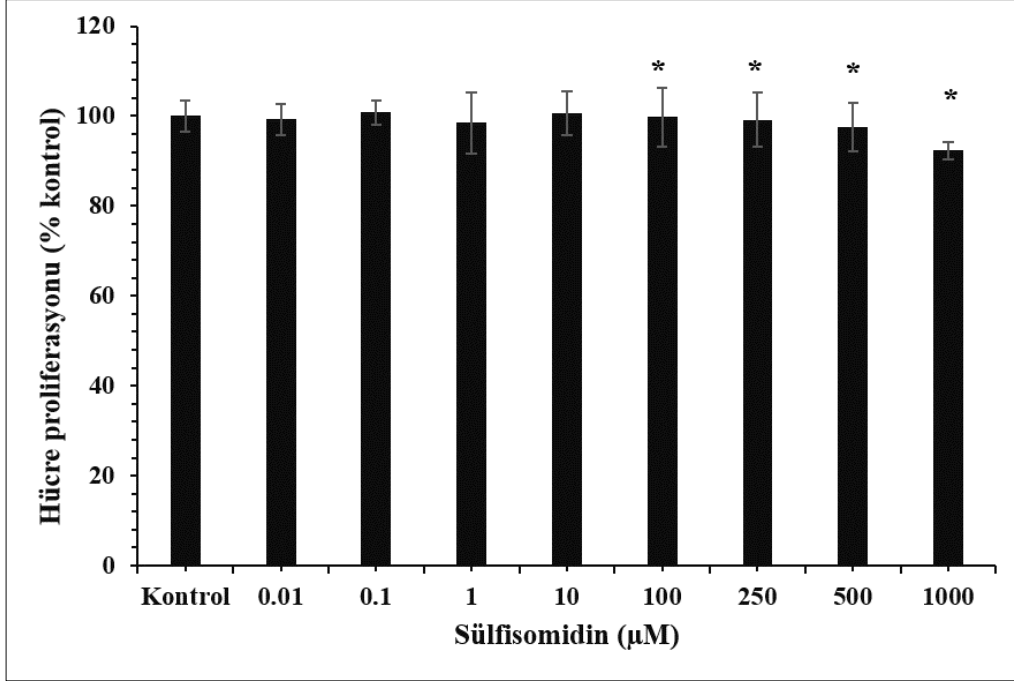
GA'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi, Şekil 4.2'de verilmiştir. GA'in HT-29 insan kolon kanser hücreleri üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası antiproliferatif etkileri anlamlı olarak 1 μM seviyesinde başlamıştır. Kontrole göre 1 μM GA hücre proliferasyonunu % 100 ± 2.48 'den % 94.09 ± 3.45 'e; 10 μM GA % 87.35 ± 1.23 'e, 25 μM GA % 74.82 ± 3.33 'e, 50 μM GA % 66.57 ± 4.53 'e, 75 μM GA % 55.2 ± 20.81 'e, 100 μM GA % 50.21 ± 4.33 'e, 125 μM GA % 39.19 ± 4.45 'e, 150 μM GA ve 200 μM GA ise sırasıyla % 29.17 ± 3.88 'e ve % 21.52 ± 3.76 'ya düşürmüştür (* $p < 0.05$). 24 saat GA maruziyeti sonucunda, GA'in IC_{50} değeri 106.430 μM (% 95 güven aralığı; 84.990-113.700) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2. GA'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama \pm SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi, (* $p < 0.05$).

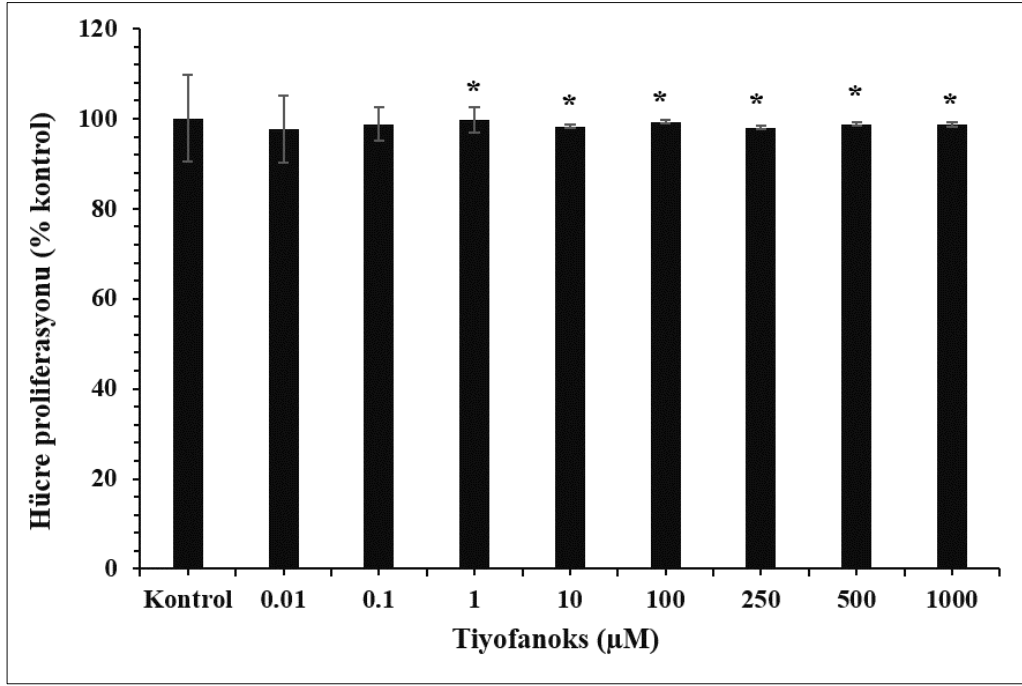
Sülfisomidin'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4.3'te verilmiştir. Sülfisomidin konsantrasyonu artmasına rağmen HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunda azalma meydana gelmemiştir. 24 saat 1000 μM

sülfisomidin maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu % 92.3 ± 1.98 olarak belirlenmiştir (* $p < 0.05$). Sonuç olarak, sülfisomidin'in 0.01-1000 μM doz aralığında HT-29 insan kolon kanser hücre modelinde antiproliferatif etki göstermediği bulunmuştur.



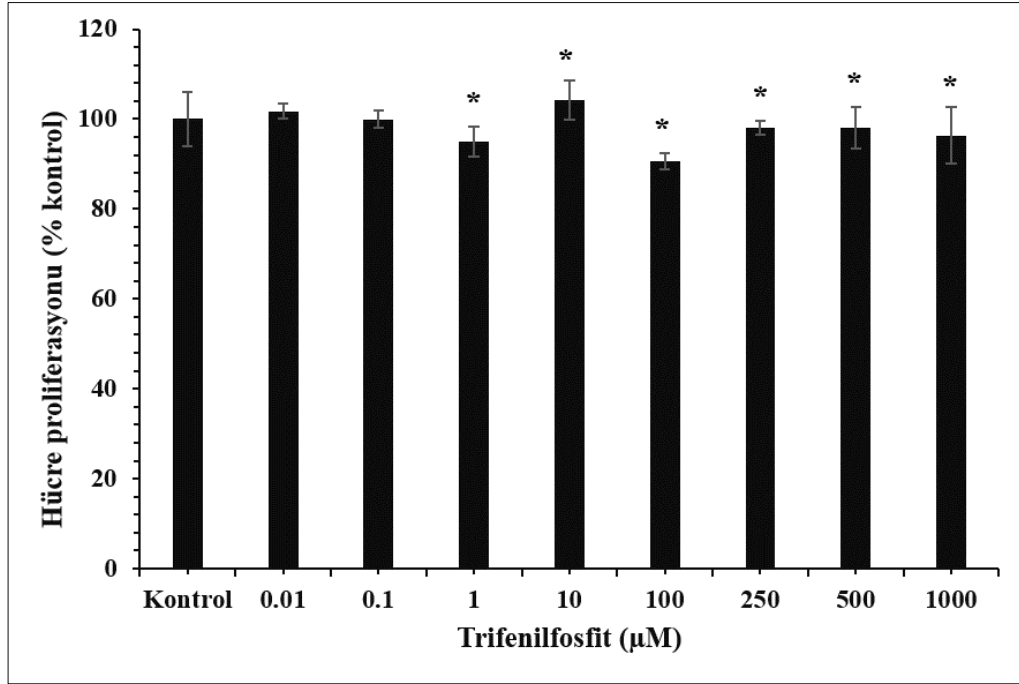
Şekil 4.3. Sülfisomidin'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama \pm SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi, (* $p < 0.05$).

Tiyofanoks'un HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4.4'te verilmiştir. Tiyofanoks konsantrasyonu artmasına rağmen HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunda azalma meydana gelmemiştir. 24 saat 1000 μM tiyofanoks maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu % 98.7 ± 0.44 olarak belirlenmiştir (* $p < 0.05$). Sonuç olarak, tiyofanoks'un 0.01-1000 μM doz aralığında HT-29 insan kolon kanser hücre modelinde antiproliferatif etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.



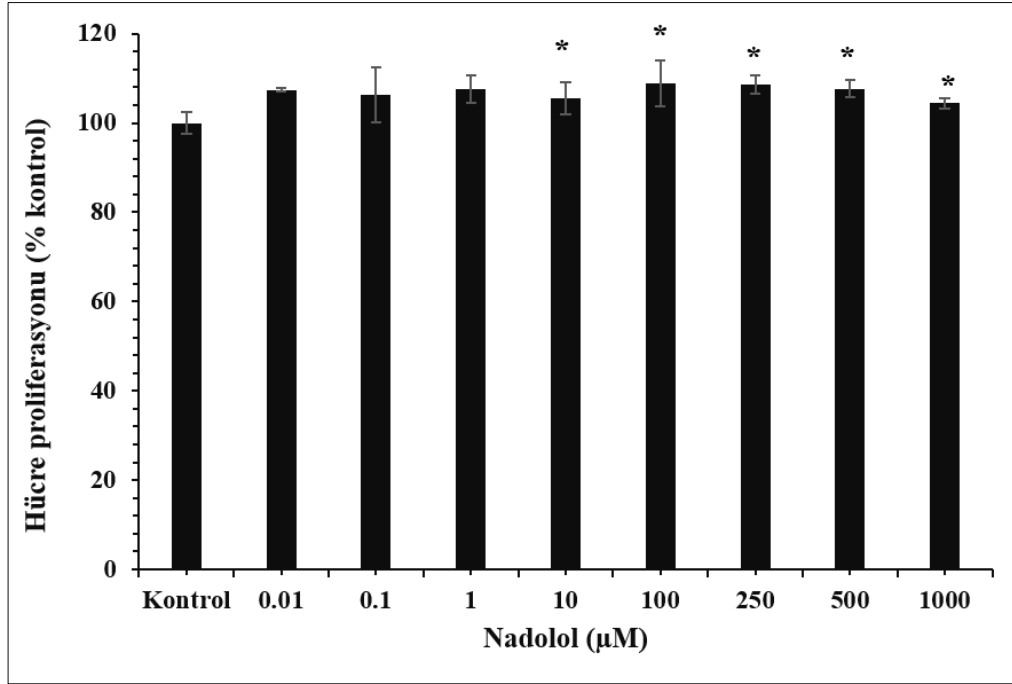
Şekil 4.4. Tiyofanoks'un HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi, (*p<0.05).

Trifenilfosfit'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4.5'te verilmiştir. Trifenilfosfit konsantrasyonu artmasına rağmen HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunda azalma meydana gelmemiştir. 24 saat 1000 µM trifenilfosfit maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu % 96.3±6.30 olarak belirlenmiştir (*p<0.05). Sonuç olarak, trifenilfosfit'in 0.01-1000 µM doz aralığında HT-29 insan kolon kanser hücre modelinde antiproliferatif etki göstermediği gözlenmiştir.



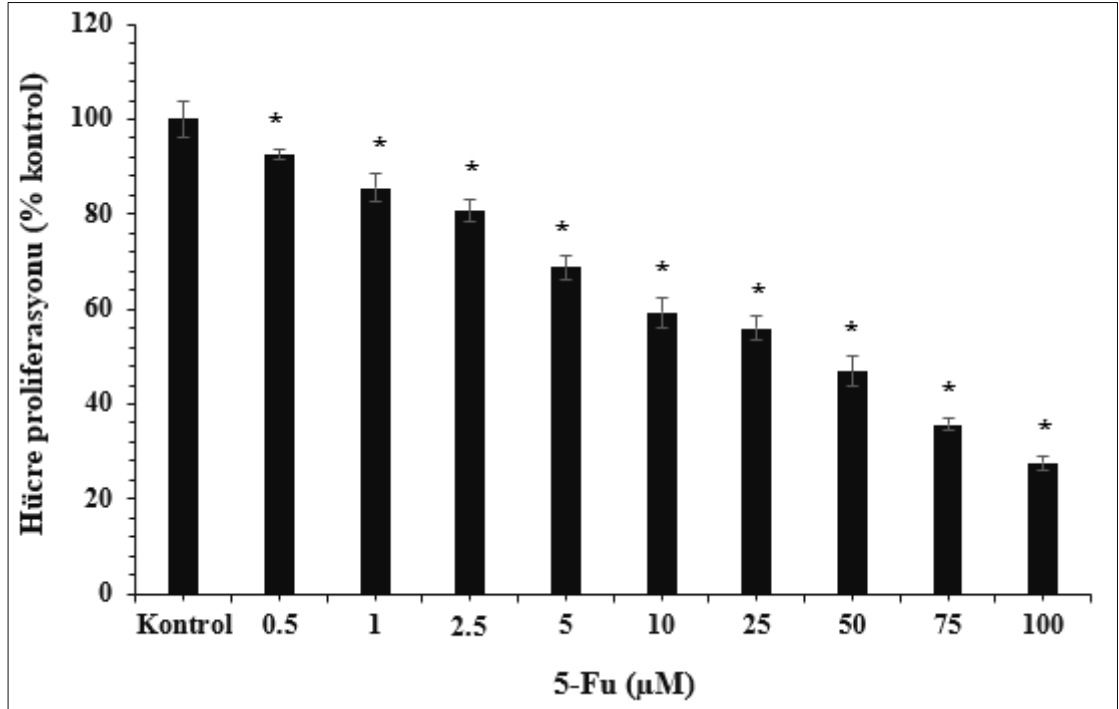
Şekil 4.5. Trifenilfosfit'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi, (*p<0.05).

Nadolol'ün HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisini incelemek amacıyla yapılan MTT hücre proliferasyon analizinin sonucu Şekil 4.6'da verilmiştir. Nadolol konsantrasyonu artmasına rağmen HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunda azalma meydana gelmemiştir. 24 saat 1000 µM nadolol maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu % 104.4±1.21 olarak belirlenmiştir (*p<0.05). Sonuç olarak, nadolol'ün 0.01-1000 µM doz aralığında HT-29 insan kolon kanser hücre modelinde antiproliferatif etkisinin olmadığı bulunmuştur.



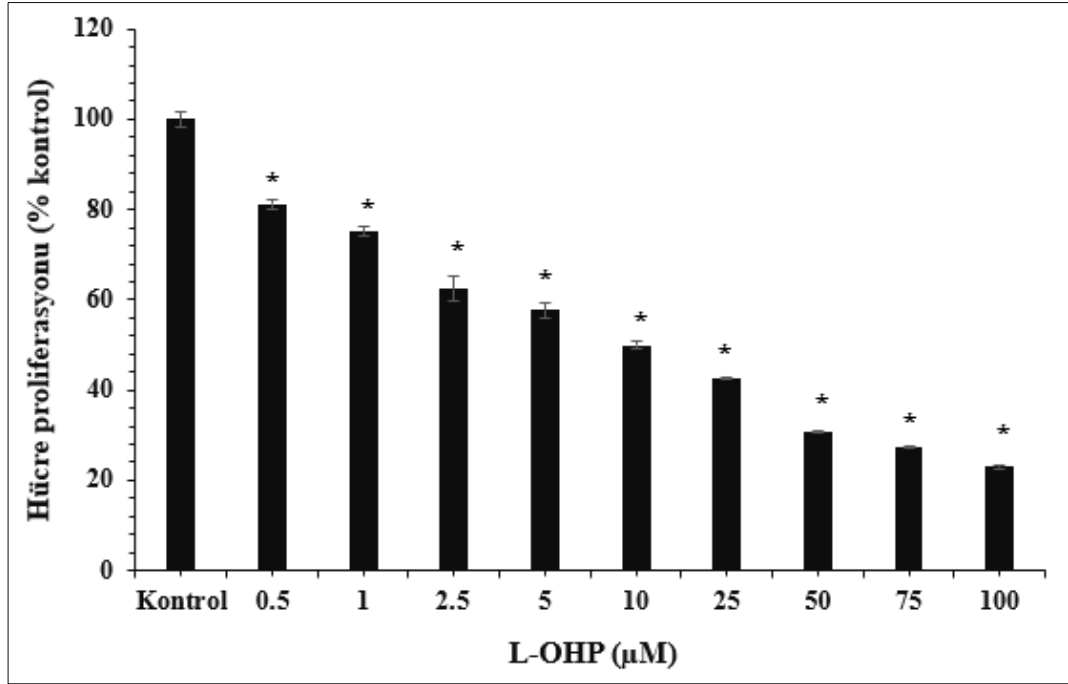
Şekil 4.6. Nadolol'ün HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi, (*p<0.05).

5-FU'in HT-29 insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası antiproliferatif etkileri anlamlı olarak 0.5 µM seviyesinde başlamıştır. Kontrole göre 0.5 µM 5-FU hücre proliferasyonunu % 100±3.83'ten % 92.58±1.09'a, 1 µM 5-FU % 85.56±2.96'ya, 2.5 µM 5-FU % 80.61 ±2.33'e, 5 µM 5-FU % 68.84±2.49'a, 10 µM 5-FU % 59.27±3.15'e, 25 µM 5-FU % 55.96±2.64'e, 50 µM 5-FU, 75 µM 5-FU ve 100 µM 5-FU ise sırasıyla % 46.78±3.18'e, % 35.67±1.29'a ve % 27.59±1.60'a düşürmüştür (*p<0.05) (Şekil 4.7). 24 saat 5-FU maruziyeti sonucunda, 5-FU'in IC₅₀ değeri 42.184 µM (% 95 güven aralığı; 29.527-48.669) olarak hesaplanmıştır.



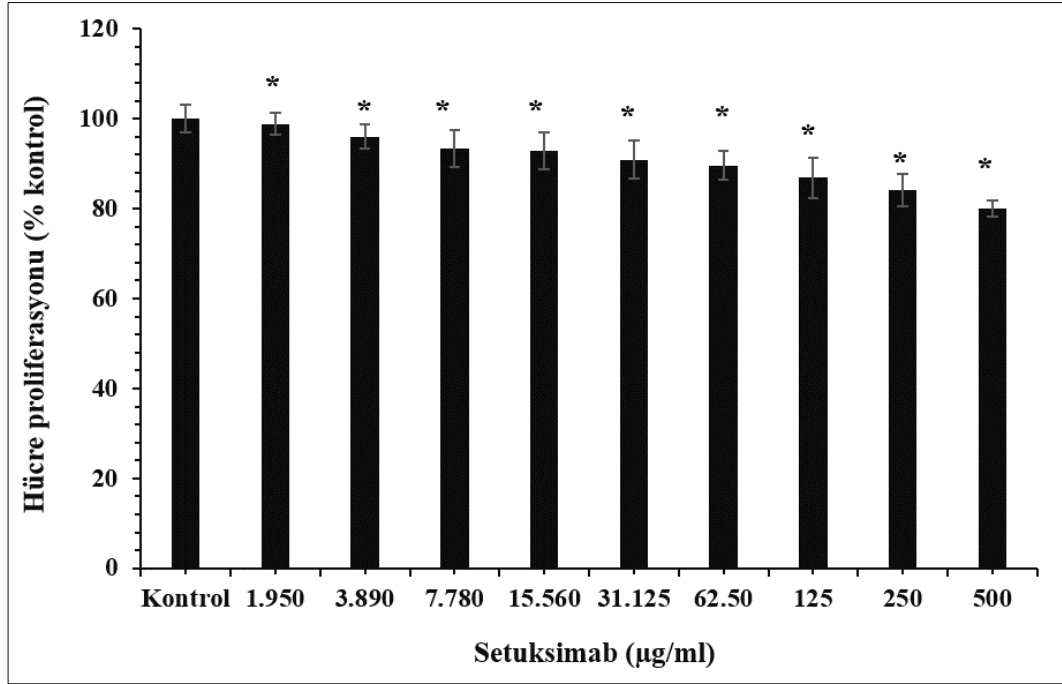
Şekil 4.7. 5-FU'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi, (*p<0.05).

L-OHP'in HT-29 insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası antiproliferatif etkileri anlamlı olarak 0.5 µM seviyesinde başlamıştır. Kontrole göre 0.5 µM L-OHP hücre proliferasyonunu % 100±1.69'dan % 81.27±0.99'a, 1 µM L-OHP % 75.03±1.03'e, 2.5 µM L-OHP % 62.41 ±2.83'e, 5 µM L-OHP % 57.77±1.64'e, 10 µM L-OHP % 50.01±0.68'e, 25 µM L-OHP % 42.60±0.36'ya, 50 µM L-OHP, 75 µM ve 100 µM L-OHP ise sırasıyla % 30.91±0.19'a, % 27.43±0.22'ye ve % 23.01±0.44'e düşürmüştür (Şekil 4.8). 24 saat L-OHP maruziyeti sonucunda, L-OHP'in IC₅₀ değeri 11.096 µM (% 95 güven aralığı; 5.389-12.627) olarak hesaplanmıştır (*p<0.05).



Şekil 4.8. L-OHP'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi, (*p<0.05).

C225'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4.9'da verilmiştir. 24 saat C225 maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunda, kontrole göre önemli ölçüde azalma meydana gelmemiştir (*p<0.05). 24 saat 500 µg/ml C225 maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu % 80.03±5.04 olarak bulunmuştur.

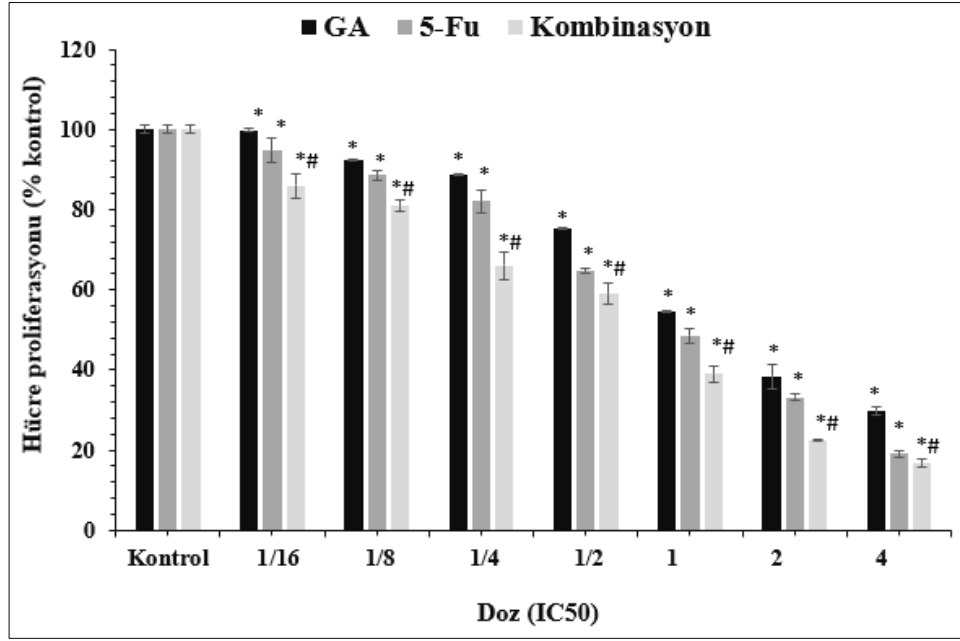


Şekil 4.9. C225'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi, (*p<0.05).

4.3. Test Moleküllerinin ve Kemoterapötiklerin Kombinasyon Etkileri

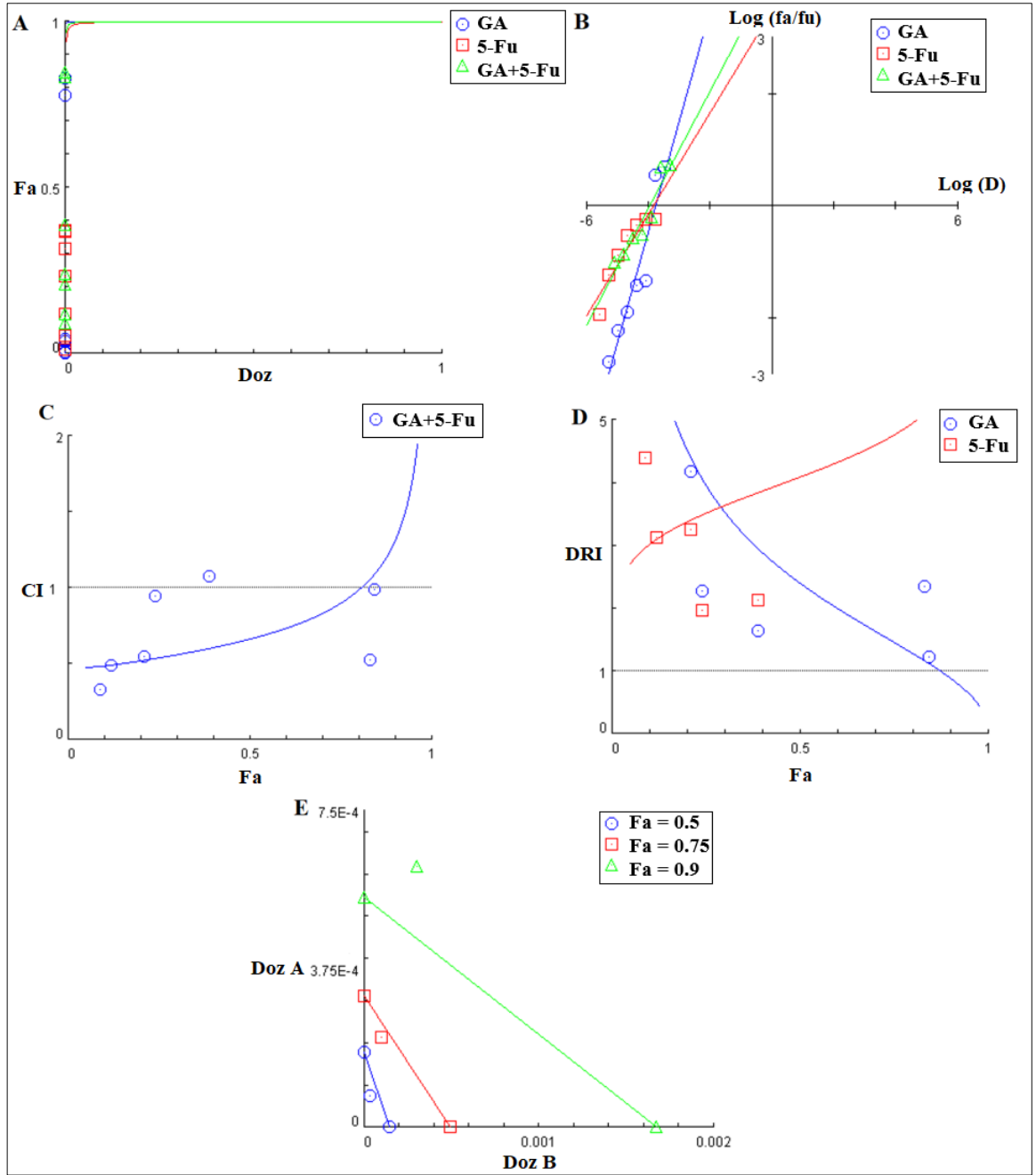
4.3.1. GA'in Kemoterapötikler ile Kombinasyon Etkileri

GA'in 5-FU, L-OHP ve C225 ile ikili kombinasyon etkileri incelendi. Bu amaçla, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine tek ajan olarak GA, 5-FU, L-OHP ve C225 uygulandı. Aynı deney koşullarında HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine 4IC₅₀-IC₅₀/16 doz aralığında GA'in, 5-FU, L-OHP veya C225 ile ikili kombinasyonu uygulandı. GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4.10'da verilmiştir. İlaç dozu arttıkça HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunun baskılandığı, GA ve 5-FU kombinasyonunda sinerjistik etkileşim meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 4.10. GA ve 5-FU kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi. *, kontrole göre, ve #, GA'ye göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunun Medyan-Etki denklemi ile yapılan analizi Şekil 4.11'de verilmiştir. GA ve 5-FU kombinasyonunun dozu arttıkça, ilaç inhibisyon etkisinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.11A ve Şekil 4.11B). GA ve 5-FU kombinasyonuna ait F_a -CI grafiği incelendiğinde, GA ve 5-FU'in sinerjistik etkileşim gösterdiği ve CI değerlerinin 1'den küçük olduğu görülmektedir (Şekil 4.11C). F_a -DRI grafiği incelendiğinde, GA ve 5-FU kombinasyonunda her bir bileşen için DRI değerlerinin 1'den oldukça büyük olduğu ve olumlu doz azalmasının gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.11D). GA ve 5-FU kombinasyonunun sinerjistik etkileşim göstermesi ve 5-FU'e ait DRI değerlerinin 1'den büyük olması, klinik olarak yararlıdır. GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonuna ait izoblogram grafiği, 0.5 ve 0.75 etki seviyelerinde CI değerinin 1'den küçük olduğunu ve sinerjistik etkileşim gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.11E).



Şekil 4.11. GA ve 5-FU kombinasyonunun farmakodinamik etkilerinin Chou-Talalay'ın kütle-eylem yasası temelli medyan-etki denklemi ile analizi. Doz- F_a grafiği (A), Medyan-etki grafiği (B), F_a -CI grafiği (C), F_a -DRI grafiği (D) ve izobologram (E). CI analizi, MTT hücre proliferasyon deneyinin istatistiksel analizini takiben, CompuSyn yazılımı kullanılarak yapıldı.

GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonu için DRI değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. GA ve 5-FU kombinasyonunda 5-FU için DRI değerlerinin 1.959 - 10.328 aralığında değiştiği bulunmuştur. Sonuç olarak, DRI değerleri GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunda 5-FU için olumlu doz azalmasının (DRI>1) gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.1. GA ve 5-FU kombinasyonundaki her bir bileşen için DRI değerleri.

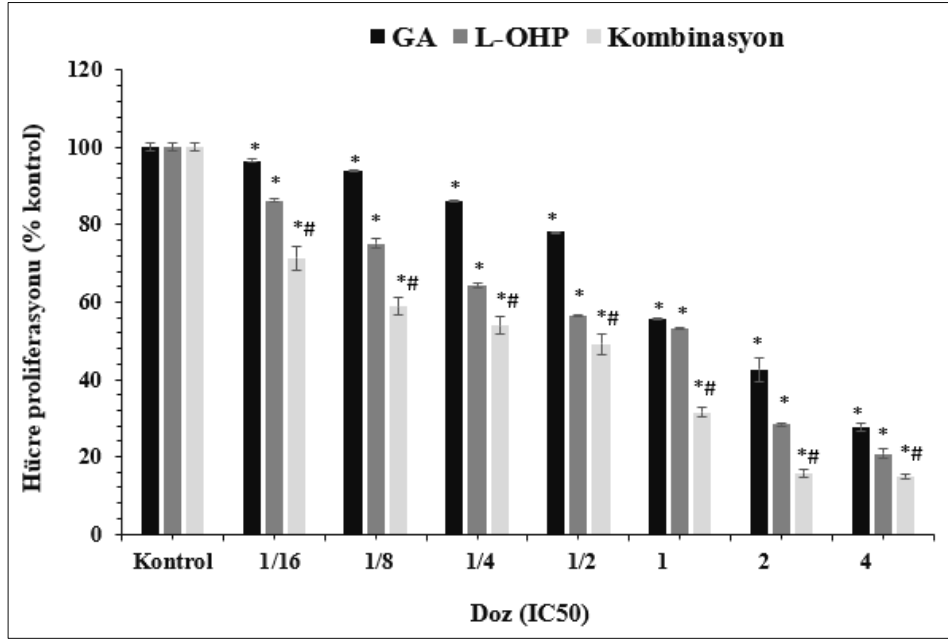
Kombinasyon dozu	GA için DRI	5-FU için DRI
IC ₅₀ /16	10.111	4.389
IC ₅₀ /8	5.956	3.127
IC ₅₀ /4	4.180	3.251
IC ₅₀ /2	2.279	1.959
IC ₅₀	1.635	2.137
2IC ₅₀	2.338	10.328
4IC ₅₀	1.228	5.744

GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonuna ait CI değerleri, Çizelge 4.2’de verilmiştir. CI değerleri incelendiğinde, Chou-Talalay’ın sınıflandırmasına göre, GA ve 5-FU kombinasyonunun IC₅₀/16, IC₅₀/8, IC₅₀/4 ve 2IC₅₀ dozlarında sinerjizm, IC₅₀/2, IC₅₀ ve 4IC₅₀ dozlarında ise yaklaşık additif etki gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. GA’in kemoterapi ajanları ile ikili kombinasyon etkileri. CI değerleri, MTT hücre proliferasyon deneyinin istatistiksel analizini takiben, Chou-Talalay tarafından geliştirilen kütle eylem yasası temelli Medyan-Etki denkleminde yararlanılarak CompuSyn yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

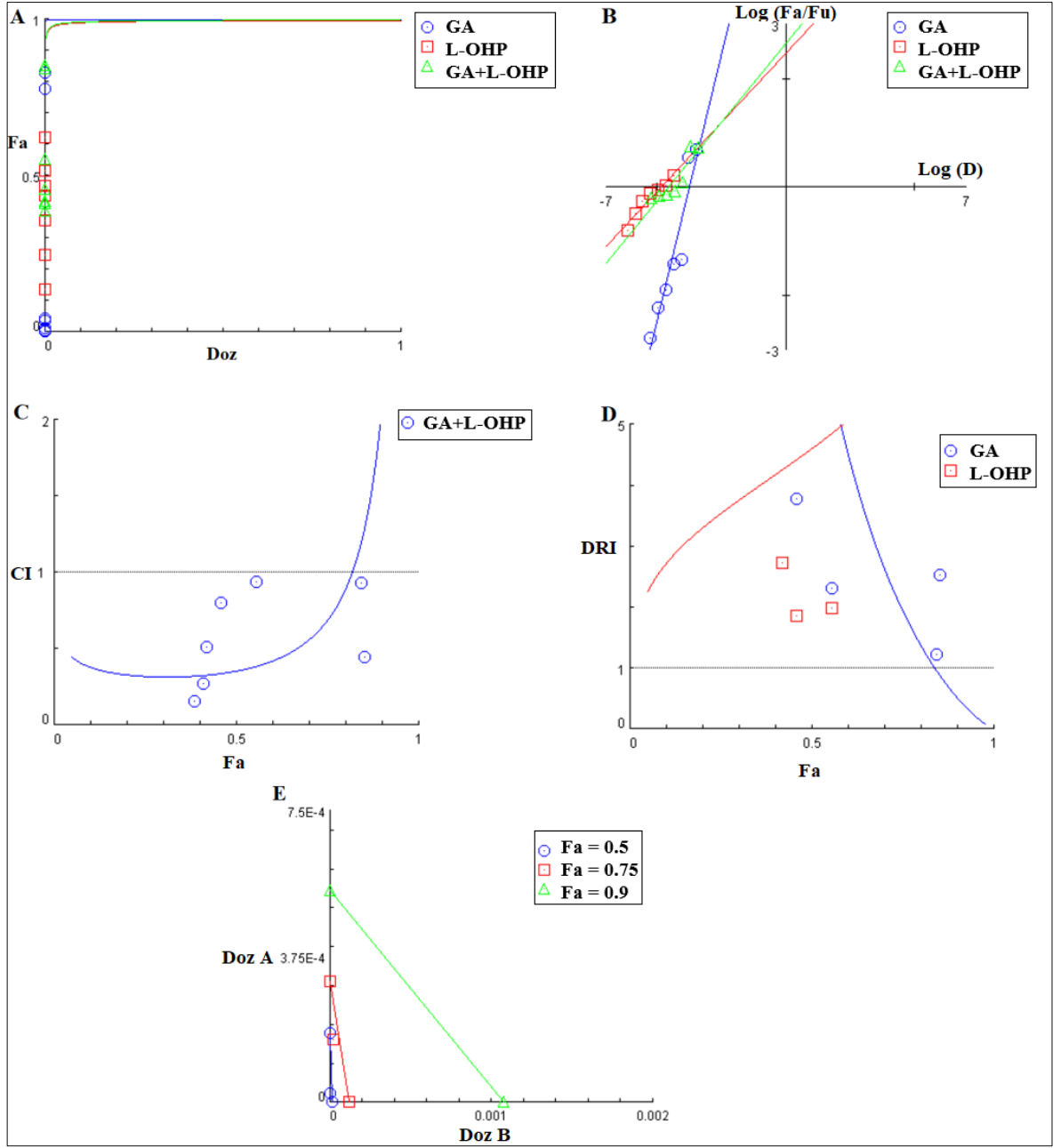
Doz	Kombinasyon						
	IC ₅₀ /16	IC ₅₀ /8	IC ₅₀ /4	IC ₅₀ /2	IC ₅₀	2IC ₅₀	4IC ₅₀
GA ve 5-FU	0.327	0.488	0.547	0.949	1.080	0.525	0.988
GA ve L-OHP	0.159	0.270	0.509	0.804	0.637	0.445	0.935
GA ve C225	2.180	1.535	2.891	2.831	7.902	8.452	2.650

GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4.12’de verilmiştir. İlaç uygulama dozu arttıkça HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunun baskılandığı, GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunda sinerjistik etkileşim meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 4.12. GA ve L-OHP kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi. *, kontrole göre, ve #, GA'ye göre istatiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunun medyan-etki denklemi ile yapılan analizi Şekil 4.13'te verilmiştir. GA ve L-OHP kombinasyon ilaç dozu arttıkça, inhibisyon etkisinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.13A ve Şekil 4.13B). GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonuna ait F_a -CI grafiği incelendiğinde, GA ve L-OHP'in sinerjistik etkileşim gösterdiği ve CI değerlerinin 1'den çok küçük olduğu görülmektedir (Şekil 4.13C). F_a -DRI grafiği incelendiğinde, GA ve L-OHP kombinasyonunda DRI değerlerinin 1'den oldukça büyük olduğu ve L-OHP için olumlu doz azalmasının gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.13D). GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunun kuvvetli sinerjistik etkileşimler göstermesi, L-OHP'e ait DRI değerlerinin 1'den büyük olması, klinik olarak faydalıdır. GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonuna ait izobologram grafiği incelendiğinde, 0.5 ve 0.75 etki seviyelerinde CI değerinin 1'den küçük olduğu ve sinerjistik etkileşim gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.13E).



Şekil 4.13. GA ve L-OHP kombinasyonunun farmakodinamik etkilerinin Chou-Talalay'ın kütle-eylem yasası temelli medyan-etki denklemi ile analizi. Doz- F_a grafiği (A), Medyan-etki grafiği (B), CI- F_a grafiği (C), DRI- F_a grafiği (D) ve isobologram (E). CI analizi, MTT hücre proliferasyon deneyinin istatistiksel analizini takiben, CompuSYN yazılımı kullanılarak yapıldı.

GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonu için DRI değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. GA ve L-OHP ilaç kombinasyonunda DRI değerleri incelendiğinde, L-OHP için DRI değerlerinin 1.854 - 20.446 değer aralığında değiştiği görülmektedir. Sonuç

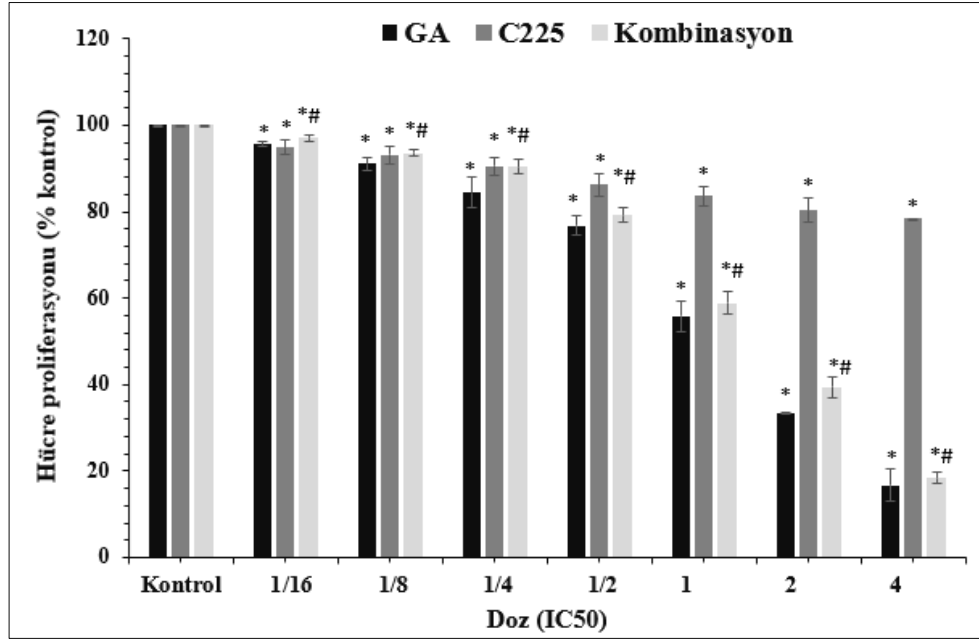
olarak, DRI değerleri GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunda L-OHP için olumlu doz azalmasının ($DRI > 1$) gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.3. GA ve L-OHP kombinasyonundaki her bir bileşen için DRI değerleri.

Kombinasyon dozu	GA için DRI	L-OHP için DRI
IC ₅₀ /16	25.993	8.270
IC ₅₀ /8	13.700	5.067
IC ₅₀ /4	6.987	2.733
IC ₅₀ /2	3.781	1.854
IC ₅₀	2.305	1.989
2IC ₅₀	2.526	20.446
4IC ₅₀	1.217	8.862

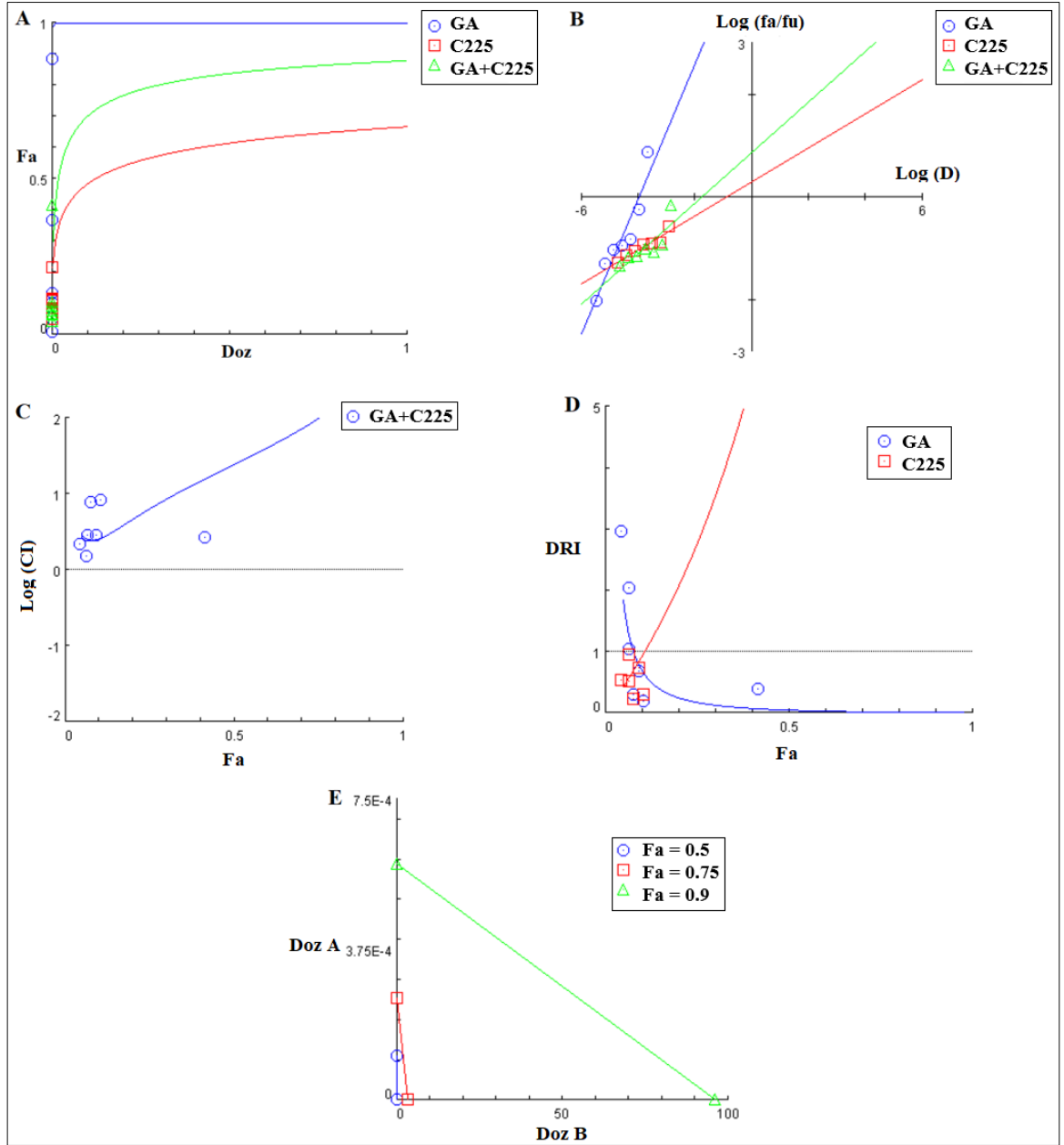
GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonuna ait CI değerleri, izelge 4.2’de verilmiştir. CI değerleri incelendiğinde, Chou-Talalay’ın sınıflandırmasına göre, GA ve L-OHP kombinasyonunun IC₅₀/16 ve IC₅₀/8 dozlarında güçlü sinerjizm, IC₅₀/4, IC₅₀ ve 2IC₅₀ dozlarında sinerjizm, IC₅₀/2 dozunda orta sinerjizm ve 4IC₅₀ dozunda ise yaklaşık additif etkileşim gerçekleştiği görülmektedir.

GA ve C225 ikili ilaç kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi şekil 4.14’de verilmiştir. Kombinasyon ilaç uygulama dozu arttıa HT-29 insan kolon kanser hücre proliferasyonunun baskılandığı ancak GA’e kıyasla, GA ve C225 kombinasyon uygulamasının üstün bir antiproliferatif etkisinin bulunmadığı ve antagonistik etkileşim meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 4.14. GA ve C225 kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi. *, kontrole göre, ve #, GA'ye göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

GA ve C225 ikili ilaç kombinasyonunun medyan-etki denklemi ile yapılan analizi Şekil 4.15'de verilmiştir. GA ve C225 kombinasyon ilaç dozu arttıkça, inhibisyon etkisinin arttığı ancak GA'in bireysel olarak GA ve C225 kombinasyonundan daha fazla etki gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.15A ve Şekil 4.15B). GA ve C225 ikili ilaç kombinasyonuna ait F_a -Log(CI) grafiği incelendiğinde, GA ve C225'in antagonistik etkileşimler gösterdiği ve CI değerlerinin 1'den oldukça büyük olduğu görülmektedir (Şekil 4.15C). F_a -DRI grafiği incelendiğinde, GA ve C225 kombinasyonunda DRI değerlerinin 1'den küçük olduğu ve C225 için olumsuz doz azalmasının (DRI<1) meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.15D). GA ve C225 kombinasyonunun antagonistik etkileşimler göstermesi, C225 için DRI değerlerinin 1'den küçük olması, klinik olarak istenen bir durum değildir. GA ve C225 kombinasyonuna ait izoblogram grafiği de, 0.5 ve 0.75 etki seviyelerinde CI değerinin 1'den büyük olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.15E).



Şekil 4.15. GA ve C225 kombinasyonunun farmakodinamik etkilerinin Chou-Talalay'ın kütle-eylem yasası temelli medyan-etki denklemi ile analizi. Doz- F_a grafiği (A), Medyan-etki grafiği (B), CI- F_a grafiği (C), DRI- F_a grafiği (D) ve isobologram (E). CI analizi, MTT hücre proliferasyon deneyinin istatistiksel analizini takiben, CompuSYN yazılımı kullanılarak yapıldı.

GA ve C225 ikili ilaç kombinasyonuna ait CI değerleri, Çizelge 4.2'de verilmiştir. GA ve C225 kombinasyonunun bütün dozlarında CI değerleri 1'den büyük olarak bulunmuştur. CI değerleri incelendiğinde, Chou-Talalay'ın sınıflandırmasına göre, GA

ve C225 kombinasyonunun $IC_{50}/16$, $IC_{50}/8$, $IC_{50}/4$, $IC_{50}/2$ ve $4IC_{50}$ dozlarında antagonizm, IC_{50} ve $2IC_{50}$ dozlarında ise güçlü antagonizm gözlenmiştir.

GA ve C225 ikili ilaç kombinasyonu için DRI değerleri Çizelge 4.4’de verilmiştir. GA ve C225 kombinasyonunda, C225 için DRI değerlerinin 0.220 - 35.194 değer aralığında değiştiği görülmektedir. Sonuç olarak, DRI değerleri GA ve C225 kombinasyonunda C225 için olumlu doz azalmasının ($DRI < 1$) gerçekleşmediğini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.4. GA ve C225 kombinasyonundaki her bir bileşen için DRI değerleri.

Kombinasyon dozu	GA için DRI	C225 için DRI
$IC_{50}/16$	2.959	0.543
$IC_{50}/8$	2.037	0.958
$IC_{50}/4$	1.039	0.518
$IC_{50}/2$	0.677	0.738
IC_{50}	0.297	0.220
$2IC_{50}$	0.193	0.307
$4IC_{50}$	0.381	35.194

4.3.2. Tiyofanoks, Sülfisomidin, Trifenilfosfit ve Nadolol’ün Kombinasyon Etkileri

Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol’ün GA ve kemoterapötikler ile kombinasyon etkileri incelendi. GA ve kemoterapötikler için kombinasyon doz aralığı $IC_{50}/16$ - $4IC_{50}$ olarak, tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol için uygulama doz aralığı 1.563-100 μ M olarak belirlenmiştir. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol tek ajan olarak 0.01-1000 μ M doz aralığında herhangi bir antiproliferatif etki göstermemektedir. Ayrıca, tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol’ün yaygın kanser türlerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol için MTT hücre proliferasyon analizleri ve bu ajanların çeşitli biyolojik sistemler üzerine toksisite değerleri temel alınarak uygulama doz aralığı, 1.563-100 μ M olarak belirlenmiştir. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol’ün kombinasyon etkileri, iki farklı yaklaşım ile incelendi. Birinci yaklaşımda, GA ve kemoterapötikler $IC_{50}/16$ - $4IC_{50}$ doz aralığında uygulandı. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol ise 1.563-100 μ M doz aralığında uygulandı. Takibinde, tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol’ün kombinasyon etkileri,

Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli temelinde incelendi. Chou-Talalay metodu ilaç kombinasyonlarının analizi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve literatürde çok sayıda atıf almıştır (Chou vd., 2019). Ancak, Chou-Talalay metodunun bazı sınırlamaları mevcuttur (Pemovska vd., 2018). Bu yöntemde, ilaçların IC₅₀ değerleri (veya D_m değeri) temel alınarak CI hesaplanmaktadır (Chou, 2006). İlaçların doz-cevap eğrileri temelde doğrusal olmadığı için medyan-etki dozunu (D_m veya IC₅₀) ve doz-cevap eğrisinin sigmoiditesini doğru bir şekilde belirlemek zordur (Pemovska vd., 2018). Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün tek ajan olarak antiproliferatif etkisi olmadığı için bu moleküllerin belirli bir doz aralığındaki doz-yanıt eğrileri ve IC₅₀ (ve/veya D_m değeri) değerleri de yoktur. Dolayısıyla bu moleküllerin kombinasyon etkileri, kombinasyondaki bileşenlerin bireysel etkileri ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Bu amaçla, Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli kullanılmıştır. Bliss modeli, Chou-Talalay yönteminden sonra en yaygın kullanılan ikinci yöntemdir. Model, n sayıda bileşenden oluşan ilaç kombinasyonlarının analizi için de kullanılmaktadır (Foucquier & Guedj, 2015).

Elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.5'de verilmiştir. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün, kemoterapötikler ve GA ile ikili ilaç kombinasyonlarının CI değerlerinin 1'den büyük olduğu ve antagonistik etkileşim gösterdiği bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün birinci yöntem ile incelenen ikili kombinasyon etkileri.

Kombinasyon	Doz	1.563 µM	3.125 µM	6.25 µM	12.5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
	+ IC ₅₀ /16	+ IC ₅₀ /8	+ IC ₅₀ /4	+ IC ₅₀ /2	+ IC ₅₀	+ 2 IC ₅₀	+ 4 IC ₅₀	
Nadolol ve 5-FU kombinasyonu	2.053	1.376	1.132	1.094	1.071	1.052	1.095	
Nadolol ve L-OHP kombinasyonu	1.665	1.329	1.148	1.105	1.068	1.058	1.074	
Nadolol ve C225 kombinasyonu	1.415	1.272	1.290	1.943	1.093	1.095	1.990	
Nadolol ve GA kombinasyonu	2.273	2.125	1.817	6.094	1.308	1.543	1.981	
Sülfisomidin ve 5-FU kombinasyonu	1.988	1.923	1.998	1.217	1.935	1.934	1.955	
Sülfisomidin ve L-OHP kombinasyonu	1.083	1.142	1.112	1.035	1.093	1.031	1.067	
Sülfisomidin ve C225 kombinasyonu	3.647	5.497	1.906	1.962	2.059	1.156	1.856	
Sülfisomidin ve GA kombinasyonu	1.530	1.972	1.959	1.926	2.233	1.098	1.045	
Trifenilfosfit ve 5-FU kombinasyonu	1.160	1.018	1.033	1.005	1.015	1.054	1.092	
Trifenilfosfit ve L-OHP kombinasyonu	1.132	1.211	1.114	1.099	1.092	1.107	1.135	
Trifenilfosfit ve C225 kombinasyonu	2.489	2.475	1.400	1.250	1.768	1.493	2.133	
Trifenilfosfit ve GA kombinasyonu	2.097	1.932	1.070	3.669	2.737	1.088	1.019	
Tiyofanoks ve 5-FU kombinasyonu	1.461	1.438	1.617	1.194	1.143	1.191	1.122	
Tiyofanoks ve L-OHP kombinasyonu	1.506	1.473	1.514	1.262	1.237	1.221	1.248	
Tiyofanoks ve C225 kombinasyonu	3.300	4.094	3.914	1.586	2.032	1.699	2.232	
Tiyofanoks ve GA kombinasyonu	1.941	1.761	3.386	1.613	2.112	1.369	1.003	

İkinci yaklaşımda GA ve kemoterapötikler, ilaç kombinasyonlarına IC₅₀ sabit dozunda uygulandı. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol ise 1.563-100 µM doz aralığında uygulandı. Ajanların ve moleküllerin HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine olan bireysel ve kombinasyon etkileri, MTT analizi ile incelendi. Takibinde, ilaç kombinasyonlarının CI değeri Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.6’da verilmiştir. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol’ün, kemoterapötikler ve GA ile ikili ilaç kombinasyonlarının sinerjistik etkileşim göstermediği (CI>1) bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol’ün ikinci yöntem ile incelenen ikili kombinasyon etkileri.

Kombinasyon	Doz	1.563 µM	3.125 µM	6.250 µM	12.5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
	+	+	+	+	+	+	+	+
	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
Nadolol ve 5-FU kombinasyonu	1.916	1.926	1.976	1.013	1.021	1.092	1.087	
Nadolol ve L-OHP kombinasyonu	1.996	1.018	1.000	1.014	1.023	1.036	1.118	
Nadolol ve C225 kombinasyonu	1.216	1.068	1.965	1.978	1.991	1.330	1.290	
Nadolol ve GA kombinasyonu	4.335	3.917	4.859	4.824	5.957	3.901	4.683	
Sülfisomidin ve 5-FU kombinasyonu	1.073	1.106	1.153	1.198	1.187	1.167	1.155	
Sülfisomidin ve L-OHP kombinasyonu	1.050	1.074	1.087	1.125	1.150	1.147	1.082	
Sülfisomidin ve C225 kombinasyonu	5.933	5.563	2.924	2.699	3.325	2.932	2.974	
Sülfisomidin ve GA kombinasyonu	1.457	1.541	1.344	2.381	1.670	1.360	2.023	
Tiyofanoks ve 5-FU kombinasyonu	1.121	1.076	1.139	1.126	1.064	1.029	1.006	
Tiyofanoks ve L-OHP kombinasyonu	1.104	1.064	1.082	1.047	1.088	1.079	1.131	
Tiyofanoks ve C225 kombinasyonu	3.535	3.810	3.154	2.073	1.632	1.876	2.324	
Tiyofanoks ve GA kombinasyonu	2.419	6.961	4.397	4.231	3.870	4.908	3.434	
Trifenilfosfit ve 5-FU kombinasyonu	1.146	1.158	1.161	1.114	1.174	1.125	1.179	
Trifenilfosfit ve L-OHP kombinasyonu	1.152	1.133	1.100	1.082	1.120	1.082	1.112	
Trifenilfosfit ve C225 kombinasyonu	3.768	4.446	5.844	5.919	5.950	5.433	4.119	
Trifenilfosfit ve GA kombinasyonu	1.740	6.253	3.802	4.478	2.988	5.036	4.552	

Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol’ün, GA ile üç-bileşenli ilaç kombinasyonlarının CI değerleri Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8’de verilmiştir. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol’ün, GA ile üç-bileşenli ilaç kombinasyonlarının antagonistik etkileşim gösterdiği gözlenmiştir. Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda, ilaç kombinasyonlarının CI değerlerinin 1’den büyük olduğu ve antagonistik etkileşim gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'un birinci yöntem ile incelenen üç-bileşenli kombinasyon etkileri.

Doz	1.563 µM + IC ₅₀ /16	3.125 µM + IC ₅₀ /8	6.25 µM + IC ₅₀ /4	12.5 µM + IC ₅₀ /2	25 µM + IC ₅₀	50 µM + 2 IC ₅₀	100 µM + 4 IC ₅₀
GA, Trifenilfosfit ve Sülfisomidin kombinasyonu	4.405	3.455	2.886	2.408	1.965	1.918	1.208
GA, Trifenilfosfit ve Tiyofanoks kombinasyonu	2.855	1.821	1.139	1.843	1.403	1.298	1.418
GA, Trifenilfosfit ve Nadolol kombinasyonu	3.977	2.197	2.749	3.632	6.136	6.074	3.502
GA, Sülfisomidin ve Tiyofanoks kombinasyonu	1.163	1.574	1.782	1.737	1.997	1.793	1.243
GA, Sülfisomidin ve Nadolol kombinasyonu	1.415	1.695	1.681	1.743	1.842	1.287	2.094
GA, Tiyofanoks ve Nadolol kombinasyonu	1.296	1.686	1.677	1.844	2.103	1.820	1.929

Çizelge 4.8. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'un ikinci yöntem ile incelenen üç-bileşenli kombinasyon etkileri.

Doz	1.563 µM + IC ₅₀	3.125 µM + IC ₅₀	6.25 µM + IC ₅₀	12.5 µM + IC ₅₀	25 µM + IC ₅₀	50 µM + IC ₅₀	100 µM + IC ₅₀
GA, Trifenilfosfit ve Sülfisomidin kombinasyonu	1.649	1.126	1.163	1.390	1.700	1.673	1.274
GA, Trifenilfosfit ve Tiyofanoks kombinasyonu	1.620	1.136	1.747	1.204	1.202	1.264	1.114
GA, Trifenilfosfit ve Nadolol kombinasyonu	1.630	1.571	1.486	1.506	1.625	1.398	1.469
GA, Sülfisomidin ve Tiyofanoks kombinasyonu	1.523	1.654	1.774	1.593	1.637	1.450	1.566
GA, Sülfisomidin ve Nadolol kombinasyonu	1.009	1.070	1.024	1.028	1.087	1.067	1.085
GA, Tiyofanoks ve Nadolol kombinasyonu	1.091	1.062	1.083	1.148	1.119	1.061	1.090

Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'un, GA ile dört-bileşenli ilaç kombinasyonlarının CI değerleri Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da verilmiştir. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'un, GA ile dört-bileşenli ilaç kombinasyonlarının sinerjistik etkileşim göstermediği tespit edilmiştir. Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda, ilaç kombinasyonlarının CI değerlerinin 1'den büyük olduğu ve antagonistik etkileşim gösterdiği bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün birinci yöntem ile incelenen dört-bileşenli kombinasyon etkileri.

Doz	1.563 µM	3.125 µM	6.25 µM	12.5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Kombinasyon	+	+	+	+	+	+	+
	IC₅₀/16	IC₅₀/8	IC₅₀/4	IC₅₀/2	IC₅₀	2 IC₅₀	4 IC₅₀
GA, Trifenilfosfit, Sülfisomidin ve Nadolol kombinasyonu	1.023	1.071	1.077	1.063	1.062	1.066	1.070
GA, Tiyofanoks, Sülfisomidin ve Nadolol kombinasyonu	1.102	1.100	1.067	1.078	1.051	1.042	1.235
GA, Trifenilfosfit, Tiyofanoks ve Sülfisomidin kombinasyonu	1.703	1.234	1.954	1.978	1.772	1.011	1.005
GA, Trifenilfosfit, Tiyofanoks ve Nadolol kombinasyonu	1.158	1.069	1.992	1.256	1.871	2.756	2.586

Çizelge 4.10. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün ikinci yöntem ile incelenen dört-bileşenli kombinasyon etkileri.

Doz	1.563 µM	3.125 µM	6.25 µM	12.5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Kombinasyon	+	+	+	+	+	+	+
	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀
GA, Trifenilfosfit, Sülfisomidin ve Nadolol kombinasyonu	1.215	1.149	1.085	1.049	1.875	1.010	1.006
GA, Tiyofanoks, Sülfisomidin ve Nadolol kombinasyonu	1.997	1.846	1.989	1.039	1.472	3.335	1.593
GA, Trifenilfosfit, Tiyofanoks ve Sülfisomidin kombinasyonu	1.834	1.939	1.842	1.766	1.862	1.929	1.720
GA, Trifenilfosfit, Tiyofanoks ve Nadolol kombinasyonu	7.992	4.280	6.598	1.915	1.074	1.061	1.026

Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün kendi aralarındaki iki-, üç- ve dört-bileşenli ilaç kombinasyonlarının Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli ile hesaplanan CI değerleri Çizelge 4.11'de verilmiştir. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün, GA ile üç-bileşenli ilaç kombinasyonlarının sinerjistik etkileşim göstermediği bulunmuştur. Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda, ilaç kombinasyonlarının CI değerlerinin 1'den büyük olduğu ve antagonistik etkileşim gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün kendi aralarındaki iki-, üç- ve dört-bileşenli kombinasyon etkileri.

Kombinasyon	Doz (µM)	1.563	3.125	6.25	12.5	25	50	100
Trifenilfosfit ve Tiyofanoks kombinasyonu		2.934	1.447	1.294	1.183	1.367	4.899	4.173
Trifenilfosfit ve Sülfisomidin kombinasyonu		2.800	3.066	3.224	4.274	4.387	2.747	2.829
Trifenilfosfit ve Nadolol kombinasyonu		2.651	8.076	6.398	3.395	3.480	2.444	7.963
Tiyofanoks ve Sülfisomidin kombinasyonu		3.523	7.796	9.310	5.712	8.421	3.921	3.146
Tiyofanoks ve Nadolol kombinasyonu		2.628	1.044	1.463	1.620	1.693	1.668	1.999
Sülfisomidin ve Nadolol kombinasyonu		4.530	5.623	1.586	8.939	6.457	1.706	5.075
Trifenilfosfit, Sülfisomidin ve Tiyofanoks kombinasyonu		3.663	4.291	4.587	3.420	3.978	4.550	2.992
Trifenilfosfit, Sülfisomidin ve Nadolol kombinasyonu		1.490	4.728	3.378	4.125	2.891	3.590	6.313
Trifenilfosfit, Tiyofanoks ve Nadolol kombinasyonu		9.058	8.847	3.799	5.126	5.402	3.886	6.566
Sülfisomidin, Tiyofanoks ve Nadolol kombinasyonu		3.996	4.740	5.864	7.329	9.009	6.831	3.736
Trifenilfosfit, Sülfisomidin, Tiyofanoks ve Nadolol kombinasyonu		1.106	1.639	1.874	1.419	1.850	1.388	1.381

Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün, GA ile beş-bileşenli ilaç kombinasyonlarının Bliss modeli ile hesaplanan CI değerleri Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13'te verilmiştir. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün, GA ile beş-bileşenli ilaç kombinasyonlarının CI değerlerinin 1'den büyük olduğu ve sinerjistik etkileşim göstermediği gözlenmiştir. Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda, ilaç kombinasyonlarının CI değerlerinin 1'den büyük olduğu ve antagonistik etkileşim gösterdiği bulunmuştur.

Çizelge 4.12. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün GA (4IC₅₀) ile beş-bileşenli kombinasyon etkileri.

Kombinasyon	Doz	1.563 µM	3.125 µM	6.25 µM	12.5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
		+	+	+	+	+	+	+
		IC₅₀/16	IC₅₀/8	IC₅₀/4	IC₅₀/2	IC₅₀	2 IC₅₀	4 IC₅₀
GA, Tiyofanoks, Sülfisomidin, Trifenilfosfit ve Nadolol kombinasyonu		6.213	7.434	5.852	4.330	4.397	1.736	1.840

Çizelge 4.13. Tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün GA (IC₅₀) ile beş-bileşenli kombinasyon etkileri.

Kombinasyon	Doz	1.563 µM	3.125 µM	6.25 µM	12.5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
		+	+	+	+	+	+	+
		IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀
GA, Tiyofanoks, Sülfisomidin, Trifenilfosfit ve Nadolol kombinasyonu		2.499	3.531	3.094	3.380	3.475	2.655	2.783

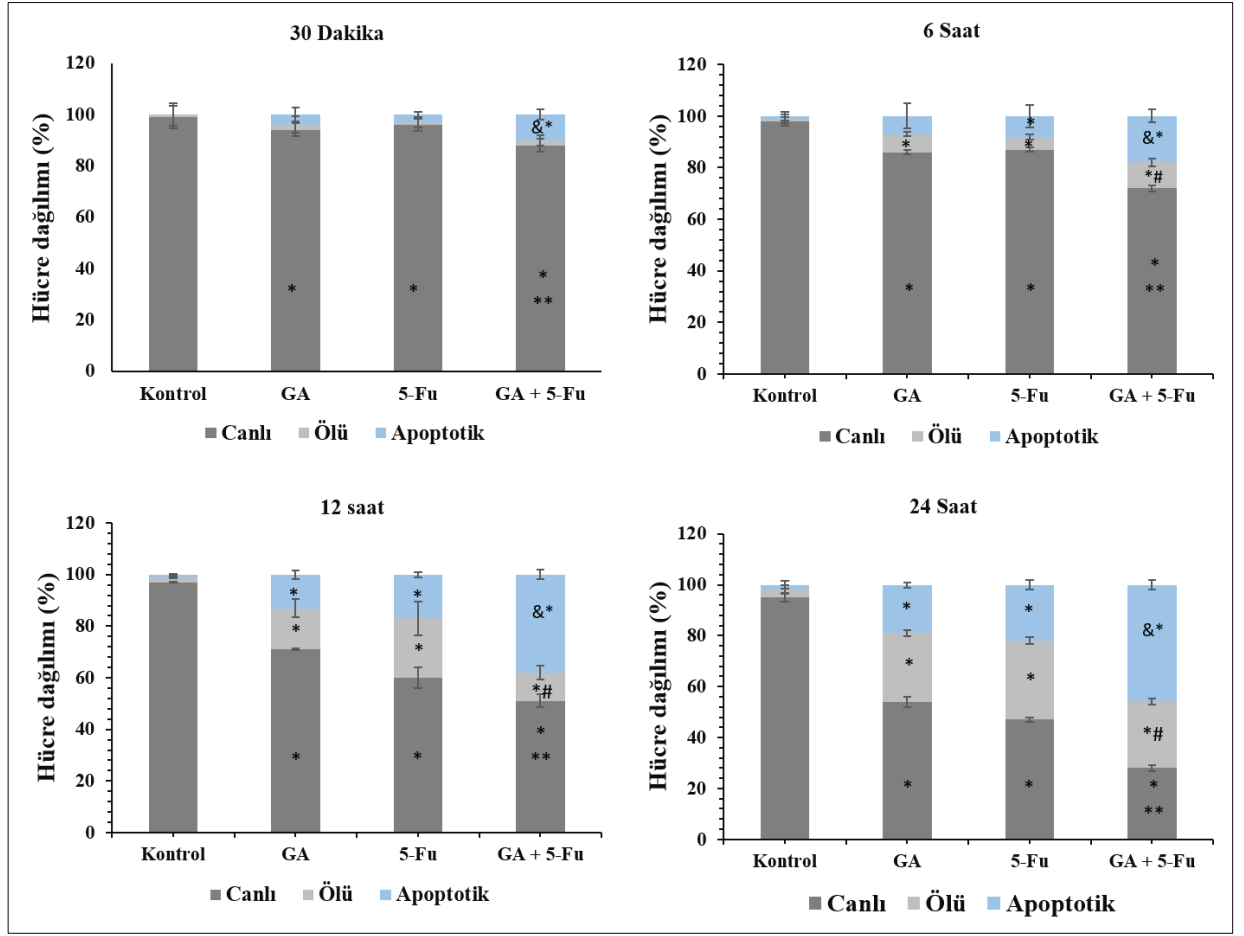
4.4. TALİ Görüntü-Temelli Sitometre Analizi

Sinerjistik ikili ilaç kombinasyonlarının HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine etkisi TALİ görüntü-temelli sitometre ile incelendi. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonu ile inkübasyonu sonunda tespit edilen ölü, canlı ve apoptotik hücre popülasyonunun oranları Çizelge 4.14’de verilmiştir. GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonu zaman-bağımlı olarak ölü hücre oranını ve apoptotik hücre oranını sinerjistik olarak artırdığı bulunmuştur.

Çizelge 4.14. GA ve 5-FU kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine etkisinin TALİ görüntü-temelli sitometre ile incelenmesi. Değerler üç farklı deneyin \pm SE ortalamasıdır.

Hücre popülasyonu (%)	Deney grubu	30 Dakika	6 Saat	12 Saat	24 Saat
Ölü hücre oranı	Kontrol	1 \pm 4.23	1 \pm 1.68	2 \pm 0.25	3 \pm 1.68
	GA	2 \pm 3.18	7 \pm 0.81	16 \pm 3.55	27 \pm 1.33
	5-FU	1 \pm 1.94	5 \pm 1.02	23 \pm 6.58	31 \pm 1.35
	GA+5-FU	2 \pm 2.01	10 \pm 1.68	11 \pm 2.76	26 \pm 1.16
Canlı hücre oranı	Kontrol	99 \pm 4.23	98 \pm 1.67	97 \pm 0.25	95 \pm 1.68
	GA	94 \pm 2.56	86 \pm 0.97	71 \pm 0.28	54 \pm 2.03
	5-FU	96 \pm 2.44	87 \pm 0.72	60 \pm 4.00	47 \pm 0.94
	GA+5-FU	88 \pm 2.46	72 \pm 1.22	51 \pm 2.48	28 \pm 1.22
Apoptotik hücre oranı	Kontrol	0 \pm 4.23	1 \pm 1.68	1 \pm 0.25	2 \pm 1.68
	GA	4 \pm 2.69	7 \pm 4.90	13 \pm 1.69	19 \pm 1.02
	5-FU	3 \pm 1.11	8 \pm 4.38	17 \pm 1.21	22 \pm 1.72
	GA+5-FU	10 \pm 1.90	18 \pm 2.47	38 \pm 1.74	46 \pm 1.71

GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunun apoptoza etkisi, Şekil 4.16’da verilmiştir. 30 dakika, 6 saat, 12 saat ve 24 saat GA uygulaması sonunda, apoptotik hücre oranı sırasıyla yaklaşık % 4, % 7, % 13 ve % 19 olarak belirlenmiştir. 30 dakika, 6 saat, 12 saat ve 24 saat 5-FU uygulaması sonunda, apoptotik hücre oranı sırasıyla yaklaşık % 3, % 8, % 17 ve % 22 olarak tespit edilmiştir. 30 dakika, 6 saat, 12 saat ve 24 saat GA ve 5-FU kombinasyon ilaç uygulaması sonunda, apoptotik hücre oranı sırasıyla yaklaşık % 10, % 18, % 38 ve % 46 olarak bulunmuştur.



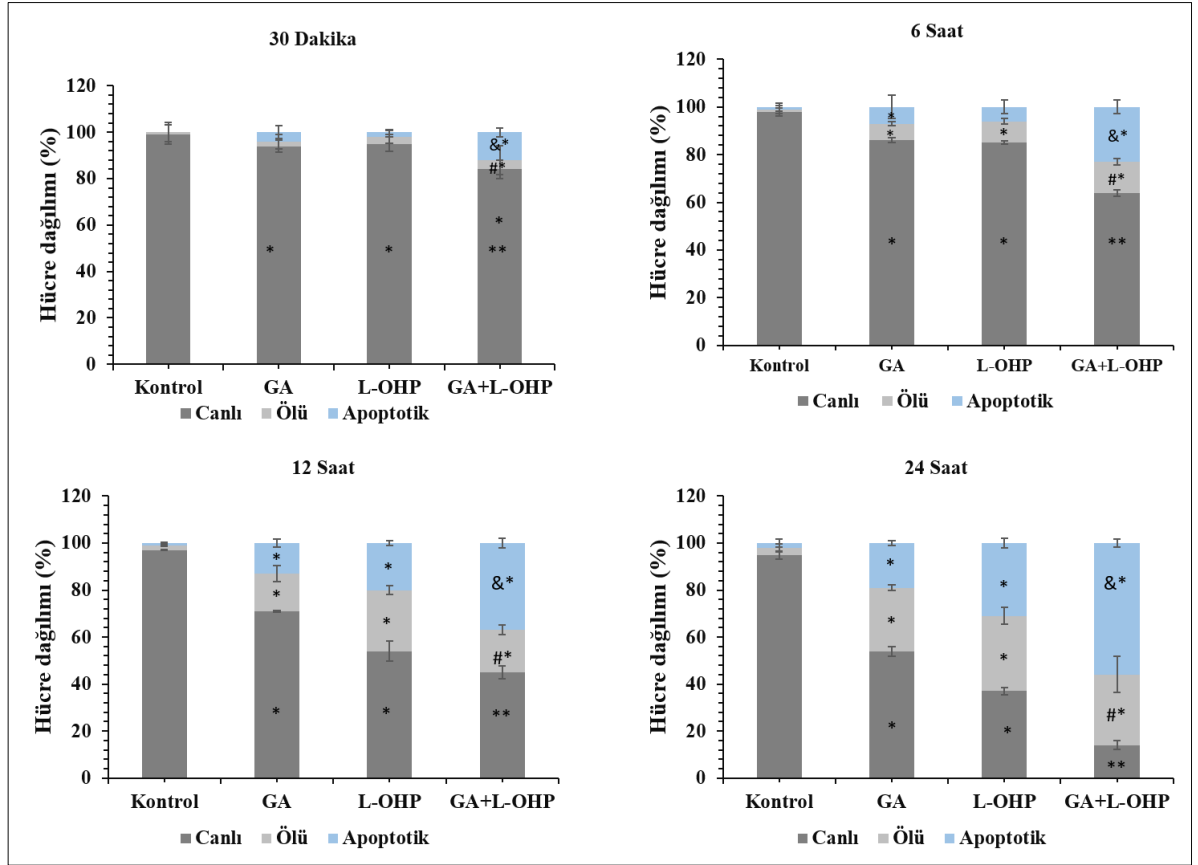
Şekil 4.16. GA ve 5-FU kombinasyonunun apoptoza etkisi. Değerler üç farklı deneyin \pm SE ortalamasıdır. *, kontrole göre, **, GA ve 5-FU grubuna göre, #, GA'ye göre, &, tüm gruplara göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonu ile maruziyeti sonunda tespit edilen ölü, canlı ve apoptotik hücre popülasyonun oranları Çizelge 4.15'de verilmiştir. GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonu zaman-bağımlı olarak HT-29 ölü hücre popülasyonunu ve sinerjistik olarak HT-29 apoptotik hücre oranını artırdığı bulunmuştur.

Çizelge 4.15. GA ve L-OHP kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine etkisinin TALİ görüntü-temelli sitometre ile incelenmesi. Değerler üç farklı deneyin \pm SE ortalamasıdır.

Hücre popülasyonu (%)	Deney grubu	30 Dakika	6 Saat	12 Saat	24 Saat
Ölü hücre oranı	Kontrol	1 \pm 4.23	1 \pm 1.68	2 \pm 0.25	3 \pm 1.68
	GA	2 \pm 3.18	7 \pm 0.81	16 \pm 3.55	27 \pm 1.33
	L-OHP	3 \pm 2.76	9 \pm 1.05	26 \pm 1.94	32 \pm 3.63
	GA+L-OHP	4 \pm 6.21	13 \pm 1.22	18 \pm 2.01	30 \pm 2.66
Canlı hücre oranı	Kontrol	99 \pm 4.23	98 \pm 1.68	97 \pm 0.25	95 \pm 1.68
	GA	94 \pm 2.56	86 \pm 0.97	71 \pm 0.28	54 \pm 2.03
	L-OHP	95 \pm 3.12	85 \pm 0.70	54 \pm 4.15	37 \pm 1.46
	GA+L-OHP	84 \pm 4.06	64 \pm 1.38	45 \pm 2.79	14 \pm 1.82
Apoptotik hücre oranı	Kontrol	0 \pm 4.23	1 \pm 1.68	1 \pm 0.25	2 \pm 1.68
	GA	4 \pm 2.69	7 \pm 4.90	13 \pm 1.69	19 \pm 1.02
	L-OHP	2 \pm 1.08	6 \pm 2.89	20 \pm 1.08	31 \pm 1.97
	GA+L-OHP	12 \pm 1.92	23 \pm 2.87	37 \pm 1.92	56 \pm 1.74

GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunun apoptoza etkisi, Şekil 4.17’de verilmiştir. 30 dakika, 6 saat, 12 saat ve 24 saat L-OHP uygulaması sonunda apoptotik hücre oranı sırasıyla yaklaşık % 2, % 6, % 20 ve % 31 olarak belirlenmiştir. 30 dakika, 6 saat, 12 saat ve 24 saat GA ve L-OHP kombinasyon ilaç uygulaması sonunda apoptotik hücre oranı sırasıyla yaklaşık % 12, % 23, % 37 ve % 56 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. GA ve L-OHP kombinasyonunun apoptoza etkisi. Değerler üç farklı deneyin \pm SE ortalamasıdır. *, kontrole göre, **, GA ve L-OHP grubuna göre, #, GA'ye göre, &, tüm gruplara göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

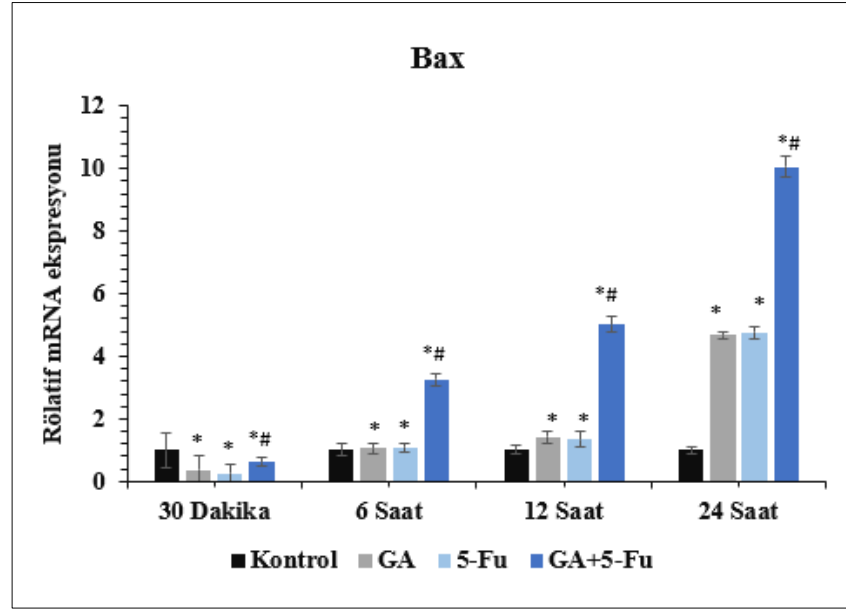
4.5. Sinerjistik İlaç Kombinasyonlarının Apoptoz Yolağında Yer Alan Genlerin mRNA İfade Düzeylerine Etkisi

GA ve 5-FU, GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonlarının apoptoz yolağında yer alan genlerin mRNA ifade düzeylerine etkisi RT-qPCR yöntemi ile incelenmiştir. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax, Bcl-2, Kaspaz-8 ve Bax/Bcl-2 oranına etkilerine ait rölatif kat artışları Çizelge 4.16'da verilmiştir. GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonu, kontrole göre zaman-bağımlı olarak Bax ve Kaspaz-8 mRNA ifade düzeyini artırmıştır. Bcl-2 protein ifadesinde kontrole göre zaman-bağımlı azalma meydana gelmiştir.

Çizelge 4.16. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax, Bcl-2, Kaspaz-8 ve Bax/Bcl-2 oranına etkilerine ait rölatif kat artışları. Değerler üç farklı deneyin \pm SE ortalamasıdır.

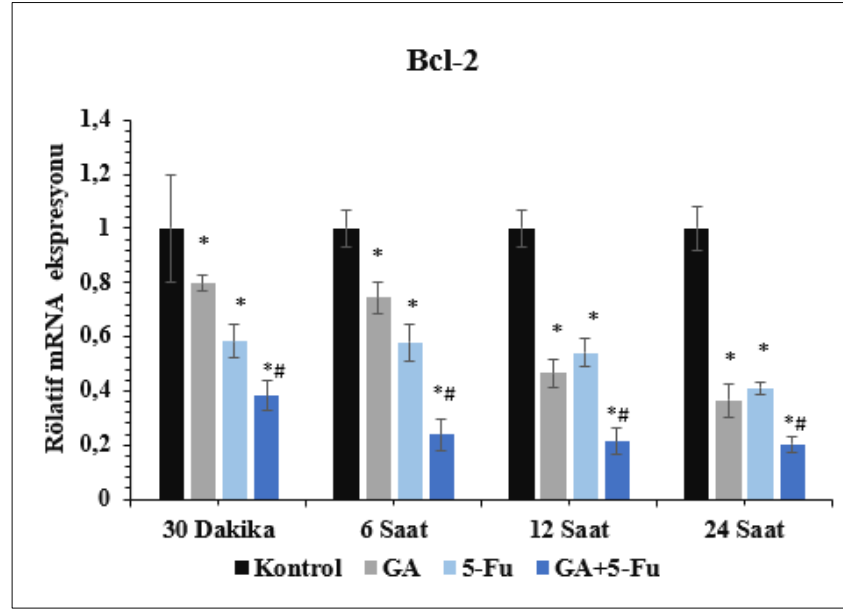
Gen	Deney grubu	30 Dakika	6 Saat	12 Saat	24 Saat
Bax	Kontrol	1 \pm 1.54	1 \pm 1.19	1 \pm 1.42	1 \pm 1.12
	GA	0.3616 \pm 1.48	1.0537 \pm 1.18	1.4224 \pm 1.18	4.6701 \pm 1.11
	5-FU	0.2402 \pm 1.32	1.0837 \pm 1.14	1.3440 \pm 1.24	4.7598 \pm 1.19
	GA+5-FU	0.6221 \pm 1.13	3.2506 \pm 1.17	5.0221 \pm 1.23	10.0651 \pm 1.35
Bcl-2	Kontrol	1 \pm 1.97	1 \pm 1.06	1 \pm 1.38	1 \pm 1.08
	GA	0.7971 \pm 1.03	0.7437 \pm 1.05	0.4650 \pm 1.03	0.3639 \pm 1.06
	5-FU	0.5827 \pm 1.106	0.5788 \pm 1.07	0.5419 \pm 1.05	0.4100 \pm 1.02
	GA+5-FU	0.3819 \pm 1.05	0.2389 \pm 1.06	0.2134 \pm 1.06	0.2015 \pm 1.03
Kaspaz-8	Kontrol	1 \pm 1.61	1 \pm 1.71	1 \pm 1.52	1 \pm 1.24
	GA	0.1368 \pm 1.56	1.1495 \pm 1.86	1.4114 \pm 1.53	3.9105 \pm 1.38
	5-FU	0.2541 \pm 1.06	1.4794 \pm 1.71	1.4191 \pm 1.35	3.5265 \pm 1.06
	GA+5-FU	0.5683 \pm 1.26	4.2506 \pm 1.03	4.3969 \pm 1.68	10.4974 \pm 2.00
Bax/Bcl-2 oranı	Kontrol	1 \pm 1.26	1 \pm 1.37	1 \pm 1.62	1 \pm 1.86
	GA	0.4537 \pm 2.31	1.4169 \pm 1.90	3.0590 \pm 1.73	12.8341 \pm 1.71
	5-FU	0.4121 \pm 1.53	1.8723 \pm 1.81	2.4800 \pm 1.42	11.6100 \pm 1.55
	GA+5-FU	1.6290 \pm 1.36	13.6090 \pm 1.36	23.5338 \pm 1.71	49.9486 \pm 1.03

GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunun Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8'in mRNA ifade düzeylerine etkisi, sırasıyla Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de verilmiştir. Bax mRNA ifadesi 30 dakika GA maruziyeti sonunda kontrole göre 0.3616 kat azalış ($p<0.05$) gösterirken, 30 dakika 5-FU maruziyeti sonucunda Bax mRNA ifadesinde kontrole göre 0.2402 kat azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole göre 0.6221 kat düşüş tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bax mRNA ifadesi 6 saat GA maruziyeti sonunda kontrole göre 1.0537 kat artış gösterirken ($p<0.05$), 6 saat 5-FU maruziyeti Bax mRNA ifadesinde kontrole göre 1.0837 kat artış göstermiştir ($p<0.05$). Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole göre 3.2506 kat artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Bax mRNA ifadesi 12 saat GA maruziyeti sonunda kontrole göre 1.4224 kat artış gösterirken ($p<0.05$), 12 saat 5-FU maruziyeti Bax mRNA ifadesinde kontrole göre 1.3440 kat artışa yol açmıştır ($p<0.05$). Kombinasyon ilaç uygulama grubunda ise, kontrole göre 5.0221 kat artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Bax mRNA ifadesi 24 saat GA maruziyeti sonunda kontrole göre 4.6701 kat artış gösterirken ($p<0.05$), 24 saat 5-FU maruziyeti Bax mRNA ifadesinde kontrole göre 4.7598 kat artış gerçekleşmiştir ($p<0.05$). Kombinasyon tedavisinde ise kontrole göre 10.0651 kat artış gözlenmiştir ($p<0.05$).



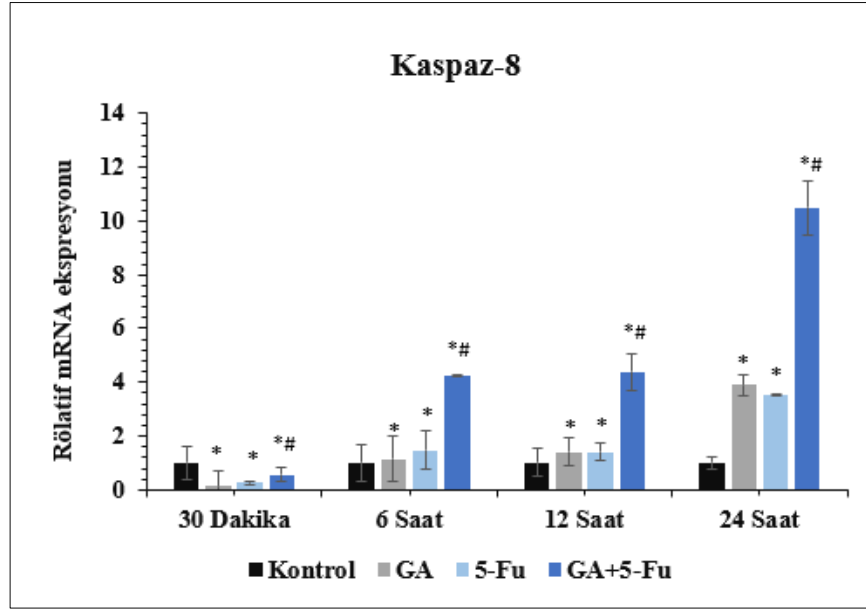
Şekil 4.18. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax mRNA ifade düzeyine etkisi. *, kontrole göre ve #, GA'ye göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

30 dakika GA maruziyeti sonunda Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.7971 kat düşüş gözlenirken ($p < 0.05$), 30 dakika 5-FU maruziyeti Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.5827 kat düşüş göstermiştir ($p < 0.05$). Kombinasyon tedavisinde ise kontrole göre 0.3819 kat düşüş gözlenmiştir ($p < 0.05$). Bcl-2 mRNA ifadesi 6 saat GA maruziyeti sonunda kontrole göre 0.7437 kat düşüş gösterirken ($p < 0.05$), 6 saat 5-FU maruziyeti Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.5788 kat azalma meydana gelmiştir. Kombinasyon tedavisinde ise kontrole göre 0.2389 kat düşüş gözlenmiştir. Bcl-2 mRNA ifadesi 12 saat GA maruziyeti sonunda kontrole göre 0.4650 kat düşüş gösterirken ($p < 0.05$), 12 saat 5-FU maruziyeti Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.5419 kat azalma meydana gelmiştir. Kombinasyon tedavisinde ise kontrole göre 0.2134 kat düşüş gözlenmiştir. Bcl-2 mRNA ifadesi 24 saat GA maruziyeti sonunda kontrole göre 0.3639 kat düşüş gösterirken ($p < 0.05$), 24 saat 5-FU maruziyeti Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.4100 kat düşüş göstermiştir ($p < 0.05$). Kombinasyon tedavisinde ise kontrole göre 0.2015 kat düşüş gözlenmiştir.



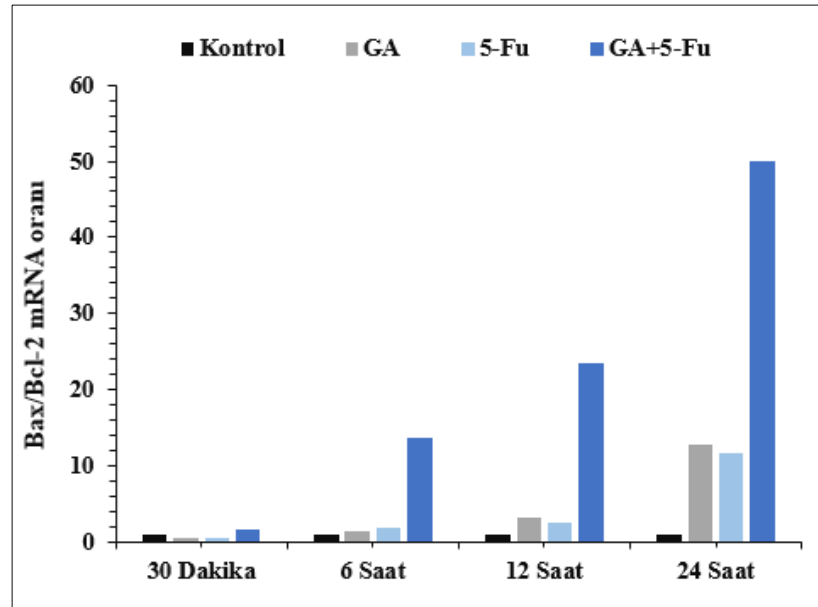
Şekil 4.19. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bcl-2 mRNA ifade düzeyine etkisi. *, kontrole göre ve #, GA'ye göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

Kaspaz-8 mRNA ifadesi 30 dakika GA maruziyeti sonunda kontrole göre 0.1368 kat düşüş gösterirken ($p < 0.05$), 30 dakika 5-FU maruziyeti Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.2541 kat azalmaya neden olmuştur ($p < 0.05$). Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole göre 0.5683 kat düşüş gözlenmiştir ($p < 0.05$). Kaspaz-8 mRNA ifadesi 6 saat GA maruziyeti sonunda kontrole göre 1.1495 kat artış gösterirken ($p < 0.05$), 6 saat 5-FU maruziyeti Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 1.4794 kat artışa yol açmıştır ($p < 0.05$). Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole göre 4.2506 kat artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). Kaspaz-8 mRNA ifadesi 12 saat GA maruziyeti sonunda kontrole göre 1.4114 kat artış gösterirken ($p < 0.05$), 12 saat 5-FU maruziyeti Kaspaz-8 mRNA ifadesini kontrole göre 1.4191 kat artırmıştır ($p < 0.05$). Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole göre 4.3969 kat artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). Kaspaz-8 mRNA ifadesi 24 saat GA maruziyeti sonunda kontrole göre 3.9105 kat artış gösterirken ($p < 0.05$), 24 saat 5-FU maruziyeti Kaspaz-8 mRNA ifadesini kontrole göre 3.5265 kat artırmıştır ($p < 0.05$). Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole göre 10.4974 kat artış gözlenmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.20. GA ve 5-FU kombinasyonunun Kaspaz-8 mRNA ifade düzeyine etkisi. *, kontrole göre ve #, GA'ye göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunun Bax/Bcl-2 mRNA oranına etkisi Şekil 4.21'de verilmiştir. 30 dakika, 6 saat, 12 saat ve 24 saat GA ve 5-FU kombinasyon ilaç uygulaması, kontrole göre Bax/Bcl-2 mRNA oranında sırasıyla 1.6290, 13.6090, 23.5338 ve 49.9486 kat artışa yol açmıştır.



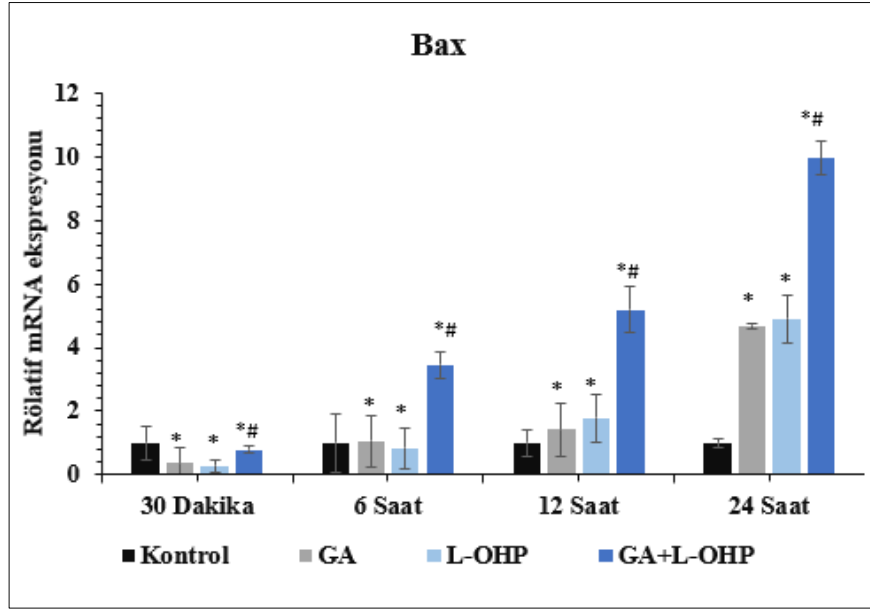
Şekil 4.21. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax/Bcl-2 mRNA oranına etkisi.

GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunun Bax, Bcl-2, Kaspaz-8 ve Bax/Bcl-2 oranına etkilerine ait rölatif kat artışları Çizelge 4.17’de verilmiştir. GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonu, kontrole göre zaman-bağımlı olarak Bax ve Kaspaz-8 mRNA ifade düzeyini artırmıştır. Bcl-2 protein ifadesinde kontrole göre zaman-bağımlı azalma meydana gelmiştir.

Çizelge 4.17. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax, Bcl-2, Kaspaz-8 ve Bax/Bcl-2 oranına etkilerine ait rölatif kat artışları. Değerler üç farklı deneyin \pm SE ortalamasıdır.

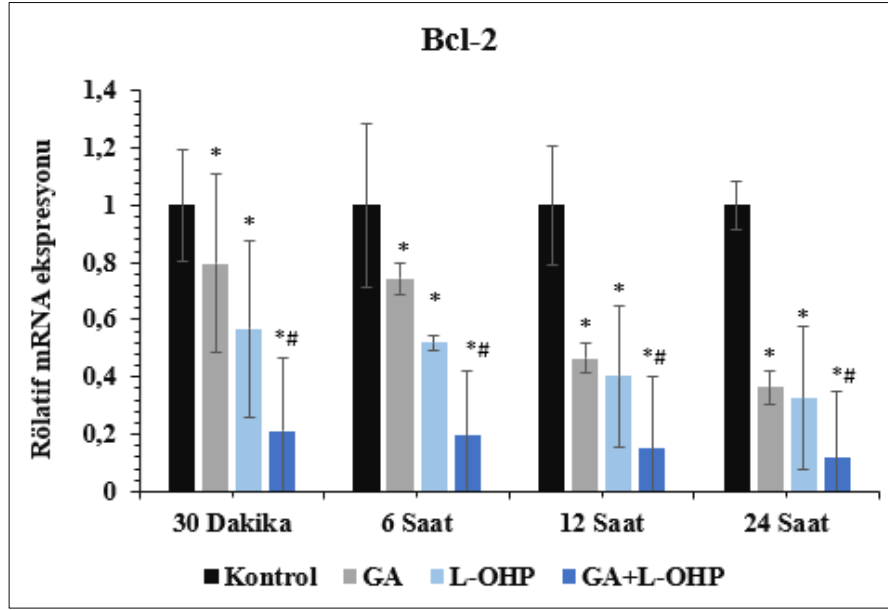
Gen	Deney grubu	30 Dakika	6 Saat	12 Saat	24 Saat
Bax	Kontrol	1 \pm 1.54	1 \pm 1.90	1 \pm 1.43	1 \pm 1.16
	GA	0.3616 \pm 1.48	1.0537 \pm 1.81	1.4224 \pm 1.84	4.6701 \pm 1.06
	L-OHP	0.2907 \pm 1.20	0.8324 \pm 1.62	1.7911 \pm 1.76	4.8970 \pm 1.75
	GA+L-OHP	0.7785 \pm 1.12	3.4567 \pm 1.42	5.1790 \pm 1.72	9.9523 \pm 1.51
Bcl-2	Kontrol	1 \pm 1.97	1 \pm 1.28	1 \pm 1.21	1 \pm 1.08
	GA	0.7971 \pm 1.31	0.7437 \pm 1.06	0.4650 \pm 1.05	0.3639 \pm 1.06
	L-OHP	0.5693 \pm 1.30	0.5206 \pm 1.03	0.4034 \pm 1.25	0.3258 \pm 1.25
	GA+L-OHP	0.2134 \pm 2.54	0.1958 \pm 1.23	0.1517 \pm 1.25	0.1164 \pm 1.23
Kaspaz-8	Kontrol	1 \pm 1.61	1 \pm 1.71	1 \pm 1.52	1 \pm 1.24
	GA	0.1368 \pm 1.56	1.1495 \pm 1.86	1.4114 \pm 1.53	3.9105 \pm 1.38
	L-OHP	0.3270 \pm 1.50	1.6757 \pm 1.55	1.4397 \pm 1.83	3.2139 \pm 1.48
	GA+L-OHP	0.6768 \pm 1.37	4.6920 \pm 1.90	4.6503 \pm 1.02	16.2958 \pm 1.42
Bax/Bcl-2 oranı	Kontrol	1 \pm 1.89	1 \pm 2.03	1 \pm 1.84	1 \pm 2.72
	GA	0.4537 \pm 1.68	1.4169 \pm 1.59	3.0590 \pm 2.35	12.8341 \pm 2.52
	L-OHP	0.5105 \pm 1.06	1.5989 \pm 1.63	4.4397 \pm 1.76	15.0295 \pm 1.53
	GA+L-OHP	3.6484 \pm 1.70	17.6551 \pm 1.43	34.1437 \pm 2.35	85.5294 \pm 1.35

GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunun Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8’in mRNA ifade düzeylerine etkisi, sırasıyla Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24’de verilmiştir. 30 dakika L-OHP maruziyeti Bax mRNA ifadesinde kontrole göre 0.2907 kat düşüş göstermiştir. Kombinasyon tedavisinde ise Bax mRNA ifadesinde kontrole göre 0.7785 kat düşüş gözlenmiştir. 6 saat L-OHP maruziyeti Bax mRNA ifadesinde kontrole göre 0.8324 kat düşüş göstermiştir. Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole göre 3.4567 kat artış gözlenmiştir. 12 saat L-OHP maruziyeti Bax mRNA ifadesinde kontrole göre 1.7911 kat artış göstermiştir. Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole göre 5.1790 kat artış gözlenmiştir. 24 saat L-OHP maruziyeti Bax mRNA ifadesinde kontrole göre 4.8970 kat artış göstermiştir. Kombinasyon tedavisinde ise, kontrole göre 9.9523 kat artış tespit edilmiştir ($p < 0.05$).



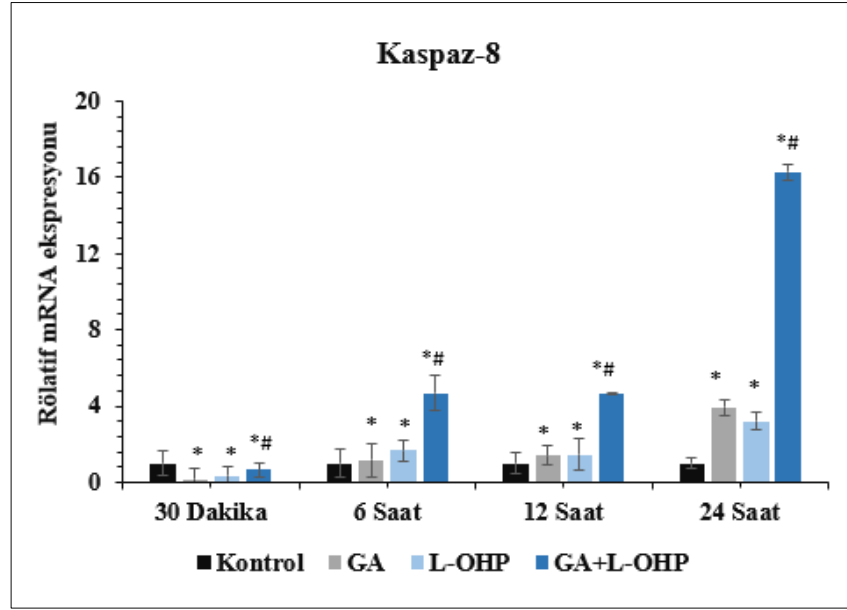
Şekil 4.22. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax mRNA ifade düzeyine etkisi. *, kontrole göre ve #, GA'ye göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

30 dakika L-OHP maruziyeti Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.5693 kat düşüş göstermiştir. Kombinasyon tedavisinde ise Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.2134 kat düşüş gözlenmiştir. 6 saat L-OHP maruziyeti Bcl-2 mRNA ifadesini kontrole göre 0.5206 kat düşürmüştür. Kombinasyon tedavisinde ise Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.1958 kat düşüş gözlenmiştir. 12 saat L-OHP maruziyeti Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.4034 kat düşüş göstermiştir. Kombinasyon tedavisinde ise Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.1517 kat düşüş gözlenmiştir. 24 saat L-OHP maruziyeti Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.3258 kat düşüşe neden olmuştur. Kombinasyon tedavisinde ise Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.1164 kat düşüş gözlenmiştir ($p < 0.05$).



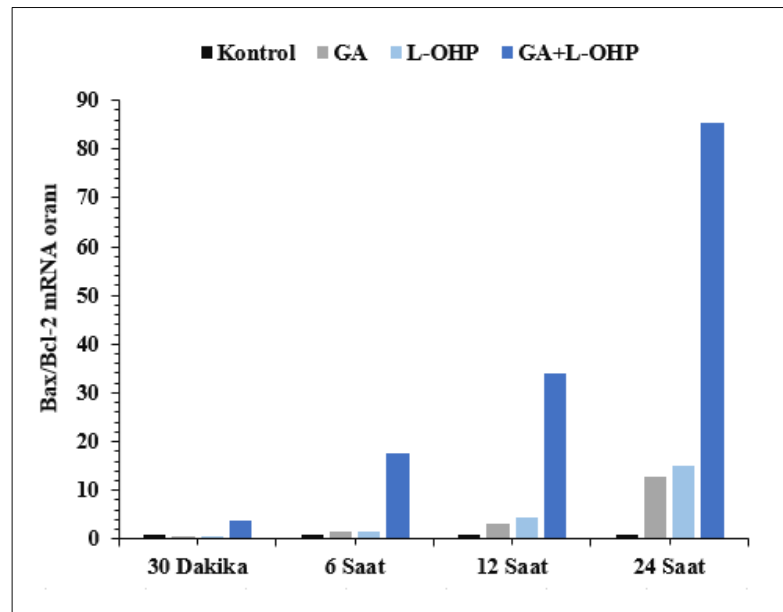
Şekil 4.23. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bcl-2 mRNA ifade düzeyine etkisi. *, kontrole göre ve #, GA'ye göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

30 dakika L-OHP maruziyeti sonucunda Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.3270 kat düşüş gözlenmiştir. Kombinasyon tedavisinde ise Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 0.6768 kat düşüş gerçekleşmiştir. 6 saat L-OHP maruziyeti, Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 1.6757 kat artışa yol açmıştır. Kombinasyon tedavisinde ise Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 4.6920 kat artış gözlenmiştir. 12 saat L-OHP maruziyeti Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 1.4397 kat artış göstermiştir. Kombinasyon tedavisinde ise Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 4.6503 kat artış gözlenmiştir. 24 saat L-OHP maruziyeti Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 3.2139 kat artışa neden olmuştur. Kombinasyon tedavisinde ise Kaspaz-8 mRNA ifadesinde kontrole göre 16.2958 kat artış gözlenmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.24. GA ve L-OHP kombinasyonunun Kaspaz-8 mRNA ifade düzeyine etkisi. *, kontrole göre ve #, GA'ye göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

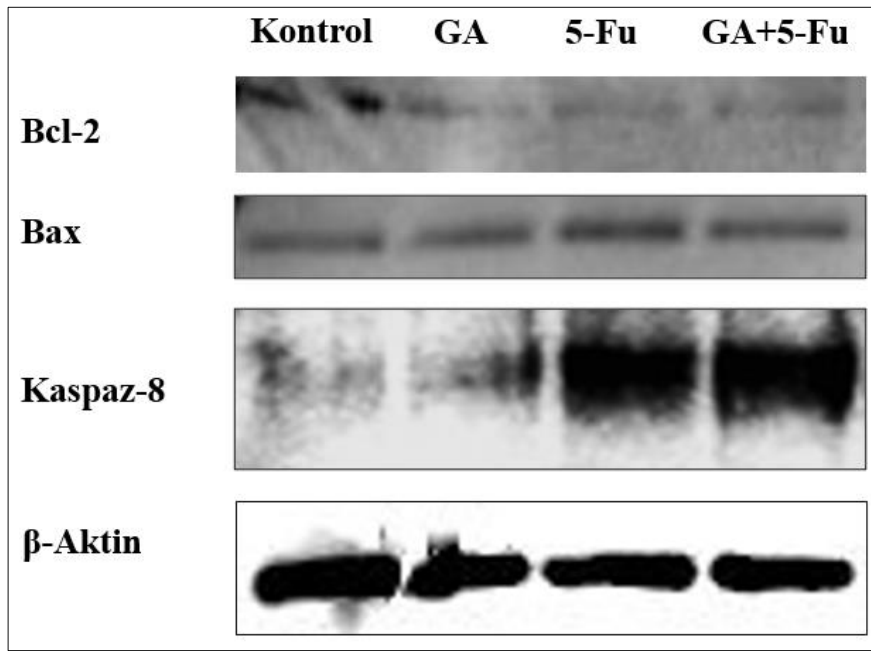
GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonunun Bax/Bcl-2 mRNA oranına etkisi Şekil 4.25'de verilmiştir. 30 dakika, 6 saat, 12 saat ve 24 saat GA ve L-OHP kombinasyon ilaç uygulaması, kontrole göre Bax/Bcl-2 mRNA oranında sırasıyla 3.6484, 17.6551, 34.1438 ve 85.5294 kat artışa yol açmıştır.



Şekil 4.25. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax/Bcl-2 mRNA oranına etkisi.

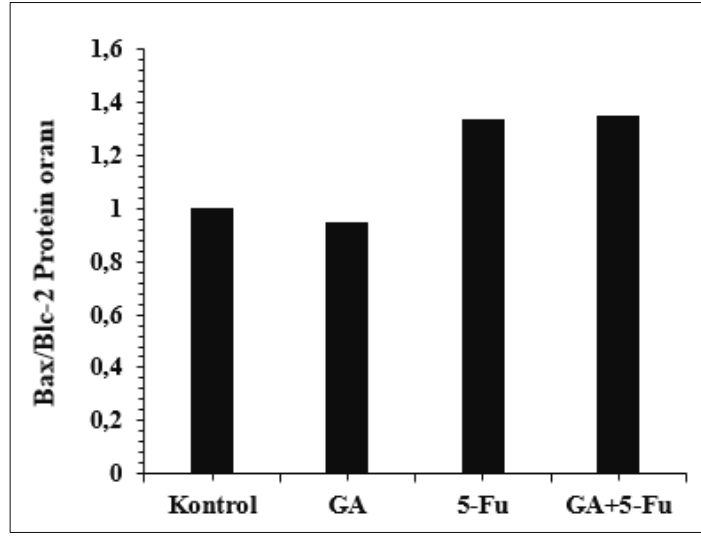
4.6. Sinerjistik İlaç Kombinasyonlarının Apoptoz Yolağında Yer Alan Genlerin Protein İfade Düzeylerine Etkisi

GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunun Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8 protein ifade düzeylerine olan etkisi, sırasıyla Şekil 4.26'da verilmiştir. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonuna maruziyeti sonucunda, Bcl-2 protein ifade düzeyinin azaldığı, Bax ifade düzeyinde değişiklik meydana gelmediği ve Kaspaz-8 protein ifadesinde önemli miktarda artış meydana geldiği bulunmuştur.



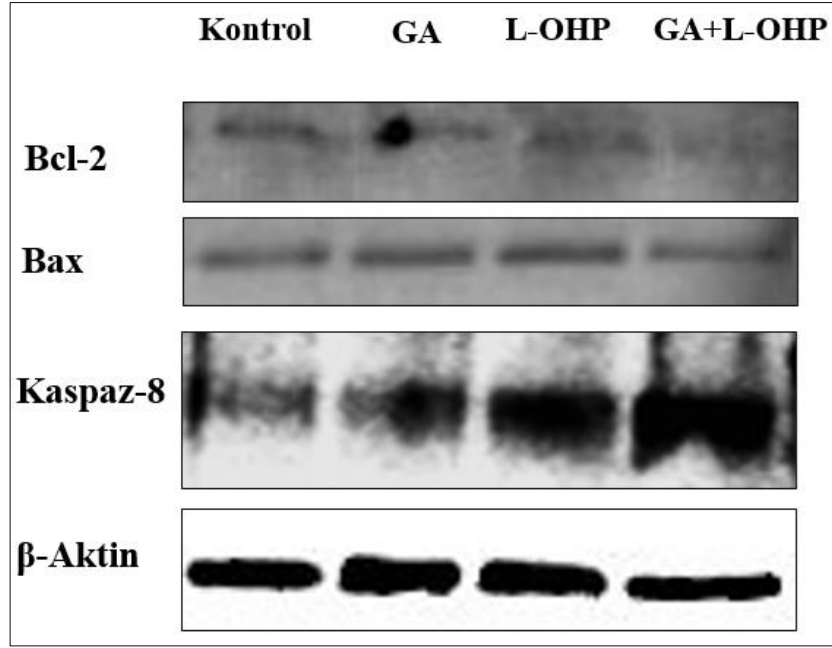
Şekil 4.26. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8 protein ifade düzeyine etkileri. Protein ifade düzeylerindeki değişimler, Western blotlama yöntemi ile belirlendi.

GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunun Bax/Bcl-2 protein oranına etkisi Şekil 4.27'de verilmiştir. GA ve 5-FU kombinasyon ilaç uygulaması, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde kontrole göre Bax/Bcl-2 mRNA oranında 1.3498 artışa yol açmıştır.



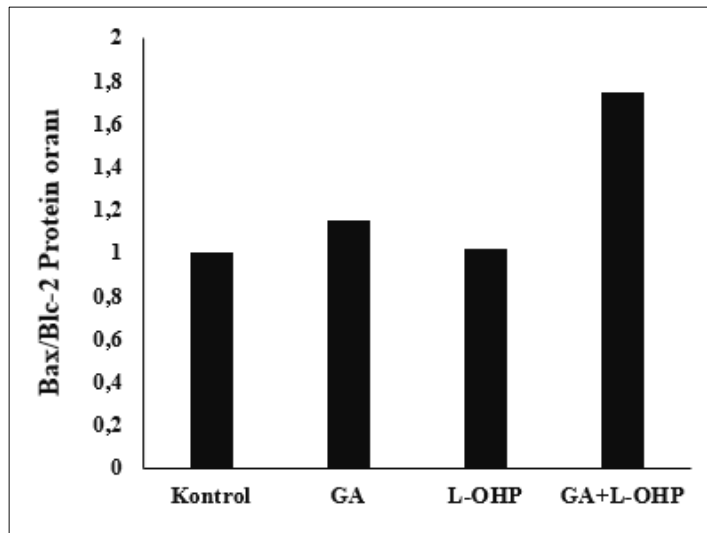
Şekil 4.27. GA ve 5-FU kombinasyonunun Bax/Bcl-2 protein oranına etkisi. Protein ifade düzeylerindeki değişimler, Western blotlama yöntemi ile belirlendi.

GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunun Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8 protein ifade düzeylerine etkisi, Şekil 4.28’de verilmiştir. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonuna maruziyeti sonucunda Bcl-2 protein ifadesinin azaldığı, Bax ifade düzeyinde değişiklik meydana gelmediği ve Kaspaz-8 protein ifade seviyesinde önemli oranda artış meydana geldiği bulunmuştur.



Şekil 4.28. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8 protein ifade düzeyine etkileri. Protein ifade düzeylerindeki değişimler, Western blotlama yöntemi ile belirlendi.

GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunun Bax/Bcl-2 protein oranına etkisi Şekil 4.29'da verilmiştir. GA ve L-OHP kombinasyon ilaç uygulaması, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde kontrole göre Bax/Bcl-2 mRNA oranında 1.7468 artışa yol açmıştır.



Şekil 4.29. GA ve L-OHP kombinasyonunun Bax/Bcl-2 protein oranına etkisi. Protein ifade düzeylerindeki değişimler, Western blotlama yöntemi ile belirlendi.

4.7. Sinerjistik İlaç Kombinasyonlarının Nanolipozomal Formülasyonları

4.7.1. Nanolipozomal Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

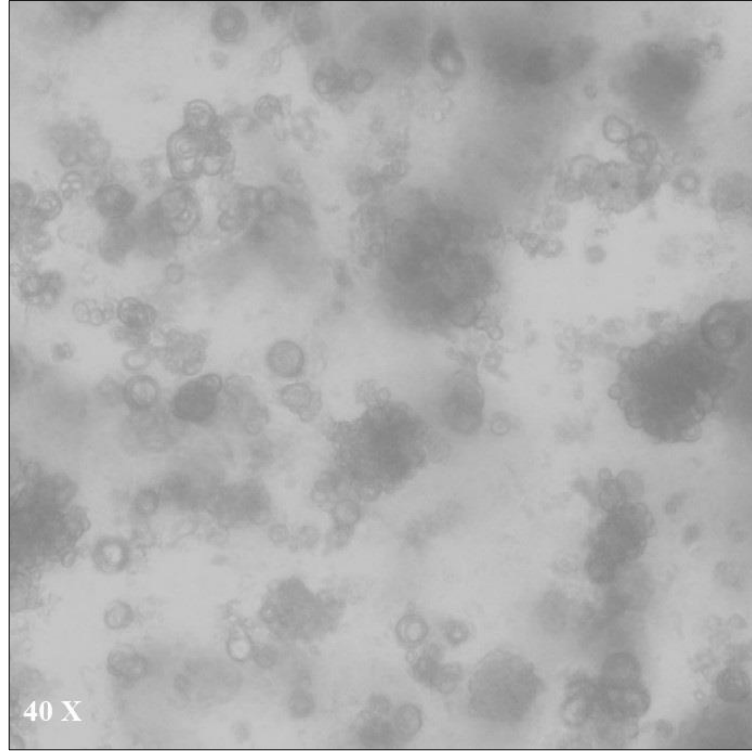
DPPC:CH (70:30) formülasyonlarında, DPPC:CH (60:40) formülasyonlarına kıyasla, daha yüksek yükleme verimi elde edilmiştir (Çizelge 4.18). Nanolipozomal formülasyonların karakterizasyonu için DPPC:CH (70:30) formülasyonları hazırlanmış ve sonraki çalışmalarda bu formülasyonlar kullanılmıştır.

Çizelge 4.18. Nanolipozomal ilaç formülasyonlarının yükleme verimleri.

Formülasyon	Yükleme verimi (% , ±S.E)
DPPC:CH@GA (70:30)	34 ± 2.5
DPPC:CH@5-FU (70:30)	30 ± 2.6
DPPC:CH@L-OHP (70:30)	32 ± 4.7
DPPC:CH@GA (60:40)	27 ± 1.8
DPPC:CH@5-FU (60:40)	24 ± 2.9
DPPC:CH@L-OHP (60:40)	26 ± 3.9

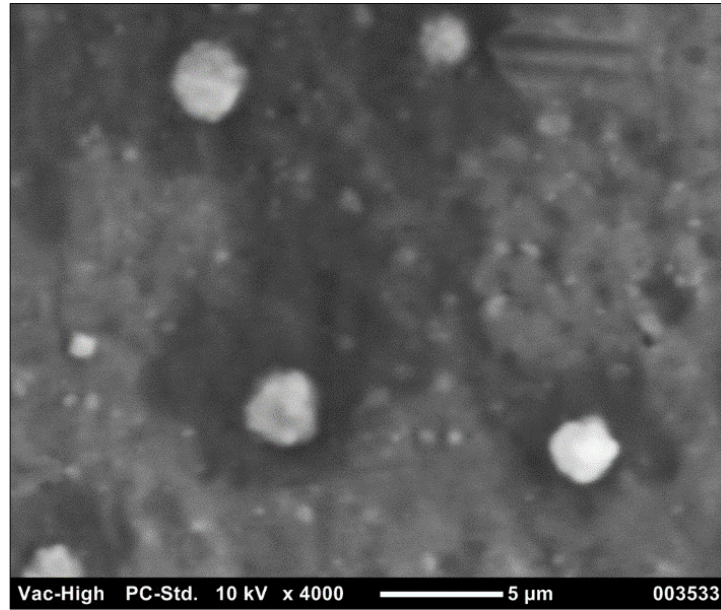
4.7.2. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının Morfolojisinin İncelenmesi

Nanolipozomal formülasyonların morfolojik yapıları faz kontrast invert mikroskop ve SEM ile belirlenmiştir. Boş DPPC:CH, DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomal formülasyonların morfolojisi faz kontrast invert mikroskop ile gözlenmiştir. Boş DPPC:CH nanolipozomların faz kontrast invert mikroskop görüntüleri Şekil 4.30'da verilmiştir. Hazırlanan DPPC:CH nanolipozomal formülasyonların küresel morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir.



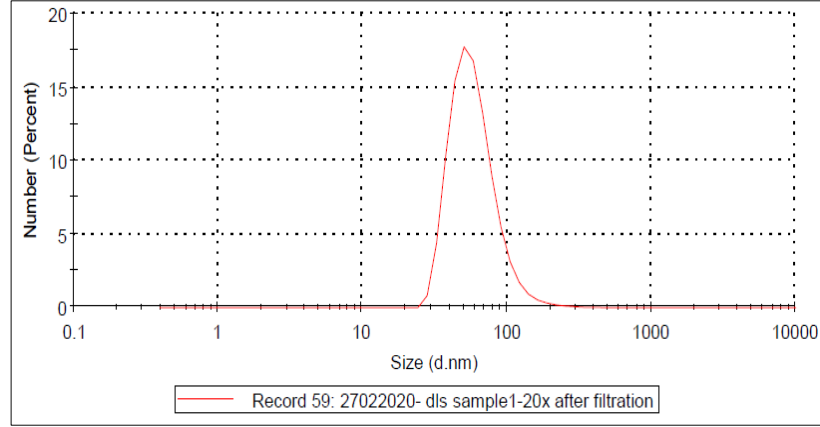
Şekil 4.30. Boş DPPC:CH nanolipozomların faz kontrast invert mikroskop görüntüsü.

Boş lipozomların SEM görüntüsü Şekil 4.31’de verilmiştir. 4000 büyütmede çekilen görüntüler, nanolipozomal formülasyonların monodispers ve küresel morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir.



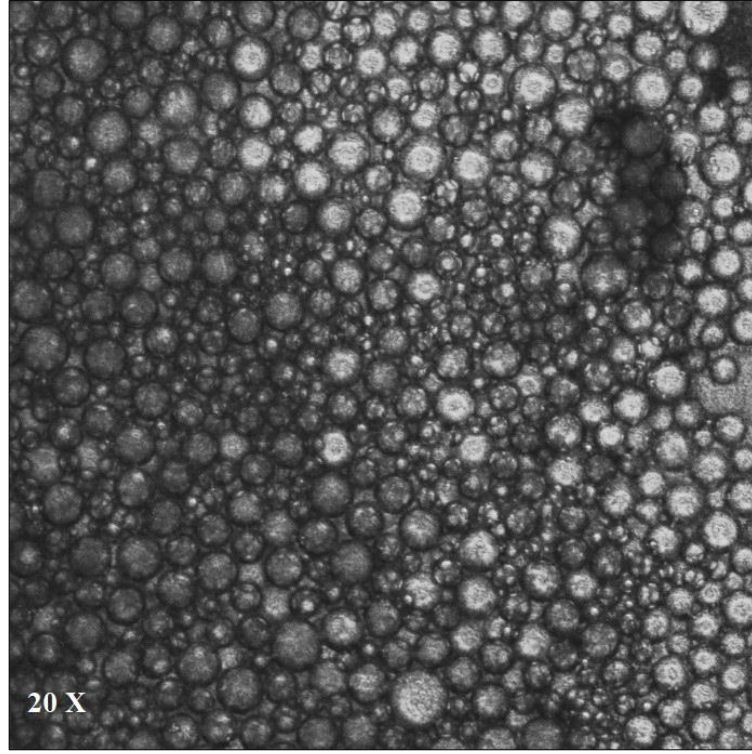
Şekil 4.31. Boş DPPC:CH nanolipozomların SEM görüntüsü.

Boş lipozomların boyut dağılımı Şekil 4.32’de verilmiştir. Boyut dağılım grafiği, lipozomal formülasyonların boyutunun 139.1 nm (nano-ölçekli) olduğunu ortaya koymuştur.



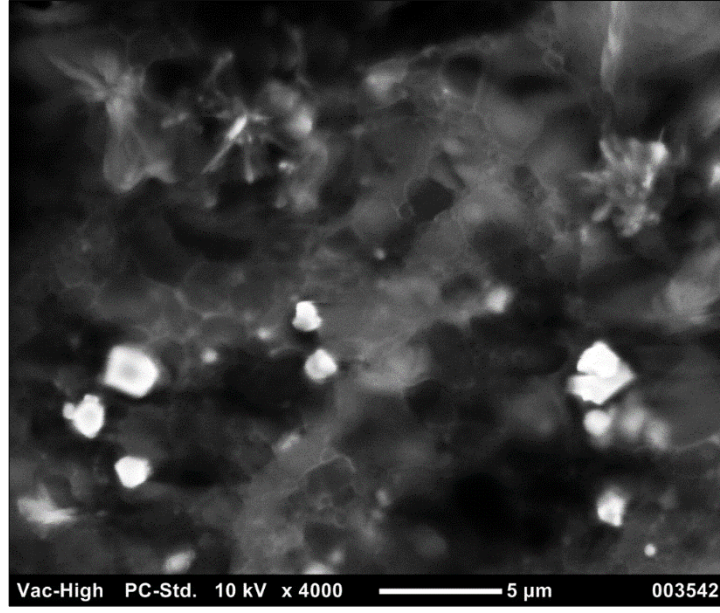
Şekil 4.32. Boş DPPC:CH nanolipozomların boyut dağılımı.

DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların faz kontrast invert mikroskop görüntüsü Şekil 4.33’de verilmiştir. 20X büyütmede çekilen görüntüler, DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların küresel morfolojiye sahip ve monodispers olduğunu göstermiştir.



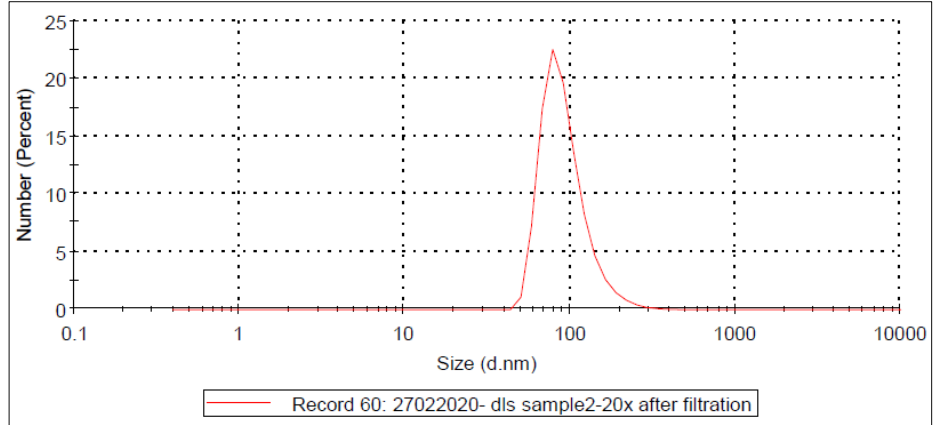
Şekil 4.33. DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların faz kontrast invert mikroskop görüntüsü.

DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların, SEM görüntüsü Şekil 4.34'de verilmiştir. 4000 büyütmede çekilen görüntüler, nanolipozomal formülasyonların monodispers ve küresel morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir.



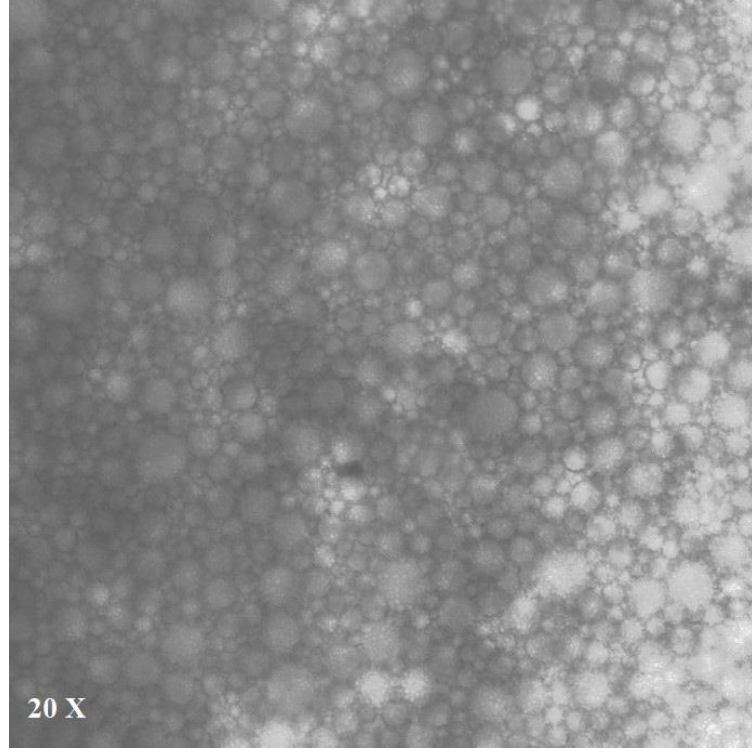
Şekil 4.34. DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların SEM görüntüsü.

DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların boyut dağılımı Şekil 4.35’de verilmiştir. Boyut dağılım grafiği, DPPC:CH@GA+5-FU lipozomal formülasyonların boyutunun 147.6 nm (nano-ölçekte) olduğunu göstermektedir.



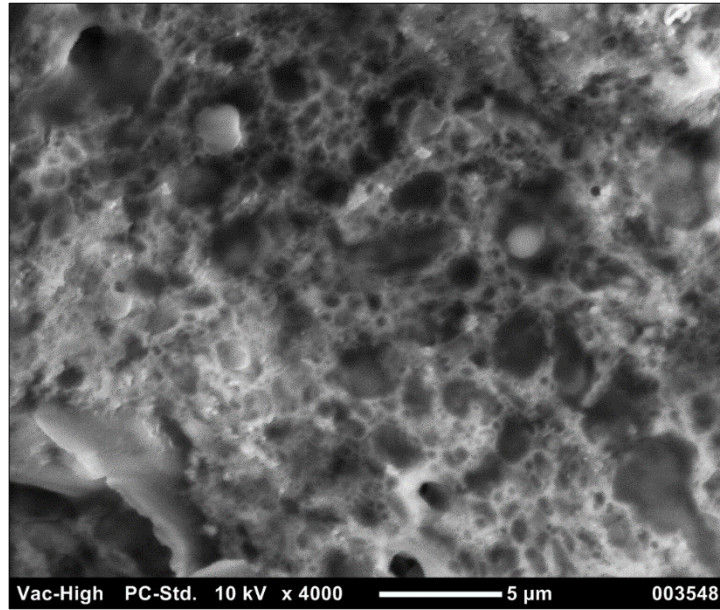
Şekil 4.35. DPPC:CH@GA+5-FU nanolipozomların boyut dağılımı.

DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların invert mikroskop görüntüleri Şekil 4.36’da verilmiştir. 20X büyütmede çekilen görüntüler, DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların küresel morfolojiye sahip ve monodispers olduğunu göstermiştir.



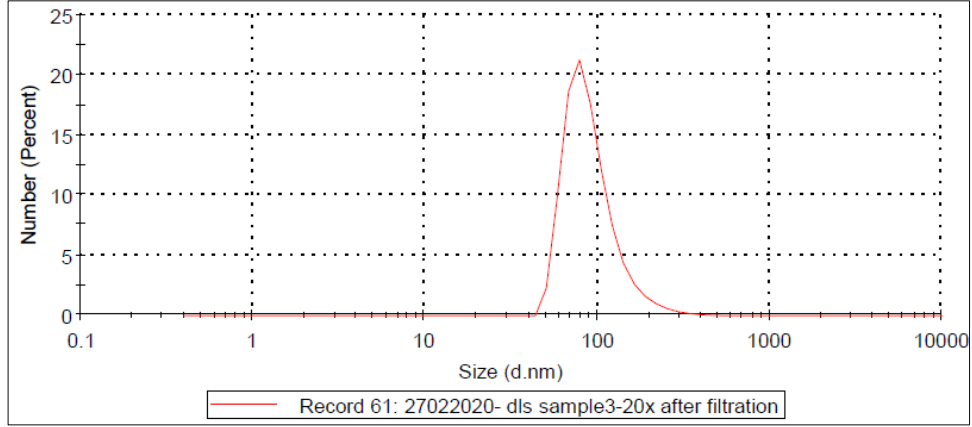
Şekil 4.36. DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların faz kontrast invert mikroskop görüntüsü.

DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların, SEM görüntüsü Şekil 4.37’de verilmiştir. 4000 büyütmede çekilen görüntüler, nanolipozomal formülasyonların monodispers ve küresel morfolojiye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.37. DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların SEM görüntüsü.

DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların boyut dağılımı Şekil 4.38’de verilmiştir. Boyut dağılım grafiği, DPPC:CH@GA+L-OHP lipozomal formülasyonların boyutunun 157.1 nm (nano-ölçekte) olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.38. DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomların boyut dağılımı.

4.7.3. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının Boyut, Zeta Potansiyeli ve PDI Değerleri

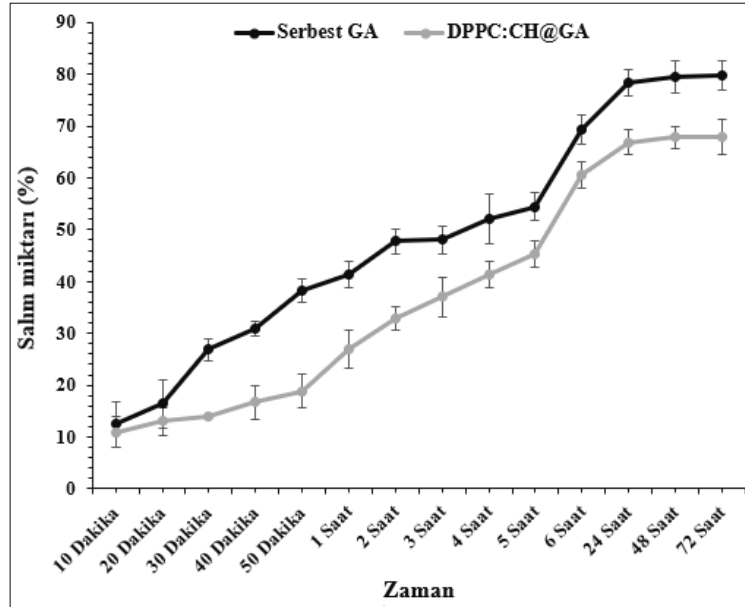
Nanolipozomal formülasyonların boyut, zeta potansiyeli ve PDI değerleri zeta ölçer ile belirlenmiştir. Sonuçlar, Çizelge 4.19’da verilmiştir. DPPC:CH, DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomal formülasyonlarının boyutu sırasıyla, 139.1 nm, 147.6 nm ve 157.1 nm olarak ölçülmüştür. DPPC:CH, DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP lipozomal nanoterapötik formülasyonlarının zeta potansiyelleri sırasıyla, -6.39 mV, -5.07 mV ve -5.59 mV olarak ölçülmüştür. DPPC:CH, DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomal formülasyonların PDI değerleri sırasıyla, 0.256, 0.196 ve 0.186 olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.19. Nanolipozomal formülasyonların boyut, zeta potansiyeli ve PDI değeri.

Formülasyon	Boyut (nm)	Zeta potansiyeli (mV)	PDI
DPPC:CH	139.1	-6.39	0.256
DPPC:CH@GA+5-FU	147.6	-5.07	0.196
DPPC:CH@GA+L-OHP	157.1	-5.59	0.186

4.7.4. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının İlaç Salım Profilleri

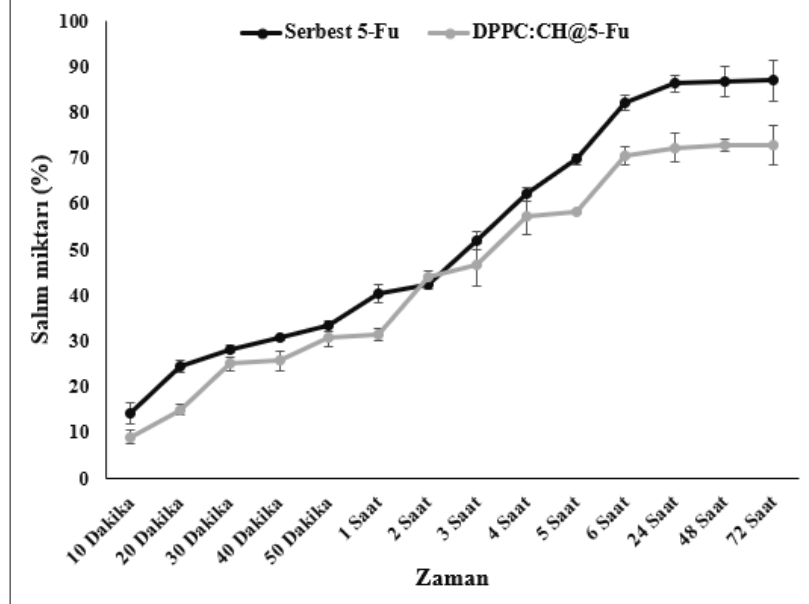
Çalışmamızda, nanolipozomal ilaç formülasyonlarının (DPPC:CH@GA, DPPC:CH@5-FU ve DPPC:CH@L-OHP) ve serbest ilaçların (GA, 5-FU ve L-OHP) *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları, Şekil 4.39, Şekil 4.40 ve Şekil 4.41’de verilmiştir. DPPC:CH@GA formülasyonundan 6 saatte yaklaşık % 60.55±2.54, 24 saatte yaklaşık % 66.83±2.44, 72 saatte ise yaklaşık % 67.80±3.34 oranında GA salımı gerçekleşmiştir. Aynı koşullarda 6 saatte yaklaşık % 69.27±2.86, 24 saatte yaklaşık % 78.25±2.60, 72 saatte ise yaklaşık % 79.76±2.71 oranında serbest GA salımı gerçekleşmiştir.



Şekil 4.39. GA ve nanolipozomal GA’in salım profili.

Değerler üç farklı deneyin \pm SE ortalamasıdır.

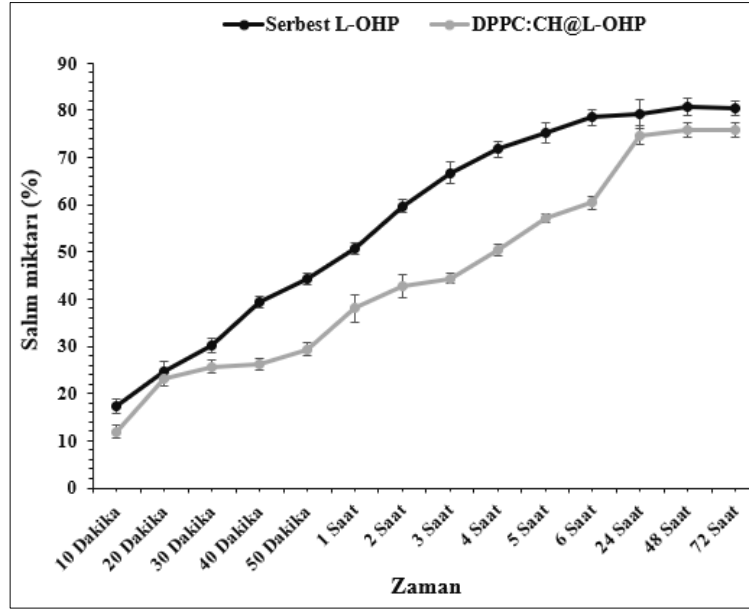
DPPC:CH@5-FU formülasyonundan 6 saatte yaklaşık % 70.55±2.02, 24 saatte yaklaşık % 72.25±3.06, 72 saatte ise yaklaşık % 72.80±4.21 5-FU salımı gerçekleşmiştir. Aynı koşullarda 6 saatte yaklaşık % 82.05±1.76, 24 saatte yaklaşık % 86.36±1.83, 72 saatte ise yaklaşık % 86.96±4.42 oranında serbest 5-FU salımı gerçekleşmiştir.



Şekil 4.40. 5-FU ve nanolipozomal 5-FU'in salım profili.

Değerler üç farklı deneyin ± SE ortalamasıdır.

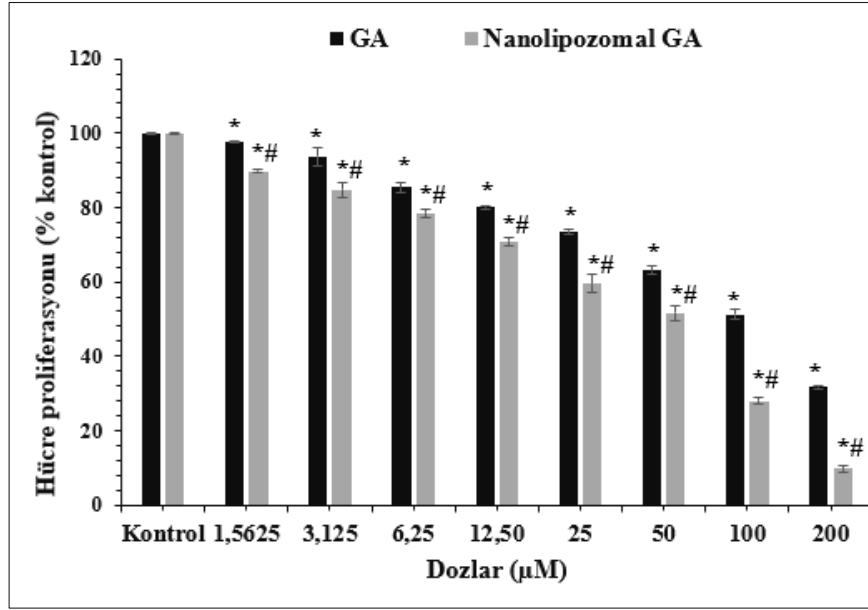
DPPC:CH@L-OHP formülasyonundan 6 saatte yaklaşık % 60.39±1.38, 24 saatte yaklaşık % 74.75±1.96, 72 saatte ise yaklaşık % 75.85±1.53 oranında L-OHP salımı gerçekleşmiştir. Aynı koşullarda 6 saatte yaklaşık % 78.54±1.64, 24 saatte yaklaşık % 79.23±2.96, 72 saatte ise yaklaşık % 80.57±1.55 oranında serbest L-OHP salımı gerçekleşmiştir.



Şekil 4.41. L-OHP ve nanolipozomal L-OHP'in salım profili.
Değerler üç farklı deneyin \pm SE ortalamasıdır.

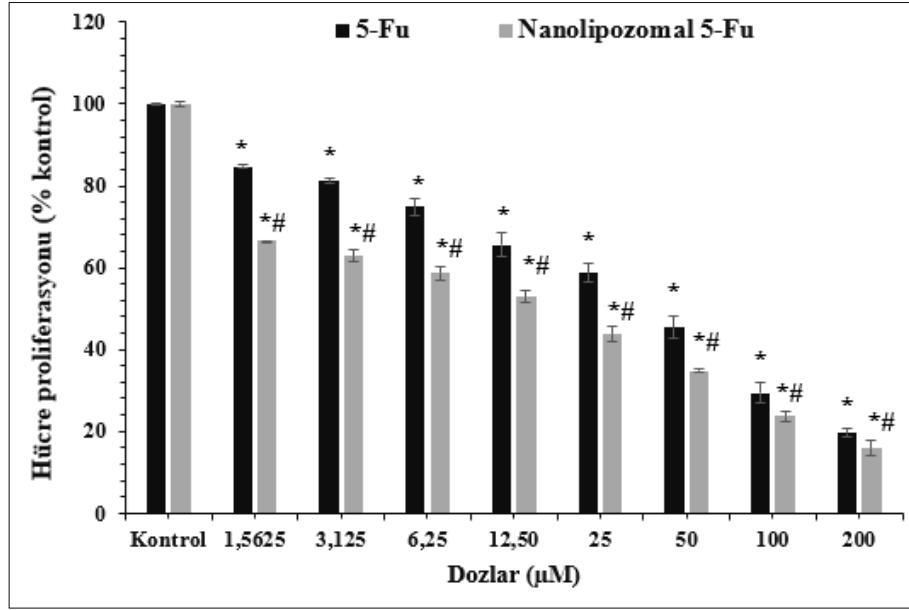
4.7.5. Nanolipozomal İlaç Formülasyonlarının HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Proliferasyonuna Etkileri

DPPC:CH@GA, DPPC:CH@5-FU, DPPC:CH@L-OHP, DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomal formülasyonların, serbest ilaç ve/veya ilaç kombinasyonlarına kıyasla, *in vitro* antiproliferatif etkinliği MTT hücre proliferasyon analizi ile incelenmiştir. Şekil 4.42'de serbest GA ve DPPC:CH@GA'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna olan etkisi verilmiştir. 1.563-200 μ M doz aralığında DPPC:CH@GA'in serbest GA'den daha fazla HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu baskıladığı bulunmuştur ($p < 0.05$). 1.563-200 μ M serbest GA maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 97.83 \pm 0.11; % 93.74 \pm 2.54; % 85.38 \pm 1.26; % 80.01 \pm 0.48; % 73.65 \pm 0.70; % 63.18 \pm 1.13; % 51.29 \pm 1.24 ve % 31.67 \pm 1.24 olarak bulunmuştur. 1.563-200 μ M DPPC:CH@GA maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 89.73 \pm 0.35; % 84.78 \pm 1.94; % 78.48 \pm 1.25; % 70.95 \pm 1.06; % 59.58 \pm 4.27; % 51.54 \pm 2.20; % 27.87 \pm 0.87 ve % 9.73 \pm 0.87 olarak bulunmuştur.



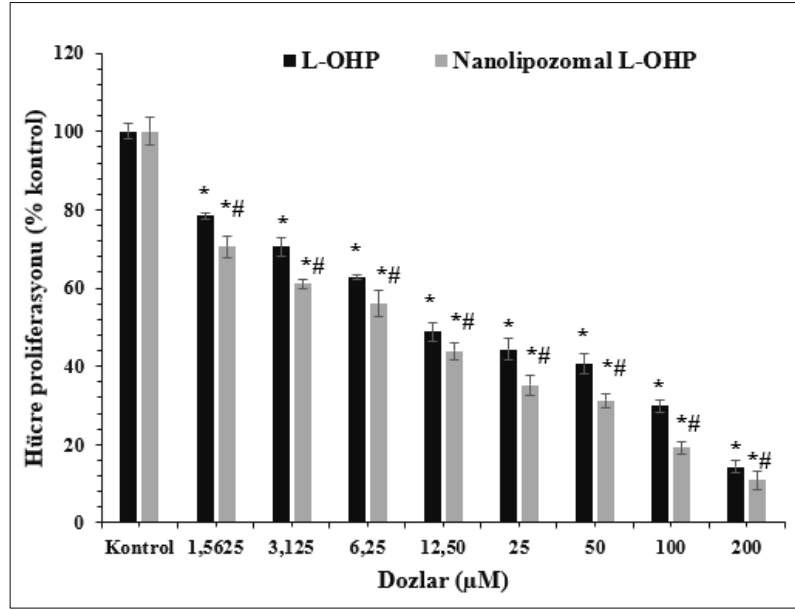
Şekil 4.42. Serbest GA ve nanolipozomal GA'nın HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi. *, kontrole göre ve #, GA'ye göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.43'de 5-FU ve DPPC:CH@5-FU'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna olan etkisi verilmiştir. 1.563-200 µM doz aralığında DPPC:CH@5-FU'in, serbest 5-FU'e kıyasla, HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu daha fazla baskıladığı bulunmuştur ($p < 0.05$). 1.563-200 µM serbest 5-FU maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 84.76±0.55; % 81.22±0.59; % 74.95±2.12; % 65.53±2.93; % 58.71±4.38; % 45.37±4.64; % 35.21±4.64 ve % 24.89±4.56 olarak bulunmuştur. 1.563-200 µM DPPC:CH@5-FU maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 66.49±0.11; % 62.91±1.53; % 58.65±1.65; % 52.91±1.54; % 43.80±1.90; % 34.76±0.43; % 23.71±1.36 ve % 15.92±1.92 olarak bulunmuştur.



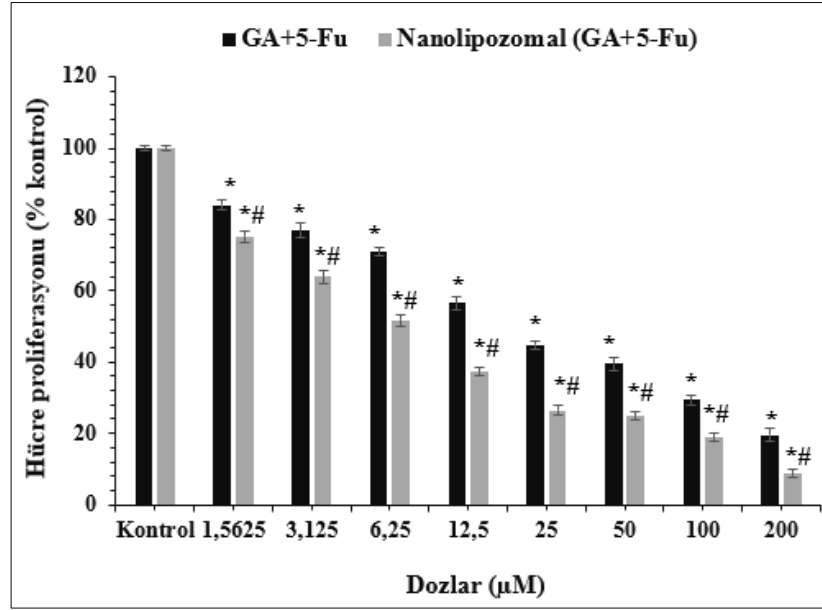
Şekil 4.43. Serbest 5-FU ve nanolipozomal 5-FU'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi. *, kontrole göre ve #, 5-FU'e göre istatiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.44'de serbest L-OHP ve DPPC:CH@L-OHP'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna olan etkisi verilmiştir. 1.563-200 µM doz aralığında DPPC:CH@L-OHP'in, serbest L-OHP'e kıyasla, HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu daha fazla baskıladığı bulunmuştur ($p < 0.05$). 1.563-200 µM serbest L-OHP maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 78.52 ± 0.75 ; % 70.50 ± 2.35 ; % 62.78 ± 0.76 ; % 48.88 ± 2.35 ; % 44.41 ± 2.72 ; % 40.61 ± 2.52 ; % 29.87 ± 1.53 ve % 14.32 ± 1.53 olarak bulunmuştur. 1.563-200 µM DPPC:CH@L-OHP maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 70.54 ± 5.88 ; % 61.10 ± 4.23 ; % 56.06 ± 3.26 ; % 43.94 ± 5.20 ; % 35.23 ± 5.64 ; % 31.27 ± 4.84 ; % 19.23 ± 3.50 ve % 10.90 ± 2.43 olarak bulunmuştur.



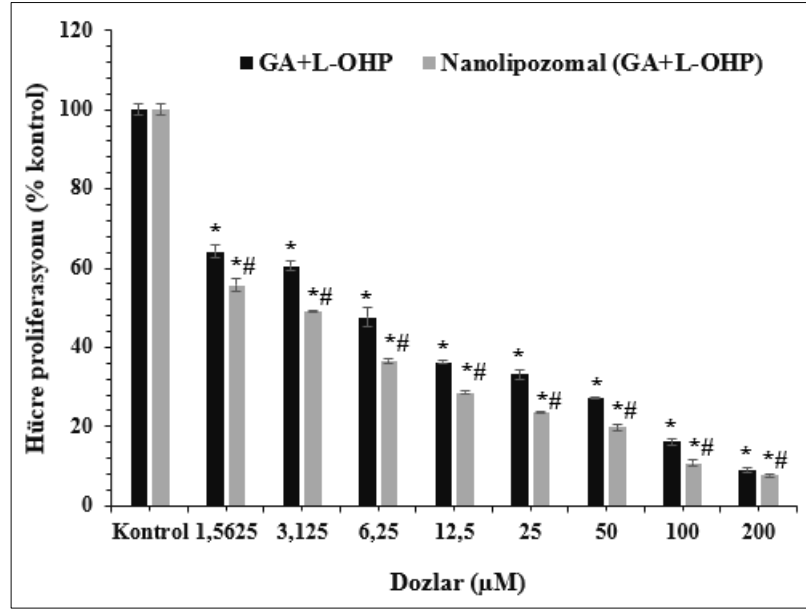
Şekil 4.44. Serbest L-OHP ve nanolipozomal L-OHP'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi. *, kontrole göre ve #, L-OHP'e göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.45'de serbest GA ve 5-FU kombinasyonunun ve DPPC:CH@GA+5-FU'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi verilmiştir. 1.563-200 µM doz aralığında DPPC:CH@GA+5-FU'in, serbest GA ve 5-FU kombinasyonuna kıyasla, daha fazla HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu baskıladığı bulunmuştur ($p < 0.05$). 1.563-200 µM serbest GA ve 5-FU kombinasyon ilaç maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 83.94±1.42; % 76.96±2.07; % 70.86±1.22; % 56.47±1.71; % 44.75±1.33; % 39.47±1.71; % 29.34±1.27 ve % 19.55±1.88 olarak bulunmuştur. 1.563-200 µM DPPC:CH@GA+5-FU maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 75.29±1.67; % 63.97±1.87; % 51.64±1.58; % 37.24±1.24; % 26.32±1.37; % 24.90±1.31; % 18.84±1.14 ve % 8.70±1.04 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.45. Serbest GA ve 5-FU kombinasyonu ve nanolipozomal GA ve 5-FU kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi. *, kontrole göre ve #, GA ve 5-FU kombinasyonuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

Şekil 4.46’da serbest GA ve L-OHP kombinasyonunun ve DPPC:CH@GA+L-OHP’in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkisi verilmiştir. 1.563-200 µM doz aralığında nanolipozomal GA ve L-OHP’in serbest GA ve L-OHP kombinasyonundan daha fazla HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu baskıladığı bulunmuştur ($p < 0.05$). 1.563-200 µM serbest GA ve L-OHP kombinasyon ilaç maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 64.20±1.73; % 60.53±1.30; % 47.58±2.39; % 36.31±0.57; % 33.22±1.22; % 27.40±0.06; % 16.25±0.85 ve % 8.98±0.07 olarak bulunmuştur. 1.563-200 µM DPPC:CH@GA+L-OHP maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu sırasıyla, % 55.64±1.55; % 49.21±0.14; % 36.61±0.62; % 28.61±0.23; % 23.54±0.19; % 19.81±0.71; % 10.82±0.94 ve % 7.64±0.26 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.46. Serbest GA ve L-OHP kombinasyonu ve nanolipozomal GA ve L-OHP kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna etkileri. Hücre proliferasyonu, MTT hücre proliferasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar, kontrole göre yüzde ve ortalama±SE olarak verildi. İstatiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-testi ile gerçekleştirildi. *, kontrole göre ve #, GA ve L-OHP kombinasyonuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Dünya çapındaki ortalama yaşam standartlarının geliştiği, hastalıkların tanı ve tedavisinin önemli ölçüde iyileştiği ve yeterli sağlık hizmetlerine erişimin arttığı bir çağda yaşıyoruz. Bu ölçütler, dünyanın çoğu bölgesinde ortalama yaşam beklentisinin artışında etkili olmuştur. Ancak, bulaşıcı hastalıklardan ölüm oranları artış göstermiştir. Kanser nedenli ölümler, son 40 yılda yaklaşık olarak % 40 oranında artmıştır. 2030 yılında yaklaşık 13 milyon insanın kanser nedenli hayatını kaybedeceği öngörülmektedir. Kolon kanseri, geçmiş yıllarda insidansı düşük olmasına rağmen zamanla yaygın bir kanser türü haline gelmiştir ve batılı ülkelerde kansere bağlı ölümlerin yaklaşık % 10'unu oluşturmaktadır (Kuipers vd., 2015). Gelişmiş ülkelerde kolon kanserinin artışı, çeşitli risk faktörlerindeki artışa bağlanabilir. İnsidans oranındaki değişim, sporadik hastalık oranlarında ve bazı ailesel kanser sendromlarında da belirgin olarak gözlenmiştir.

Kemoterapi, uzun süredir birincil ve metastatik kanser için standart tedavidir. Ancak, ilaçlar tek ajan olarak tatbik edildiğinde klinik yarar sınırlıdır. Monoterapi ile ilgili yaygın sorunlar arasında hücresel ve tümör seviyesinde ilaç direnci, ilacın penetrasyonunu ve etkinliğini engelleyen sert tümör mikroçevresi, tümör heterojenitesi ve doz-sınırlayıcı toksisite bulunmaktadır. Bu nedenle, iki veya daha fazla antikanser ajandan oluşan kombinasyon kemoterapi modaliteleri, çeşitli kanser türlerinin tedavisi için yıllardır kullanılmaktadır. Kombinasyon tedavisi, monoterapiye kıyasla sinerjistik ilaç etkileşimi ile daha yüksek etkinlik ve ilaç direnci gelişmesini engelleyebilmek gibi faydalarından dolayı giderek artan öneme sahiptir (Chen, Lian, Yuan, & Li, 2019; Dey, Chang, Vadlamudi, Park, & Kang, 2020; Sidorov, Naulaerts, Bonnet, Pasquier, & Ballester, 2019). Ancak, sonuçlar hala yetersizdir ve kemoterapötik etkinlik istenilen düzeyde değildir. Farklı ajanların etki mekanizmalarına dayanarak, sinerjistik

etkileşimlerle terapötik etkiyi en üst düzeye çıkarmak için yeni kombinasyon tedavi modalitelerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Hastalıkların tedavisinde entofarmakolojik ürünlerin rolü, uzun zamandır bilinmektedir. Doğal ürünler, günümüzde ilaç keşfine önemli katkı sağlamaktadır. Bitki, hayvan, deniz organizması ve mikro-organizma türündeki çeşitlilikten dolayı, doğa potansiyel terapötik molekül kaynağıdır. Arteether, galantamin, nitisinon ve tiotropium dahil olmak üzere bitkisel kökenli birçok ilaç, piyasaya sürülmüştür. Entofarmakolojik ürünlerden aday ilaç keşfi, kanser tedavisinde önemli rol oynar (Majolo, Delwing, Marmitt, Filho, & Goettert, 2019). Bitki sekonder metabolitleri ve türevleri, klinik uygulamalarda değerlendirilmektedir (Fakhri, Moradi, Farzaei, & Bishayee, 2020; Rosa, Tavares, Sousa, Seca, & Pinto, 2020).

İlaçların ve/veya moleküllerin düşük çözünürlüğü, vücutta erken parçalanma, serbest formda vücuda verildiğinde ilaç kombinasyonlarındaki sinerjistik etkileşimin korunmaması ve kontrollü salımının sağlanamaması terapötik modalitelerin geliştirilmesinde önemli problemlerdir. Bu sorunlar, ilaç taşıyıcı sistemler ile önemli oranda çözülmüştür (Blanco, Shen, & Ferrari, 2015). Sinerjistik ilaç kombinasyonlarının nano-ölçekli formülasyonları, serbest kombinasyon tedavisinden daha üstün terapötik fayda sağlayabildiği için kanser tedavisinde giderek artan öneme sahiptir (Malam, Loizidou, & Seifalian, 2009). İlaç taşıyıcı ve/veya salım sistemleri, ilaç kombinasyonların tek platformda taşınmasına, tedavinin daha etkili ve güvenli bir şekilde uygulanmasına imkan sağlar. Taşıyıcı sistemler arasından, teranostik için en uygun olanı nano-ölçekli lipozomlardır. Bazı lipozomal formülasyonlar, kanser tedavisi için klinik onaylıdır (Pattni vd., 2015).

Bu bilgiler doğrultusunda, doktora tezinin amacı HT-29 *in vitro* insan kolon kanser modeli ile yeni terapötik modalitelerin geliştirilmesi ve özgün nanolipozomal formülasyonlarının hazırlanmasıdır. Doktora tezinin temeli, Dr. Dıbirdık ve talebelerinin çeşitli kanserlerin tedavisine yönelik yeni terapötik modalite geliştirme çalışmaları sırasında *in vitro* HT-29 insan kolon kanser modelinde etnofarmakolojik bir ürün ile aldıkları sonuçlara dayanmaktadır (Fidan, 2017; Zenginer, 2017). Çalışmamızda, ürünün kimyasal bileşenleri GA, tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit ve nadolol'ün *in vitro* anti kolon kanser özellikleri incelendi ve IC₅₀ değerleri belirlendi. Aynı süreçte,

konvansiyonel kemoterapi ilaçları 5-FU, L-OHP ve C225'in de kullanılan ortamlardaki IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Yaptığımız çalışmada, GA doz- bağımlı olarak HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu kuvvetli bir şekilde baskılamıştır (Şekil 4.2). Çalışmamızda, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 24 saat GA (1-200 µM) ile maruziyeti ve takibinde 48 saat hücre besiyeri ile inkübasyonu sonunda GA'in IC₅₀ değeri 106.430 µM (% 95 güven aralığı; 84.990-113.700) olarak hesaplanmıştır. Faried ve ekibi tarafından, 24 saat 0.01-6.25 mg/ml GA maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde IC₅₀ değerini 0.18 mg/ml olarak hesaplanmıştır (Faried vd., 2007). Forester ve ekibi tarafından, 72 saat 50 µM GA maruziyeti sonunda, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin canlılığı yaklaşık % 20 olarak bulunmuştur (Forester, Choy, Waterhouse, & Oteiza, 2014). Caco-2 insan kolon kanseri hücrelerinin 72 saat GA ile maruziyeti sonunda GA'in IC₅₀ değeri 68.7 µM olarak hesaplanmıştır (Forester & Waterhouse, 2010). Subramanian ve ekibi, HCT-15 insan kolon kanseri hücrelerinin 72 saat GA (0-1500 µM) ile maruziyeti sonunda GA'in IC₅₀ değerini yaklaşık 740 µM olarak hesaplamışlardır (Subramanian, Jaganathan, Mandal, Supriyanto, & Muhamad, 2016). Devi ve ekibi, 24 saat GA uygulaması sonunda GA'in IC₅₀ değerini HCT-15 insan kolon kanseri hücreleri için 96 µg/ml olarak belirlemişlerdir (Devi, Uma, Narasu, & Kalyani, 2014). Rivera ve ekibi tarafından, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde 48 saat GA maruziyeti sonunda GA'in IC₅₀ değeri 10 µg/ml olarak bulunmuştur (Rivera, Delgado, Bougarne, Haegeman, & Berghe, 2011). You ve ekibi tarafından, HeLa insan serviks kanseri hücrelerinde GA'in IC₅₀ değeri 80 µM olarak belirlenmiştir (You, Moon, Han, & Park, 2010). Moghtaderi ve ekibi, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinin 24 ve 48 saat GA ile maruziyeti sonunda GA'in IC₅₀ değerini sırasıyla 150 ve 50 µM olarak belirlemişlerdir (Moghtaderi, Sepehri, Delphi, & Attari, 2018). GA'in MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, GA'in IC₅₀ değeri 48 ve 72 saat inkübasyon için sırasıyla 18.5 ve 18 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Seresht vd., 2019). Liang ve ekibi, 24 saat GA maruziyeti sonunda U-2OS ve MNNG/HOS insan osteosarkoma hücrelerinde GA'in IC₅₀ değerini sırasıyla 54.23 ve 87.12 µM olarak belirlemişlerdir (Liang vd., 2012). Sourani ve ekibi tarafından, C121 insan lösemi hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat GA maruziyeti sonunda GA'in IC₅₀ değeri sırasıyla 60.3±1.6, 50.9±1.5 ve 30.9±2.8 µM olarak belirlenmiştir (Sourani, Pourgheysari, Beshkar, Shirzad, & Shirzad, 2016).

Sonuçlarımız, literatür verileri ile uyum göstermektedir. Ancak, IC₅₀ değerlerindeki farklılıkların, hücre modeli, ekim yapılan hücre sayısı, ilaç maruziyet süresi, hücre proliferasyon analiz yöntemindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Xu vd., 2009).

Araştırmamızda, etnofarmasötik kökenli bir ürünün kimyasal içeriğinde bulunan sülfisomidin, tiyofanoks, nadolol ve trifenilfosfit'in antiproliferatif etkisinin olmadığını ve artan ilaç konsantrasyonlarına (0.01-1000 µM) rağmen HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunun baskılanmadığı tespit ettik (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Bu durumun, sülfisomidin, tiyofanoks, nadolol ve trifenilfosfit'in etki mekanizmaları ile yaygın antiproliferatif moleküller ve/veya kemoterapötiklerin etki mekanizmalarının birbirinden tamamen farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde sülfisomidin, tiyofanoks, nadolol ve trifenilfosfit'in antiproliferatif etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Tezimizde HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 5-FU ile maruziyeti sonunda hücre proliferasyonu doz-bağımlı baskılanmıştır (Şekil 4.7). HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 24 saat 5-FU (0.5-100 µM) ile maruziyeti ve takibinde 48 saat besiyeri ile inkübasyon sonucunda IC₅₀ değeri 42.184 µM (% 95 güven aralığı; 29.527-48.669) olarak bulunmuştur. Lamberti ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 72 saat 5-FU ile maruziyeti sonunda IC₅₀ değerini 4 µM±0.01 olarak belirlemişlerdir (Lamberti vd., 2012). Richard ve ekibi, 72 saat 5-FU ile maruziyeti sonunda, HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için IC₅₀ değerini 4.20 µM olarak bulmuşlardır (Richard & Marignac, 2015). Varghese ve ekibi, 72 saat 5-FU ile maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için IC₅₀ değerini 3.1±0.4 µg/ml olarak hesaplamışlardır (Varghese vd., 2019). Focaccetti ve ekibi, 24 saat 5-FU maruziyeti sonunda, HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için IC₅₀ değerini sırasıyla 106.8 µM olarak belirlemişlerdir (Focaccetti vd., 2015). Leong ve ekibi, 24, 48 ve 72 saat 5-FU maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için IC₅₀ değerini sırasıyla 25.98±3.11, 1.43±0.11 ve 0.15±0.01 µM olarak hesaplamışlardır (Leong vd., 2016). Srimuangwong ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 24 ve 48 saat 5-FU maruziyeti sonunda 5-FU'in IC₅₀ değerini sırasıyla 39.13±2.32 ve 38±2.21 µM olarak belirlemişlerdir (Srimuangwong, Tocharus, Chintana, Suksamrarn, & Tocharus, 2012). Tong ve ekibi, 48 saat 5-FU maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için 5-FU'in IC₅₀ değerini 798.38±1.25 µM

olarak hesaplamışlardır (Tong vd., 2011). He ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 48 saat 80 μM 5-FU ile maruziyeti sonunda hücre canlılığını % 47.75 olarak bulmuşlardır (He, Fan, & Zha, 2011). Ikehata ve ekibi, 72 saat 5-FU maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için IC_{50} değerini 10.0 ± 4.0 μM olarak rapor etmişlerdir (Ikehata vd., 2014). Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar, literatür verileri ile uyumludur ancak, IC_{50} değerindeki farklılıkların hücre modeli, ekim yapılan hücre sayısı, ilaç maruziyet süresi, hücre proliferasyon analiz protokolündeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Xu vd., 2009).

Projemizde, artan L-OHP konsantrasyonları ile birlikte HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunun doz-bağımlı olarak önemli oranda baskılandığı bulunmuştur (Şekil 4.8). HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 24 saat L-OHP (0.5-100 μM) ile maruziyeti ve takibinde 48 saat besiyeri ile inkübasyon sonucunda IC_{50} değeri 11.096 μM (% 95 güven aralığı; 5.389-12.627) olarak bulunmuştur. Flis ve ekibi tarafından, 72 saat L-OHP maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için IC_{50} değeri 9 ± 0.4 μM olarak bulunmuştur (Flis & Splawinski, 2009). Richard ve ekibi, 72 saat L-OHP maruziyetini takiben, HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için L-OHP'in IC_{50} değerini 0.88 ± 0.2 μM olarak hesaplamışlardır (Richard & Marignac, 2015). Ghasemi ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat L-OHP ile maruziyeti sonunda IC_{50} değerini sırasıyla 161.4, 29.8 ve 29.8 μM olarak hesaplamışlardır (Ghasemi, Moradzadeh, Mousavi, & Sadeghnia, 2016). Stoman ve ekibi, 48 saat L-OHP ile inkübasyonun ardından, L-OHP'in IC_{50} değerini HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için 12.30 μM olarak bulmuşlardır (Stoman, Preez, & Venter, 2011). Ikehata ve ekibi, 72 saat L-OHP maruziyeti sonunda HT-29, SW480, SW48 ve HCT116 insan kolon kanseri hücreleri için L-OHP'in IC_{50} değerini sırasıyla 0.8 ± 0.1 , 42.5 ± 10 , 5.6 ± 2.1 ve 0.8 ± 0.2 μM olarak rapor etmişlerdir (Ikehata vd., 2014). Xiang ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP'in IC_{50} değerini 11.954 μM olarak belirlemişlerdir (Xiang, Kang, & Xiang, 2015). Mohammadian ve ekibi tarafından, 24 saat L-OHP maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için IC_{50} değeri 4.60 ± 3.53 μM olarak hesaplanmıştır (Mohammadian, Zeynali, Azarbaijani, Ansari, & Kheradmand, 2017). Virag ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 24 saat L-OHP maruziyeti sonunda IC_{50} değerini 22.31 ± 2.717 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplamışlardır (Virag vd., 2013). Nannizzi ve ekibi tarafından, 24 saat L-OHP maruziyeti sonunda, HT-29 insan kolon kanseri hücreleri için

IC₅₀ değeri 0.33±0.02 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Nannizzi vd., 2010). Çalışmamızda, elde ettiğimiz bulgular literatür verileri ile örtüşmektedir ancak, IC₅₀ değerindeki farklılıkların, hücre modeli, ekim yapılan hücre sayısı, ilaç maruziyet süresi, hücre proliferasyon analiz metodundaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Xu vd., 2009).

Bizim çalışmamızda artan C225 konsantrasyonlarına (1.95-500 µg/ml) rağmen HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunda önemli oranda azalma meydana gelmediği ve 24 saat 500 µg/ml C225 maruziyeti ve takibinde 48 saat besiyeri ile inkübasyon sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunun yaklaşık % 80 olduğu bulunmuştur (Şekil 4.9). Araştırmamızdaki MTT hücre proliferasyon analizleri, C225'in doz-bağımlı olarak HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu baskılamadığını ortaya koymuştur. Matsuo ve ekibi tarafından, 48 saat C225 maruziyeti sonunda HT29, CW2, HCT116, JHSK-rec, JHCOLO-YI ve TT1TKB insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunun baskılanmadığı bildirilmiştir (Matsuo vd., 2011). Bu durumun, C225 dahil olmak üzere monoklonal antikör sınıfı bazı antikanser ajanların, konakçı-bağımlı sitotoksikite mekanizması gerektirebilecek diğer geleneksel antikanser ilaçlar kadar sitotoksik olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Matsuo vd., 2011). Farias ve ekibi, 10 nM C225'in HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu baskıladığını göstermiştir (Farias vd., 2012). Troiani ve ekibi tarafından, GEO, SW48, HT-29, LoVo, HCT-116, HCT-15, SW-620 ve SW-480 insan kolon kanseri hücrelerinin 0.01-20 µg/ml C225 ile 96 saat maruziyeti sonunda, doz-bağımlı antiproliferatif etki gözlenmiştir. GEO, SW48, HT-29 ve LoVo insan kolon kanseri hücreleri için IC₅₀ değerini sırasıyla 0.1, 0.5, 20 ve 20 µg/ml olarak bulunmuştur. HCT-116, HCT-15, SW-620 ve SW-480 insan kolon kanseri hücreleri için ise IC₅₀ değeri >20 µg/ml olarak belirlenmiştir (Troiani vd., 2014). Levy ve ekibi tarafından, 1x10⁻³-1x10² µg/ml 96 saat C225 maruziyeti sonunda 1x10¹-1x10² µg/ml doz aralığında HCT-116, DLD-1, T84, HT-29 ve Caco-2 insan kolon kanseri hücrelerinin canlılığında azalma meydana geldiği bulunmuştur. C225, hücre proliferasyonunda ortalama % 93.71 oranında inhibisyona yol açmıştır (Levy vd., 2009). Narvi ve ekibi, 72 saat C225 maruziyeti sonunda, HCA7 ve LS180 insan kolon kanseri hücreleri için C225'in IC₅₀ değerini sırasıyla 0.02±0.1 ve 0.004±0.002 µg/ml, Caco-2, SW620, DLD-1, HCT116, HT-29, RKO ve VaCo-5 insan kolon kanseri hücreleri için IC₅₀ değerini >100 µg/ml olarak bulmuşlardır (Narvi vd.,

2018). Solmi ve ekibi tarafından, C225 maruziyeti sonunda Caco-2 insan kolon kanseri hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana geldiği, ancak HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir (Solmi vd., 2008). Chung ve ekibi tarafından, C225'in wild-tip EGFR ekspresyonu olan SW480 insan kolon kanseri hücrelerinde belirgin bir etkinliğe sahip olduğu, HT-29 ve LS174T insan kolon kanseri hücrelerinin C225'e direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Chung, Chiu, Wei, Chang, & Chao, 2020). Wu ve ekibi tarafından, C225 uygulaması sonunda Caco-2 insan kolon kanseri hücre canlılığının azaldığı, HT-29 ve HCT-116 insan kolon kanseri hücrelerinin canlılığında azalma meydana gelmediği tespit edilmiştir (Wu, Huang, Gong, Lin, & Guo, 2018). Luca ve ekibi tarafından, C225 maruziyeti sonunda Caco-2, HT-29 ve HCT-116 insan kolon kanseri hücrelerinin canlılığında azalma meydana gelmediği bulunmuştur (Luca vd., 2014). Gauthier ve ekibi, HCT-116, HCT-8, HT-29 ve SW620 insan kolon kanseri hücrelerinde 100 µg/ml C225 dozunun sitotoksik veya sitostatik olmadığını rapor etmişlerdir (Gauthier vd., 2006). Di Nicolantonio ve ekibi, C225'in etkisini COLO-205 ve HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde incelemişlerdir. C225 maruziyeti sonunda hücre canlılığında azalma meydana gelmediği, COLO-205 ve HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin C225'e dayanıklı olduğu bulunmuştur (Nicolantonio vd., 2008). BRAF *V600E* alelinin C225'e yanıtı zayıflattığını göstermişlerdir. Mutasyona uğramış BRAF *V600E* alelini (DiFi-BRAF) eksprese eden DiFi insan kolon kanseri hücrelerinin, boş bir vektörle transdüksiyona uğratılmış parent hücrelere kıyasla, C225'e daha az duyarlı olduğu bulunmuştur. HT-29 ve COLO-205 insan kolon kanseri hücrelerinin BRAF *V600E* alelini taşıdığı (KRAS wild-tip), C225 ve panitumumab tedavisine dirençli olduğu bulunmuştur. Onkogenik BRAF (*V600E* mutant) varlığının kolon kanseri hücrelerinde C225'in terapötik etkisini zayıflattığı tespit edilmiştir. Kolon kanseri hastalarının taşıdığı KRAS mutasyonlarının, C225'e direncin önemli belirleyicisi olduğu ve wild-tip KRAS mutasyonu barındıran hastaların büyük kısmında C225 tedavisinin başarılı olmadığı bildirilmiştir (Cunningham vd., 2004; Cutsem vd., 2007). Literatürdeki çalışmalar, C225'in insan kolon kanseri hücre proliferasyonundaki etkilerine ilişkin bulguların çelişkili olduğunu göstermektedir. Çalışmalarımızda, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunun C225 tarafından kuvvetli bir şekilde baskılanmadığı ve

24 saat 500 µg/ml C225 maruziyeti ve takibinde 48 saat besiyeri ile inkübasyon sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonu yaklaşık % 80 olarak tespit edilmiştir.

Tümör matriksinin kompleks yapısı nedeni ile, etkili bir tedavi için tek bir ilaç veya modalite yeterli olmayabilir. İki veya daha fazla terapötik ajanın uygulanmasına dayalı kombinasyon kemoterapisi, uzun süreli prognoza ulaşmak ve yan etkileri azaltmak için giderek artan öneme sahiptir. Kombinasyon tedavisi kanser hücrelerinde farklı sinyal yollarını modüle edebilir, sinerjistik etkilere neden olabilir, terapötik etkiyi maksimum düzeye çıkarabilir ve ilaç direnci gelişmesini engelleyebilir (Mokhtari vd., 2017). Kombinasyon tedavisi, monoterapiye kıyasla üstünlüğü kanıtlanmış klinik onaylı yaklaşımdır ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Fouquier & Guedj, 2015; Lazikani vd., 2012).

Doktora tez çalışmasında, test molekülleri ile geleneksel kemoterapötiklerin IC₅₀ konsantrasyonlarının belirlenmesinin takibinde, aynı anda kombinasyon uygulamalar ile kimyasal bileşenler ve geleneksel kemoterapi ilaçları arasındaki etkileşimler analiz edildi. GA'in 5-FU veya L-OHP ile ikili ilaç kombinasyonları, sinerjistik olarak HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu doz-bağımlı baskılamıştır (Şekil 4.10 ve Şekil 4.12). Chou-Talalay metodu literatürde kullanılan en yaygın kullanılan ve çok sayıda atıf alan bir yöntemdir (Chou vd., 2019). Araştırmamızda, GA'in 5-FU veya L-OHP ile ikili ilaç kombinasyonlarının analizi için Chou-Talalay metodu ve bu metod temelinde geliştirilen CompuSyn yazılımı kullanılmıştır. GA ve 5-FU kombinasyonunun CompuSyn ile simülasyonu, ilaç kombinasyonundaki sinerjistik etkileşimleri başarılı bir şekilde göstermiştir (Şekil 4.11). F_a-CI ve izolobogram grafikleri, CI değerlerinin 1'den küçük olduğunu göstermektedir (Şekil 4.11C ve Şekil 4.11E). GA ve 5-FU kombinasyonuna ait F_a-CI grafiği, additif etkinin (CI=1) altında kalan CI değerlerini ve GA ve 5-FU arasındaki sinerjistik etkileşimi ifade etmektedir. İlaç kombinasyonlarında, sinerjistik etkileşimin sayısal ölçüsü sadece CI değeridir (Chou, 2006). Tez çalışmamız kapsamında, GA ve 5-FU kombinasyonuna ait CI değerleri her etki ve doz seviyesi için Chou-Talalay metodu ile hesaplanmıştır. Chou-Talalay'ın sınıflandırmasına göre, IC₅₀/16, IC₅₀/8, IC₅₀/4 ve 2IC₅₀ dozlarında GA ve 5-FU kombinasyonunun sinerjizm gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2). IC₅₀ ve 4IC₅₀ dozlarında ise GA ve 5-FU kombinasyonunun antagonizm gösterdiği bulunmuştur. GA ve L-OHP kombinasyonunun CompuSyn ile simülasyonu, GA ve L-OHP arasındaki kuvvetli sinerjizmi açıkça

göstermektedir (Şekil 4.13). GA ve L-OHP kombinasyonuna ait Fa-CI grafiğinde, additif etki çizgisinin altında kalan CI değerleri GA ve L-OHP arasında kuvvetli sinerjistik etkileşimler meydana geldiğini ifade etmektedir (Şekil 4.13C). Çalışmalarımızda, GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonuna ait CI değerleri her etki ve doz seviyesi için Chou-Talalay metodu ile hesaplanmıştır. GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonunda Chou-Talalay'ın sınıflandırmasına göre, $IC_{50}/16$ dozunda kuvvetli sinerjizm, $IC_{50}/8$, $IC_{50}/4$, IC_{50} ve $2IC_{50}$ dozlarında ise sinerjizm gözlenmiştir. $IC_{50}/2$ dozunda orta sinerjizm gözlenmiştir (Çizelge 4.2). $4IC_{50}$ dozunda ise, additif etki tespit edilmiştir. GA ve C225 kombinasyonu, GA tek ajan uygulamasına kıyasla üstün bir etki göstermemiştir (Şekil 4.14). Dolayısıyla, GA ve C225 arasında herhangi bir pozitif kombinasyon etkisi gerçekleşmemiştir. GA ve C225 ikili ilaç kombinasyonunun CompuSyn ile simülasyonu, antagonistik etkileşimleri açıkça göstermektedir (Şekil 4.15). GA ve C225 kombinasyonuna ait F_a -CI grafiği, CI değerlerinin additif etkiden daha büyük olduğunu ($CI > 1$) ifade etmektedir (Şekil 4.15E). Chou-Talalay'ın sınıflandırmasına göre, GA ve C225 ikili ilaç kombinasyonunun IC_{50} ve $2IC_{50}$ dozlarında kuvvetli antagonizm, diğer dozlarında ise antagonizm gözlenmiştir (Çizelge 4.2). GA'nın 5-FU veya L-OHP ile ikili kombinasyonlarındaki kuvvetli sinerjistik etkileşimler, 5-FU ve LOHP'in terapötik etkilerinin artırılması açısından klinik olarak önemlidir.

DRI değeri, kombinasyonda yer alan her bir ilacın dozunun belirli bir etki seviyesinde kaç kat azaltılabileceğinin ölçüsüdür (Chou vd., 2019). İlaç kombinasyonu sinerjistik etkileşim gösterdiğinde, aynı etkiyi elde etmek için her bir ilacın daha düşük dozları gerekir ve böylece terapötik etkinlik korunurken doz azalır. DRI, düşük dozda konakçıya karşı toksisitenin azaldığı ve terapötik etkinliğin korunduğu durumda klinik olarak önemlidir (Chou, 2006). $DRI > 1$ istenen durum olmasına rağmen, additif etki ve/veya antagonistik etkileşimlerde de DRI değeri 1'den büyük olabilir. DRI değerinin =1, >1 ve <1 olması sırasıyla herhangi bir doz azalmasının gerçekleşmediğini, istenilen (olumlu) doz azalması ve istenmeyen (olumsuz veya negatif) doz azalmasının gerçekleştiğini gösterir (Chou, 2011). Daha büyük DRI değeri, verilen terapötik etki için daha fazla doz azalmasını ifade eder.

Tez çalışmasında, GA'nın 5-FU ve L-OHP ile ikili kombinasyonlarında her bir doz ve etki seviyesi için 5-FU ve L-OHP'e ait DRI değerleri CompuSyn yazılımı ile hesaplanmıştır. Araştırmamızda GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunda, 5-FU için DRI

değerlerinin bütün dozlarda 1'den büyük olduğu ve 5-FU için olumlu doz azalmasının (DRI>1) gerçekleştiği bulunmuştur (Çizelge 4.1). CompuSyn yazılımı ile çizilen GA ve 5-FU kombinasyonuna ait F_a -DRI grafiği de, 5-FU için DRI değerlerinin 1'den büyük olduğunu açıkça göstermektedir (Şekil 4.11D). GA ve 5-FU kombinasyonunun $2IC_{50}$ dozunda 5-FU için DRI değeri 10.328 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). $2IC_{50}$ dozunda GA ve 5-FU ikili ilaç kombinasyonunun CI değeri 0.525 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Bu sonuçlar, 5-FU ve GA kombinasyon ilaç uygulaması ile, 5-FU dozunun azaltılarak terapötik etkisinin artırılabilirliğini ifade etmektedir. CompuSyn yazılımı ile yaptığımız hesaplamalar, GA ve L-OHP kombinasyonunda L-OHP için DRI değerlerinin bütün dozlarda 1'den çok büyük olduğu ve L-OHP için olumlu doz azalmasının gerçekleştiğini göstermiştir (Çizelge 4.3). CompuSyn yazılımı ile çizilen GA ve L-OHP kombinasyonuna ait F_a -DRI grafiği de, L-OHP için DRI değerlerinin 1'den çok büyük olduğunu açıkça göstermektedir (Şekil 4.13D). GA ve L-OHP kombinasyonunun $2IC_{50}$ dozunda L-OHP için DRI değeri 20.446 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). $2IC_{50}$ dozunda GA ve L-OHP kombinasyonunun CI değeri 0.445 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). GA'nın 5-FU veya L-OHP ile ikili ilaç kombinasyonlarının sinerjistik etkileşim göstermesi, 5-FU ve L-OHP'e ait DRI değerlerinin 1'den büyük olması klinik olarak önemlidir. Sonuç olarak, 5-FU veya L-OHP'in GA ile kombinasyon uygulaması tek ajan olarak 5-FU ve L-OHP'den elde edilen terapötik etkinin daha düşük dozlarda elde edilmesine ve ilaç dozu ile ilişkili yan etkilerin azaltılmasına imkan sağlayabileceğini göstermektedir. CompuSyn yazılımı ile yaptığımız hesaplamalar, GA ve C225 kombinasyonunda C225 için DRI değerlerinin 1'den çok küçük olduğu ve C225 için olumlu doz azalmasının (DRI<1) gerçekleşmediği ortaya koymuştur (Çizelge 4.4). GA ve C225 ikili ilaç kombinasyonunun $4IC_{50}$ dozunda C225 için DRI değeri 35.194 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Ancak, GA ve C225 ikili ilaç kombinasyonunun $4IC_{50}$ dozunda CI değeri 2.650 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Daha önce de belirtildiği üzere, antagonistik ilaç etkileşimlerinde de DRI değeri 1'den büyük olabilir (Chou, 2006). DRI değerleri, ilaç kombinasyonu belirli bir etki ve doz seviyesinde sinerjistik etkileşim gösterdiğinde önemlidir. Dolayısıyla, çalışmamız kapsamında C225 için elde edilen DRI değeri terapötik olarak anlamlı değildir.

Literatürde, polifenol sınıfı bileşiklerin çeşitli moleküller, ilaçlar ve kemoterapötikler ile kombinasyon etkilerinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır.

Reddy ve ekibi, GA ve imatinib kombinasyonunun K562 insan lösemi hücrelerinde sinerjistik etkileşim gösterdiğini rapor etmişlerdir (Reddy vd., 2012). Madlener ve ekibi tarafından, HL-60 insan lösemi hücrelerinin GA ve trimidoks kombinasyonuna maruziyeti sonunda CI değerlerini 0.72-1.15 aralığında bulmuşlardır (Madlener vd., 2007). Elde ettiğimiz bulgularda, GA'in çok düşük dozlarında ($IC_{50}/16$, $IC_{50}/8$, $IC_{50}/4$) 5-FU veya L-OHP kuvvetli sinerjistik etkileşimler ($CI < 0.5$) gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Moghtaderi ve ekibi, GA ve kurkumin kombinasyonunun sinerjistik olarak MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini baskıladığını bulmuşlardır (Moghtaderi vd., 2018). Çalışmamızda, GA'in 5-FU veya L-OHP ile ikili ilaç kombinasyonları doz-bağımlı olarak HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu baskılamış ve HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonuna karşı çok düşük ilaç dozlarında ($IC_{50}/16$, $IC_{50}/8$, $IC_{50}/4$) kuvvetli sinerjizm göstermiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.12).

Yapılan literatür taramalarında, 5-FU, L-OHP ve C225'in çeşitli moleküller ve/veya ilaçlar ile kombinasyon etkilerinin rapor edildiği saptanmıştır. Bun ve ekibi, α -hederin'in 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarının HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU'in sitotoksitesini artırdığını ve IC_{50} dozlarında 5-FU ile α -Hederin kombinasyonunun sinerjizm gösterdiğini belirtmişlerdir (Bun vd., 2008). Bizim çalışmamızda ise, GA ve 5-FU kombinasyonunun çok düşük ilaç dozlarında ($IC_{50}/16$, $IC_{50}/8$, $IC_{50}/4$) sinerjizm gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Hwang ve ekibi, genistein ve 5-FU kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücre canlılığını baskıladığını bulmuşlardır (Hwang, Ha, & Park, 2005). Srimuangwong ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU ve heksahidrokurkumin kombinasyon ilaç uygulamasının, bireysel ilaç uygulamasından daha fazla hücre ölümüne yol açtığını rapor etmişlerdir (Srimuangwong vd., 2012). Lei ve ekibi, insan mide kanseri hücrelerinde timokinon uygulamasının takibinde 5-FU inkübasyonunun, bireysel 5-FU uygulamasına kıyasla daha fazla hücre ölümüne yol açtığını bildirmişlerdir (Lei vd., 2012). Hwang ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU ve epigallokateşin 3-gallat kombinasyon ilaç uygulamasının, 5-FU veya epigallokateşin 3-gallat uygulamasına kıyasla, daha fazla antikanser etki gösterdiği ve hücre canlılığını baskıladığını tespit etmişlerdir (Hwang vd., 2007). Zhao ve ekibi, MGC-803 insan mide kanseri hücrelerinde 5-FU ve wogonin kombinasyon uygulamasının sinerjizm gösterdiğini belirtmişlerdir (Zhao vd., 2010).

Tang ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU ve triptolit kombinasyonunun düşük dozlarda sinerjizm gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Tang, Zhu, Tao, Wei, & Lin, 2007). Flis ve ekibi, 5-FU ve sulindak sülfid kombinasyonunun Colo-205 ve SW48 insan kolon kanseri hücrelerinde sinerjizm, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde ise antagonizm gösterdiğini bulmuşlardır (Flis & Splawinski, 2009). Suzuki ve ekibi, MiaPaCa-2 insan pankreas kanseri hücrelerinde genistein ve 5-FU kombinasyon ilaç uygulamasının, genistein veya 5-FU uygulamasına kıyasla, daha fazla antikanser etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (Suzuki vd., 2014). Du ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU ve kurkumin kombinasyonun CI değerlerinin 1'den küçük olduğunu gözlemlemişlerdir (Du, Jiang, Xia, & Zhong, 2006). Tong ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU ve dikloro asetat'ın sinerjizm gösterdiğini tespit etmişlerdir (Tong vd., 2011). Calviello ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU ve deksaheksaenoik asit kombinasyonunun CI değerini 0.179 olarak hesaplamışlardır (Calviello vd., 2005). Koo ve ekibi, AGS insan mide kanseri hücrelerinde 5-FU ve kurkumin kombinasyonunun, 5-FU veya kurkumin uygulamasına göre daha fazla hücre büyüme inhibisyonuna yol açtığını gözlemlemişlerdir (Koo, Kim, Jung, & Park, 2004). Moon ve ekibi, nobiletin ve 5-FU kombinasyonunun SNU-16 insan mide kanseri hücrelerinde kuvvetli sinerjizm gösterdiğini tespit etmişlerdir (Moon, Cho, Ahn, & Cho, 2013). Choi ve ekibi, 5-FU ve apigenin kombinasyonunun MDA-MB-453 insan meme kanseri hücrelerinde önemli antiproliferatif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Choi & Kim, 2009). Bu tez çalışmasında, 5-FU'in GA ile ikili ilaç kombinasyonu $IC_{50}/16 - 4IC_{50}$ konsantrasyon aralığında doz-bağımlı olarak HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu kuvvetli bir şekilde baskılamış ve HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonuna karşı çok düşük ilaç dozlarında ($IC_{50}/16$, $IC_{50}/8$, $IC_{50}/4$) kuvvetli sinerjistik etkileşimler göstermiştir (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.2).

Hu ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP ve epigallokateşin 3-gallat kombinasyonunun CI değerlerinin 1'den küçük olduğunu göstermişlerdir (Hu vd., 2015). Flis ve ekibi, L-OHP ve sulindak sülfid kombinasyonunun HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde sinerjizm gösterdiğini bulmuşlardır (Flis & Splawinski, 2009). Stoman ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP ve mangiferin ikili ilaç kombinasyonunun sinerjizm gösterdiğini rapor etmişlerdir (Stoman vd., 2011). Montopoli ve ekibi, 2008 ve C13 insan over kanseri hücrelerinde L-OHP'in kurkumin ile

sinerjizm gösterdiğini tespit etmişlerdir (Montopoli, Ragazzi, Froldi, & Caparrotta, 2009). Araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, L-OHP'in GA ile ikili ilaç kombinasyonunun $IC_{50}/16 - 4IC_{50}$ konsantrasyon aralığında doz-bağımlı olarak HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu önemli ölçüde baskıladığını ve HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonuna karşı çok düşük ilaç dozlarında ($IC_{50}/16$, $IC_{50}/8$, $IC_{50}/4$) GA ve L-OHP arasında kuvvetli sinerjistik etkileşimler meydana geldiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.2).

Baro ve ekibi tarafından, FaDu ve A431 insan baş ve boyun kanseri hücrelerinde dasatinib ile kombinasyon halinde C225'in etkilerinin azaldığı gösterilmiştir (Baro vd., 2014). Terzuoli ve ekibi, hidroksi tirozol ve C225 kombinasyonunun HT-29 ve WiDr insan kolon kanseri hücrelerinde, bireysel ilaç uygulamasına göre, daha üstün etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir (Terzuoli vd., 2017). Lattanzio ve ekibi, insan baş ve boyun kanseri hücrelerinde C225 ve temsirolimus kombinasyonunda sinerjizm gözlemlemişlerdir (Lattanzio vd., 2016). Park ve ekibi, C225 ve tectochrysin kombinasyonunun HCT116 ve SW480 insan kolon kanseri hücrelerinde sinerjistik etkileşim gösterdiğini rapor etmişlerdir (Park vd., 2016). Iannelli ve ekibi, valproik asit ve C225'in insan baş ve boyun kanseri hücrelerinde sinerjizm gösterdiğini bulmuşlardır (Iannelli vd., 2020). Gehrke ve ekibi tarafından, çinko nanopartikül ve C225 kombinasyonunun, FaDu ve HLaC-78 insan baş ve boyun kanseri hücrelerinde antagonistik etkileşim gösterdiği rapor edilmiştir (Gehrke vd., 2017). Bizim çalışmamızda, GA ve C225 kombinasyonu HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonuna karşı antagonistik etkileşimler göstermiştir (Şekil 4.14 ve Çizelge 4.2).

Literatürlere baktığımızda, Fogli ve ekibi MiaPaCa-2 insan pankreas kanseri hücrelerinde kannabinoid türevi ve 5-FU kombinasyonunun düşük ilaç dozlarında 5-FU için olumlu doz azalmasının gerçekleştiğini göstermişlerdir (Fogli vd., 2006). Flis ve ekibi, Colo-205 insan kolon kanseri hücrelerinde desitabin'in 5-FU veya L-OHP ile kombinasyonlarında olumlu doz azalmasının gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (Flis, Gnyszka, Krzemińska, & Szałwiński, 2009). Flis ve ekibi tarafından, SW48, HT-29 ve Colo-205 insan kolon kanseri hücrelerinde histon deasetilaz inhibitörlerinin L-OHP ile ikili ilaç kombinasyonlarında L-OHP için DRI değerlerinin 1'den büyük olduğu bulunmuştur (Flis, Gnyszka, & Szałwiński, 2009). Gazerro ve ekibi, DLD-1 insan kolon kanseri hücrelerinde rimonabant ve L-OHP kombinasyonunda L-OHP için DRI değerinin

1'den büyük olduğunu (0.9 - 4 değer aralığı) tespit etmiştir (Gazzerro vd., 2010). Mohammadian ve ekibi, HCT-116 ve HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 17-AAG, kapesitabin ve L-OHP'in 2'li ve 3'lü ilaç kombinasyonlarında L-OHP için DRI değerlerini 1'den büyük olarak bulmuşlardır (Mohammadian vd., 2017). Doktora tez çalışmamızda, GA'in 5-FU ve L-OHP ile ikili ilaç kombinasyonlarında 5-FU ve L-OHP için DRI değerlerinin sırasıyla 1.959 - 10.328, ve 1.854 - 20.446 aralığında olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.3). Araştırmamızda, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde GA'in 5-FU veya L-OHP ile ikili ilaç kombinasyonlarında 5-FU ve L-OHP'e ait DRI değerlerinin 1'den çok büyük olduğunu, 5-FU ve/veya L-OHP için olumlu doz azalmasının gerçekleştiğini tespit ettik. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, 5-FU ve L-OHP'e ait DRI değerlerinin klinik olarak önemini açıkça ortaya koymaktadır.

Çalışmamız kapsamında, tiyofanoks, trifenilfosfit, sülfisomidin ve nadolol'ün kendi aralarındaki iki-, üç- ve dört-bileşenli kombinasyon etkileri, kemoterapötikler ile iki bileşenli kombinasyon etkileri ve GA ile iki-, üç-, dört- ve beş-bileşenli kombinasyon etkileri araştırılmıştır. CI değerleri, Chou-Talalay metodu yerine Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli ile hesaplanmıştır. Bu durumun temel sebebi, Chou-Talalay yönteminin ilaçların medyan-etki dozunu (IC_{50} veya D_m) temel almasıdır (Chou, 2006). Tiyofanoks, trifenilfosfit, sülfisomidin ve nadolol antiproliferatif etki göstermediği için herhangi bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Kombinasyon çalışmaları, iki farklı yaklaşım ile incelenmiştir. Birinci yaklaşımda, kemoterapötikler $IC_{50}/16-4IC_{50}$ artan doz aralığında uygulanmıştır. İkinci yaklaşımda ise kemoterapötikler sabit IC_{50} dozunda uygulanmıştır. İki farklı yaklaşım ile kombinasyon etkilerini incelememizin amaçları, $IC_{50}/16-4IC_{50}$ doz aralığında kemoterapötiklerden elde edilen etkilerin tiyofanoks, trifenilfosfit, sülfisomidin ve nadolol (1.5625-100 μM) tarafından artırılıp artırılmadığını belirlemek, kemoterapötikler HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde sabit IC_{50} dozunda uygulandığında elde edilen etkilerin tiyofanoks, trifenilfosfit, sülfisomidin ve nadolol (1.5625-100 μM) tarafından nasıl değiştirildiğini incelemek ve $IC_{50}/16-4IC_{50}$ doz aralığında ilaç etkileşim türlerini tanımlamaktır. Literatürde, ilaç kombinasyon çalışmaları yapılırken geniş doz aralıkları ve çoklu-oran yaklaşımlarının kullanılması önerilmektedir (Chou, 2006; Foucquier & Guedj, 2015). Elde ettiğimiz sonuçlarda, her iki yaklaşımda da, bireysel ilaç uygulamasına kıyasla, ikili-ilâç kombinasyonlarında üstün bir antiproliferatif etki gözlenmemiştir. Nadolol'ün 5-FU, L-OHP, C225 veya GA

ile ikili-ilaç kombinasyonlarının CI değerleri, tüm dozlarda 1'den büyük olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Benzer sonuçlar, tiyofanoks, trifenilfosfit ve sülfisomidin için de bulunmuştur (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Tiyofanoks, trifenilfosfit, sülfisomidin ve nadolol'ün GA ile üç-bileşenli kombinasyonlarında da, tek ajan uygulamasına kıyasla kombinasyon ilaç uygulamasında pozitif bir etki bulunmamıştır (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8). Benzer sonuçlar, üç-bileşenli kombinasyonlarda da gözlenmiştir (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10). Etnofarmakolojik ürünün kimyasal içeriğinde bulunan tiyofanoks, trifenilfosfit, sülfisomidin ve nadolol'ün kendi aralarındaki iki-, üç- ve dört-bileşenli kombinasyonları da, tek ajan uygulamasına kıyasla, üstün bir antiproliferatif etki göstermemiştir (Çizelge 4.11). Etnofarmakolojik ürünün kimyasal içeriğinde bulunan moleküllerin (GA, tiyofanoks, trifenilfosfit, sülfisomidin ve nadolol) beş-bileşenli kombinasyon etkileri aynı anda ilaç uygulaması ile incelenmiş ve herhangi bir sinerjistik etkileşim tespit edilmemiştir (Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13). Antagonistik etkileşimlerin sebeplerinin, tiyofanoks, trifenilfosfit, sülfisomidin ve nadolol'ün herhangi bir antiproliferatif etkisinin bulunmamasından, kemoterapötikler ve GA ile etki mekanizmalarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde, tiyofanoks, trifenilfosfit, sülfisomidin ve nadolol'ün kemoterapötik ajanlar ile kombinasyon etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Kolon epitelyumun karsinoma dönüşümü sırasında apoptoz inhibisyonunun gerçekleştiği gözlenmiştir (Yang vd., 2009). Bu durum, apoptoz disfonksiyonunun kolon tümörü oluşumunda önemli rol oynadığını gösterir. Kolonda programlanmış hücre ölümü uygun şekilde gerçekleşmediğinde, bazı hücreler ölümsüz hale gelebilir ve ilerleyen süreçlerde kolon tümörüne dönüşebilir. Apoptoz, normal kolonik epitel yapısının belirlenmesinde önemli rol oynar ve hücrel strese verilen yanıtın parçasıdır (Yang vd., 2009). Stres sinyallerinin işlenmesi ve memelilerde hücre ölümünden sorumlu, dışsal ve içsel yolak olarak tanımlanan iki apoptoz yolağı vardır (Green, 1998). Dışsal yolak, pro-apoptotik ligandların hücre yüzey ölüm reseptörlerine bağlanması ile ilişkilidir. Dışsal yolakta Kaspaz-8, başlatıcı kaspaz olarak önemli rol oynar (Watson, 2004). İçsel apoptoz yolağı, DNA hasarı, işlevsiz onkogenler veya büyüme faktörlerinin yokluğu gibi hücrel stresler tarafından tetiklenir. İçsel yolak, Bax ve Bcl-2 gibi Bcl-2 protein ailesi üyeleri ve mitokondri tarafından düzenlenir (Abraha & Ketema, 2016; Huerta, Goulet, & Livingston, 2006; Zhang & Yu, 2013).

Bu tez çalışmasında, GA ve 5-FU, GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonlarının apoptoza etkisi incelendi. Çalışma sonuçlarımız, apoptotik hücre oranının bireysel GA, 5-FU veya L-OHP maruziyeti sonunda süre-bağımlı artış gösterdiğini ortaya koymuştur (Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15). HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin GA ve 5-FU kombinasyonuna maruziyeti sonunda, zaman-bağımlı sinerjistik olarak apoptozun tetiklendiği bulunmuştur (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.16). GA ve L-OHP kombinasyonu HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde zaman-bağımlı sinerjistik olarak apoptozu indüklemiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.17). HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde GA ve L-OHP kombinasyonunun, GA ve 5-FU kombinasyonundan daha fazla apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15). HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 12 ve 24 saat GA ve 5-FU, GA ve L-OHP kombinasyonlarına maruziyeti sonucunda, Bax ve Kaspaz-8 mRNA ifade düzeyinde kontrole göre önemli oranda artış gözlenmiştir (Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17). Bcl-2 mRNA ifade düzeyinde kontrole göre azalma meydana geldiği bulunmuştur (Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17). GA ve 5-FU, GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonları, Bax/Bcl-2 mRNA oranında kontrole göre önemli oranda artışa sebep olmuştur (Şekil 4.21 ve Şekil 4.25). HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin GA ve 5-FU, GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonlarına maruziyeti sonucunda Bax protein ifade düzeyinde değişiklik olmadığı, Kaspaz-8 protein ifadesinde kontrole göre önemli oranda artış ve Bcl-2 protein ifadesinde ise azalma meydana geldiği bulunmuştur (Şekil 4.26 ve Şekil 4.28). GA ve 5-FU, GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonları, Bax/Bcl-2 protein ifade oranında kontrole göre önemli oranda artışa yol açmıştır (Şekil 4.27 ve Şekil 4.29). Çalışmamızda TALİ görüntü-temelli sitometre ile elde ettiğimiz bulgular, MTT hücre proliferasyon analizleri ve CI değerleri ile uyumludur. TALİ görüntü-temelli sitometre analiz sonuçları, programlı hücre ölümü apoptozun GA ve 5-FU, GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonlarındaki sinerjistik anti-proliferatif etkilerden sorumlu moleküler mekanizmalardan biri olduğunu göstermiştir.

Bax ve Bcl-2, tümör gelişmesinde ve/veya mitokondriyal disfonksiyon tarafından tetiklenen içsel apoptoz yolağının inhibisyonunda önemli rol oynayan Bcl-2 protein ailesinin temel üyeleridir. Mitokondriyal disfonksiyon tarafından tetiklenen içsel apoptoz yolağında Bcl-2 proteinlerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Dolayısıyla, Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki denge hücrel

süreçlerde önemlidir. Bax proteini, mitokondriyal dış zarın geçirgenleştirilmesini sağlayarak hücre ölümünü tetikler. Bcl-2 proteini ise, Bax aktivitesini inhibe ederek apoptozu önler (Hector & Prehn, 2009; Khodapasand vd., 2015; Mohan vd., 2012; Yang vd., 2009; Yip & Reed, 2008). Araştırmamızda, GA ve 5-FU, GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonlarının Bax/Bcl-2 mRNA ve protein oranını kontrole göre önemli ölçüde artırması (Şekil 4.21 ve Şekil 4.25), GA ve 5-FU, GA ve L-OHP kombinasyonlarındaki sinerjistik antiproliferatif etkilere mitokondriyal apoptoz yolağının (içsel apoptoz yolağı) aracılık ettiğini göstermektedir. Kaspaz-8, dışsal apoptoz yolağında kilit rol oynayan önemli proteinlerden biridir (Fritsch vd., 2019). GA ve 5-FU, GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonlarının Kaspaz-8 mRNA ve protein ifadesini kontrole kıyasla önemli ölçüde artırması (Şekil 4.20, Şekil 4.24, Şekil 4.26 ve Şekil 4.28), GA ve 5-FU, GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonlarındaki sinerjistik antiproliferatif etkilere dışsal apoptoz yolağının da aracılık ettiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, doktora tez çalışmasında elde ettiğimiz bu bulgular, programlı hücre ölümü apoptozun GA ve 5-FU, GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonlarının terapötik etkilerinden sorumlu sinyal yolağı olduğunu göstermektedir. Bu temelde, GA ve 5-FU, GA ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonlarının HT-29 insan kolon kanseri hücrelerindeki anti-proliferatif etkilerinde Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-8 proteinlerinin muhtemel terapötik moleküler hedefler olduğunu düşünüyoruz.

İnsan kolon kanseri *in vitro* ve/veya *in vivo* modellerinde, GA'in kemoterapötikler ile sinerjistik olarak apoptozu tetiklediğini gösteren yayınlanmış bir araştırma bulunmamaktadır. Literatür çalışmaları, GA, 5-FU veya L-OHP'in tek ajan olarak farklı hücre modellerinde apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Forester ve ekibi, Caco-2 insan kolon kanseri hücrelerinde GA maruziyeti sonunda kaspaz-3 aktivitesinde, mono- ve oligo-nükleozomlarda artış gözlenmiştir. GA maruziyetinin Bcl-2 protein ifadesinde azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Forester vd., 2014). Subramanian ve ekibi, GA maruziyetinin HCT-15 insan kolon kanseri hücrelerini apoptoza indüklediğini bulmuşlardır (Subramanian vd., 2016). Projemizde de, GA maruziyeti HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde zaman-bağımlı olarak apoptotik hücre oranında artışa yol açmıştır (Çizelge 4.14). You ve ekibi, GA'in HeLa hücrelerinde apoptozu tetiklediğini gözlemlemişlerdir. GA maruziyetinin, Bcl-2 protein seviyesinde azalmaya ve Bax protein düzeyinde ise artışa yol açtığı bulunmuştur (You vd., 2010). Lima ve ekibi, GA

maruziyetinin HepG2 insan hepatosellüler karsinom hücrelerini apoptoza indüklediğini gözlemlemişlerdir (Lima vd., 2016). You ve ekibi, Calu-6 ve A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde GA maruziyeti sonunda apoptotik hücre oranında artış tespit etmişlerdir (You & Park, 2010). Reddy ve ekibi, GA maruziyetinin K562 insan lösemi hücrelerini apoptoza indüklediğini bulmuşlardır (Reddy vd., 2012). Liu ve ekibi, MiaPaCa-2 insan pankreas kanseri hücrelerinde GA maruziyetinin, kontrole göre apoptotik hücre oranında artışa neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Liu, Li, Yu, & Niu, 2012). Moghtaderi ve ekibi, GA maruziyetinin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre modelinde apoptoza tetiklediğini bulmuşlardır (Moghtaderi vd., 2018). Sun ve ekibi, SMMCC-7721 insan hepatosellüler karsinom hücrelerinin GA ile maruziyeti sonucunda apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiğini bulmuşlardır (Sun, Zhang, Xie, Zhang, & Zhao, 2016). Lo ve ekibi, A375.S2 insan malign melanoma hücrelerinin GA tarafından kaspaz-bağımlı ve -bağımsız yolaklar ile apoptoza indüklediğini rapor etmişlerdir. GA maruziyeti sonucunda, Bax, sitokrom c, Kaspaz-9 ve -3 protein seviyesinde artış, Bcl-2 protein düzeyinde ise azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Lo vd., 2010). Tsai ve ekibi, GA maruziyeti sonunda AGS insan mide kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü meydana geldiğini bulmuşlardır. GA maruziyeti sonunda Kaspaz-3, -8 ve -9 seviyelerinde artış, Bcl-2 protein düzeyinde ise azalma gerçekleştiği tespit edilmiştir (Tsai vd., 2018). Araştırmamızda da, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde GA maruziyeti kontrole göre Kaspaz-8 mRNA ve protein ifadesini önemli oranda artırmıştır (Çizelge 4.16, Şekil 4.26 ve Şekil 4.28). Yeh ve ekibi, GA maruziyetinin HL-60 insan lösemi hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini gözlemlemişlerdir. GA maruziyeti sonunda, Kaspaz-8 ve Bax protein seviyesinde artış, Bcl-2 protein düzeyinde ise azalma meydana geldiği rapor edilmiştir (Yeh vd., 2011). Liang ve ekibi, GA'ın U-2OS ve MNNG/HOS insan osteosarkoma hücrelerini apoptoza indüklediğini gözlemlemişlerdir. GA maruziyeti sonunda, U-2OS ve MNNG/HOS insan osteosarkoma hücrelerinde erken apoptotik morfolojik özellikler tespit edilmiştir (Liang vd., 2012). Sourani ve ekibi, C121 insan lösemi hücrelerinde 10, 30, 50 ve 80 µM GA maruziyeti sonunda, apoptotik hücre oranını sırasıyla % 25, % 35, % 50 ve % 86 olarak belirlemişlerdir (Sourani vd., 2016). Lamberti ve ekibi, 5-FU maruziyetinin HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini gözlemlemişlerdir (Lamberti vd., 2012). Bizim çalışmamızda, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU maruziyeti kontrole göre

apoptotik hücre oranını zaman-bağımlı artırmıştır (Çizelge 4.14). Varghese ve ekibi, 5-FU maruziyetinin HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde Kaspaz-bağımlı apoptoza yol açtığını rapor etmişlerdir (Varghese vd., 2019). Deneylerimizde de, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU maruziyeti sonunda Kaspaz-8 mRNA ve protein ifade oranında kontrole göre önemli oranda artış gerçekleşmiştir (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.26). Mhaidat ve ekibi, 5-FU maruziyetinin HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediğini bulmuşlardır (Mhaidat, Bouklihacene, & Thorne, 2014). Tong ve ekibi, 5-FU maruziyetinin HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediğini ve 5-FU maruziyetinin Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olduğunu göstermişlerdir (Tong vd., 2011). Araştırmamızda da, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 5-FU ile maruziyeti Bax/Bcl-2 mRNA ve protein oranında kontrole göre önemli ölçüde artışa yol açmıştır (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.27). He ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 80 µM 5-FU ile maruziyeti sonunda apoptotik hücre oranının % 37.42±3.15 olduğunu ve Bax/Bcl-2 oranında artış gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir (He vd., 2011). Xavier ve ekibi, 5-FU'in HCT15 ve CO115 insan kolon kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediğini göstermişlerdir (Xavier, Lima, Rohde, & Wilson, 2011). Marchetti ve ekibi, HCT15 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP'in apoptozu tetiklediğini ve Kaspaz-8 protein aktivasyonunun gerçekleştiği belirtmişlerdir (Marchetti vd., 2004). Ghasemi ve ekibi yaptıkları çalışmada, L-OHP maruziyeti sonunda HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün meydana geldiğini bulmuşlardır (Ghasemi vd., 2016). Tez çalışmasında da, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP maruziyeti kontrole göre apoptotik hücre oranını zaman-bağımlı artırmıştır (Çizelge 4.15). Stoman ve ekibi, L-OHP'in HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini rapor etmişlerdir (Stoman vd., 2011). Rakitina ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin L-OHP'e maruziyeti sonunda apoptotik hücre ölümünün ve Kaspaz-8 aktivasyonunun gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir (Rakitina, Vasilevskaya, & O'dwyer, 2007). Bulgularımızda, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP maruziyeti Kaspaz-8 mRNA ve protein ifadesini kontrole göre önemli oranda artırmıştır (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.28). Raeisi ve ekibi, L-OHP'in HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde apoptozu aktive ettiğini bulmuşlardır (Raeisi vd., 2019). Fujie ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP'in apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini ve L-OHP maruziyeti sonunda Bax protein ifadesinde değişiklik olmadığını tespit etmişlerdir (Fujie vd., 2005).

Laboratuvarımızda, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP maruziyeti Bax protein ifadesinde değişikliğe yol açmamış ancak Bax/Bcl-2 protein oranında kontrole göre önemli oranda artış gerçekleşmiştir (Şekil 4.28 ve Şekil 4.29). Sonuç olarak, çalışmamızda GA, 5-FU ve L-OHP'in tek ajan olarak uygulandığında zaman-bağımlı olarak apoptotik hücre oranında önemli artışa yol açtığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15). HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde GA, 5-FU ve L-OHP maruziyeti, Bax ve Kaspaz-8 mRNA ifadesinde artışa ve Bcl-2 mRNA ifadesinde azalmaya yol açmıştır (Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17). Tek ajan olarak, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin 5-FU ve L-OHP ile maruziyeti kontrole göre Bax ve Kaspaz-8 protein ifadesinde artışa yol açmıştır (Şekil 4.26 ve Şekil 4.28). TALİ görüntü-temelli sitometre, RT-qPCR ve Western blotlama yöntemleri ile elde ettiğimiz sonuçlar, literatür verileri ile uyumludur.

Aborehab ve ekibi, HeLa insan serviks hücrelerinde GA ve paklitaksel kombinasyonunun, GA veya paklitaksel uygulamasına kıyasla, apoptotik hücre ölümünü artırdığını bulmuşlardır (Aborehab & Osama, 2019). Sourani ve ekibi, Jurkat insan lösemi hücrelerinde asparajinaz'ın apoptotik etkilerinin GA tarafından tetiklendiği bulunmuştur (Sourani vd., 2017). Literatür çalışmaları, GA'in kanser kombinasyon tedavisinde komplementer ajan olarak önemli potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Deneylelerimizde, GA'in 5-FU ve L-OHP ikili ilaç kombinasyonlarının HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde zaman-bağımlı sinerjistik olarak apoptozu indüklediğini tespit ettik (Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15).

Literatürlere baktığımızda, Xavier ve ekibi, CO115 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU'in apoptotik etkilerinin kersetin tarafından artırıldığını gözlemlemişlerdir (Xavier vd., 2011). Choi ve ekibi, MDA-MB-453 insan meme kanseri apigenin ve 5-FU kombinasyonunun, apigenin veya 5-FU uygulamasına kıyasla, apoptotik hücre oranını artırdığını bildirmişlerdir (Choi & Kim, 2009). Moon ve ekibi, SNU-16 insan mide kanseri hücrelerinde nobiletin ve 5-FU kombinasyonunun, nobiletin veya 5-FU uygulamasına kıyasla, daha fazla apoptotik hücre ölümüne yol açtığını gözlemlemişlerdir (Moon vd., 2013). Calviello ve ekibi, LS-174, Colo 320, HT-29 ve Colo 205 insan kolon kanseri hücrelerinde 5-FU ve dekosahesanoik kombinasyon grubunda, 5-FU veya dekosahesanoik uygulamasına kıyasla, daha fazla apoptotik hücre ölümü gerçekleştiğini belirtmişlerdir. 5-FU'in Bcl-2 protein ifade düzeyini

azaltığını bulmuşlardır (Calviello vd., 2005). Tong ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde dikloroasetat ve 5-FU kombinasyon uygulamasının, dikloroasetat veya 5-FU uygulamasına kıyasla, daha fazla apoptotik hücre ölümüne yol açtığını bulmuşlardır. Bcl-2 protein ifade düzeyinde azalma ve Bax protein ifade düzeyinde artış meydana geldiği rapor edilmiştir (Tong vd., 2011). Zhao ve ekibi, MGC-803 insan mide kanseri hücrelerinde wogonin ve 5-FU kombinasyonunun, wogonin veya 5-FU uygulamasına kıyasla, daha fazla apoptozu indüklediğini tespit etmişlerdir. Wogonin veya 5-FU kombinasyonunun Bax protein ifade düzeyini artırdığı, Bcl-2 protein ifade seviyesinde ise azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Zhao vd., 2010). Wang ve ekibi, BGC-823 insan mide kanseri hücrelerinde 5-FU'in apoptotik etkisinin gambojik asit tarafından artırıldığı, kombinasyonunun Bcl-2 protein ifade düzeyini azalttığı ve Bax protein ifade seviyesinde ise değişikliğe yol açmadığını bulmuşlardır (Wang vd., 2009). Lei ve ekibi, insan mide kanseri hücrelerinde timokinon ve 5-FU kombinasyon uygulamasının, timokinon veya 5-FU uygulamasına kıyasla, daha fazla apoptoza yol açtığını gözlemlemişlerdir. 5-FU maruziyetinin Bax protein ifade düzeyinde artışa, Bcl-2 protein ifade seviyesinde ise azalmaya yol açtığı ve 5-FU'in etkilerinin timokinon tarafından artırıldığı rapor edilmiştir (Lei vd., 2012). Çalışmamızda, 5-FU'in GA ile ikili ilaç kombinasyonu sinerjistik olarak apoptoza indüklemiş (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.16), Bax/Bcl-2 mRNA (Şekil 4.21) ve protein oranında (Şekil 4.27) kontrole göre önemli oranda artışa yol açmıştır. Sonuçlarımız, GA ve 5-FU kombinasyonunun Kaspaz-8 mRNA (Şekil 4.20) ve protein oranını (Şekil 4.26) önemli oranda artırdığını göstermiştir. Flis ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP ve sulindak sülfid kombinasyonunun sinerjistik olarak apoptozu indüklediğini bulmuşlardır (Flis & Splawinski, 2009). Stoman ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde mangiferin ve L-OHP kombinasyonunun, mangiferin veya L-OHP uygulamasına kıyasla, daha fazla apoptoza yol açtığını gözlemlemişlerdir (Stoman vd., 2011). Montopoli ve ekibi, 2008 ve C13 insan over kanseri hücrelerinde kurkumin ve L-OHP kombinasyonunun, kurkumin veya L-OHP uygulamasına kıyasla, daha fazla apoptozu tetiklediğini bulmuşlardır (Montopoli vd., 2009). Projemizde, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde L-OHP'in GA ile ikili ilaç kombinasyonu sinerjistik olarak apoptozu indüklemiş (Çizelge 4.15), Bax/Bcl-2 mRNA (Şekil 4.25) ve protein oranında (Şekil 4.29) kontrole göre önemli oranda artışa yol açmıştır. Bulgularımız, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde GA ve L-OHP kombinasyonunun Kaspaz-8 mRNA

(Şekil 4.24) ve protein oranını (Şekil 4.28) önemli oranda artırdığını göstermiştir. Literatür verileri, bizim elde ettiğimiz sonuçlar, ile uyumludur.

İlaç kombinasyonlarının tek platformda taşınması ve sinerjistik ilaç dozlarında kontrollü salımının sağlanması, kanser tedavisinde kritik öneme sahiptir (Zhang, Wong, Xue, Eoh, & Wu, 2016). Sinerjistik ilaç kombinasyonunu oluşturan bileşenlerin optimum sinerjistik etkileri elde etmek için aynı anda hücrelere veya hastalıklı bölgeye ulaşamaması kombinasyon tedavisindeki en önemli problemlerden biridir. Bu sebeple, ilaç taşıyıcılar geliştirilmiş ve kanser tedavisine uygulanmıştır (Anselmo & Mitragotri, 2016). Lipozomlar, klinik uygulamalara başarıyla çevrilmiş nano-ölçekli ilk ilaç salım/taşıyıcı sistemleridir. Terapötik ajanların lipozomlar ile salımı, ilaçların biyo-dağılım profilini iyileştirir ve terapötik indekslerinin artmasına olanak sağlar (Pattni vd., 2015). Lipozomlar, yapı ve özellik bakımından hücre membranına benzer ve fosfolipit yapısından dolayı hücre membranı ile etkileşim içerisindedirler (Torchilin, 2005). Lipozomlar, hidrofobik ve hidrofilik ilaçları enkapsüle edebilme, enkapsülünmüş ilacı degradasyondan korumak, ilaçların biyo-dağılımını artırmak ve sistemik toksisiteyi azaltmak, biyo-parçalanabilirlik ve uyumluluk özelliklerinden dolayı kanser tedavisi için ideal ve güvenli nano-ölçekli ilaç taşıyıcılardır (Meng vd., 2011; Pattni vd., 2015).

Çalışmamız kapsamında GA ve 5-FU, GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonlarının özgün nano-ölçekli geleneksel lipozomal formülasyonları geliştirildi ve fizikokimyasal karakterizasyonu yapıldı. UV-spektrofotometre ile yapılan ölçümler, DPPC:CH (70:30) formülasyonlarının, DPPC:CH (60:40) formülasyonlarına kıyasla, daha fazla yükleme kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.18). SEM analizi, nanolipozomların küresel morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.31, Şekil 4.34 ve Şekil 4.37). Lipozomların küresel morfolojisi, faz-kontrast invert mikroskop görüntüleme ile doğrulanmıştır (Şekil 4.30, Şekil 4.33 ve Şekil 4.36). Zeta-ölçer ile yapılan analizler sonucu elde edilen boyut-dağılım grafikleri de, lipozomal ilaç formülasyonlarının nano-ölçekli olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.32, Şekil 4.35 ve Şekil 4.38). Ölçümler, nanolipozomal ilaç formülasyonlarının boyutlarının 100-200 nm aralığında olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.19). Geliştirdiğimiz DPPC:CH nanolipozomal formülasyonu GA, 5-FU ve L-OHP'in kontrollü salımına imkan sağlamış ve ilaç salımını geciktirmiştir (Şekil 4.39, Şekil 4.40 ve Şekil 4.41). Nano-ölçekli lipozomal ilaç formülasyonlarının zeta potansiyellerinin negatif değerde olduğu ve PDI

değerlerinin 0.1-0.25 aralığında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.19). PDI değerleri, ilaç taşıyıcı sistemlerin, nano- ve mikro-partiküllerin, koloidal sistemlerin homojenlik derecesini gösterir. Düşük PDI değerleri, homojen veziküllere işaret etmektedir. 0.5'ten büyük PDI değerleri ise yüksek heterojenliğe işaret etmektedir (Becker vd., 2011; Marxer vd., 2011). Araştırmamızda geliştirdiğimiz DPPC:CH, DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP nanoterapötik formülasyonların PDI değerleri sırasıyla, 0.256, 0.196 ve 0.186 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.19). Bu sonuçlar, DPPC:CH, DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP nanoterapötik formülasyonların yüksek homojen boyut dağılımına sahip olduğunu ortaya koymuştur. MTT hücre proliferasyon analizleri, DPPC:CH@GA, DPPC:CH@5-FU, DPPC:CH@L-OHP nanolipozomal formülasyonların 1.5625-200 µM konsantrasyon aralığında HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde, sırasıyla serbest GA, 5-FU, L-OHP'den daha üstün antiproliferatif etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.42, Şekil 4.43 ve Şekil 4.44). DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomal formülasyonları, 1.5625-200 µM konsantrasyon aralığında sırasıyla GA ve 5-FU, GA ve L-OHP serbest ikili ilaç kombinasyonlarından daha fazla ve sinerjistik olarak HT-29 insan kolon kanser hücre proliferasyonunu baskılamıştır (Şekil 4.45 ve Şekil 4.46). Doktora tez çalışmasında elde ettiğimiz bu bulgular, DPPC:CH nanolipozomal formülasyonların kullanışlı olduğunu ortaya koymuştur.

Yayınlanmış önceki çalışmalarda, Lin ve ekibi DPPC lipozomların boyut, zeta potansiyeli ve PDI değerlerini sırasıyla 114.20 ± 1.70 nm, 3.40 ± 0.80 mV ve 0.36 ± 0.06 olarak bulmuşlardır (Lin vd., 2016). Mady ve ekibi, DPPC lipozomların negatif zeta potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir (Mady, Fathy, Youssef, & Khalil, 2012). Araştırmamızda da, geliştirdiğimiz DPPC nanolipozomların zeta potansiyellerinin negatif değerde olduğunu bulduk (Çizelge 4.19). Szcze's, DPPC lipozomlarında kolesterol içeriği arttıkça zeta potansiyelinin +5.0 mV'dan -7.5 mV değerine düştüğünü rapor etmiştir (Szcześ, 2013). Yusuf ve ekibi, DPPC lipozomlarını lipit ince-film metodu ile hazırlamıştır. SEM ve STEM ölçümleri, DPPC lipozomların küresel morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir. Gümüş nanopartikül yüklü DPPC lipozomların sudaki boyutu 139.0 ± 22.47 nm olarak ölçülmüştür (Yusuf & Casey, 2020). Projemiz kapsamında, geliştirdiğimiz DPPC nanolipozomların küresel morfolojiye sahip olduğu SEM analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.31, Şekil 4.34 ve Şekil 4.37). Foteini ve ekibi, DPPC lipozomları

lipit ince film yöntemi ile hazırlamışlardır. 10 mg/ml fosfolipit konsantrasyonunda su ortamındaki boyut, PDI ve zeta potansiyeli sırasıyla 125.7 ± 0.8 nm, 0.408 ± 0.004 ve 28.8 ± 0.9 mV olarak ölçülmüştür. 30 mg/ml fosfolipit konsantrasyonunda sudaki boyut, PDI ve zeta potansiyeli sırasıyla 247.8 ± 16.2 nm, 0.893 ± 0.095 ve 19.3 ± 1.0 mV olarak ölçülmüştür (Foteini, Pippa, Naziris, & Demetzos, 2019). Becker ve ekibi, DPPC lipozomları lipit ince-film hidrasyon metodu ile hazırlamışlardır. Lipozomların ortalama boyutunu ve PDI değerini sırasıyla 223.5 ± 5.4 nm ve 0.28 olarak ölçmüşlerdir. Lipozomların küresel morfolojiye sahip olduğu gösterilmiştir (Becker vd., 2011). Mady ve ekibi, DPPC lipozomların morfolojisini TEM ile incelemişlerdir. DPPC lipozomların küresel morfolojisi ve negatif zeta potansiyeli rapor edilmiştir (Mady & Darwish, 2010). Aikawa ve ekibi, DPPC lipozomların küresel morfolojiye sahip olduğunu ve boyutunun nano-ölçekli olduğunu rapor etmişlerdir (Aikawa vd., 2017). Marxer ve ekibi, DPPC lipozomal ilaç formülasyonlarını lipit ince-film metodu ile hazırlamışlardır. Lipozomların zeta potansiyelini ve boyutunu sırasıyla -5.35 ± 3.24 mV ve 218.7 ± 19.8 nm (PDI=0.45) olarak ölçmüşlerdir. AFM ve TEM analizi, lipozomların küresel morfolojiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Marxer vd., 2011). Biz de, geliştirdiğimiz DPCC nanolipozomların boyutlarının 100-200 nm aralığında ve PDI değerlerinin 0.1-0.25 aralığında değiştiğini tespit ettik (Çizelge 4.19). Tez çalışması kapsamında geliştirdiğimiz formülasyonların SEM görüntüleri, invert mikroskop görüntüleri lipozomal formülasyonların küresel morfolojisini açıkça ortaya koymuştur. Bulgularımız, literatür verileri ile yüksek uyum göstermektedir. Ancak boyut, zeta potansiyeli ve PDI değeri gibi fizikokimyasal parametrelerdeki farklılıkların, lipozomal formülasyonların bileşimi, hazırlama protokolü ve analiz yöntemi gibi değişkenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bazı tek ve/veya ikili ilaç yüklü lipozomal formülasyonların sırasıyla serbest ilaç veya ilaç kombinasyonlarına kıyasla, daha fazla sitotoksositeye sahip olduğunu gösteren çalışmalar rapor edilmiştir. Handali ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde lipozomal 5-FU'in hücre canlılığını serbest 5-FU'den daha fazla baskıladığını bulmuşlardır (Handali vd., 2018). Udofot ve ekibi, 5-FU yüklü lipozomal nanopartiküllerin etkilerini HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde araştırmışlardır. Lipozomal formülasyonların hücre büyümesini serbest 5-FU'den daha fazla baskıladığı gözlenmiştir (Udofot, Affram, & Bridg'ette Israel, 2015). Araştırmamızda da, HT-29

insan kolon kanseri hücrelerinde DPPC:CH@5-FU nanolipozomal formülasyonu 1.5625-200 µM doz aralığında serbest 5-FU'den daha üstün antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 4.43). Banerjee ve ekibi, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde doğal flavonoid apigenin yüklü lipozomların serbest apigeninden daha fazla sitotoksosite gösterdiğini rapor etmişlerdir (Banerjee, Banerjee, & Mandal, 2017). Bu tez çalışmasında da, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde doğal polifenol GA'in nanolipozomal formülasyonu DPPC:CH@GA serbest GA'den 1.5625-200 µM doz aralığında daha üstün antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 4.42). Cheng ve ekibi, kurkumin ve sisplatin yüklü nanolipozomların, insan hepatosellüler karsinom hücrelerinde serbest ilaç kombinasyonundan daha fazla sitotoksosite gösterdiğini rapor etmişlerdir (Cheng vd., 2018). Tezimizde, DPPC:CH@GA+L-OHP nanolipozomal formülasyonu serbest GA+L-OHP kombinasyonundan daha fazla antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 4.46). Zhang ve ekibi, CT-26 ve HCT-116 insan kolon kanseri hücrelerinde, L-OHP ve irinotekan ikili ilaç yüklü nanolipozomların serbest ilaç kombinasyonundan daha fazla etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Zhang, B. vd., 2016). Hattori ve ekibi, kolon tümörlerinde irinotekan ve fitik asit ikili ilaç yüklü nanolipozomların insan kolon kanseri tümörlerinde serbest ilaç kombinasyonuna kıyasla daha fazla anti tümör aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Hattori vd., 2009). Sonuç olarak, projemizde HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde DPPC:CH@GA, DPPC:CH@5-FU ve DPPC:CH@L-OHP lipozomal nanoterapötik formülasyonları serbest GA, 5-FU ve L-OHP'den daha fazla antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 4.42, Şekil 4.43 ve Şekil 4.44). DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP lipozomal nanoterapötik formülasyonları sinerjistik olarak HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunu baskılamış ve sırasıyla serbest GA ve 5-FU, GA ve L-OHP kombinasyonlarından daha üstün antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 4.45 ve Şekil 4.46). Geliştirdiğimiz lipozomal nanoterapötik formülasyonların serbest ilaç ve/veya serbest ilaç kombinasyonlarından üstün antiproliferatif etki göstermesi, lipozomların hücre membranı ile etkileşimlerin ve hücre içine alımlarının yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Torchilin, 2005).

Sonuç olarak, çalışmamız GA'in 5-FU veya L-OHP ile ikili ilaç kombinasyonlarının HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde kuvvetli sinerjistik antiproliferatif etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. GA ve 5-FU, GA ve L-OHP ikili

ilaç kombinasyonları, HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde içsel ve dışsal yolak aracılığıyla sinerjistik olarak programlı hücre ölümü apoptozu indüklemiştir. GA'in 5-FU ve L-OHP ile ikili ilaç kombinasyonlarının sinerjistik etkileşimler göstermesi, 5-FU ve L-OHP'e ait DRI değerlerinin 1'den çok büyük olması, kolon kanserinin klinik tedavisi önem arz etmektedir. Elde ettiğimiz bu özgün bulgular temelinde, doktora tez çalışmamız GA'in kolon kanseri tedavisinde komplementer ajan olarak 5-FU veya L-OHP birlikte kullanılabilceğini gösteren literatürdeki ilk çalışma olma niteliğini taşımaktadır. 5-FU veya L-OHP'in GA ile kombinasyon olarak uygulanması, klinikte terapötik etkinin artırılmasına, ilaç dozunun azaltılmasına ve doz ile ilişkili yan etkilerin en aza indirilmesine imkan sağlayabilir. Deneylelerimiz, DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP lipozomal formülasyonların, serbest ilaç kombinasyonlarının tek platformda taşınmasını, kontrollü ilaç salımının ve terapötik etkinin artmasını sağlayan özgün ve yenilikçi nanoterapötik modaliteler olduğunu ortaya koymuştur. Geliştirdiğimiz DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP lipozomal nanoterapötik modalitelerin kolon kanseri için hayati öneme sahip klinik tedavi stratejileri olabileceğini düşünüyoruz. Çalışmamızda elde ettiğimiz *in vitro* sonuçlar temelinde, *in vivo* çalışmaların planlanıp yürütülmesinin elde edilen bulgulara önemli katkı sağlayacağını ve klinik çalışmalar için de temel oluşturabileceğini öngörüyoruz.

Öneri olarak, projemize rehber olan etnofarmakolojik ürünün kimyasal bileşenleri GA, tiyofanoks, sülfisomidin, trifenilfosfit, nadolol'un yaygın kanser türleri üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak bilinmemektedir. Dolayısıyla, bu moleküllerin etkilerinin kolon kanserinin farklı prelinik modellerinde araştırılmasına ihtiyaç vardır. Literatürde C225'in insan kolon kanser hücrelerindeki etkilerine ilişkin bulgular çelişkilidir. Bu nedenle, C225'in farklı mutasyonlara sahip kolon kanseri hücrelerindeki antiproliferatif etkileri ve bu etkilerden sorumlu moleküler mekanizmalar detaylı olarak incelenmelidir. GA ve diğer bileşiklerin HT-29 insan kolon kanseri hücre proliferasyonunda yer alan sinyal yollarına etkilerinin araştırılması, moleküler terapötik hedeflerin keşfedilmesinde önemlidir. GA ve 5-FU, GA ve L-OHP sinerjistik ikili ilaç kombinasyonlarının etkisinin, klinik onaylı FOLFOX, FOLFIRI ve FOLFOXIRI tedavi modalitesinin etkisi ile karşılaştırmalı olarak *in vitro* ve/veya *in vivo* araştırılması kolon kanserinin tedavisi için önemli ipuçları sağlayacaktır. DPPC:CH@GA+5-FU ve DPPC:CH@GA+L-OHP lipozomal nanoterapötik modalitesinin etkinliklerinin kolon

kanserinin *in vivo* prelinik modellerinde incelenmesi, kolon kanserin tedavisi için kritik öneme sahiptir.

KAYNAKLAR

- Aborehab, N. M., Elnagar, M. R., & Waly, N. E. (2021). Gallic acid potentiates the apoptotic effect of paclitaxel and carboplatin via overexpression of Bax and P53 on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(2), e22638. doi:doi.org/10.1002/jbt.22638
- Aborehab, N. M., & Osama, N. (2019). Effect of Gallic acid in potentiating chemotherapeutic effect of Paclitaxel in HeLa cervical cancer cells. *Cancer Cell International*, 19(1), 154. doi:10.1186/s12935-019-0868-0
- Abraha, A. M., & Ketema, E. B. (2016). Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World journal of gastrointestinal oncology*, 8(8), 583-591. doi:10.4251/wjgo.v8.i8.583
- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. doi:10.1038/sj.onc.1210220
- Aikawa, T., Sato, K., Okado, H., Takahashi, Y., Kondo, T., & Yuasa, M. (2017). Lyoprotective Effect of Alkyl Sulfobetaines for Freeze-drying 1, 2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine Liposomes. *Journal of Oleo Science*, 66(11), 1277-1284. doi:10.5650/jos.ess17100
- Alam, M. N., Almoyad, M., & Huq, F. (2018). Polyphenols in colorectal cancer: current state of knowledge including clinical trials and molecular mechanism of action. *BioMed Research International*, 2018, Article ID 4154185. doi:10.1155/2018/4154185
- Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2016). Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational medicine*, 1(1), 10-29. doi:10.1002/btm2.10003
- Ashkenazi, A. (2008). Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(12), 1001-1012. doi:10.1038/nrd2637
- Asl, M. N., & Hosseinzadeh, H. (2016). Review of the pharmacological effects of Vitis vinifera (Grape) and its bioactive constituents: an update. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1392-1403. doi:10.1002/ptr.5644
- Badhani, B., Sharma, N., & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Advances*, 5(35), 27540-27557. doi:10.1039/C5RA01911G
- Bai, J., Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., Zhang, Y., Wang, X., & Meng, X. (2021). Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110985. doi:doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985
- Banerjee, K., Banerjee, S., & Mandal, M. (2017). Enhanced chemotherapeutic efficacy of apigenin liposomes in colorectal cancer based on flavone-membrane interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 491, 98-110. doi:10.1016/j.jcis.2016.12.025

- Barani, H., & Montazer, M. (2008). A review on applications of liposomes in textile processing. *Journal of Liposome Research*, 18(3), 249-262. doi:10.1080/08982100802354665
- Baro, M., De Llobet, L., Figueras, A., Skvortsova, I., Mesia, R., & Balart, J. (2014). Dasatinib worsens the effect of cetuximab in combination with fractionated radiotherapy in FaDu-and A431-derived xenografted tumours. *British journal of cancer*, 111(7), 1310-1318. doi:10.1038/bjc.2014.432
- Becker, A., Marxer, E., Brüßler, J., Hoormann, A. S., Kuhnt, D., Bakowsky, U., & Nimsky, C. (2011). Ultrasound active nanoscaled lipid formulations for thrombus lysis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(3), 424-429. doi:10.1016/j.ejpb.2010.12.003
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*, 33(9), 941-951. doi:10.1038/nbt.3330
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Bun, S. S., Elias, R., Baghdikian, B., Ciccolini, J., Ollivier, E., & Balansard, G. (2008). α -hederin potentiates 5-FU antitumor activity in human colon adenocarcinoma cells. *Phytotherapy Research*, 22(10), 1299-1302. doi:10.1002/ptr.2483
- Calviello, G., Di Nicuolo, F., Serini, S., Piccioni, E., Boninsegna, A., Maggiano, N., Ranelletti, F. O., & Palozza, P. (2005). Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 55(1), 12-20. doi:10.1007/s00280-004-0846-6
- Carlson, K., & Ehrich, M. (1999). Organophosphorus compound-induced modification of SH-SY5Y human neuroblastoma mitochondrial transmembrane potential. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 160(1), 33-42. doi:10.1006/taap.1999.8741
- Carlson, K., Jortner, B. S., & Ehrich, M. (2000). Organophosphorus compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168(2), 102-113. doi:10.1006/taap.2000.8997
- Chen, W., Lian, W., Yuan, Y., & Li, M. (2019). The synergistic effects of oxaliplatin and piperlongumine on colorectal cancer are mediated by oxidative stress. *Cell Death & Disease*, 10(8), 1-12. doi:10.1038/s41419-019-1824-6
- Cheng, Y., Zhao, P., Wu, S., Yang, T., Chen, Y., Zhang, X., He, C., Zheng, C., Li, K., & Ma, X. (2018). Cisplatin and curcumin co-loaded nano-liposomes for the treatment of hepatocellular carcinoma. *International journal of pharmaceutics*, 545(1-2), 261-273. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.05.007
- Chin, B. H., Tallant, M. J., Duane, W. C., & Sullivan, L. J. (1980). Anticholinesterase effects of carbamate insecticide thiofanox and its metabolites in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6), 1327-1330. doi:10.1021/jf60232a029
- Choi, E. J., & Kim, G.-H. (2009). 5-Fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through induction of apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Oncology Reports*, 22(6), 1533-1537. doi:10.3892/or_00000598

- Chou, T.-C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews*, 58(3), 621-681. doi:10.1124/pr.58.3.10
- Chou, T.-C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*, 70(2), 440-446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947
- Chou, T.-C. (2011). The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research. *Integrative Biology*, 3(5), 548-559. doi:10.1039/c0ib00130a
- Chou, T.-C., Shapiro, T. A., Fu, J., Chou, J. H., & Merzenich, G. S. U. (2019). Computerized quantification of drugs synergism in animal studies or in clinical trials using only ten data points. *Synergy*, 9, 100049. doi:10.1016/j.synres.2019.100049
- Chung, Y. C., Chiu, H. H., Wei, W. C., Chang, K. J., & Chao, W. T. (2020). Application of trastuzumab emtansine in HER-2-positive and KRAS/BRAF-mutated colon cancer cells. *European Journal of Clinical Investigation*, e13255. doi:10.1111/eci.13255
- Cordell, G. A., & Colvard, M. D. (2005). Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 5-14. doi:10.1016/j.jep.2005.05.027
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., & Verslype, C. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(4), 337-345. doi:10.1056/NEJMoa033025
- Cutsem, E. V., Peeters, M., Siena, S., Humblet, Y., Hendlisz, A., Neyns, B., Canon, J.-L., Laethem, J.-L. V., Maurel, J., & Richardson, G. (2007). Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(13), 1658-1664. doi:10.1200/JCO.2006.08.1620
- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., & Akbarzadeh, A. (2016). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(1), 381-391. doi:10.3109/21691401.2014.953633
- Devi, Y. P., Uma, A., Narasu, M. L., & Kalyani, C. (2014). Anticancer activity of gallic acid on cancer cell lines, HCT-15 and MDA MB 231. *IMPACT : International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences (IMPACT : IJRANSS)*, 2(5), 269-272.
- Dey, D. K., Chang, S. N., Vadlamudi, Y., Park, J. G., & Kang, S. C. (2020). Synergistic therapy with tangeretin and 5-fluorouracil accelerates the ROS/JNK mediated apoptotic pathway in human colorectal cancer cell. *Food and Chemical Toxicology*, 143, 111529. doi:10.1016/j.fct.2020.111529
- Ding, P., Yang, L., Feng, C., & Xian, J.-c. (2019). Research and application of *Alpinia officinarum* in medicinal field. *Chinese Herbal Medicines*, 11(2), 132-140. doi:10.1016/j.chmed.2019.04.003
- Donia, M. B. A. (2003). Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 58(8), 484-497. doi:10.3200/AEOH.58.8.484-497

- Du, B., Jiang, L., Xia, Q., & Zhong, L. (2006). Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy*, 52(1), 23-28. doi:10.1159/000090238
- Efferth, T., Saeed, M. E., Mirghani, E., Alim, A., Yassin, Z., Saeed, E., Khalid, H. E., & Daak, S. (2017). Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. *Oncotarget*, 8(30), 50284-50304. doi:10.18632/oncotarget.17466
- Fakhri, S., Moradi, S. Z., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2020). *Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Farias, C. B. d., Heinen, T. E., Santos, R. P. d., Abujamra, A. L., Schwartzmann, G., & Roesler, R. (2012). BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(2), 328-332. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.091
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., & Kuwano, H. (2007). Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 30(3), 605-613. doi:10.3892/ijo.30.3.605
- Fidan, Ç. (2017). *Ankaferd bloodstopper kanama durdurucu'nun in vitro meme kanseri hücrelerinin çoğalmaları üzerine olan etkisi*. (Yüksek Lisans tezi), Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Flis, S., Gnyszka, A., Krzemińska, I. M., & Sławiński, J. (2009). Decytabine enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin and 5-fluorouracil in the colorectal cancer cell line Colo-205. *Cancer Cell International*, 9(1), 10. doi:10.1186/1475-2867-9-10
- Flis, S., Gnyszka, A., & Sławiński, J. (2009). HDAC inhibitors, MS275 and SBHA, enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin in the colorectal cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(2), 336-341. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.017
- Flis, S., & Splawinski, J. (2009). Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *Anticancer Research*, 29(1), 435-441.
- Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., Bucci, E. O., Finzi, G., Sessa, F., & Noonan, D. M. (2015). Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PLoS One*, 10(2), e0115686. doi:10.1371/journal.pone.0115686
- Fogli, S., Nieri, P., Chicca, A., Adinolfi, B., Mariotti, V., Iacopetti, P., Breschi, M. C., & Pellegrini, S. (2006). Cannabinoid derivatives induce cell death in pancreatic MIA PaCa-2 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS letters*, 580(7), 1733-1739. doi:10.1016/j.febslet.2006.02.024
- Forester, S. C., Choy, Y. Y., Waterhouse, A. L., & Oteiza, P. I. (2014). The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2, 4, 6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Molecular Carcinogenesis*, 53(6), 432-439. doi:10.1002/mc.21974
- Forester, S. C., & Waterhouse, A. L. (2010). Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2, 4, 6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell

- proliferation of Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5320-5327. doi:10.1021/jf9040172
- Foteini, P., Pippa, N., Naziris, N., & Demetzos, C. (2019). Physicochemical study of the protein–liposome interactions: Influence of liposome composition and concentration on protein binding. *Journal of Liposome Research*, 29(4), 313-321. doi:10.1080/08982104.2018.1468774
- Fouquier, J., & Guedj, M. (2015). Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives*, 3(3), e00149. doi:10.1002/prp2.149
- Fritsch, M., Günther, S. D., Schwarzer, R., Albert, M.-C., Schorn, F., Werthenbach, J. P., Schiffmann, L. M., Stair, N., Stocks, H., & Seeger, J. M. (2019). Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*, 575(7784), 683-687. doi:10.1038/s41586-019-1770-6
- Fujie, Y., Yamamoto, H., Ngan, C. Y., Takagi, A., Hayashi, T., Suzuki, R., Ezumi, K., Takemasa, I., Ikeda, M., & Sekimoto, M. (2005). Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 35(8), 453-463. doi:10.1093/jjco/hyi130
- Gauthier, D. B., Delord, J.-P., Rochaix, P., Mallard, V., Thomas, F., Hennebelle, I., Bugat, R., Canal, P., & Allal, C. (2006). In vivo and in vitro antitumor activity of oxaliplatin in combination with cetuximab in human colorectal tumor cell lines expressing different level of EGFR. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 57(6), 709-718. doi:10.1007/s00280-005-0123-3
- Gazzerro, P., Malfitano, A. M., Proto, M. C., Santoro, A., Pisanti, S., Caruso, M. G., Notarnicola, M., Messa, C., Laezza, C., & Misso, G. (2010). Synergistic inhibition of human colon cancer cell growth by the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant and oxaliplatin. *Oncology Reports*, 23(1), 171-175.
- Gehrke, T., Scherzad, A., Ickrath, P., Schendzielorz, P., Hagen, R., Kleinsasser, N., & Hackenberg, S. (2017). Zinc oxide nanoparticles antagonize the effect of Cetuximab on head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer biology & Therapy*, 18(7), 513-518. doi:10.1080/15384047.2017.1323598
- Ghasemi, S., Moradzadeh, M., Mousavi, S., & Sadeghnia, H. (2016). Cytotoxic effects of *Urtica dioica* radix on human colon (HT29) and gastric (MKN45) cancer cells mediated through oxidative and apoptotic mechanisms. *Cellular and Molecular Biology*, 62(9), 90-96.
- Globocan. (2018). CANCER TOMORROW. Erişim adresi: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>
- Green, D. R. (1998). Apoptotic pathways: The Roads to Ruin. *Cell*, 94(6), 695-698. doi:10.1016/S0092-8674(00)81728-6
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Handali, S., Moghimipour, E., Rezaei, M., Ramezani, Z., Kouchak, M., Amini, M., Angali, K. A., Saremy, S., & Dorkoosh, F. A. (2018). A novel 5-Fluorouracil targeted delivery to colon cancer using folic acid conjugated liposomes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 1259-1273. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.128
- Hare, J. I., Lammers, T., Ashford, M. B., Puri, S., Storm, G., & Barry, S. T. (2017). Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: an industry

- perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 108, 25-38. doi:10.1016/j.addr.2016.04.025
- Hari, D. M., Leung, A. M., Lee, J.-H., Sim, M.-S., Vuong, B., Chiu, C. G., & Bilchik, A. J. (2013). AJCC Cancer Staging Manual 7th edition criteria for colon cancer: do the complex modifications improve prognostic assessment? *Journal of the American College of Surgeons*, 217(2), 181-190. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2013.04.018
- Hattori, Y., Shi, L., Ding, W., Koga, K., Kawano, K., Hakoshima, M., & Maitani, Y. (2009). Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors. *Journal of Controlled Release*, 136(1), 30-37. doi:10.1016/j.jconrel.2009.01.013
- He, X. T., Fan, X. M., & Zha, X. L. (2011). Ghrelin inhibits 5-fluorouracil-induced apoptosis in colonic cancer cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(7), 1169-1173. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06715.x
- Hector, S., & Prehn, J. H. (2009). Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1795(2), 117-129. doi:10.1016/j.bbcan.2008.12.002
- Heinrich, M. (2010). 3.12—Ethnopharmacology and drug discovery. *Comprehensive Natural Products II. Elsevier, Oxford*, 3, 351-381.
- Hu, F., Wei, F., Wang, Y., Wu, B., Fang, Y., & Xiong, B. (2015). EGCG synergizes the therapeutic effect of cisplatin and oxaliplatin through autophagic pathway in human colorectal cancer cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 128(1), 27-34. doi:10.1016/j.jphs.2015.04.003
- Huerta, S., Goulet, E. J., & Livingston, E. H. (2006). Colon cancer and apoptosis. *The American Journal of Surgery*, 191(4), 517-526. doi:10.1016/j.amjsurg.2005.11.009
- Hwang, J.-T., Ha, J., Park, I.-J., Lee, S.-K., Baik, H. W., Kim, Y. M., & Park, O. J. (2007). Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Letters*, 247(1), 115-121. doi:10.1016/j.canlet.2006.03.030
- Hwang, J.-T., Ha, J., & Park, O. J. (2005). Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(2), 433-440. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.143
- Iannelli, F., Zotti, A. I., Roca, M. S., Grumetti, L., Lombardi, R., Moccia, T., Vitagliano, C., Milone, M. R., Ciardiello, C., & Bruzzese, F. (2020). Valproic Acid Synergizes With Cisplatin and Cetuximab in vitro and in vivo in Head and Neck Cancer by Targeting the Mechanisms of Resistance. *Frontiers in Cell Developmental Biology*, 8, 732. doi:10.3389/fcell.2020.00732
- Ikehata, M., Ogawa, M., Yamada, Y., Tanaka, S., Ueda, K., & Iwakawa, S. (2014). Different effects of epigenetic modifiers on the cytotoxicity induced by 5-fluorouracil, irinotecan or oxaliplatin in colon cancer cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(1), 67-73. doi:10.1248/bpb.b13-00574
- Ji, Y., Chen, S., Xiao, X., Zheng, S., & Li, K. (2012). β -blockers: a novel class of antitumor agents. *OncoTargets and Therapy*, 5, 391-401. doi:10.2147/OTT.S38403
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H.-Y. M., & Ravagnan, L. (2001). Essential role of the

- mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549-554. doi:10.1038/35069004
- Kardan, M., Rafiei, A., Golpour, M., Ebrahimzadeh, M. A., Niaki, H. A., & Fattahi, S. (2020). Urtica dioica Extract Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in HepG2 and HTC116 as Gastrointestinal Cancer Cell Lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 20(8), 963-969. doi:10.2174/1871520620666200311095836
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584. doi:10.1038/nrc2167
- Kemp, J. A., Shim, M. S., Heo, C. Y., & Kwon, Y. J. (2016). "Combo" nanomedicine: co-delivery of multi-modal therapeutics for efficient, targeted, and safe cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 98, 3-18. doi:10.1016/j.addr.2015.10.019
- Kheirleseid, E. A., Miller, N., & Kerin, M. J. (2013). Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American journal of molecular biology*, 3(2), 72-80. doi:10.4236/ajmb.2013.32010
- Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B., & Houshmand, M. (2015). Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? *Iranian Biomedical Journal*, 19(2), 69-75. doi:10.6091/ibj.1366.2015
- Koo, J. Y., Kim, H. J., Jung, K.-O., & Park, K.-Y. (2004). Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells in vitro and shows synergism with 5-fluorouracil. *Journal of Medicinal Food*, 7(2), 117-121. doi:10.1089/1096620041224229
- Koren, E., & Torchilin, V. P. (2011). Drug carriers for vascular drug delivery. *IUBMB life*, 63(8), 586-595. doi:10.1002/iub.496
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15065. doi:10.1038/nrdp.2015.65
- Lamberti, M., Porto, S., Marra, M., Zappavigna, S., Grimaldi, A., Feola, D., Pesce, D., Naviglio, S., Spina, A., & Sannolo, N. (2012). 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(1), 60. doi:10.1186/1756-9966-31-60
- Lammers, T., Hennink, W., & Storm, G. (2008). Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *British journal of cancer*, 99(3), 392-397. doi:10.1038/sj.bjc.6604483
- Lattanzio, L., Milano, G., Monteverde, M., Tonissi, F., Vivenza, D., Merlano, M., & Lo Nigro, C. (2016). Schedule-dependent interaction between temsirolimus and cetuximab in head and neck cancer: a preclinical study. *Anti-cancer drugs*, 27(6), 533-539. doi:10.1097/CAD.0000000000000360
- Lazikani, B. A., Banerji, U., & Workman, P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature biotechnology*, 30(7), 679-692. doi:10.1038/nbt.2284
- Lei, X., Lv, X., Liu, M., Yang, Z., Ji, M., Guo, X., & Dong, W. (2012). Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(2), 864-868. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.063

- Leong, K. H., Looi, C. Y., Loong, X.-M., Cheah, F. K., Supratman, U., Litaudon, M., Mustafa, M. R., & Awang, K. (2016). Cycloart-24-ene-26-ol-3-one, a new cycloartane isolated from leaves of *Aglaia exima* triggers tumour necrosis factor-receptor 1-mediated caspase-dependent apoptosis in colon cancer cell line. *PLoS One*, *11*(4), e0152652. doi:10.1371/journal.pone.0152652
- Levy, E. M., Sycz, G., Arriaga, J. M., Barrio, M. M., Von Euw, E. M., Morales, S. B., González, M., Mordoh, J., & Bianchini, M. (2009). Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells. *Innate Immunity*, *15*(2), 91-100. doi:10.1177/1753425908101404
- Lian, T., & Ho, R. J. (2001). Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, *90*(6), 667-680. doi:10.1002/jps.1023
- Liang, C.-z., Zhang, X., Li, H., Tao, Y.-q., Tao, L.-j., Yang, Z.-r., Zhou, X.-p., Shi, Z.-l., & Tao, H.-m. (2012). Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, *27*(10), 701-710. doi:10.1089/cbr.2012.1245
- Lima, K. G., Krause, G. C., Schuster, A. D., Catarina, A. V., Basso, B. S., De Mesquita, F. C., Pedrazza, L., Marczak, E. S., Martha, B. A., & Nunes, F. B. (2016). Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *84*, 1282-1290. doi:10.1016/j.biopha.2016.10.048
- Lin, M.-W., Huang, Y.-B., Chen, C.-L., Wu, P.-C., Chou, C.-Y., Wu, P.-C., & Hung, S.-Y. (2016). A formulation study of 5-aminolevulinic acid encapsulated in DPPC liposomes in melanoma treatment. *International Journal of Medical Sciences*, *13*(7), 483-489. doi:10.7150/ijms.15411
- Liu, Z., Li, D., Yu, L., & Niu, F. (2012). Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chemotherapy*, *58*(3), 185-194. doi:10.1159/000337103
- Lo, C., Lai, T.-Y., Yang, J.-H., Yang, J.-S., Ma, Y.-S., Weng, S.-W., Chen, Y.-Y., Lin, J.-G., & Chung, J.-G. (2010). Gallic acid induces apoptosis in A375. S2 human melanoma cells through caspase-dependent and-independent pathways. *International Journal of Oncology*, *37*(2), 377-385. doi:doi.org/10.3892/ijo_00000686
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, *3*(5), 330-338. doi:10.1038/nrc1074
- Luca, T., Barresi, V., Privitera, G., Musso, N., Caruso, M., Condorelli, D., & Castorina, S. (2014). In vitro combined treatment with cetuximab and trastuzumab inhibits growth of colon cancer cells. *Cell proliferation*, *47*(5), 435-447. doi:10.1111/cpr.12125
- Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H. L., Krupitza, G., & Bernhaus, A. (2007). Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, *245*(1-2), 156-162. doi:10.1016/j.canlet.2006.01.001
- Mady, M. M., & Darwish, M. M. (2010). Effect of chitosan coating on the characteristics of DPPC liposomes. *Journal of Advanced Research*, *1*(3), 187-191. doi:10.1016/j.jare.2010.05.008

- Mady, M. M., Fathy, M. M., Youssef, T., & Khalil, W. M. (2012). Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. *Physica Medica*, 28(4), 288-295. doi:10.1016/j.ejmp.2011.10.001
- Majolo, F., Delwing, L. K. d. O. B., Marmitt, D. J., Filho, I. C. B., & Goettert, M. I. (2019). Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters*, 31, 196-207. doi:10.1016/j.phytol.2019.04.003
- Malam, Y., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11), 592-599. doi:10.1016/j.tips.2009.08.004
- Marchetti, P., Galla, D. A., Russo, F. P., Ricevuto, E., Flati, V., Porzio, G., Ficorella, C., & Cifone, M. G. (2004). Apoptosis induced by oxaliplatin in human colon cancer HCT15 cell line. *Anticancer Research*, 24(1), 219-226.
- Marxer, E. E. J., Brüßler, J., Becker, A., Schümmelfeder, J., Schubert, R., Nimsky, C., & Bakowsky, U. (2011). Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions as contrast agents. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(3), 430-437. doi:10.1016/j.ejpb.2010.12.007
- Matsuo, T., Nishizuka, S. S., Ishida, K., Iwaya, T., Ikeda, M., & Wakabayashi, G. (2011). Analysis of the anti-tumor effect of cetuximab using protein kinetics and mouse xenograft models. *BMC Research Notes*, 4(1), 140. doi:10.1186/1756-0500-4-140
- Mayoclinic. (2018). Diagnosis: Screening for colon cancer. Erişim adresi: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/diagnosis-treatment/drc-20353674>
- Mendelsohn, J., & Baselga, J. (2003). Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(14), 2787-2799. doi:10.1200/JCO.2003.01.504
- Meng, S., Su, B., Li, W., Ding, Y., Tang, L., Zhou, W., Song, Y., & Caicun, Z. (2011). Integrin-targeted paclitaxel nanoliposomes for tumor therapy. *Medical Oncology*, 28(4), 1180-1187. doi:10.1007/s12032-010-9621-1
- Menhali, A. A., Al-Rumaihi, A., Al-Mohammed, H., Al-Mazrooey, H., Al-Shamlan, M., AlJassim, M., Al-Korbi, N., & Eid, A. H. (2015). Thymus vulgaris (thyme) inhibits proliferation, adhesion, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 18(1), 54-59. doi:10.1089/jmf.2013.3121
- Meyerhardt, J. A., & Mayer, R. J. (2005). Systemic therapy for colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 352(5), 476-487. doi:10.1056/NEJMra040958
- Mhaidat, N. M., Bouklihacene, M., & Thorne, R. F. (2014). 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C- δ . *Oncology Letters*, 8(2), 699-704. doi:10.3892/ol.2014.2211
- Mirian, M., Zarghi, A., Sadeghi, S., Tabaraki, P., Tavallae, M., Dadrass, O., & Sadeghi-aliabadi, H. (2011). Synthesis and cytotoxic evaluation of some novel sulfonamide derivatives against a few human cancer cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4), 741-748.
- Misaka, S., Miyazaki, N., Fukushima, T., Yamada, S., & Kimura, J. (2013). Effects of green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate on pharmacokinetics of

- nadolol in rats. *Phytomedicine*, 20(14), 1247-1250. doi:10.1016/j.phymed.2013.07.003
- Moghtaderi, H., Sepehri, H., Delphi, L., & Attari, F. (2018). Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. *BioImpacts*, 8(3), 185-194. doi:10.15171/bi.2018.21
- Mohammadian, M., Zeynali, S., Azarbaijani, A. F., Ansari, M. H. K., & Kheradmand, F. (2017). Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 517-525. doi:10.4103/1735-5362.217432
- Mohan, S., Abdelwahab, S. I., Kamalidehghan, B., Syam, S., May, K. S., Harmal, N. S. M., Shafifiyaz, N., Hadi, A. H. A., Hashim, N. M., & Rahmani, M. (2012). Involvement of NF- κ B and Bcl2/Bax signaling pathways in the apoptosis of MCF7 cells induced by a xanthone compound Pyranocycloartobiloxanthone A. *Phytomedicine*, 19(11), 1007-1015. doi:10.1016/j.phymed.2012.05.012
- Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022-38043. doi:10.18632/oncotarget.16723
- Montopoli, M., Ragazzi, E., Froidi, G., & Caparrotta, L. (2009). Cell-cycle inhibition and apoptosis induced by curcumin and cisplatin or oxaliplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cell proliferation*, 42(2), 195-206. doi:10.1111/j.1365-2184.2009.00585.x
- Moon, J. Y., Cho, M., Ahn, K. S., & Cho, S. K. (2013). Nobiletin induces apoptosis and potentiates the effects of the anticancer drug 5-fluorouracil in p53-mutated SNU-16 human gastric cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 65(2), 286-295. doi:10.1080/01635581.2013.756529
- Munteanu, I., & Mastalier, B. (2014). Genetics of colorectal cancer. *Journal of Medicine and Life*, 7(4), 507-511.
- Nagaraja, A. S., Sadaoui, N. C., Lutgendorf, S. K., Ramondetta, L. M., & Sood, A. K. (2013). β -blockers: a new role in cancer chemotherapy? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(11), 1359-1363. doi:10.1517/13543784.2013.825250
- Nannizzi, S., Veal, G. J., Giovannetti, E., Mey, V., Ricciardi, S., Ottley, C. J., Del Tacca, M., & Danesi, R. (2010). Cellular and molecular mechanisms for the synergistic cytotoxicity elicited by oxaliplatin and pemetrexed in colon cancer cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66(3), 547-558. doi:10.1007/s00280-009-1195-2
- Narvi, E., Vaparanta, K., Karrila, A., Chakroborty, D., Knuutila, S., Pulliainen, A., Sundvall, M., & Elenius, K. (2018). Different responses of colorectal cancer cells to alternative sequences of cetuximab and oxaliplatin. *Scientific Reports*, 8(1), 16579. doi:10.1038/s41598-018-34938-y
- Nicolantonio, F. D., Martini, M., Molinari, F., Bianchi, A. S., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., & Siena, S. (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(35), 5705-5712. doi:10.1200/JCO.2008.18.0786
- Park, M. H., Hong, J. E., Hwang, C. J., Choi, M., Choi, J. S., An, Y. J., Son, D. J., & Hong, J. T. (2016). Synergistic inhibitory effect of cetuximab and tectochrysin on

- human colon cancer cell growth via inhibition of EGFR signal. *Archives of Pharmacol Research*, 39(5), 721-729. doi:10.1007/s12272-016-0735-7
- Pattni, B. S., Chupin, V. V., & Torchilin, V. P. (2015). New developments in liposomal drug delivery. *Chemical reviews*, 115(19), 10938-10966. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00046
- Pemovska, T., Bigenzahn, J. W., & Furga, G. S. (2018). Recent advances in combinatorial drug screening and synergy scoring. *Current Opinion in Pharmacology*, 42, 102-110. doi:10.1016/j.coph.2018.07.008
- Pezzani, R., Salehi, B., Vitalini, S., Iriti, M., Zuñiga, F. A., Sharifi-Rad, J., Martorell, M., & Martins, N. (2019). Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: An update on the cancer perspective. *Medicina*, 55(4), 110. doi:10.3390/medicina55040110
- Pinto, A. C., Moreira, J. N., & Simões, S. (2011). Combination chemotherapy in cancer: Principles, evaluation and drug delivery strategies. In *Current Cancer Treatment- Novel Beyond Conventional Approaches*: IntechOpen.
- Raeisi, S., Chavoshi, H., Mohammadi, M., Ghorbani, M., Sabzichi, M., & Ramezani, F. (2019). Naringenin-loaded nano-structured lipid carrier fortifies oxaliplatin-dependent apoptosis in HT-29 cell line. *Process Biochemistry*, 83, 168-175. doi:10.1016/j.procbio.2019.05.013
- Rakitina, T. V., Vasilevskaya, I. A., & O'Dwyer, P. J. (2007). Inhibition of G1/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines. *Biochemical pharmacology*, 73(11), 1715-1726. doi:10.1016/j.bcp.2007.01.037
- Raymond, E., Chaney, S., Taamma, A., & Cvitkovic, E. (1998). Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Annals of Oncology*, 9(10), 1053-1071. doi:10.1023/a:1008213732429
- Reddy, T. C., Reddy, D. B., Aparna, A., Arunasree, K. M., Gupta, G., Achari, C., Reddy, G., Lakshmipathi, V., Subramanyam, A., & Reddanna, P. (2012). Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: Downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF- κ B inactivation. *Toxicology in vitro*, 26(3), 396-405. doi:10.1016/j.tiv.2011.12.018
- Rejhova, A., Opattova, A., Čumová, A., Slíva, D., & Vodička, P. (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European journal of medicinal chemistry*, 144, 582-594. doi:10.1016/j.ejmech.2017.12.039
- Reynolds, N. A., & Wagstaff, A. J. (2004). Cetuximab In the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Drugs*, 64(1), 109-118. doi:10.2165/00003495-200464010-00007
- Richard, S. M., & Marignac, V. L. M. (2015). Sensitization to oxaliplatin in HCT116 and HT29 cell lines by metformin and ribavirin and differences in response to mitochondrial glutaminase inhibition. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 11(2), 336-340. doi:10.4103/0973-1482.157317
- Rivera, D. G., Delgado, R., Bougarne, N., Haegeman, G., & Berghe, W. V. (2011). Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of *Mangifera indica* L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. *Cancer Letters*, 305(1), 21-31. doi:10.1016/j.canlet.2011.02.011
- Rosa, G. P., Tavares, W. R., Sousa, P., Seca, A. M., & Pinto, D. C. (2020). Seaweed secondary metabolites with beneficial health effects: An overview of successes in

- in vivo studies and clinical trials. *Marine drugs*, 18(1), 8. doi:10.3390/md18010008
- Seresht, H. R., Cheshomi, H., Falanji, F., Motlagh, F. M., Hashemian, M., & Mireskandari, E. (2019). Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 9(6), 574-586. doi:10.22038/AJP.2019.13475
- Sharma, R., Gatchie, L., Williams, I. S., Jain, S. K., Vishwakarma, R. A., Chaudhuri, B., & Bharate, S. B. (2017). Glycyrrhiza glabra extract and quercetin reverses cisplatin resistance in triple-negative MDA-MB-468 breast cancer cells via inhibition of cytochrome P450 1B1 enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(24), 5400-5403. doi:10.1016/j.bmcl.2017.11.013
- Sidorov, P., Naulaerts, S., Bonnet, J. A., Pasquier, E., & Ballester, P. (2019). Predicting synergism of cancer drug combinations using NCI-ALMANAC data. *Frontiers in Chemistry*, 7, 509. doi:10.3389/fchem.2019.00509
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21590
- Solmi, R., Lauriola, M., Francesconi, M., Martini, D., Voltattorni, M., Ceccarelli, C., Ugolini, G., Rosati, G., Zanotti, S., & Montroni, I. (2008). Displayed correlation between gene expression profiles and submicroscopic alterations in response to cetuximab, gefitinib and EGF in human colon cancer cell lines. *BMC Cancer*, 8(1), 227. doi:10.1186/1471-2407-8-227
- Soloneski, S., Kujawski, M., Scuto, A., & Larramendy, M. L. (2015). Carbamates: a study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in vitro*, 29(5), 834-844. doi:10.1016/j.tiv.2015.03.011
- Sourani, Z., Pourgheysari, B., Beshkar, P., Shirzad, H., & Shirzad, M. (2016). Gallic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in lymphoblastic leukemia cell line (C121). *Iranian Journal of Medical Sciences*, 41(6), 525.
- Sourani, Z., Shirzad, H., Shirzad, M., & Pourgheysari, B. (2017). Interaction between gallic acid and asparaginase to potentiate anti-proliferative effect on lymphoblastic leukemia cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 1045-1054. doi:10.1016/j.biopha.2017.11.122
- Srimuangwong, K., Tocharus, C., Chintana, P. Y., Suksamrarn, A., & Tocharus, J. (2012). Hexahydrocurcumin enhances inhibitory effect of 5-fluorouracil on HT-29 human colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 18(19), 2383-2389. doi:10.3748/wjg.v18.i19.2383
- Stein, A., Atanackovic, D., & Bokemeyer, C. (2011). Current standards and new trends in the primary treatment of colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 47, 312-314. doi:10.1016/S0959-8049(11)70183-6
- Stoman, D. d. P., Preez, J. d., & Venter, M. v. d. (2011). Combination treatment with oxaliplatin and mangiferin causes increased apoptosis and downregulation of NFκB in cancer cell lines. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(2), 177-184. doi:10.4314/ajtcam.v8i2.63206
- Subramanian, A. P., Jaganathan, S. K., Mandal, M., Supriyanto, E., & Muhamad, I. I. (2016). Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 22(15), 3952-3961. doi:10.3748/wjg.v22.i15.3952
- Subramanian, A. P., John, A., Vellayappan, M., Balaji, A., Jaganathan, S., Supriyanto, E., & Yusof, M. (2015). Gallic acid: prospects and molecular mechanisms of its

- anticancer activity. *RSC Advances*, 5(45), 35608-35621. doi:10.1039/C5RA02727F
- Sugikawa, K., Kadota, T., Yasuhara, K., & Ikeda, A. (2016). Anisotropic Self-Assembly of Citrate-Coated Gold Nanoparticles on Fluidic Liposomes. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(12), 4059-4063. doi:10.1002/anie.201511785
- Sun, G., Zhang, S., Xie, Y., Zhang, Z., & Zhao, W. (2016). Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Letters*, 11(1), 150-158. doi:10.3892/ol.2015.3845
- Suzuki, R., Kang, Y. a., Li, X., Roife, D., Zhang, R., & Fleming, J. B. (2014). Genistein potentiates the antitumor effect of 5-Fluorouracil by inducing apoptosis and autophagy in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Research*, 34(9), 4685-4692.
- Swaminathan, J., & Ehrhardt, C. (2011). Liposomes for Pulmonary Drug Delivery. In H. D. C. Smyth & A. J. Hickey (Eds.), *Controlled Pulmonary Drug Delivery* (pp. 313-334). New York, NY: Springer New York.
- Szczeń, A. (2013). Effects of DPPC/Cholesterol liposomes on the properties of freshly precipitated calcium carbonate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 44-48. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.06.013
- Tang, X.-y., Zhu, Y.-q., Tao, W.-h., Wei, B., & Lin, X.-l. (2007). Synergistic effect of triptolide combined with 5-fluorouracil on colon carcinoma. *Postgraduate Medical Journal*, 83(979), 338-343. doi:10.1136/pgmj.2006.055426
- Terzuoli, E., Nannelli, G., Frosini, M., Giachetti, A., Ziche, M., & Donnini, S. (2017). Inhibition of cell cycle progression by the hydroxytyrosol–cetuximab combination yields enhanced chemotherapeutic efficacy in colon cancer cells. *Oncotarget*, 8(47), 83207-83224.
- Thompson, A. K., Couchoud, A., & Singh, H. (2009). Comparison of hydrophobic and hydrophilic encapsulation using liposomes prepared from milk fat globule-derived phospholipids and soya phospholipids. *Dairy Science and Technology*, 89(1), 99-113. doi:10.1051/dst/2008036
- Tong, J., Xie, G., He, J., Li, J., Pan, F., & Liang, H. (2011). Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011(740564). doi:10.1155/2011/740564
- Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), 145-160. doi:10.1038/nrd1632
- Troiani, T., Napolitano, S., Vitagliano, D., Morgillo, F., Capasso, A., Sforza, V., Nappi, A., Ciardiello, D., Ciardiello, F., & Martinelli, E. (2014). Primary and acquired resistance of colorectal cancer cells to anti-EGFR antibodies converge on MEK/ERK pathway activation and can be overcome by combined MEK/EGFR inhibition. *Clinical Cancer Research*, 20(14), 3775-3786. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2181
- Tsai, C. L., Chiu, Y.-M., Ho, T.-Y., Hsieh, C.-T., Shieh, D.-C., Lee, Y.-J., Tsay, G. J., & Wu, Y.-Y. (2018). Gallic acid induces apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Anticancer Research*, 38(4), 2057-2067. doi:10.21873/anticancer.12445
- Udofot, O., Affram, K., & Bridg'ette Israel, E. A. (2015). Cytotoxicity of 5-fluorouracil-loaded pH-sensitive liposomal nanoparticles in colorectal cancer cell lines. *Integrative cancer science therapeutics*, 2(5), 245-252. doi:10.15761/ICST.1000150

- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews*, 99(11), 3181-3198. doi:10.1021/cr940351u
- Vahed, S. Z., Salehi, R., Davaran, S., & Sharifi, S. (2017). Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1327-1341. doi:10.1016/j.msec.2016.11.073
- Varghese, V., Magnani, L., Harada-Shoji, N., Mauri, F., Szydlo, R. M., Yao, S., Lam, E. W.-F., & Kenny, L. M. (2019). FOXM1 modulates 5-FU resistance in colorectal cancer through regulating TYMS expression. *Scientific Reports*, 9(1), 1505. doi:10.1038/s41598-018-38017-0
- Virag, P., Fischer-Fodor, E., Perde-Schrepler, M., Brie, I., Tatomir, C., Balacescu, L., Berindan-Neagoe, I., Victor, B., & Balacescu, O. (2013). Oxaliplatin induces different cellular and molecular chemoresistance patterns in colorectal cancer cell lines of identical origins. *BMC Genomics*, 14(1), 480. doi:10.1186/1471-2164-14-480
- Vlot, A. H., Aniceto, N., Menden, M. P., Merzenich, G. U., & Bender, A. (2019). Applying synergy metrics to combination screening data: agreements, disagreements and pitfalls. *Drug Discovery Today*, 24(12), 2286-2298. doi:10.1016/j.drudis.2019.09.002
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2002). *The genetic basis of human cancer*: McGraw-Hill.
- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413-431. doi:10.1016/j.cell.2009.04.037
- Wang, J., Liu, W., Zhao, Q., Qi, Q., Lu, N., Yang, Y., Nei, F.-F., Rong, J.-J., You, Q.-D., & Guo, Q.-L. (2009). Synergistic effect of 5-fluorouracil with gambogic acid on BGC-823 human gastric carcinoma. *Toxicology*, 256(1-2), 135-140. doi:10.1016/j.tox.2008.11.014
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., & Xue, D. (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 298(5598), 1587-1592. doi:10.1126/science.1076194
- Watson, A. (2004). Apoptosis and colorectal cancer. *Gut*, 53(11), 1701-1709. doi:10.1136/gut.2004.052704
- WHO. (2018). Latest global cancer data. Erişim adresi: <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., & Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, 200, 138-157. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.030
- Wu, Z., Huang, M., Gong, Y., Lin, C., & Guo, W. (2018). BRAF and EGFR inhibitors synergize to increase cytotoxic effects and decrease stem cell capacities in BRAF (V600E)-mutant colorectal cancer cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(4), 355-361. doi:10.1093/abbs/gmy018
- Xavier, C. P., Lima, C. F., Rohde, M., & Wilson, C. P. (2011). Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(6), 1449-1457. doi:10.1007/s00280-011-1641-9
- Xiang, Z., Kang, Q., & Xiang, X. (2015). Gene and protein expression in the oxaliplatin-resistant HT29/L-OHP human colon cancer cell line. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 11013-11022. doi:10.4238/2015.September.21.14

- Xu, W.-L., Liu, J.-R., Liu, H.-K., Qi, G.-Y., Sun, X.-R., Sun, W.-G., & Chen, B.-Q. (2009). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by γ -tocotrienol in human colon carcinoma HT-29 cells. *Nutrition*, 25(5), 555-566. doi:10.1016/j.nut.2008.10.019
- Yang, S. Y., Sales, K. M., Fuller, B., Seifalian, A. M., & Winslet, M. C. (2009). Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 15(5), 225-233. doi:10.1016/j.molmed.2009.03.003
- Yeh, R.-D., Chen, J.-C., Lai, T.-Y., Yang, J.-S., Yu, C.-S., Chiang, J.-H., Lu, C.-C., Yang, S.-T., Yu, C.-C., & Chang, S.-J. (2011). Gallic acid induces G0/G1 phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway. *Anticancer Research*, 31(9), 2821-2832.
- Yip, K., & Reed, J. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27(50), 6398-6406. doi:10.1038/onc.2008.307
- You, B. R., Moon, H. J., Han, Y. H., & Park, W. H. (2010). Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5), 1334-1340. doi:10.1016/j.fct.2010.02.034
- You, B. R., & Park, W. H. (2010). Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicology in vitro*, 24(5), 1356-1362. doi:10.1016/j.tiv.2010.04.009
- Yusuf, A., & Casey, A. (2020). Liposomal encapsulation of silver nanoparticles (AgNP) improved nanoparticle uptake and induced redox imbalance to activate caspase-dependent apoptosis. *Apoptosis*, 25, 120-134. doi:10.1007/s10495-019-01584-2
- Zaidi, S., Atrooz, F., Valdez, D., Liu, H., Kochi, C., Bond, R. A., & Salim, S. (2020). Protective effect of propranolol and nadolol on social defeat-induced behavioral impairments in rats. *Neuroscience Letters*, 134892. doi:10.1016/j.neulet.2020.134892
- Zenginer, B. D. (2017). *Ankaferd bloodstopper kanama durdurucu'nun in vitro kolon kanseri hücrelerinin çoğalmaları üzerine olan etkisi*. (Yüksek Lisans tezi), Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Zhang, B., Wang, T., Yang, S., Xiao, Y., Song, Y., Zhang, N., & Garg, S. (2016). Development and evaluation of oxaliplatin and irinotecan co-loaded liposomes for enhanced colorectal cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 238, 10-21. doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.022
- Zhang, L., & Yu, J. (2013). Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. *Current Colorectal Cancer Reports*, 9(4), 331-340. doi:10.1007/s11888-013-0188-z
- Zhang, R. X., Wong, H. L., Xue, H. Y., Eoh, J. Y., & Wu, X. Y. (2016). Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy—Strategies and perspectives. *Journal of Controlled Release*, 240, 489-503. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.012
- Zhao, Q., Wang, J., Zou, M.-J., Hu, R., Zhao, L., Qiang, L., Rong, J.-J., You, Q.-D., & Guo, Q.-L. (2010). Wogonin potentiates the antitumor effects of low dose 5-fluorouracil against gastric cancer through induction of apoptosis by down-regulation of NF-kappaB and regulation of its metabolism. *Toxicology letters*, 197(3), 201-210. doi:10.1016/j.toxlet.2010.05.019
- Zhu, W., Li, Y., Liu, L., Chen, Y., & Xi, F. (2012). Supramolecular hydrogels as a universal scaffold for stepwise delivering Dox and Dox/cisplatin loaded block

copolymer micelles. *International journal of pharmaceutics*, 437(1-2), 11-19.
doi:10.1016/j.ijpharm.2012.08.007

ÖZGEÇMİŞ

2012 yılında, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden lisans derecesi ile mezun oldum. 2014 yılında, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalından yüksek lisans derecesi ile mezun oldum. 2015 yılında, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında doktora eğitimi ve öğretimime başladım.

BİLİMSEL FAALİYETLER

A. YAYINLAR

A1.Özer, B.O., Çete, S. (2017). Development of a novel biosensor based on a polypyrrole–dodecylbenzene sulphonate (PPy–DBS) film for the determination of amperometric cholesterol. *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(4), 824-832. doi:doi.org/10.1080/21691401.2016.1178133

B. BİLDİRİLER

B1.Özer, B.O., Dıbirdık İ., Gallic acid, a natural polyphenolic acid, inhibits the growth of HT-29 human colon adenocarcinoma cells in vitro, 2nd International Conference on “Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry: Advances and Challenges in Understanding the Mechanism of Diseases, Ankara, Türkiye, 24-26 Ekim 2019. (Doktora tezinden)

B2.Özer, B.O., ‘‘Kolesterol tayini için yeni bir biyosensör geliştirilmesi’’, 1. Ulusal Biyosensör Kongresi, Tekirdağ, Türkiye, 22-26 Haziran 2014, ss.1-1

C. PROJELER

C1.HT-29 İnsan Kolon Kanseri Modeli İle Yeni Terapötik Modalitelerin Geliştirilmesi. Trakya Üniversitesi, BAP, Proje kodu: 2017/222, Araştırmacı.

C2.Yeni nesil kanser terapisi için bir yaklaşım: G4-DNA’yı kararlı kılan floren/fluorenon temelli yeni nesil floresans ligandların sentezi, ligand-DNA etkileşim mekanizmalarının ve antitelomeraz aktivitesinin incelenmesi. TÜBİTAK, Proje kodu: 113Z704, Bursiyer.

C3.Kolesterol tayini için amperometrik bir biyosensör hazırlanması. Gazi Üniversitesi, BAP, Proje kodu: 05/2013-04, Araştırmacı.