



**7-DEAZAHİPOKSANTİN VE MİTOKSANTRON'UN
CACO-2 HÜCRELERİNDE ANTİKANSER
ÜZERİNDEKİ SİNERJİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Elif AKSAKAL

**Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2022
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**7-DEAZAHİPOKSANTİN VE MİTOKSANTRON'UN CACO-2 HÜCRELERİNDE
ANTİKANSER ÜZERİNDEKİ SİNERJİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of Synergistic Effect of 7-Deazahypoxanthine and Mitoxantrone on Anti-
cancer in Caco-2 Cells)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif AKSAKAL

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Erzurum
Ocak, 2022



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**7-DEAZAHİPOKSANTİN VE MİTOKSANTRON'UN CACO-2 HÜCRELERİNDE
ANTİKANSER ÜZERİNDEKİ SİNERJİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Elif AKSAKAL tarafından hazırlanan bu çalışma, 11/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (oybirliği)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Harun BUDAK <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun/.../.... tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında sunulan “7-Deazahipoksantin ve Mitoksantron’un Caco-2 Hücrelerinde Antikanser Üzerindeki Sinerjik Etkisinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	8	30
Kuramsal Temeller	2	30
Materyal ve Yöntem	10	35
Bulgular	5	20
Tartışma	2	20
Tezin Geneli	4	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Elif AKSAKAL	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
17.1.2022	17.1.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışma sürecimde yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürüttüğüm Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) Müdürü Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a, bilgi ve tecrübelerinden her daim yararlandığım ve desteklerini hissettiğim çok değerli Müdür Yardımcısı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e, DAYTAM'da görev yapan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferhunde AYSİN'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aslı YILMAZ'a teşekkür ederim.

Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve her daim yakın ilgisini hissettiğim, hiçbir yardım ve desteği esirgemeyen Ardahan Üniversitesi öğretim üyesi çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e teşekkür ederim.

Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Arzu ALA GÖRMEZ'e, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatma Betül ÖZGERİŞ'e ve Erzurum Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ'e gösterdikleri ilgiden ve verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sürecinde desteğini her zaman hissettiğim, benimle değerli bilgilerini paylaşan Sayın Kübra SOLAK'a, tez çalışma sürecimde her daim yanımda olan ve desteğini esirgemeyen değerli dostum Sayın Merve YILDIRIM'a ve değerli dostum Funda DORU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sürecinde desteklerini esirgemeyen Sayın Neslişah BARLAK'a, çalışma arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Emine KARACA'ya, Sayın Şükran GÜNAYDIN'a, Sayın Bükre ERTANO'ya, Sayın Şeyda Nur KALIN'a ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her daim maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan çok değerli babam Sayın Naci AKSAKAL'a, annem Sayın Dilek AKSAKAL'a ve kardeşlerim Esmâ ve M. Enes AKSAKAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif AKSAKAL

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

7-DEAZAHİPOKSANTİN VE MİTOKSANTRON’UN CACO-2 HÜCRELERİNDE ANTİKANSER ÜZERİNDEKİ SİNERJİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif AKSAKAL

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Amaç: Bu tez çalışmasında insan kolon kanser hücre hattında (Caco-2) 7-deazahipoksantin (7-DHX) ile mitoksantronun (MTX) kombinasyon tedavisi ile antikanser üzerindeki sinerjik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 7-DHX ve MTX’in ayrı ayrı ve birlikte insan kolon kanser hücre hattı (Caco-2) üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etkileri metabolik sitotoksikite testi olan MTT testi ile *in vitro* olarak araştırıldı. MTT test sonuçlarını doğrulamak ve bu ajanların Caco-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla LDH testi yapıldı. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX’in Caco-2 hücrelerinin total protein miktarı üzerindeki etkileri SRB testi ile incelendi. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX’in Caco-2 hücrelerinin apoptozu ve nekrozu üzerindeki etkileri Annexin V-FITC/PI boyama metodu ile, hücrelerin migrasyonu üzerindeki etkileri yara iyileştirme (wound healing assay) testi ile ve koloni oluşturabilme yetenekleri üzerindeki etkileri ise klonojenik test ile araştırıldı.

Bulgular: Kombine 7-DHX/MTX’in doz ve zaman bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinde antiproliferatif ve sitotoksik etki gösterdiği, hücrelerde apoptozu ve nekrozu indüklediği, hücrelerin migrasyonunu zaman bağımlı olarak engellediği ve hücrelerin proliferasyonunu ve koloni oluşturmalarını önemli ölçüde azalttığı saptanmış, böylece Caco-2 hücreleri üzerinde sinerjik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Kombine 7-DHX/MTX’in Caco-2 hücreleri üzerinde sinerjik etki göstererek antikanser aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: caco-2 hücreleri, 7-deazahipoksantin, mitoksantron, sinerjik etki, antikanser, kemoterapötik ajan

Ocak 2022, 114 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

INVESTIGATION OF SYNERGISTIC EFFECT OF 7-DEAZAHYPOXANTHINE AND MITOXANTRONE ON ANTI-CANCER IN CACO-2 CELLS

Elif AKSAKAL

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Purpose: In this thesis study, it was aimed to investigate the synergistic effects of 7-deazahypoxanthine (7-DHX) and mitoxantrone (MTX) with combination treatment on anticancer in human colon cancer cell line (Caco-2).

Method: As dose and time dependent antiproliferative effects of 7-DHX and MTX on the human colon cancer cell line (Caco-2) separately and together were investigated as *in vitro* with the MTT test, which is a metabolic cytotoxicity test. LDH test was performed to confirm the MTT test results and with aim determine the cytotoxic effects of these agents on Caco-2 cells. The effects of 7-DHX, MTX and combined 7-DHX/MTX on the total protein amount of Caco-2 cells were examined with SRB assay. Effects of 7-DHX, MTX and combined 7-DHX/MTX on apoptosis and necrosis of Caco-2 cells with Annexin V-FITC/PI staining method, effects on cell migration with wound healing assay and effects on colony formation abilities, the effects on were investigated by clonogenic test.

Findings: It was determined that combined 7-DHX/MTX as dose and time-dependently which is indicated antiproliferative and cytotoxic effects on Caco-2 cells, induced apoptosis and necrosis in cells, as time dependently inhibited cells migration, and significantly, it is determine to reduced important measure being cells proliferation and colony formation, so it has been determined that it has a synergistic effect on Caco-2 cells.

Results: Combined 7-DHX/MTX was determined to have anticancer activity by showing a synergistic effect on Caco-2 cells.

Keywords: caco-2 cells, 7-deazahypoxanthine, mitoxantrone, synergistic effect, anticancer, chemotherapeutic agent.

January 2022, 114 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xii
GİRİŞ.....	1
Kanser.....	1
Kanserde Tedavi Yaklaşımları	2
Kemoterapi	2
Radyoterapi.....	3
İmmünoterapi	3
Kök hücre tedavisi.....	8
İnce ve Kalın Bağırsak	10
Kolonrektal Kanser ve Tanı Yöntemleri	13
Kolonoskopi	15
Sigmoidoskopi.....	16
DCBE yöntemi	16
Bilgisayarlı tomografi (BT taraması)	16
Caco-2 Hücre Hattı.....	17
Kolonrektal Kanser ve Metastaz	18
Kolonrektal Kanser ve Apoptoz	19
Hücre İskeleti ve Elemanları	22
Aktin filamentleri	23
Ara filamentler.....	23
Septinler.....	24
Mikrotübüller.....	24
Topoizomerazlar.....	27
Topoizomeraz 2 (TOP2) İnhibitörleri	28

Çoklu İlaç Terapisi	29
Deniz Alkaloidleri	30
7-Deazahipoksantin (7-DHX)	30
Mitoksantron (MTX)	31
KURAMSAL TEMELLER.....	34
MATERYAL VE METOT	38
Kullanılan Kimyasallar.....	38
Kullanılan Materyal ve Cihazlar	39
Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	40
İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattının (Caco-2) Kültüre Alınması; 7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX ile Muamele Edilmesi ve Antikanser Etkilerinin Araştırılması. 41	
Caco-2 kanser hücre hattının kültüre alınması	41
7-DHX ve MTX'in hazırlanması.....	42
MTT testi	42
Laktat dehidrogenaz (LDH) testi.....	44
Sulforhodamine B (SRB) testi.....	45
Apoptoz testi.....	47
Yara iyileştirme (wound healing assay) testi.....	48
Klonojenik test.....	50
İstatistiksel Analiz	51
ARAŞTIRMA BULGULARI	52
7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif Etkileri.....	52
7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri	56
7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX /MTX'in Caco-2 Hücrelerinin Total Protein Miktarı Üzerindeki Etkileri	58
7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücrelerinin Apoptozu ve Nekrozu Üzerindeki Etkileri	61
7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücrelerinin Migrasyonu Üzerindeki Etkileri	65
7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yetenekleri Üzerindeki Etkileri.....	68
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	70
Tartışma ve Sonuç	70

Sonuç ve Öneriler	74
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	98



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	38
Tablo 2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyaller.....	39
Tablo 3. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar.....	39
Tablo 4. Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser hücrelerinin düzensiz ve kontrolsüz bölünmesinin şematik gösterimi.	2
Şekil 2. İnce bağırsak bölümlerinin şematik gösterimi.	11
Şekil 3. Kalın bağırsak bölümlerinin şematik gösterimi.	12
Şekil 4. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2020 yılına ait dünyadaki (A) kolon ve (B) rektum kanserlerinin yaşa ve cinsiyete bağlı insidans oranları.....	14
Şekil 5. Kolorektal kanser gelişiminin şematik gösterimi.....	15
Şekil 6. Kanser hücre metastazının şematik gösterimi.....	18
Şekil 7. 7-DHX'in kimyasal yapısı	31
Şekil 8. MTX'in kimyasal yapısı	31
Şekil 9. İnsan kolon kanser hücre hattının (Caco-2) 10X büyütmedeki mikroskop görüntüsü.....	41
Şekil 10. MTT'nin formazana enzimatik redüksiyonu.	42
Şekil 11. Laktik asitin pirüvata katalizlenme reaksiyonu	44
Şekil 12. SRB'nin kimyasal yapısı.....	45
Şekil 13. Yara iyileştirme testi aşamalarının şematik gösterimi.	49
Şekil 14. 7-DHX'in doz (0,05-50 μ M) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri.	52
Şekil 15. 7-DHX'in doz (0,05-50 μ M) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri	53
Şekil 16. MTX'in doz (0,05-50 μ M) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri.	53
Şekil 17. MTX'in doz (0,05-50 μ M) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri.	54
Şekil 18. 7-DHX ve MTX'in birlikte doz (0,05-3,2 μ M) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki sinerjik antiproliferatif etkileri	55
Şekil 19. 7-DHX ve MTX'in birlikte doz (0,05-3,2 μ M) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki sinerjik antiproliferatif etkileri	55
Şekil 20. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri	57
Şekil 21. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri	58
Şekil 22. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin total protein miktarı üzerindeki etkileri.....	59

Şekil 23. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin total protein miktarı üzerindeki etkileri.....	60
Şekil 24. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin apoptozu ve nekrozu üzerindeki etkileri	62
Şekil 25. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin apoptozu ve nekrozu üzerindeki etkileri	64
Şekil 26. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (6, 12, 24 ve 48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkileri.....	67
Şekil 27. (A) Kristal violenin 590 nm dalga boyunda, düşük ve yüksek konsantrasyonda gösterdiği pikin spektrofotometrik analiz sonucu. (B) 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin koloni oluşturmaları üzerindeki etkileri	69



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABP	: Aktin bağlayıcı protein
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AML	: Akut miyeloid lösemi
APC	: Antijen sunucu hücre
ApF1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ASC	: Yetişkin kök hücre
Ca⁺²	: Kalsiyum
CAD	: Kaspaz aktive edici DNase
CAR-T	: Kimerik antijen reseptör T
CD	: Crohn hastalığı
CRC	: Kolorektal kanser
CTL	: Sitotoksik T lenfosit
CTLA-4	: Sitotoksik T lenfosit ile ilişkili molekül 4
D.K.	: Düşük konsantrasyon
DC	: Dendritik hücre
DISC	: Ölümü indükleyen sinyal kompleksi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
ESC	: Embriyonik kök hücre
FADD	: Fas ilişkili ölüm alanı proteini
FBS	: Fetal Bovin Serum
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
g	: Gram
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
GI	: Gastrointestinal
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
GZM A	: Granzim A
GZM B	: Granzim B
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
hTop 1	: İnsan topoizomeras 1
hTop 2	: İnsan topoizomeras 2
IBD	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı

IC₅₀	: Hücre proliferasyonunu %50 azaltmak için gereken konsantrasyon
ICAD	: İnaktif kaspaz aktive edici DNase
IEC	: Bağırsak epitel hücreleri
IFN-α	: İnterferon α
IL-2	: İnterlökin 2
IMRT	: Yoğunluk ayarlı radyasyon tedavisi
IPSC	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
IR	: İyonlaştırıcı radyasyon
LIF	: Lösemi inhibitör faktör
MHC	: Majör doku uygunluk kompleksi
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MOMP	: Mitokondriyal dış zar geçirgenliği
MS	: Multipl skleroz
MTX	: Mitoksantron
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NK hücreleri	: Doğal öldürücü hücreler
nm	: Nanometre
PBS	: Fosfat Buffer Salin
PD-1	: Programlanmış hücre ölüm reseptörü 1
PD-L1	: Programlanmış hücre ölüm reseptörü ligandı 1
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
SBRT	: Stereotaktik vücut radyasyon tedavisi
TCL	: Tümör hücre lizatı
TCR-T	: T hücresi reseptör T
TMÇ	: Tümör mikroçevre
TNF	: Tümör nekroz faktör
TOP 2	: Topoizomeraz 2
Topo I	: Topoizomeraz 1
Topo II	: Topoizomeraz 2
UC	: Ülseratif kolit
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
Y.K.	: Yüksek konsantrasyon

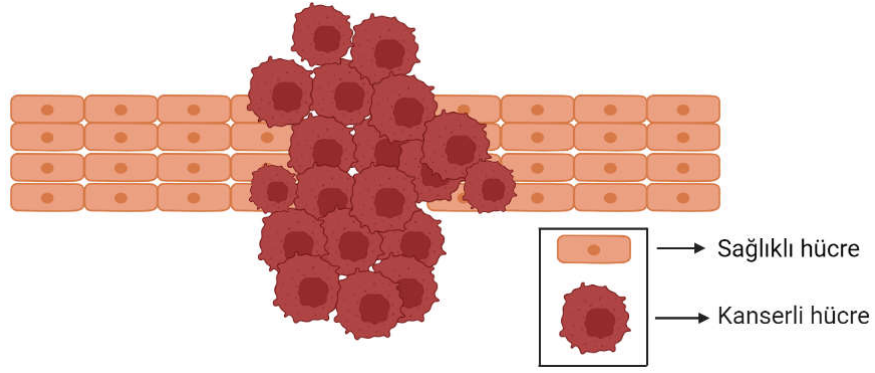
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
7-DHX	: 7-deazahipoksantin



GİRİŞ

Kanser

Kanser; normal hücrelerin bölünme hızında, hasarlı hücre ölümünün indüksiyonunda, hücre döngüsü düzenleyicilerinin ve sinyallerinin aktivitesinde değişikliklere sebep olan düzensiz veya kontrolsüz hücre bölünmesidir (Şekil 1) (Pimm *et al.*, 2020). Toplumumuzu etkileyen en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir ve dünya çapında önde gelen ölüm nedenini oluşturmaktadır (Sung *et al.*, 2021). 2020 yılında dünyada kansere bağlı 10 milyon kişinin öldüğü ve yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakasının olduğu GLOBOCAN'dan alınan verilerle gösterilmiştir (Sung *et al.*, 2021). Kanser vakalarının ve ölümlerin yarısından fazlasının düşük ve orta gelirli ülkelerde olduğu görülmektedir ve bu oranların 2025 yılına kadar artış göstermesi beklenmektedir (Block *et al.*, 2015). Kanser hücresi, normal ömrünün ötesinde hayatta kalmaya izin veren ve anormal bir şekilde çoğalan özelliklere sahiptir (Feitelson *et al.*, 2016). Aşırı proliferasyon, apoptoz ve immün sistemden kaçma, anjiyogenez, metastaz, hücreler arası iletişimin artması ve gelen sinyallere yanıt vermeme, farklılaşma, immortalize olma, tümör teşvik eden iltihaplanmanın oluşması, telomeraz aktivitesinin indüksiyonu, hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesi ve tedaviye direnç gösterme gibi birçok durum kanser hücrelerinin tipik özellikleridir (Block *et al.*, 2015; Hanahan & Weinberg, 2011). Çoğu kanser; genetik, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerini ve bunların etkileşimlerini içeren karmaşık bir etiyolojiden meydana gelir (Shantanam, 2019). Beslenme, diyet, kronik stres, fiziksel hareketsizlik, yetersiz sosyal destek ve obezitenin küresel kanser insidansını arttırmada önemli olduğu düşünülmektedir. Kanser yükünü ve riskini azaltmak yaşam tarzı davranışlarında yapılacak değişiklikler ile mümkün olabilir (Jaffee *et al.*, 2017). Bu faktörlerin yanı sıra birçok kanserin gelişmesinde ve ilerlemesinde tümör mikroçevresinin de (TMC) rol aldığı bilinmektedir. Katı tümörlerdeki TMC, temel olarak tümörle ilişkili makrofajlar, dendritik hücreler, T ve B lenfositleri; kanserle ilişkili fibroblastlar ve mezenkimal stromal hücreler ile birlikte hücre dışı matris ve enzimler, sitokinler, büyüme faktörleri vb. moleküllerden oluşmaktadır. Bunların yanı sıra genomda meydana gelen mutasyonlar, tümör dokularındaki hücre dışı pH'ın daha asidik olmasına (5,7–6,9) (Alfarouk *et al.*, 2011), düşük glikoz seviyelerine ve hipoksi gibi genetik kararsızlıklara sebep olup doku mikroçevresinde aşırı büyüme ve baskınlığa neden olarak kanserin başlaması ve ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır (Block *et al.*, 2015; Feitelson *et al.*, 2016; Simmons, 2017).



Şekil 1. Kanser hücrelerinin düzensiz ve kontrolsüz bölünmesinin şematik gösterimi

Kanserde Tedavi Yaklaşımları

Kanserin tipine ve malignitesine bağlı olarak birçok tedavi yaklaşımı bulunmaktadır. Mevcut kanser tedavileri arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, kök hücre nakli ve hedefe yönelik tedaviler veya bu tedavilerin kombinasyonlarını içeren tedaviler yer almaktadır (Block *et al.*, 2015).

Kemoterapi

Kemoterapi, cerrahi ve radyoterapi ile karşılaştırıldığında sistemik bir tedavi yöntemidir. Bununla birlikte kemoterapi, cerrahi veya diğer tedavilerle entegre olarak kullanılabilen bir yöntemdir (J. Wang *et al.*, 2021). Kanser tedavisinde kemoterapi, hücre bölünmesini engelleme, apoptozu indüklemeye ve kanser hücrelerini hedef alma gibi farklı etki mekanizmalarına sahip çeşitli antikanser ilaçlarının kombine bir şekilde kullanımını içermektedir (Kasi *et al.*, 2015). Antikanser ilaçların çoğu, kemoterapötik ajanların temel etki mekanizması olarak görülen DNA hasarı oluşturarak tümör hücrelerinin öldürülmesine dayanmaktadır. Bunun yanı sıra kanser hücreleri, DNA hasarının üstesinden gelmek için çeşitli farklı onarım mekanizmalarını ve sinyal yollarını aktive ederek bir yanıt oluşturabilir. Bu mekanizmaların aktivasyonu sonucu onarılan kanser hücreleri kemoterapötik tedaviye daha dirençli hale gelir (M. Wang *et al.*, 2014). Alkilleyici ajanlar, antrasiklinler (doksorubisin, daunorubisin, epirubisin, idarubisin, aklarubisin ve pirarubisin), epipodofilotoksinler, platin bazlı ilaçlar (sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin) ve vinka alkoksitler kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarıdır (Ilghami *et al.*, 2019; Moiseeva, 2019). Kemoterapi ajanlarının hedefi her ne kadar tümör hücreleri olsa da, deri, saç ve mide-bağırsak sisteminin epitelinde çoğalan, tümör olmayan sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Bulantı, kusma, ağrı, ishal başta olmak üzere anafilaksi, sitopeni, karaciğer, kalp, nefron, kulak toksisitesi, alopesi, anoreksi, kaşeksi, iltihaplanma gibi çeşitli ciddi yan etkiler oluşturmaktadır (Feitelson *et al.*, 2016; Oun *et al.*, 2018). Bununla birlikte,

kemoterapinin zayıf stabilite ve düşük çözünürlük gibi dezavantajları da vardır (J. Wang *et al.*, 2021).

Radyoterapi

Radyoterapi, batı ülkelerinde kanser vakalarının üçte ikisinden fazlasının tedavisinde hem iyileştirici hem de palyatif olarak kullanılan en önemli tedavi yaklaşımlarından biridir (Sato *et al.*, 2021; Z. Wang *et al.*, 2019). Radyoterapi, iyonlaştırıcı radyasyon (IR) yoluyla doğrudan veya reaktif oksijen türleri (ROS) yoluyla dolaylı olarak oksidatif hasar oluşturmaya dayanan, DNA hasarına neden olan ve bunun sonucu olarak kanser hücrelerini ortadan kaldıran bir tedavi yöntemidir (Y. Liu *et al.*, 2020). Radyoterapi, kanser tedavisinin toplam maliyetinin yalnızca %5'ini oluşturarak uygun maliyetli bir tedavi imkanı sağlamaktadır. Farklı tümör bölgelerinde tek başına veya kemoterapi gibi diğer tedavi yaklaşımlarıyla birlikte kullanılabilir (Soko *et al.*, 2019). İyileştirici radyoterapi, tümör dokusuna yakın olan normal dokularda uzun süreli, kalıcı yan etki riskini azaltmak için rutin olarak çoklu, az miktarda günlük dozlar halinde verilir (Spencer *et al.*, 2018). Son birkaç on yılda, teknolojiye ilerlemeler, stereotaktik vücut radyasyon tedavisi (SBRT) ve yoğunluk ayarlı radyasyon tedavisi (IMRT) gibi 3D konformal radyasyon tekniklerinin gelişimini hızlandırmıştır. Günümüzde 3D konformal radyasyon teknikleri ve gelişmiş görüntüleme sistemlerinin kombine bir şekilde kullanılması ile radyasyon dozlarının lezyonun bulunduğu bölgeye, doğru bir şekilde iletilmesi sağlanmaktadır ve bu durum lezyonun bulunduğu bölgedeki normal dokuyu yüksek derecede korumaktadır (Z. Wang *et al.*, 2019). Modern radyoterapinin amacı, tümör bölgesini yüksek düzey doğrulukla saptamak, normal dokuya olan maruziyeti azaltmak ve yan etkileri en aza indirmektir (Lawrie *et al.*, 2018). Bununla birlikte, radyoterapide karşılaşılan zorluklardan biri tedaviden kısa bir süre sonra birincil ve kazanılmış direncin oluşmasıdır. Ayrıca radyoterapinin, kanser hücrelerinin radyorezistansı ve tümörlerin artmış invazyonu ve metastazı teşvik edebildiği gösterilmiştir (Y. Liu *et al.*, 2020; Z. Wang *et al.*, 2019).

İmmünoterapi

Kanser immünoterapisi, diğer geleneksel tedavilerden daha doğru ve güvenli bir şekilde tedavi etmeyi amaçlayan kanser için umut verici bir tedavi yöntemidir (Riley *et al.*, 2019). İmmünoterapi, genellikle tedavi bittikten sonra antitümör tepkisi oluşturmak için vücudun kendi bağışıklık sisteminin kullanılmasıdır; bu ise bağışıklık sisteminin modülasyonu ve modifikasyonunun bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Marin-Acevedo *et al.*, 2018). İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin neoplastik hücreleri algılama, hedefleme ve

bunları yok etme kapasitesini arttırırken, sağlıklı hücrelerde herhangi bir değişikliğe neden olmamakta veya zarar vermemektedir; bu durum immünoterapiyi her türlü kanserin yönetimi ve tedavisi için daha iyi bir seçenek haline getirir (Mellman *et al.*, 2011). İmmünoterapide kullanılan ajanlar, hasar gören doğal mekanizmaları onararak veya güçlendirerek, tümör büyümesini ve metastazı inhibe ederek birincil ve ikincil antitümör bağışıklık tepkisini tetiklemek üzere tasarlanmıştır (C. Wang *et al.*, 2017). Kanser immünoterapi yaklaşımları immün kontrol noktası blokajı, sitokin tedavisi, tasarlanmış T hücre tedavisi ve kanser aşısı tedavilerini içermektedir (F. Yang *et al.*, 2020).

İmmün kontrol noktası blokajı

Bağışıklık kontrol noktaları, fizyolojik bağışıklık dengesini düzenleyen bağışıklık sistemindeki engelleyici yolaklardır. İmmünolojik kontrol noktası inhibitörleri en çok çalışılan immünoterapilerdir ve PD-1/PD-L1 (programlanmış hücre ölüm reseptörleri 1/programlanmış hücre ölüm reseptörü ligandı 1) blokajı ve CTLA-4 (sitotoksik T lenfosit ile ilişkili molekül 4) inhibisyonu için en yaygın kullanılan inhibitörlerdir (Pardoll, 2012). İndüklenmiş T hücreleri, anormal veya kanserli hücreleri tanımak ve ortadan kaldırmak için PD-1'i eksprese eder (Munn & Bronte, 2016). Bununla birlikte, tümör hücreleri de PD-1'e bağlanan PD-1 ligandlarını eksprese ederek, tümör antijenlerini tanıyan T hücrelerini etkisiz hale getirir ve bağışıklık sistemi saldırılarından kaçınır (Alsaab *et al.*, 2017). Bu nedenle, tümör hücresi ölümü, PD-1 veya onun ligandının inhibitörlerini inhibe ederek indüklenebilir. CTLA-4 ise, T hücre aktivasyonunu azaltan ve ligandlarına (CD80 ve CD86) bağlanarak tümör ilerlemesini destekleyen başka bir bağışıklık kontrol noktasıdır (Webb *et al.*, 2019). CTLA-4 ve ligandlarının inhibitörleri, T hücre aktivitesini arttırmak ve tümörlü hücreleri yok etmek için etkileşimlerini bloke eder. Son birkaç yılda, PD-1, PD-L1 veya CTLA-4 kontrol noktası blokaj stratejileri umut verici klinik sonuçlar elde etmiş ve farklı tip tümörler için beşten fazla kontrol noktası inhibitörü onaylanmıştır (Ellis *et al.*, 2017). Bu olumlu gelişmelerin yanı sıra kullanımlarında birçok sınırlama da mevcuttur. İmmünolojik kontrol noktası inhibitörlerinin sistemik kullanımı, birçok normal organa zarar verebilir (Byun *et al.*, 2017); ek olarak, tüm hastalar kontrol noktası inhibitörlerinden fayda göremeyebilir. Bu yüzden kontrol noktası inhibitörlerine karşı reaktivite üzerine çalışmalar da devam etmektedir. Bununla birlikte, farklı tümörlerin immünosüpresif mikroçevresi değişmektedir; bundan dolayı tümörlerin tam olarak tedavi edilebilmesi için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, biyometaryaller kullanılarak ilaçların daha verimli bir şekilde tümör bölgesine iletilmesi sağlanıp daha etkin bir tedavi oluşturulabilir (F. Yang *et al.*, 2020).

Sitokin tedavisi

Sitokinler vücuda enjekte edildikten sonra, bağışıklık hücreleri bağışıklık tepkisi oluşturmak için indüklenebilir. İnterferon, interlökin ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) immünoterapide kullanılan mevcut sitokinlerdir (S. Lee & Margolin, 2011). Genellikle, bir organizma patojenik mikroorganizmalar tarafından enfekte edildiğinde, makrofajların, lenfositlerin, dendritik hücrelerin (DC) ve diğer bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu ve olgunlaşmasını indüklemek için interferon üretilmektedir. İnterferonlar tümör bölgesinde anjiyogenezi de inhibe edebilir (Katze *et al.*, 2002). İnterlökinler ise, doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtları oluşturmak için $CD4^+$ T hücrelerinin, $CD8^+$ hücrelerinin ve B hücrelerinin aktivasyonunu ve farklılaşmasını desteklemektedir (Ben-Sasson *et al.*, 2009; Cox *et al.*, 2011). Diğer bir sitokin olan GM-CSF, kemik iliği hücrelerinin farklılaşmasını destekleyen bir başka sitokindir; DC'lerin aktivasyonunda ve antitümör sitotoksik T lenfositlerin (CTL) hazırlanmasında önemli bir göreve sahiptir (Yan *et al.*, 2017). Lösemi tedavisinde kullanmak için hem granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) hem de granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) olan rekombinant bir IFN- α onaylanmıştır (Ahmed & Rai, 2003; Mehta *et al.*, 2015). Bununla birlikte insan kanserini tedavi etmek için ilk etkili immünoterapinin bir proinflamatuvar sitokin olan IL-2 olduğu bildirilmiştir (Rosenberg, 2014).

Sitokinlerin belirli bir terapötik etkisinin olmasıyla birlikte, yarı ömürlerinin kısa olması nedeniyle, daha etkin terapötik sonuçlar elde etmek için yüksek dozlara ihtiyaç duyulmaktadır; bu ise sitokin salma sendromuna neden olmaktadır (S. Lee & Margolin, 2011). Ek olarak, sitokinler, otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına yol açan stimüle edilmiş T-hücre ölümünü indüklerken düzenleyici T-hücre büyümesini teşvik edebilir (Milling *et al.*, 2017). Şu anda, uygulanan doz miktarını azaltmak ve yüksek dozların neden olduğu yan etkileri en aza indirmek için birden fazla sitokin kullanımı veya sitokini kemoterapi veya diğer immünoterapilerle kombinleme yoluyla en etkin tedavi yaklaşımı geliştirilmeye çalışılmaktadır (F. Yang *et al.*, 2020). Sitokinin neden olduğu toksisite riskini azaltmaya yönelik yapılan çalışmalarla birlikte sitokinin antitümör etkinliğini artıran ilaç sistemlerinin tasarlanması da gerekmektedir (Abdou *et al.*, 2020).

Tasarlanmış T hücre tedavisi

T hücreleri temel olarak kimerik antijen reseptör T (CAR-T) hücrelerini ve T hücresi reseptör T (TCR-T) hücrelerini içermektedir. Tedavi, hastanın bağışıklık sisteminin bir parçası olan T hücrelerinin kanserle savaşması temeline dayanmaktadır. Son yıllarda, CAR-T hücreleri çok önemli klinik başarı elde etmiştir ve FDA tarafından kan kanserlerini tedavi

etmek için iki CAR-T hücre tedavisi onaylanmıştır (Abdou *et al.*, 2020; Lim & June, 2017). CAR-T hücresi terapisinde T hücreleri, bir hastanın periferik kanından toplanarak tümör antijenlerini spesifik olarak tanıyan CAR'ları eksprese etmek için *in vitro* olarak güçlendirilip tümörü hedef alacak şekilde yeniden tasarlanır ve daha sonra tümörleri tanımak ve öldürmek için aynı hastaya yeniden enjekte edilir (Lim & June, 2017). Yeniden tasarlanmış T hücreleri vücutta uzun süre aktiviteyi sürdürebilir (Scholler *et al.*, 2015). 2017'de, lenfoma tedavisi için CD-19'u hedefleyen iki CAR-T hücresi tedavisi daha onaylanmıştır (Maude *et al.*, 2018; Neelapu *et al.*, 2017). B hücreli lösemiler ve lenfomalar, CD-19 moleküllerini yüksek düzeyde eksprese etmektedir. Ayrıca, CD-19 eksprese eden normal hücreler yalnızca B hücre soylarına sahiptir. Bu nedenle, CD-19'u hedef alan CAR-T hücrelerinin ana yan etkisi, immünoglobulin replasman tedavisi ile hafifletilebilen B hücre hipoplazisidir (F. Yang *et al.*, 2020). Bununla birlikte, CAR-T hücre tedavisi sitokin salınım sendromuna ve nörotoksisiteye sebep olur (Care *et al.*, 2017) ve özellikle karma mikro ortamlara sahip katı tümörlerin olduğu durumlarda, CAR-T hücrelerinin hayatta kalması etkilenir (Hege *et al.*, 2017; Migliorini *et al.*, 2018). Bununla birlikte, zaman alıcı, pahalı ve teknik olarak zahmetli olması gibi dezavantajlar CAR-T hücre tedavisinin yaygın kullanımını sınırlandırmaktadır (Levine *et al.*, 2017). Yine sistemik olarak uygulanan CAR-T hücreleri, tümör bölgesine/bölgelerine verimli bir şekilde ulaşmadığı için katı tümörlerin tedavisinde genellikle sınırlı terapötik etkinliğe sahiptir (Beatty & O'Hara, 2016). Diğer bir immünoterapik ajan, majör doku uygunluk kompleksine (MHC) bağımlı olan TCR-T hücreleridir (Cameron *et al.*, 2013). TCR-T hücreleri, hematolojik ve katı kanserlerin klinik kullanımında mevcuttur. TCR'ler, MHC tarafından sunulan tümörle ilişkili hücre içi antijenler olan neoantijenler ve kanser-testis antijenlerine yanıt verir (Linnemann *et al.*, 2013). Bununla birlikte TCR-T hücrelerinin özgül olmasının klinik sonuçlarda önemli bir rol oynadığı klinik öncesi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Cameron *et al.*, 2013). Alınan olumlu sonuçların yanı sıra yüksek afiniteli TCR-T hücrelerinin neden olduğu toksisiteyi tahmin etmek oldukça güçtür (Linette *et al.*, 2013). Elde edilen verilere dayanarak CAR-T hücreleri ve TCR-T hücreleri ile daha etkin bir tedavi sağlamak, bu hücrelerin neden olduğu toksisiteden kaçınmak ve katı tümörlere uygulanabilirliklerini iyileştirmek için yeni teknolojilerin ve yeni biyomalzemelerin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmaktadır (F. Yang *et al.*, 2020).

Kanser aşılıarı

Kanser immünoterapi aşılarının amacı, tümör antijenleri ve immünotimülatör adjuvanların birlikte verilmesi sonucu elde edilen tümör antijenlerine karşı immün toleransı azaltmak ve konakçı immün sisteminin kanser hücrelerine saldırmasını teşvik etmektir (Ali *et*

al., 2009). Kanser aşıları; tam hücre lizatları, DNA, peptitler, rekombinant virüsler veya modifiye edilmiş bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere çeşitli immünojenik bileşenlerden oluşabilir (Thomas & Prendergast, 2016). Kanser immünoterapi aşıları, tümör mikroçevresinde bulunan konakçı immün hücrelerini indükleyen ve bölgesel olarak mevcut tümör antijenlerini kullanan, tümör antijenlerini önceden tanımlama ve iletilme ihtiyacını ortadan kaldıran immünostimülatör bileşenleri içermektedir (Sheen & Fiering, 2019). İmmünostimülatör adjuvanlar, kanser aşısı formülasyonlarında sıklıkla kullanılan, bununla birlikte monoterapi olarak da kullanılabilen bir immünoterapötik sınıftır. Metillenmemiş CpG açısından zengin bölgeler içeren oligodeoksineotitler, TLR9 reseptörlerine bağlanarak doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücrelerini aktive etme yeteneklerine sahip olmalarından dolayı kanser immünoterapi aşıları için tercih edilen adjuvanlardır (Furumoto *et al.*, 2004; Kawarada *et al.*, 2001).

Dendritik hücreler (DC), nükleik asitler, tümör hücre lizatları (TCL) ve neoantijenler dört temel kanser aşısıdır (C. Guo *et al.*, 2013). Bunlar arasında DC aşıları, geniş çapta incelenen hücre bazlı tümör aşıları sınıfıdır. Öncelikle hastalardan elde edilen DC'ler tümörle ilişkili antijenleri eksprese etmek için *in vitro* olarak uyarılmaktadır. Daha sonra DC aşıları tümörleri öldürmek için T hücrelerini doğrudan aktive ederek etki göstermektedir. Sipuleucel-T, bu yöntemle yapılmış ve prostat kanseri için FDA tarafından onaylanmış bir DC aşısı örneğidir (Mullard, 2016). Bununla birlikte diğer DC bazlı aşılar, güvenilirliklerinin yüksek olmasına rağmen klinik çalışmalarda başarısız sonuç vermiştir (S. Rosenberg, J. Yang, 2004). Eksojen nükleik asitleri hedef hücrelere vererek çalışan ve geleneksel aşılara umut verici bir alternatif olan diğer bir kanser aşısı ise nükleik asit aşısıdır. Nükleik asitten oluşan terapötikler, hedef antijenleri eksprese eden tümörleri öldürmek için hedef proteinlere karşı immün yanıtları antijen sunucu hücreler (APC) tarafından alınan ve antijenik proteinlere çevrilen DNA'lardan veya RNA'lardan oluşur (Pardi *et al.*, 2018). DNA bazlı nükleik asit aşıları klinik olarak test edilmiş olmasına rağmen, intranükleer iletim zorluğu ve olumsuz immünojenisitetleri nedeniyle başarısız sonuç vermiştir (M. A. Liu, 2011; B. Yang *et al.*, 2014). Buna karşılık, RNA bazlı nükleik asit aşıları, bağışıklık etkinliğini artıran antijenik proteinlere doğrudan çevrilerek daha olumlu sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca, RNA doğal olarak oluşan bir nükleik asit olduğu için hazırlama maliyeti düşüktür ve yarılanma ömrü birçok farklı modifikasyonla uzatılabilir. Bununla birlikte RNA, DNA gibi genoma entegre olmadığı için kalıtsal yan etkilere sebep olmaz (Schlake *et al.*, 2012). Bunların yanı sıra, çıplak RNA, nükleazlar tarafından bozulmaya karşı oldukça hassastır; bu yüzden, hücre içi dağıtımını geliştirmek için özel transfeksiyon reaktifleri veya dağıtım tekniklerine ihtiyaç vardır (Kauffman *et al.*, 2016). Bir diğer kanser aşısı, antitümör immün yanıtını desteklemek

için antijenler olarak tümör somatik DNA'sını kullanan neoantijen aşılardır (L. Li *et al.*, 2017). Bu antijenler yalnızca tümör hücrelerinde eksprese edilir, bu durum ise normal dokuların zarar görmesini engelleyebilir (Lauss *et al.*, 2017).

İmmünoterapideki bu olumlu gelişmelere rağmen, tedavi etkinliğinin ve hasta yanıtının tahmin edilememesi, yüksek tedavi maliyetleri, ek biyobelirteçlere ihtiyaç duyulması, kanser immünoterapilerine karşı direnç gelişimi, immünoterapötik ajanların farklı etkilerinin belirlenmesi için optimize edilmiş klinik çalışma tasarımlarının eksik olması gibi kanser immünoterapisi alanında hala üstesinden gelinmesi gereken birçok olumsuz durum bulunmaktadır (Lee Ventola, 2017). Bununla birlikte kanser immünoterapi alanının hedefe yönelik yaklaşımlar kullanılarak daha düşük toksisite ve yüksek etkinlik sağlayan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesiyle bu terapinin hızlı bir ilerleme katedeceği öngörülmektedir (Hall *et al.*, 2016).

Kök hücre tedavisi

Kök hücreler; üç germ tabakasını oluşturan endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarının tümüne farklılaşma ve daha sonra hepatositler, nöronlar ve kardiyomiyositler gibi çeşitli hücre tiplerini oluşturma yeteneğine sahip pluripotent hücrelerdir (A. S. Lee *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2010). Kök hücreler oluştukları kökene göre embriyonik kök hücreler (ESC) ve yetişkin kök hücreler (ASC) olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır. ESC'ler, pluripotenslerini korurken doku kültüründe muhafaza edilebilmektedir (Prathipati *et al.*, 2017). Hücre kültüründeki ESC'ler, proliferatif ve farklılaşmamış halin devam etmesi için Oct4 içsel transkripsiyon faktörünü eksprese eder ve pluripotent durumlarını korumak için yapısal olarak lösemi inhibitör faktörden (LIF) dış sinyali alır (Nichols *et al.*, 1998). ASC'ler, çoğalmak veya farklılaşmak için belirli çevresel sinyallere yanıt verebilen yavaş döngülü hücrelerdir. ASC'ler, farklılaşma sırasında geçici olarak hızlı çoğalma durumuna girer (Potten *et al.*, 1979), hücre döngüsünden çekilir ve terminal farklılaşmayı gerçekleştirir. ASC'ler, dışsal ve içsel uyaranlara bağlı olarak belirli nişlerde lokalizedir. ASC bölünme kapasitelerine göre; değişken hücreler (skumöz ve salgı bezleri hücreleri ile kemik iliğindeki hematopoetik hücreler), durağan hücreler (endotel hücreler, hepatositler, osteoblastlar) ve kalıcı hücreler (nöron, kardiyak ve sinir kas hücreleri) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Secchiero *et al.*, 2012). Bu potansiyele sahip kök hücre temelli terapötiklerin kullanımı hasarlı hücreleri, kök hücrelerden türetilen uygun fonksiyona sahip sağlıklı hücrelerle değiştiren bir dizi teknik adımın gerçekleşmesini gerektirir (Cortesini, 2005).

Kök hücrelerin yetişkin bir organizmadan veya embriyodan izole edilmesi ve bunların kültür ortamında büyütülmesi, kök hücre tedavisinin başlamasında ilk adımı oluşturmaktadır

(Herberts *et al.*, 2011). Sağlıklı bir donörden alınan yetişkin veya embriyonik kök hücreler allojenik (donör kaynaklı) kök hücre nakli (Janin *et al.*, 2009) veya hastanın vücudundan elde edilen otolog (kendi kendine türetilmiş) kök hücreler ile olmak üzere iki farklı yoldan elde edilen kök hücrelerle hastaya nakledilebilir (Mousavinejad *et al.*, 2016). Kök hücre tedavisindeki hızlı gelişmelere rağmen, transplantasyon etkinliğini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Allojenik transplantasyonda, daha fazla kök hücre kültürü elde etmek ve manipülasyon yapabilmek için embriyodan izole edildiğinde, insan kimliğiyle ilgili ciddi etik sorunları gündeme getirebilir. Bununla birlikte, yüksek bağışıklık reddi riski bulunmaktadır (Revell & Athanasiou, 2009). Otojenik kök hücreler ise etik sorunlar ve greft reddinden bağımsız olmakla birlikte, bu tip kök hücre transplantasyonunda kök hücrelerle birlikte kanser hücrelerinin de alınma ihtimalinin olması bir dezavantaj oluşturmaktadır (Corradini *et al.*, 2006; D'Amore *et al.*, 2012). Allojenik ve otolog kök hücre transplantasyonlarının yanı sıra insanlarda yaygın bir kök hücre transplantasyonu olan hematopoietik allojenik transplantasyon da bulunmaktadır. Bu kök hücre tedavisi uygulandıktan sonra malign olmayan ve malign olmak üzere iki şekilde etki göstermektedir (Lowe *et al.*, 2007). Oküler ve pulmoner sorunlar, karaciğer, kemik ve eklem komplikasyonları, ergenlik ve gonadal yetmezlik malign olmayan etkiler arasında sayılabilmektedir (Socié *et al.*, 2003). Bağışıklık sisteminin baskılanması, lenfoma ve lösemi gibi ciddi sonuçlar malign etkiler arasında yer almaktadır (Torsvik *et al.*, 2010). Kök hücrelerin *in vitro* kültürasyonu sırasında tümörjenisite riskini artıran çok sayıda mutasyon ve karyotipik değişikliğin meydana gelebileceği yapılan çalışmayla gösterilmiştir (J. Ji *et al.*, 2012). Kök hücrelerin kullanımı sırasında meydana gelebilecek epigenetik değişiklikler gibi içsel faktörler ve transplantasyon gerçekleştirilmeden önce istenen hücre tipini oluşturmak için kök hücre üretiminde oluşabilecek olumsuzluklar gibi dışsal faktörler kök hücre tedavisinde yüksek riskte tümör gelişiminin ana nedenlerini oluşturmaktadır (Y. Tan *et al.*, 2014). Bununla birlikte kök hücre tedavisinde farklılaşmamış kök hücrelerin doğrudan kullanılması pek mümkün olmamakla birlikte, kullanımında büyüme potansiyeli tümör gelişimi riskini artırmaktadır (Hentze *et al.*, 2007). Düşük oranda spontan farklılaşma sonucu oluşan bir koloninin hızlı büyüme göstermesi farklılaşmamış kök hücrelerin yararlı özelliklerinden birini oluşturmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, kök hücrelerin kontrolsüz büyümesi tümör oluşumuna sebep olabilir (Ben-David & Benvenisty, 2011). Fakat son çalışmalar, kök hücrelerin onkojenik aktivitesinin yalnızca farklılaşmamış hücrelerle ilişkili olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, kök hücre tedavisi için kullanılan farklılaşmış kök hücreler p53 kaybı, apoptoza direnç, temas inhibisyonunun olmaması gibi özellikler sergileyerek kanser gelişimine neden olabilmektedir (H. Li *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2009).

Kök hücre tedavi yaklaşımları iyi bir başlangıca ve birçok zorlu hastalığın tedavisi için muazzam bir potansiyele sahiptir (Mousavinejad *et al.*, 2016). Kök hücreler yalnızca yaşamı tehdit eden hastalıklar için değil, aynı zamanda görme ve işitme sorunları veya saç dökülmesi gibi kronik sorunlar için de terapötik imkan sunmaktadır (H. Li *et al.*, 2004; R. J. Morris *et al.*, 2004). Kök hücrelerin umut verici tedavileri; kanserler, diyabet ve nörodejeneratif bozukluklar gibi çoğu zaman tedaviye başarısız yanıt veren birçok hastalık ve durum için endikedir (Herberts *et al.*, 2011). Bunlarla birlikte kök hücre tedavisi etik, yan etkiler, etkinlik ve güvenliği içeren birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Kök hücre tedavisinde kullanılan embriyonik kök hücreler veya yetişkin kök hücreler yerine indüklenmiş pluripotent kök hücre (IPSC) türevi kullanılarak etik sorunlar çözülebilir (Mousavinejad *et al.*, 2016). Toksisite, dozlama miktarı ve uygulama yolu gibi farmakokinetik konular da kök hücre tedavisinde önemli sorunlardır. Bu sorunların esas nedeni, hastada nakledilen kök hücrelerin farklılaşma, emilim, migrasyon ve metabolizma takibinin saptanamamasıdır. Bu sebeplerden dolayı, kök hücrelerin terapötik dozu ve uygulama yolu çoğunlukla belirsiz olduğundan maksimum klinik faydaya ulaşmak zordur (Di Stasi *et al.*, 2011; Goldring *et al.*, 2011).

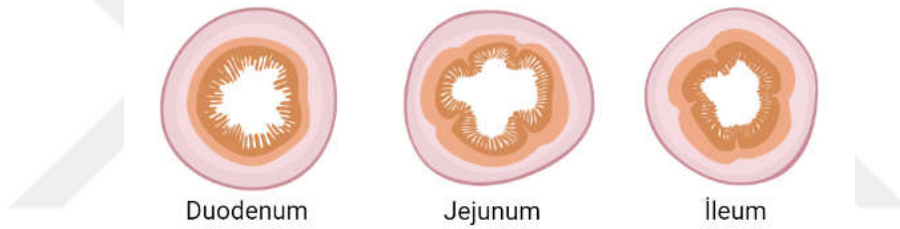
Kanser önleme, tarama ve erken teşhise yönelik mevcut yaklaşımlar geneldir ve genellikle yaş veya cinsiyete göre katagorize edilir ve risk değerlendirmeleri kesin değildir (Jaffee *et al.*, 2017).

İnce ve Kalın Bağırsak

Bağırsak epitel, memelilerde en hızlı yenilenen dokudur. İnsan bağırsağında her gün milyarlarca hücrenin yıkılıp yeniden oluştuğu tahmin edilmektedir (Z. Wang *et al.*, 2010). Bağırsak oluşturan epitel hücreleri, hayvan fizyolojisinde çok önemli işlevlere sahiptir. Bağırsak epitel, çeşitli besin maddelerinin ve ksenobiyotiklerin emilimi ve metabolizması için birincil en önemli bölgedir. Vücudun diğer kısımlarına metabolik ve immünolojik sinyalleri iletir ve bağırsak lümeni içerisinde bulunan mikroorganizmalar için önemli bir bariyer görevi görür. Bağırsak epitel hücrelerinin (IEC) gelişimi ve fizyolojisinde meydana gelen işlev bozuklukları gıda alerjisi, obezite, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve kolorektal kanser gibi birçok insan hastalığına sebep olmaktadır (Lickwar *et al.*, 2017). İnflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) temel olarak ülseratif kolit (UC) ve Crohn hastalığı (CD) olmak üzere iki şekilde kendini göstermektedir. Her ikisi de iyi farklılaşmıştır fakat, genetik yatkınlığı olan bireylerde bu hastalıklar çeşitli çevresel faktörler tarafından tetiklenerek bağışıklık sisteminin hatalı bir yanıt oluşturmaya sebep olur; bu ise kronik ve kontrolsüz bağırsak iltihabının oluşumuyla kendini gösterir. İnflamatuvar bağırsak hastalığına (IBD) sahip bireylerde %12 ile %85 arasında değişen bir oranda kötü beslenmenin olduğu görülmektedir.

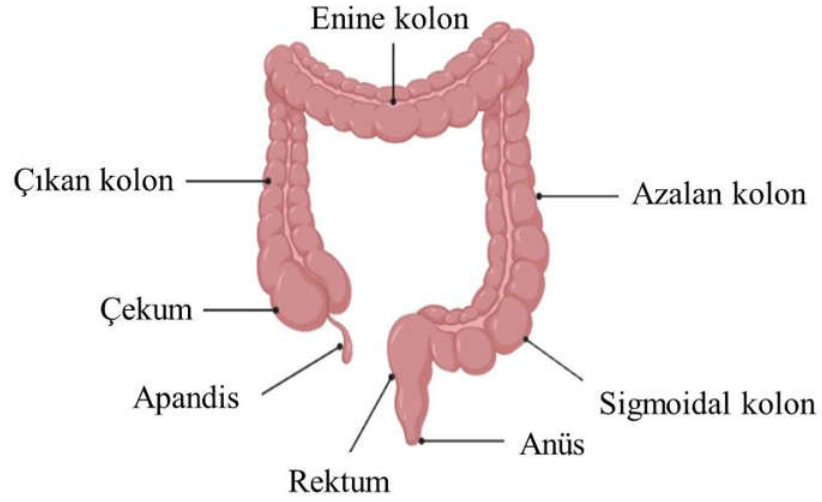
Bu geniş aralık ise hastalığın tipi, yayılımı, inflamatuvar aktivitesi ve çeşitli değerlendirme yöntemlerinin heterojenliğinden kaynaklanmaktadır (Casanova *et al.*, 2017).

İnce bağırsak ve kolon tübüler yapıli organlardır. İnce bağırsak mide ve kalın bağırsak arasında yer almaktadır ve karbohidratlar, proteinler ve lipitler de dahil olmak üzere tüm besinlerin gıdalardan son emiliminin birincil yeridir. Proksimalden distale doğru duodenum (oniki parmak bağırsağı), jejunum ve ileum olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2). Duodenum ve jejunum arasındaki anatomik sınırı treitz ligamenti belirlerken; jejunum ve ileum arasında belirgin bir sınır bulunmamaktadır. Bir mezenter, jejunumu (proksimal %40) ve ileumu (distal %60) karın arka duvarına bağlar ve bağırsağın periton boşluğu içinde rahatça hareket etmesine imkan sağlamaktadır. Duodenum, vücuttaki sindirim enzimlerinin çoğunun salındığı yerdir ve ince bağırsak kanserlerinin en yaygın görüldüğü bölgedir. Genel olarak, ince bağırsak neoplazmalarının %55-82'si ince bağırsağın bu en küçük bölgesi olan duodenumda oluşmaktadır. Bununla birlikte, jejunum bu neoplazmaların %11-25'ini oluştururken, ileum ise %7-17'sini oluşturmaktadır (Moon *et al.*, 2010; Shafik *et al.*, 2011).



Şekil 2. İnce bağırsak bölümlerinin şematik gösterimi

Kalın bağırsak yetişkinlerde yaklaşık 150 ila 180 cm uzunluğundadır. Çekumdan ve çok büyük bir bölümünü meydana getiren kolon (çıkan, enine, azalan, sigmoidal kolon) ve rektumdan oluşmaktadır (Şekil 3). Kolonun çapı ince bağırsağa kıyasla daha büyüktür, pozisyonu sabittir ve besin emiliminde çok sınırlı bir görevi vardır. Kolonun ana işlevleri, katı atık oluşturmak için suyu emmek, peristalsis denilen koordineli dalga benzeri mekanik hareketle atık içeriğini gastrointestinal (GI) kanaldan aşağı doğru iterek rektuma göndermektir. Kalın bağırsak ayrıca kullanılmayan enerji substratlarını fermente etmek, bağırsıklık sistemini güçlendirmek ve vitamin ve hormon üretmek gibi bir dizi yararlı işlevi yerine getirmekle sorumlu olan bağırsak mikrobiyotasını oluşturan bakteri, arke ve mantarı önemli miktarda barındırmaktadır. Rektumun ana işlevleri ise, kontinans yani atık maddelerini geçici olarak depolamak ve atığı vücuttan uzaklaştırmaktır (Siri *et al.*, 2020).



Şekil 3. Kalın bağırsak bölümlerinin şematik gösterimi

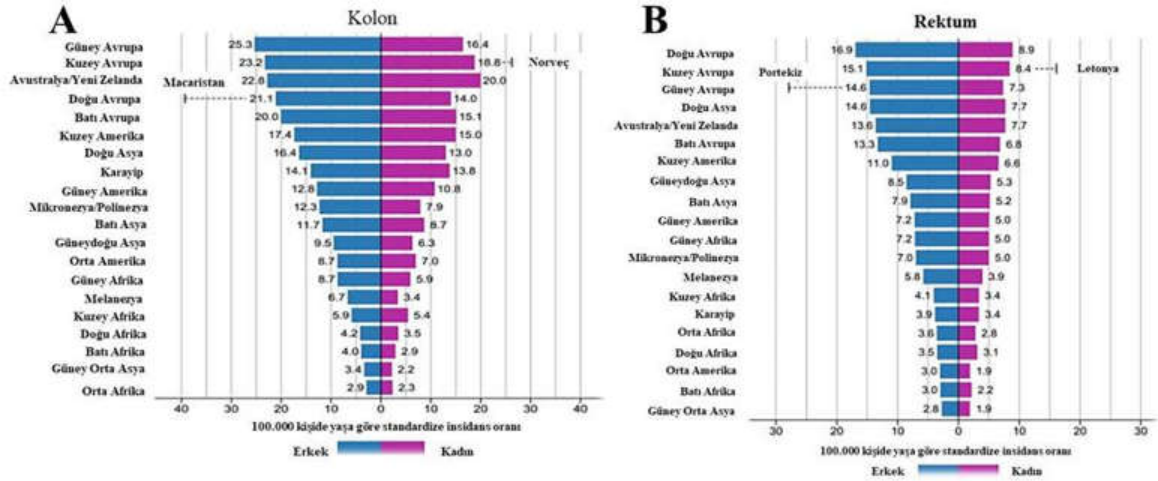
Kalın bağırsak duvarı içten dışa doğru mukoza, submukoza, muskularis propria (eksterna) ve seroza olmak üzere dört ana katmandan meydana gelmektedir. Her tabaka farklı bir anatomik yapıya ve nöronal doku içeriğine sahiptir; böylelikle bağırsak fizyolojisi ve patofizyolojisinde farklı biyomekanik yollarda görev almaktadırlar (Carniel *et al.*, 2014). Mukoza, kolon ve rektumun iç astarını oluşturur; glandüler epitel denilen ince bir epitel tabakası, lamina propria denilen bir bağ dokusu tabakası ve muskularis mukozası denilen ince bir kas tabakasından oluşmaktadır. Glandüler epitel, kript adı verilen silindirik yapılar meydana getirir. Lamina propria epiteli desteklemekle görevlidir ve elastin, retikülin ve kollajen lifleri ile retiküler bağ dokusundan; lenfatikler ve kılcak damarlardan ve eozinofilik granüositler, plazma hücreleri ve lenfositler gibi hücre elemanlarından meydana gelmektedir. Muskularis mukoza ise, mukoza ve submukozayı birbirine bağlayan ince bir düz kas tabakasıdır (Zhao *et al.*, 2017). Kalın bağırsağın besin emiliminde önemli bir rolünün olmaması, mukozada villus denilen ince bağırsağın intraluminal yüzey alanını önemli ölçüde artıran küçük, katlanmış yapıların olmaması ile sonuçlanmıştır (Shamsuddin *et al.*, 1982). Submukoza, mukozayı çevreleyen fibröz bir bağ dokusu tabakasıdır. Bu tabaka kalın bağırsağı besleyen ana kan ve lenf damarlarını ve büyük miktarda lenfositleri, fibroblastları ve mast hücrelerini barındırır. Submukoza bunların yanı sıra iki ana enterik nöral pleksustan biri olan submukoza pleksusa ev sahipliği yapmaktadır. Submukoza pleksusun görevi ise, glandüler sekresyonları kontrol etmek, elektrolit ve su taşınmasını değiştirmek, lümen yüzeyinin konfigürasyonunu ve lokal kan akışını düzenlemektir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ikinci harmonik nesil görüntüleme yöntemiyle submukozanın yük taşıma işlevi için yoğun kalın kollajen liflerine sahip olduğu gösterilmiştir (Egorov *et al.*, 2002; Maier *et al.*, 2021). Diğer bir kalın bağırsak duvarı tabakası olan muskularis propria ise içte sirküler kas tabakası ve dışta longitudinal kas tabakası olmak üzere iki düz kas tabakasından oluşmaktadır

ve bu kas tabakaları bağırsakların kasılmasından sorumludur. Bu iki kas tabakası arasında, iki ana enterik nöral pleksustan biri olan myenterik pleksus bulunmaktadır. Myenterik pleksustaki ganglionlar, submukozadaki ganglionlardan daha belirgindir. Myenterik pleksus, kolonun koordineli peristalsis hareketini polarize polisınaptik peristaltik sistem aracılığıyla yönlendirmektedir (Maier *et al.*, 2021). Son olarak bağırsak duvarının en dış tabakasını oluşturan seroza tabakası, skuamöz epitel hücreleri tabakasından oluşur. Bağırsakları sardığı için visseral periton ve mezenterin bir uzantısını temsil eder. Seroza önemli bir kolajen lif içeriğine sahip olmasına karşın toplam bağırsak duvar kalınlığına kıyasla ince kalınlıkta olması nedeniyle önemli bir yük taşıma kapasitesine sahip değildir (Egorov *et al.*, 2002; Siri *et al.*, 2020).

İnce bağırsak adenokarsinomları ile kalın bağırsak adenokarsinomları evreleme, prognostik faktörler ve metastatik bölge tercihinde benzer klinik davranış sergilemektedir. Bununla birlikte metastatik hastalığı olan bireylerde sitotoksik kemoterapiye gösterdikleri yanıt oranları her iki bölge için karşılaştırılabilir düzeydedir (Overman *et al.*, 2012). Kalın bağırsakta, tüm adenomların yalnızca %10'u adenokarsinoma dönüşmektedir. İnce bağırsak kanserlerinin nadir görülmesinden dolayı ve kolonoskopi ile karşılaştırılabilir düzenli tarama prosedürlerinin olmaması nedeniyle hangi oranda adenokarsinoma dönüştüğü bilinmemektedir (Stewart *et al.*, 2006).

Kolorektal Kanser ve Tanı Yöntemleri

Kolorektal kanser (CRC), genetik ve çevresel faktörlerin etkileşiminden kaynaklanan ve bu faktörlere göre sınıflandırılabilen çok heterojen bir hastalıktır (Binefa *et al.*, 2014). Kolorektal kanser, dünyada hem kadınlarda hem de erkeklerde en sık görülen kanserlerden biridir (Tardu *et al.*, 2016). Dünyada kadınlarda en sık görülen üçüncü, erkeklerde en sık görülen dördüncü kanserdir (Klimczak *et al.*, 2016). Kolorektal kanser genel olarak insidans açısından üçüncü, mortalite açısından ise ikinci sırada yer almaktadır. 2020'de 1,9 milyondan fazla yeni kolorektal kanser (anüs dahil) vakası ve 935.000 ölümün meydana geldiği tahmin edilmektedir; bu ise yaklaşık 10 kanser vakasından ve ölümden birini temsil etmektedir. Avrupa bölgeleri, Kuzey Amerika ve Okyanusya en yüksek insidans oranlarına sahipken; Afrika'nın çoğu bölgesi ve Güney Orta Asya en düşük insidans oranlarına sahiptir (Şekil 4) (Sung *et al.*, 2021).

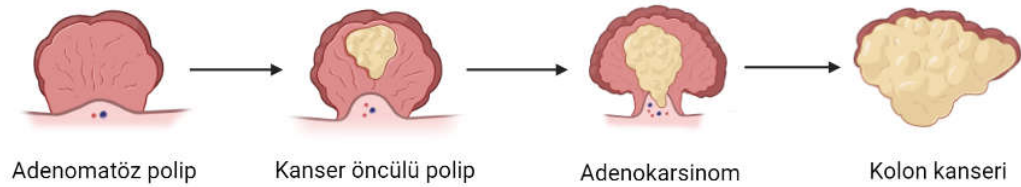


Şekil 4. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2020 yılına ait dünyadaki (A) kolon ve (B) rektum kanserlerinin yaşa ve cinsiyete bağlı insidans oranları (Sung *et al.*, 2021)

Batı tarzı yaşam ve çevresel faktörler, dünyanın farklı yerlerinde gözlemlenen kalın bağırsak kanseri insidans oranlarındaki büyük farklılıkların temel nedenlerinden biridir. Dengeli beslenme, düzenli fiziksel aktivite ve normal vücut kütlesinin korunması gibi risk faktörlerini azaltacak alışkanlıklar teşvik edilebilirse, kanser insidansının %50-75'e kadar azalacağı öngörülmektedir (Klimczak *et al.*, 2016). Bunların yanı sıra sigara, alkol alımı ve artan vücut ağırlığı kolorektal kanser gelişme riskini doğru orantılı olarak arttırmaktadır. Kolorektal kanser riski vücut kitle indeksindeki her birim artışla, %2-3 oranında artmaktadır. Bununla ilişkili olarak, tip 2 diyabetli hastalarda da kolorektal kanser riski artmaktadır (Kuipers *et al.*, 2015). Kırmızı et ve işlenmiş et tüketiminde günlük 100 g'lık bir artışın, kolorektal kanser gelişme riskini 1,16 kat arttırdığı tahmin edilmektedir (Song *et al.*, 2015). Buna karşılık, tam tahıllar, süt, taze meyve ve sebzelerin yanı sıra kalsiyum, lif, multivitaminler ve D vitamini alımı riski azaltmaktadır (Dahm *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2015). Yine günlük 30 dakikalık fiziksel aktivite benzer olumlu etkilere sahiptir. Hastalık; yorgunluk, soluk görünüm, nefes darlığı kilo kaybı, bağırsak alışkanlıklarında değişiklik, dışkıda kan ve karın ağrısı gibi birçok semptomla ilişkilendirilebilir (Kuipers *et al.*, 2015).

CRC oluşumuna neden olan tümör hücreleri, klonal ömür, dinamikler ve tedaviye yanıt açısından değişkenlik göstermelerinden dolayı fonksiyonel özellikleri açısından oldukça heterojendir (Kreso *et al.*, 2013). CRC'nin çoğunluğu sporadiktir (%70-80) ve yaş önemli bir risk faktörüdür. Bu hastalığa sahip vakaların sadece küçük bir kısmı, ailesel adenomatöz polipoz (%1'den az), Lynch sendromu (polipoz olmayan kalıtsal CRC) (%2-%5) veya MYH geniyle ilişkili polipoz (<%1) gibi kalıtsal durumlardan kaynaklanmaktadır. Normal kolorektal epitel hücreleri, kontrolsüz büyüme ve apoptozdan kaçınma gibi özellikler kazanarak malign forma dönüşür. Hızlı hücre proliferasyonu epitelde prekanseröz bir lezyon

olan adenoma dönüşebilen polipoid bir yapı oluşturur. Bir adenom, mutasyonlar biriktikçe ve hücreler gerekli malign özellikleri kazandıkça CRC'ye dönüşebilir (Şekil 5) ve kanser hücreleri başlangıçtaki bağırsak tümöründen ayrılabilir ve yakın veya uzak dokulara göç edebilir (Paschos *et al.*, 2014). Bunlara ek olarak enflamasyon da, birçok dokuda malign transformasyon, kanser progresyonu ve patogeneizde rol oynayabilir. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi iltihaplı bağırsak hastalıkları enflamasyona örnek verilebilir. Bu hastalıklar kronik iltihaplanma ile tümör gelişimini destekleyebilir ve kolon kanseri gelişimine sebep olur (Arnst *et al.*, 2019). Çoğu kolorektal tümöre, tübüler adenomlar veya tırtıklı polipler gibi kanser öncesi polipler neden olmaktadır. Adenomlar, DNA onarımını ve hücre çoğalmasını düzenleyen normal mekanizmalarda bir değişiklik meydana geldiği zaman gelişir. Yüzey hücrelerinin bağırsak mukozasından sürekli kaybı nedeniyle epitel hücrelerinin yenilenmesi gerekir; çoğalma sadece kript tabanında gerçekleşir. Mutant hücreler kolonik lümene doğru ilerledikçe, öngörülebilir terminal farklılaşma ve nihai apoptoz süreci bozulur ve ayrı adenomlar oluşur. Bu adenomların boyutu zamanla artabilir ve displastik özellikler geliştirmeye başlayarak sonunda invaziv potansiyel kazanabilir (Nguyen *et al.*, 2020). Son yıllarda, erken tanı, yeni kemoterapötikler, tarama programları, radyasyon onkolojisindeki gelişmeler ve cerrahi teknikler sayesinde kolorektal kanserli hastaların yaşam kalitesinde önemli bir artış sağlanmıştır (Tardu *et al.*, 2016). Kolorektal kanseri tespit etmek için birkaç tanı yöntemi mevcuttur. Bunlar kolonoskopi, sigmoidoskopi, DCBE yöntemi ve BT tarama yöntemidir.



Şekil 5. Kolorektal kanser gelişiminin şematik gösterimi

Kolonoskopi

Kolonoskopi kalın bağırsakta oluşan poliplerin erken dönemde saptanması ve çıkarılması temeline dayanarak tedavi sonuçlarının iyileştirilmesine hizmet eden ve böylece kanser oluşumunu önleyen bir yöntemdir (Kowalczyk *et al.*, 2020). ABD Ulusal Polip Çalışması tarafından yapılan çalışmalarla kolonoskopinin, kolorektal kanser insidansını ve mortalitesini önemli ölçüde azaltma etkinliğinin olduğu iyi bir şekilde gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen son 20 yıllık verilere göre kolorektal kanserin mortalitesinde %53 oranında azalma olduğu görülmektedir (Zauber *et al.*, 2012). Bu yöntem yüksek teşhis doğruluğuna sahiptir ve tümörün yerini belirleyebilir. Bundan dolayı hem tanısal hem de

tedavi edici etki sağlayan tek tarama tekniği olma özelliğine sahiptir. Bununla birlikte, kolonoskopi eş zamanlı olarak biyopsi için örnek alınmasına imkan vermektedir; böylelikle örneğin histolojik olarak tanımlanıp doğrulanmasını da sağlayarak moleküler profillemenin oluşturulmasına olanak sağlamaktadır (E. J. A. Morris *et al.*, 2015; Pox *et al.*, 2012). Aseptomatik dönemde saptanan kanserlerde prognozu çok daha iyi sonuç vermektedir (Kowalczyk *et al.*, 2020). Kolonoskopi bu olumlu terapötik etkilerinin yanı sıra ayrıca invaziv bir yöntemdir. Bu sebepten dolayı uygulanan prosedür, perforasyon ve polipektomi sonrası kanama gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilir (Binefa *et al.*, 2014).

Sigmoidoskopi

Sigmoidoskopi kolonoskopiye kıyasla sedasyona gerek duyulmadan geręekleřtirilen bir yöntemdir ve işlem aşamasında daha az hazırlık gerektirdiğinden büyük bir avantaja sahiptir. Bununla birlikte, sigmoidoskopi sadece distal kolon neoplazmalarını tespit edebildiğinden dolayı büyük bir dezavantaja sahiptir (Binefa *et al.*, 2014). Kolonoskopiden farklı olarak, sigmoidoskopiye değerlendiren randomize klinik çalışmaların sonuçları mevcuttur. CRC insidansında %33'lük, mortalitede %43'lük bir azalmanın elde edildiği bir ABD alışması en olumlu sonuçlardan biridir (Lawton, 2013). Birleşik Krallık ve İtalya (SCORE)'da yapılan çalışmalarda ise insidansta %21 mortalitede ise %26'lık bir azalma olduğu ortaya konularak tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir (Atkin *et al.*, 2010; Segnan *et al.*, 2011). Bu olumlu verilerin yanı sıra Norveç çalışmasında, 7 yıllık takipten sonra hiçbir fayda sağlamadığına dair sonuçlar elde edilmiştir (Hoff *et al.*, 2009).

DCBE yöntemi

DCBE yöntemi ile ilgili çok az veri mevcuttur. Popüler Ulusal Polip alışmasında DCBE'nin 6 mm'nin altındaki poliplerin %32'sini, 6 ila 10 mm arasındaki poliplerin %53'ünü, 10 mm'den büyük poliplerin %48'ini saptadığı ortaya konulmuştur (England, 2000). DCBE, maliyetinden ve toplum tarafından daha az kabul görmesinden dolayı tarama için çok sık kullanılan bir yöntem değildir. Bu yüzden genellikle DCBE, endoskopik tekniklerin tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır (Binefa *et al.*, 2014).

Bilgisayarlı tomografi (BT taraması)

BT kolonografi, çok yenidir ve tarama için çok az araştırılmıştır. Bu tarama yönteminde sedasyona gerek duyulmaz, fakat geleneksel kolonoskopide olduğu gibi ön bir hazırlığa ihtiyaç vardır ve lezyon saptanması halinde lezyonları çıkarmak veya biyopsi yapmak için ek bir eksplorasyonun yapılması gerekmektedir (Von Wagner *et al.*, 2012). BT kolonografisi kullanılarak iki analiz yapılmış ve her iki analizde de aynı sonuca varılmıştır.

Yapılan analizler sonucu BT kolonografisinin 10 mm'den büyük poliplerin saptanmasında duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olduğu sonucuna varılmışken (%82); 10 mm'den küçük polipler için bu duyarlılık ve özgüllük saptanamamıştır (Sosna *et al.*, 2003).

Kolorektal kanseri tanılamadaki tüm bu gelişmelere rağmen, esas olarak metastatik, tekrarlayan veya lokal olarak ilerleyen tümörlerden dolayı kötü prognoz hala bir gerçektir ve bu kötü prognozün üstesinden gelmek için daha etkin ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Tardu *et al.*, 2016).

Caco-2 Hücre Hattı

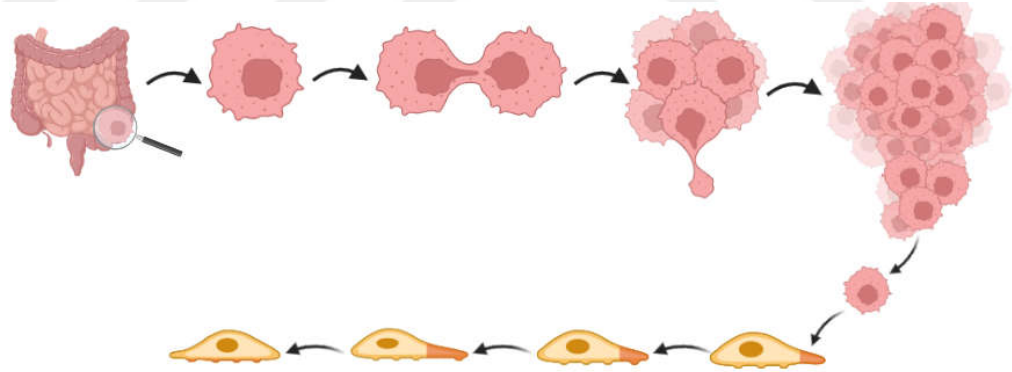
İnsan Caco-2 hücre hattı, bağırsak epitel bariyerinin en yaygın ve kapsamlı bir şekilde karakterize edilen ve 30 yılı aşkın bir süredir *in vitro* çalışmalarda kullanılan hücre tabanlı modeldir. Belirli koşullar altında, Caco-2 hücreleri olgun hücrelerden kendiliğinden farklılaşır ve bozulmamış tek tabakalar oluşturur. Caco-2 hücreleri bir kolon adenokarsinomundan türetilir ve kültür ortamına alındıktan sonra kültürde belirli bir süre spontan farklılaşmaya uğrayarak polarize ince bağırsak enterositlerinin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini geliştirir (Hiebl *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2018). Caco-2 hücreleri kültür ortamına alındığında öncelikle fırça kenarlı mikroviller aşamalı bir şekilde oluşmaya başlar. Hücreler kültür ortamına alındıktan sonra her hücrenin kapladığı yüzey, 5 ila 20 gün arasında kademeli olarak azalır ve hücreler arasında yakın bağlantılar gelişir. Eş zamanlı olarak mikrovillilerin uzunluğu ve yoğunluğu artar. Caco-2 hücreleri, 21 günlük kültürün ardından iyi gelişmiş sıkı bağlantılar oluşturur. Kültüre alındıktan sonraki 30. günde, hücre yüzeyi tipik enterosit benzeri morfoloji oluşturmaya başlar ve 30 gün sonra tam yapısal polarizasyon meydana geldiğinde, çoğu hücre uzun ve düzenli mikrovilli bir yapı ile tam fırça sınırları geliştirir. Son olarak tam polarize olan Caco-2 hücreleri, insan ince bağırsak mukoza hücrelerine benzemeye başlar (Awortwe *et al.*, 2014).

Farklılaşan Caco-2 hücreleri, belirli koşullar altında geçirgen filtre destekli kültür kaplarında tek tabaka oluşturarak büyür (Y. Gao *et al.*, 2015; H. Y. Tan *et al.*, 2018). Hücrelerin üst tarafında fırça kenarlı mikrovillilerin oluşması, hücreler arası sıkı bağlantıların gelişmesi ve mevcut çeşitli metabolik enzimlerin varlığı Caco-2 hücrelerinin en belirgin özelliklerinden bazılarıdır (H. Y. Tan *et al.*, 2018). Caco-2 hücre hattı; ilaç-ilac etkileşimlerinin araştırılması, ilaç taşıyıcılarının substratlarının ve/veya inhibitörlerinin tanımlanması ve ilaçların bağırsak zarı enterositleri aracılığıyla absorpsiyonunun değerlendirilmesi gibi birçok amaç için çalışmalarda kullanılmaktadır (Awortwe *et al.*, 2014; Mohammadi Farsani *et al.*, 2018). Caco-2 hücresinde pasaj sayısı, ortamın bileşimi ve kültür sistemi gibi bazı faktörler hücrenin farklılaşmasını, çoğalmasını ve fizyolojik özelliklerini

etkileyebilir. Caco-2 hücreleri hücre özelliklerinin iyi karakterize edildiği sınırlı bir pasaj aralığında kullanılmalıdır (Mohammadi Farsani *et al.*, 2018).

Kolorektal Kanser ve Metastaz

Metastaz, herhangi bir dokuda veya organda oluşan tümör hücrelerinin, bulunduğu bölgeden kan ve lenf sistemi yoluyla uzak doku ve organlara yayılım göstermesidir (Şekil 6). Metastaz, tümör hücrelerinde genomik değişikliklerin birikmesine neden olan, iyi huylu bir lezyondan hastanın ölümüne neden olabilecek sonuçlar doğuran karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir (Sayagués *et al.*, 2016). Metastatik kanserler çoğu durumda tedaviye yanıt vermemektedir. Bu nedenle metastaz kansere bağlı ölümlerin başlıca sebebinin oluşturur ve kanser ölümlerinin %90'ının fazlasından sorumludur (Jiramongkol & Lam, 2020). Metastaz; çevre dokulara invazyon, vaskülatür intravazasyon, sistemik dolaşım yoluyla translokasyon, uzak sekonder bölgelerin parankimi içine ekstrasvazasyon, mikrometastazların oluşumu ve makroskopik ikincil tümörlerin oluşumu gibi aşamalardan geçerek oluşmaktadır (Mani *et al.*, 2007). Birçok kanser hücrelerinin mikrometastaz yaptığı yaygın olarak görülmektedir, ancak makrometastazlar nadiren meydana gelmektedir. Mikrometastazlar, yabancı doku ortamında hayatta kalmayı veya adapte olmayı başaramayan malign hücrelerin büyük çoğunluğu için son metastatik aşamadır (Paschos *et al.*, 2014).



Şekil 6. Kanser hücre metastazının şematik gösterimi

Kolorektal kanser (CRC) dünya çapında gastrointestinal kanserler arasında en yaygın görülen kanser türünü oluşturmaktadır. Metastaz, CRC'li hastalarda ciddi bir ölüm nedenidir (P. Yang *et al.*, 2019). CRC, genetik ve epigenetik değişikliklerin zamanla birikmesi sonucu normal kolon mukozasının invaziv kansere dönüşmesine sebep olan bir hastalıktır. Çoğu CRC, adenomlardan gelişmektedir ve neoplaziye dönüşme süresi yaklaşık 10-15 yıl olarak tahmin edilmektedir. Bu süre ise adenomların invaziv karsinoma dönüşmeden önce saptanması ve cerrahi yöntemler kullanılarak çıkarılması için mevcut süreyi belirtmektedir (Binefa *et al.*, 2014). CRC'li hastaların yarısından fazlasında radikal cerrahi uygulanmadan

önce mikrometastaz gözlemlenmektedir, bu durum postoperatif metastazın oluşmasına ve kolorektal kanserin nüksetmesine sebep olmaktadır (P. Yang *et al.*, 2019). Çevre doku ve lenf düğümlerine invazyon yapan kanserli hastalarda sağkalım oranları %70'dir ve distal metastazın olduğu ileri evre hastalarda sağkalım oranları %14'e düşmektedir (Henley *et al.*, 2021; Ward *et al.*, 2021). Birçok CRC, semptomların ortaya çıktığı ileri evrelerde tespit edilmektedir (Binefa *et al.*, 2014). CRC; doğrudan yayılma, lenfatik yayılma, karaciğere portal venöz yoluyla yayılma, periton yayılımı ve akciğer, kemik ve beyin dahil olmak üzere uzak organlara vasküler yayılma olmak üzere beş yolla metastaz yapmaktadır. Metastatik yayılımın en çok olduğu bölgelerden biri karaciğerdir. CRC teşhisi konan hastaların neredeyse yarısında, hastalıklarının herhangi bir döneminde karaciğer metastazı olduğu tespit edilmektedir. Karaciğer metastazının sebebi anatomiktir, çünkü kolon ve rektumdaki tüm venöz, kan portal dolaşım yoluyla karaciğere akmaktadır. Karaciğer metastazı olan hastalar tedavi edilmediğinde ortalama sağkalımları 6-9 ay gibi bir süredir. Akciğer, karaciğerden sonra kolorektal metastazların en yaygın görüldüğü ikinci bölgedir ve metastatik hastalığın yaklaşık %10-15'ini oluşturmaktadır. Çoğu durumda, pulmoner metastazlar karaciğer metastazları ile eşzamanlı olarak ortaya çıkabilmektedir (Shantanam, 2018). Kolorektal neoplazmların diğer bir metastaz yeri ise kemiktir. Kemik metastazına sahip olan çoğu hasta, hastalık süreçleri boyunca ağrı, instabilite, sinir sıkışması, hiperkalsemi ve patolojik kırık gibi morbiditeye ve yaşam kalitesinin düşmesine neden olacak birçok semptom geliştirmektedir (Kawamura *et al.*, 2018). CRC'nin diğer bir metastaz yeri ise beyindir. Fakat beyin metastazı diğer bölgelere kıyasla daha az görülmektedir. Beyin metastazları daha çok üç veya daha fazla farklı bölgeye metastazı olan hastalarda gözlenmektedir (Riihimäki *et al.*, 2016). Metastazlar çoğunlukla frontal lob ve serebellumda görülmektedir. Beyin metastazları tespit edildiğinde, öncelikle tıbbi stabilizasyonun yapılması ve nörolojik bozulmanın önlenmesi gerekmektedir (Soffietti *et al.*, 2017).

Kolorektal Kanser ve Apoptoz

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, organizma gelişimi ve doku homeostazında önemli bir rol oynayan normal gelişim ve yaşlanma sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölümü sürecidir (Okushi *et al.*, 2015). Normal dokularda hücre kaybı ve yeni hücre oluşumu denge halindedir. Normal kolon epitelinde de apoptoz ile hücre proliferasyonu arasındaki dinamik bir denge ile korunmaktadır (Kosinski *et al.*, 2007). Ama patolojik koşullarda özellikle kanserde hücreler, kontrolsüz çoğalmaya neden olan apoptoza bağlı ölüme maruz kalma yeteneklerini kaybederler. Bu durum apoptoza karşı içsel veya edinilmiş direnç geliştirmelerinden kaynaklanmaktadır ve insan kanserlerinin en önemli

özelliğinden biridir (Okushi *et al.*, 2015). Kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi de dahil olmak üzere şu anda mevcut olan antikanser tedavilerinin çoğu, kanser hücrelerinde ölüm/apoptotik yolları aktive ederek etki göstermektedir. Bundan dolayı apoptozdan kaçınma, tümör gelişimine, ilerlemesine ve ayrıca tedavi direncine sebep olmaktadır (Block *et al.*, 2015). Uyarıya bağlı olarak, apoptozu indükleyebilen iyi karakterize edilmiş başlıca iki ana yol bulunmaktadır. Bunlar intrinsik (mitokondriyal) yol ve ekstrinsik (ölüm reseptörü) yoludur (Elkin *et al.*, 2018).

Mitokondriyal bağımlı olan intrinsik yol genetik hasar, hipoksi, şiddetli oksidatif stres, kemoterapötik ajanlar ve UV radyasyonu gibi ölüm uyaranlarına yanıt olarak çalışmaktadır (Raducka-Jaszul *et al.*, 2020). Apoptoz hızı, hücrenin türüne, apoptotik uyaranların tipine ve gücüne bağlıdır. Apoptoz indüksiyonunun intrinsik yol aracılığıyla gerçekleşebilmesi için minimum birkaç saatlik aktive edici uyarana ihtiyaç duyulmaktadır (Palchaudhuri *et al.*, 2015). İntrinsik (mitokondriyal) yolda, ölüm uyaranları ya doğrudan ya da Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından transdüksiyon yoluyla mitokondriyi hedef alarak kaspazların aktivasyonuna sebep olur ve bunun bir sonucu olarak apoptotik süreç başlamış olur (Jang *et al.*, 2002). Apoptotik yolu etkileyen üç grup Bcl-2 ailesi proteini vardır. Bu proteinlerden Bax ve Bac gibi proapoptotik çok alanlı proteinler ve Bim, Bad, Bid ve tBid gibi yalnızca proapoptotik BH3 alanı içeren proteinler, apoptozun indüklenmesinde görev alırken; Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik proteinler apoptotik hücre ölümünü bloke etmekle görevlidir. Apoptozun başlaması, proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki dengeye bağlıdır (Galluzzi *et al.*, 2012). Proapoptotik protein seviyeleri antiapoptotik protein seviyelerinden yüksek olduğunda apoptozun başlaması tetiklenir. Aktivatör BH3, Bid ve Bim gibi proteinlerin mitokondriyal membrana bağlanmasını sağlayarak, aktive olan ve mitokondriyal dış zarın geçirgenliğinin artmasını sağlayan Bax ve Bac gibi gözenek oluşturmalarının afinitesini arttırmaktadır. Sadece BH3 proteinleri olan Bad, Bid ve Bim gibi proteinler, hücresel apoptozun oluşmasına neden olan Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik proteinleri bağlar ve inhibe eder (Kale *et al.*, 2018; Siddiqui *et al.*, 2015). İntrinsik (mitokondriyal) yolun mekanizması şu şekilde ilerlemektedir. Öncelikle intrinsik yolda DNA hasarı, ısı şoku ve reaktif oksijen gibi çeşitli uyaranlarla aktive edildiğinde mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP) artar ve sitoplazmaya sitokrom c'nin apoptoz indükleyici faktör (AIF) ile birlikte serbest bırakılması ile sonuçlanır (Dejean *et al.*, 2006). Sitoplazmaya salınan bu iki faktörden sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (ApF1)'e bağlanır ve aktive eder (Tian *et al.*, 2017). Sitokrom c ve ApF1 kompleksine ATP bağlanınca apoptozom kompleksi oluşur ve bu kompleks başlatıcı kaspaz 9'u keserek aktifleştirir (W. Zhang *et al.*, 2018). Aktifleşen kaspaz 9 prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3'e dönüştürür (Raychaudhuri *et al.*, 2010). Kaspaz 3

ICAD'a bağlanarak CAD'ı serbest hale getirir; CAD ise yüzey kabarması, hücre büzülmesi ve kromatin yoğunlaşmasına sebep olarak apoptotik süreci başlatmış olur (Y. J. Wang *et al.*, 2015).

Ekstrinsik apoptoz yolu ise reseptör aracılı bir apoptoz mekanizmasıdır ve hücre dışı ölüm ligandlarının hücre yüzeyi ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla hücre dışında başlamaktadır (C. Park *et al.*, 2015). Bu apoptotik sinyal yolu, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinin ölüm ligandlarının spesifik ölüm reseptörlerine bağlanmasını içermektedir (Y. Ji *et al.*, 2019). Fas, TNF-R1, DR4 ve DR5 ekstrinsik yolda en iyi bilinen ölüm reseptörleridir. Bu reseptörler ortak sinyalleme mekanizmalarına sahiptir ve her reseptör kendi spesifik ligandı tarafından uyarılmaktadır. Örneğin; DR4/DR5, Fas ve TNF-R1 reseptörlerine sırasıyla TRAIL, Fas Ligand ve TNF ligandları bağlanmaktadır (Beurel & Jope, 2006). Hücre yüzeyindeki bu ölüm reseptörlerine ölüm sinyalleri bağlandığında reseptörün trimerizasyonu indüklenmektedir. İndüklenmiş trimerize ölüm reseptörleri, sitoplazmik proteinler FADD (Fas ilişkili ölüm alanı proteini) ve prokaspaz-8 veya prokaspaz-10'a bağlanarak ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) yapısını oluştururlar (Peter & Krammer, 2003). DISC içindeki prokaspaz-8/10, proteolitik bölünme yolu ile aktive edilmektedir; bu durum ise daha sonra başta kaspaz-3, 6 ve 7 olmak üzere efektör kaspazların aktivasyonuna neden olmaktadır (Kaufmann & Hengartner, 2001). Aktifleşen kaspaz-8/-10 sırasıyla prokaspaz-3/prokaspaz-7 gibi yürütücü kaspazları aktive etmektedir (Kranz & Boutros, 2014). Aktif kaspaz 8 iki yolla kaspaz 3'ü aktive eder. Aktifleşen kaspaz 8 ya doğrudan kaspaz 3'ü aktiveleştirir ya da indirek olarak ilk önce Bid'i keserek tBid oluşturur ve intrinsik yolda kaspaz 9'u aktive ettikten sonra prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3'e aktive eder (Lovell *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2006). Daha sonra aktif kaspaz-3, inaktif ICAD'ı aktif CAD'a dönüştürdükten sonra kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi parçalayarak aktive eder ve apoptozu başlatır (Sp *et al.*, 2020).

İntrinsik ve ekstrinsik süreçlere ek olarak, T-hücresi aracılı sitotoksisiteyi ve hücrenin perforin-granzime bağlı olarak öldürülmesini hedefleyen ve hücre ölümünü indüklemekten sorumlu granzim B ve granzim A proteazlarını içeren başka bir yol daha bulunmaktadır (Ewen *et al.*, 2012). İntrinsik, ekstrinsik ve granzim B aracılı apoptoz yolları farklı başlama mekanizmalarına sahip olmakla birlikte aynı sonuca sahiptirler. Bu üç apoptotik yol da nihayetinde kaspaz ailesinin üyeleri olan proteolitik enzimlerin aktivasyonunu sağlayarak etki göstermektedir. Granzimler, hedef hücrelerde apoptotik ölümü hızlı bir şekilde indükleyebilen sitotoksik T lenfositler (CTL) ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi sitotoksik lenfositlerin anahtar efektör molekülleri olarak tanımlanmaktadır (Hagn *et al.*, 2014). Serin proteaz granzimleri ve gözenek oluşturucu protein olan perforin, litik granüllerinde veya sitotoksik

lenfositlerin sitozolündeki zara bağlı salgı lizozomlarında depolanmaktadır (Voskoboinik *et al.*, 2015). Granzimler, aspartat kalıntılarının karboksi tarafındaki proteinleri parçalayabilen serin proteazlardır (X. Y. Li *et al.*, 2014). Granzim A (GzmA), hedef hücreleri öldürmek için aktive edilmiş CTL'ler ve NK hücreleri tarafından salgılanan sitotoksik kaspaz bağımsız bir serin proteazdır (Lu *et al.*, 2011). Gzm A DNA'nın tek zincirinde çentik meydana getirerek DNA hasarı oluşturmaya yoluyla hücre ölümüne neden olmaktadır (Chowdhury *et al.*, 2006). Diğer bir serin proteinaz ailesinin üyesi olan granzim B (GzmB) ise, aspartat kalıntılarının sonra proteinleri proteolitik olarak parçalamaktadır. Bunun bir sonucu olarak DNA fragmentasyonu ve hızlı membran bütünlüğü kaybı oluşumu meydana gelmektedir (Chuang *et al.*, 2014; Salti *et al.*, 2011). GzmB aracılı apoptozda, GzmB lipid hücre zarlarına bağlanmayı başlatmadığı ve hedef hücreye girmesi zar gözenek oluşumunu gerektirdiği için, perforinin varlığına bağlıdır (Hodge *et al.*, 2014; Hoves *et al.*, 2010). NK hücreleri ve CTL'ler hedef hücreyi tanıdıktan sonra hedef hücre ile sıkı bir apozisyon oluşturarak immünolojik sinaps oluşturmaktadır. Yüzey reseptörü sinyali sonucu litik granüllerden iki hücre arasındaki sinaps içine granzimlerin ve perforinin endositik salınımı gerçekleşir (De Saint Basile *et al.*, 2010). Daha sonra perforin hedef hücre zarına girer ve granzimin hedef hücreye yayılabilmesini sağlamak için geçici gözenekler oluşturmak üzere oligomerize olur (Lopez *et al.*, 2013; Thiery *et al.*, 2011). GzmB, öncelikle CTL'ler tarafından salgılandıktan sonra hedef hücrelerdeki mannoz-6-fosfat reseptörüne bağlanır ve daha sonra GzmB, perforinin oluşturduğu gözeneklerden hedef hücrenin sitoplazmasına salınır (Froelich *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997). Hedef hücreye giren GzmB, Bid'i keserek tBid'i oluşturur. Tbit ise proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bax/Bac'ın oligomerizasyonunu ve bunun sonucunda intrinsik apoptoz yolunun aktivasyonunu indüklemektedir (Lalier *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2011). Bununla birlikte GzmB prokaspaz-3'ü doğrudan aktif kaspaz 3'e dönüştürerek ekstrinsik yolla apoptozu başlatabilir; fakat bu yol, bid aktive olmadığından verimsizdir (Carrero *et al.*, 2008).

Apoptoza direnç, çeşitli seviyelerde çeşitli sinyal yollarının etkileşimini içermektedir. Bu sebepten dolayı, kanser hücrelerinin apoptoza girmesini sağlamak için tek yol hedefli ajanların kullanılması uygun bir strateji değildir; birden fazla yolu hedefleyen ajanların kullanımına ihtiyaç vardır (Okushi *et al.*, 2015).

Hücre İskeleti ve Elemanları

Hem prokaryotik hem de ökaryotik canlı sistemler, hücre iskeleti adı verilen oldukça dinamik ve yapılandırılmış işlevsel birimler tarafından düzenlenmektedir. (M. Gao *et al.*, 2018). Hücre iskeleti, hücre şeklini korumaya yardımcı olan (Tokuda *et al.*, 2014), organeli organize eden ve taşıyan (Barak *et al.*, 2014), mekanik destek sağlayan ve hücre bölünmesine

ve hareketine imkan sağlayan (Rao & Maddala, 2016) hücredeki en önemli birimlerdir. Ökaryotik hücre iskeleti aktin filamentleri, ara filamentler, septinler ve mikrotübüller olmak üzere dört ana filament türünden meydana gelmektedir (M. Gao *et al.*, 2018).

Aktin filamentleri

Aktin; bitki, hayvan ve mantar hücreleri de dahil olmak üzere tüm ökaryotik hücrelerde en bol bulunan proteinlerden biridir. Bu protein, bir organizmanın hayatta kalabilmesi için gerekli olan birçok biyolojik süreçte görev almaktadır. Aktin proteinleri, hücrelerin şekillerini korumalarına yardımcı olan, hücrelerin bölünmesi ve hareket etmesi için gereken kuvveti sağlayan uzun filamentler oluşturmaktadırlar (Ngo *et al.*, 2015). Aktin filamentleri, ökaryotik hücrelerde sitokinez, lamellipodial uzama, yapışma, hücre içi taşıma, kas kasılması ve nükleer işlevler gibi birçok önemli hücresel işlevlerde görev alır ve bu işlevlerini genellikle aktin ve spesifik aktin bağlayıcı proteinler (ABP) ile etkileşime girerek gerçekleştirir (Ngo *et al.*, 2016). Aktin filamentleri sarmal yapıdadır ve birçok aktin alt biriminin bir araya gelmesinden meydana gelmektedir. Aktin filamentleri, filamentlerin uç kısımlarına yeni aktin alt birimleri eklenerek veya mevcut alt birimler uçlardan çıkarılarak devamlı olarak büyüyen ve küçülen değiştirilebilir yapılardır. Aktin filamentinin bir ucu diğerinden daha hızlı büyümektedir ve hızlı büyüyen bu uç dikenli uç olarak adlandırılırken; yavaş büyüyen uç, sivri uç olarak adlandırılmaktadır (Ngo *et al.*, 2015). Aktin filamentlerinin hızlı büyüyen ucu olan dikenli uçlar, parmak benzeri filopodia ve peçe benzeri lamellipodia gibi çıkıntılı yapıların oluşumunda görev almaktadır. Dikenli uçlar filament polimerizasyonu için önemli bir bölge olan plazma zarında, zarın iç kısmına bakmaktadır. Filamentlerin yapısının bozulması sivri uçta gerçekleşir ve zardan uzağa yönlendirilir (Pacheco & Gallo, 2016).

Ara filamentler

Ara filamentler, hem güçlü hem de esnek polimerlerdir (Goldman *et al.*, 2008). Ara filamentler 10 nm çapındadır ve 25 nm mikrotübüller ve 7 nm aktin filamentler arasında orta büyüklükte olmaları sebebiyle bu isimle adlandırılmıştır (Alonso *et al.*, 2015). Ara filamentler aktinin ve mikrotübüllerin aksine, polar olmayan yapılardır, birleşim dinamikleri nükleotitten bağımsızdır ve bilinen bir taşıma işlevleri bulunmamaktadır (Tanuj Sapra & Medalia, 2021). Ara filamentler, mekanik olarak dirençli bir iskele oluşturur; bu iskele doku stabilitesi ve tutarlılık sağlar (Coch & Leube, 2016). Hücre yüzeyinde, çeşitli bağlayıcı proteinler aracılığıyla desmozomlar, hemidesmozomlar, fokal adezyonlar ve hücre dışı matris ile etkileşime girmektedirler (Bayir & Sendemir, 2021). Ara filamentler, ara filament

proteinlerinin baş ve kuyruk bölgelerinde fosforile olmaktadır ve fosforilasyon/defosforilasyon dinamikleri, ara filamentlerin yapısal organizasyonunu ve işlevini hücre ve dokuya özgü bir şekilde düzenlemede önemli bir göreve sahiptir (Sihag *et al.*, 2007). Ara filamentler özellikle epitel hücrelerinde bol miktarda bulunmaktadır (Coch & Leube, 2016). Ara filamentler hücre büyümesinin düzenlenmesinde, farklılaşmada, sinyal iletiminde, apoptozda ve hücre göçünde rol oynamaktadır (Schwarz & Leube, 2016). Bununla birlikte ara filamentlerin nükleer şekli belirlediği ve mitokondrinin, lizozomların, golgi aygıtının, sentrozomların, taşıma keseciklerinin, melanozomların, ribozomların, lipid damlacıklarının ve hücreler arasındaki bağlantıların ve hücre dışı matrisin konumunu etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Chang *et al.*, 2009; Y. Guo & Yixian, 2015; Seltnann *et al.*, 2013).

Septinler

Septinler, tüm ökaryotlarda korunan bir GTP bağlayıcı hücre iskeleti protein ailesidir (Nishihama *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2007). Septinler, heterooligomerik kompleksler halinde bir araya gelmektedir ve hücrel membranlar, aktin filamentleri ve mikrotübüllerle birleşerek polar olmayan filamentler oluştururlar (Mostowy & Cossart, 2012; Saarikangas & Barral, 2011). Septinler protein bağlanması için iskele görevi görürler, hücre membranı ile etkileşime girerler ve aktin filamentleri ve mikrotübüllerle birlikte hayvan hücrelerinin şeklini korumak ve göçlerini kolaylaştırmak için hareket ederler (Saarikangas & Barral, 2011). Bunlara ek olarak, septinler hücre bölünmesine katkı sağlayan difüzyon bariyerlerini oluşturabilir. Septinler ayrıca kamçı ve silya oluşumunda, kromozom ayrımında, hücre bölünmesi, farklılaşması ve morfogenezin temel süreçlerinde ve apoptozda görev almaktadır (K. A. Akhmetova, I. N. Chesnokov, 2018).

Mikrotübüller

Hücre iskeletinin diğer bir elemanı olan mikrotübüller oldukça dinamik yapılardır ve önemli hücrel işlevlerin gerçekleşmesinde görev almaktadır. Mikrotübüller; proliferasyonda, hücre göçünde, hücre içi aktivitenin sağlanmasında ve uzun mesafeli taşımada, organellerin konumlandırılmasında rol oynamaktadır; böylelikle fazlar arası hücrel mimariyi oluşturur ve mitozda kromozom ayrımını sağlamaktadır (Kaverina & Straube, 2011). Mikrotübüller aktin ve ara filamentlerden çok daha geniş ve serttir (Kikumoto *et al.*, 2006). Mikrotübüller birbirine bağlı bir şekilde ağ oluşturur ve bir filamentte etki eden aktif kuvvetler, ağ içindeki diğer filamentlerin hareketine de etki etmektedir (Pallavicini *et al.*, 2014). Mikrotübüller α ve β tübülün heterodimerlerinden oluşan, çapı yaklaşık 25 nm olan içi

boş tüplerden oluşan filamentlerdir. Heterodimerler lineer 13 protofilamentlerden meydana gelir ve sonrasında içleri boş ve kutupsal bir silindir oluşturmak üzere yanal olarak birleşirler (S. Li *et al.*, 2012). Her tübülün monomeri bir guanin nükleotidini bağlamaktadır. α tübüline (N-bölgesi) bağlı nükleotit, intradimer ara yüzüne gömülüdür ve polimerizasyon üzerine hidrolize olmamaktadır; β - tübüline (E-bölgesi) bağlı GTP ise çözelti içerisinde değiştirilebilir ve polimerize halde hidrolize olabilmektedir. Protofilamentler arasındaki yanal etkileşimler, bitişik α ve β tübülünlerin homotipik temasları arasında meydana gelir ve α tübülün ve β tübülünün yanal olarak temas ettiği bölgede bir B-kafesi oluşur (M. Gao *et al.*, 2018). Mikrotübüller kararlı yapıda değildirler ve bu durum dinamik kararsızlık olarak adlandırılmaktadır (Pallavicini *et al.*, 2014). Mikrotübülün eksi ucu hücrelerde genel olarak ana mikrotübül düzenleme merkezine gömülü halde bulunmaktadır ve büyümeyiz; artı uç ise hücre alanı belirlemeye çalışır ve nihayetinde hücre kenarlarıyla temas etme eğilimindedir (Kaverina & Straube, 2011). Mikrotübüllerin alt birimleri filament yapılarının stabilizasyonunda çok önemli bir göreve sahiptir (Wawro *et al.*, 2019).

Hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılması, kinetokor lifleri (K-lifleri) adı verilen özel mikrotübül demetlerinin oluşumuyla mümkündür. Memeli hücrelerinde olgun K-lifleri, yaklaşık 25 mikrotübülden oluşmaktadır. Bu mikrotübüllerin dinamik artı uçları kinetokora bağlıdır, eksi uçları ise iğ kutuplarına gömülü halde bulunur veya iğ içindeki diğer mikrotübül demetleriyle dinamik bağlantılar oluştururlar (Sikirzhytski *et al.*, 2018). Kromozom ayrımı, hücre bölünmesi esnasında kromozomların iki hücreye bölündüğü temel biyolojik süreçlerdir. Ökaryotlarda kromozom ayrımı, esas olarak mikrotübüllerden oluşan iğ iplikçikleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Yu *et al.*, 2019). Mitotik iğ mikrotübülleri, fazlar arası hücre iskeleti mikrotübül ağlarından kayda değer ölçüde daha dinamiktir. Mitotik iğler merkezden çevreye doğru yayılım gösterir ve bölünen hücrelerde kardeş kromatitlerin sentromerlerine bağlanır; kinetokorda eş zamanlı olarak tübülün eklenmesi meydana gelirken, kutuplarda karşılaştırılabilir bir oranda tübülün kaybı oluşumuyla sonuçlanır. İğ iplikçiği kromozoma bipolar bağlanamazsa hücre, hücre döngüsü boyunca devam edemez; metafazda bloke olur ve nihayetinde apoptoza gider (Arnst *et al.*, 2019). Birçok sistemde, iğ mili uzama hızı kromozom ayrışmasından daha yavaştır, kromozomlar anafaz boyunca iğ mili kutuplarına daha yakın hareket etmektedirler. Kromozomların iğ kutuplarına doğru hareketi anafaz A olarak adlandırılırken; iğ milinin uzaması (iğ mili kutuplarının ayrılması) anafaz B olarak adlandırılmaktadır (Yu *et al.*, 2019).

Kanserlerde, aktin veya mikrotübüllerin kontrol edilemeyen dinamikleri anormal hücre bölünmesine, hücre morfolojisi veya boyutunda anormalliklere ve istilacı hücre

göçünün meydana gelmesine neden olmaktadır. Birçok tümör baskılayıcının mikrotübül ve aktin ile etkileşime girdiği ve bunun sonucu olarak hücre bölünmesi ve göçünü, epitelyal mezenkimal geçişleri (EMT) ve epitel konumlandırılması gibi birçok hücresel işlevleri bozduğu öne sürülmüştür (Pimm *et al.*, 2020). Mikrotübüller özellikle yönlü hücre göçünün bilinen düzenleyicileridir (Adams *et al.*, 2016). Hücrelerin göçü, karmaşık bir biyolojik süreçten oluşmaktadır; bu durum ise aktin, mikrotübüller, membran reseptörleri, lipidler ve hücre matrisinin yeniden düzenlenmesini gerektirmektedir. Hücrelerde lamellar, zar yüzeyini iten aktin filamentlerinin bir araya gelmesi sonucu üretilen fiziksel kuvvetler tarafından indüklenip zar çıkıntılarını uzatarak hareketleri başlatmaktadır (Pimm *et al.*, 2020). Mikrotübüller, hücrelerin göç etmesiyle çekirdeği ileri doğru hareket ettirmek ve sentrozomu konumlandırmak için ek çekme kuvveti uygulama yeteneğini kullanmaktadır (Letort *et al.*, 2016). Bu çekme kuvveti, hücreyi ileriye doğru itmek için yönlü olarak uzatılmış odak yapışma bölgelerinden ve aktin stres liflerinden üretilmektedir. Bununla birlikte aktin-miyozin stres lifleri tarafından kasılma kuvvetleri üretilir ve bu kuvvet hücre ilerledikçe hücreyi geriye doğru çeker (Pimm *et al.*, 2020). Kanseri hedeflemede mikrotübül dinamiklerine müdahale önemli bir antikanser stratejisidir. Mikrotübülleri hedef alan birçok ilaç, çok çeşitli malignitelerde terapötik etki göstermektedir. Mikrotübülü hedefleyen ajanlar G2/M fazında mitotik tutuklamaya sebep olma, mitotik iğ yapılarını bozma veya mitotik kontrol noktalarını indüklemeye gibi birçok farklı yola etki ederek terapötik bir etki sağlamaktadır (Arnst *et al.*, 2019).

Mikrotübül İnhibitörleri

Hücrelerin mitoz bölünmeyi tamamlayabilmesi için polimerizasyon ve depolimerizasyon dinamiklerinin koordineli bir şekilde işlemesi gerekmektedir. Mikrotübülleri hedef alan ajanlar klinik kullanımda hem hematolojik hem de katı tümörlerde terapötik faydaları olan başarılı antikanser ilaç sınıflarıdır (Mukhtar *et al.*, 2014; X. Zhang *et al.*, 2015). Bu terapötik ajanlar, tübülün polimerizasyonunu indükleyen mikrotübül stabilizatörleri ve tübülün polimerizasyonunu inhibe eden kararsızlaştırıcılar olarak sınıflandırılabilir (X. Zhang *et al.*, 2015). Mikrotübül hedefleyen ilaçlar, mikrotübül dinamiklerinin kontrolünü gerektiren mitozları bloke ederek hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Bununla birlikte GDP'ye bağlı polimerize olan tübülünü, aşırı stabilize edebilir veya mikrotübülleri destabilize ve depolimerize ederek terapötik etki sağlayabilir (Myers & Collins, 2016). Epatilonlar, diskodermolid, dosetaksel, paklitaksel gibi ajanlar mikrotübül stabilize edici ajanlar olarak kullanılırken; vinca alkaloidleri (vinblastin, vinkristin, vinorelbin, vindesin ve vinflunin), mikrotübül destabilize edici ajanlar olarak

kullanılmaktadır. Her iki tip ajan da hücre düzeyinde mitozda hücre döngüsü durmasına neden olabilir ve apoptoz yoluyla hücre ölümünü indükleyebilir (Mukhtar *et al.*, 2014).

Kanser tedavisinde mikrotübülü hedefleyen ajanların oldukça etkili olduğu ortaya konulmuş olmakla birlikte, uzun ve kısa süreli kullanımlarında olumsuz yan etkileri vardır ve direnç gelişimi görülmektedir. Bu durum ise klinikte uygulanabilirliklerini sınırlandırmaktadır. Tübülün bağlayıcı ajanların kullanımında bulantı, kusma ve ishal gibi yaygın semptomlar görülmesinin yanı sıra nörolojik ve hematolojik yan etkilerin oluşumu da başlıca önemli toksisiteler arasındadır. Tüm bu sebeplerden dolayı uygulamada doz sınırlayıcı etkilere sahiptir (Anchoori *et al.*, 2008; Mukhtar *et al.*, 2014).

Topoizomerazlar

DNA topolojisi *in vivo* olarak topoizomerazlar adı verilen enzimler tarafından düzenlenmektedir. Bu enzimler, DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon ve kromatin yeniden şekillenmesi gibi hücresel süreçlerde hayati öneme sahiptir (Spakman *et al.*, 2021; Thomson *et al.*, 2014). Bakteriyel ve ökaryotik organizmalardaki topoizomerazlar, tip I ve tip II topoizomerazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Bergant Loboda *et al.*, 2020). İnsan topoizomerazlarının iki formu olan topoizomeraz I (hTop 1) ve topoizomeraz II (hTop 2) önemli antikanser ilaçlarının hücresel hedefleridir (Delgado *et al.*, 2018).

Topoizomeraz I (Topo I), topolojik gerilimi azaltmak için çift zincirli DNA'nın yalnızca tek bir ipliğinin kırılmasını ve yeniden birleştirilmesini katalize etmektedir. Monomerik enzim Topo I, DNA gevşemesi için magnezyuma ihtiyaç duymaz ve ATP enerjisi gerektirmez (A. L. Li *et al.*, 2020). Tip I topoizomerazlar tip IA, tip IB ve tip IC olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır. Tip IA topoizomerazlar, DNA'ya bağlanabilmek için bir çentiğe veya tek zincirli bir bölgeye ihtiyaç duymaktadır (Delgado *et al.*, 2018). Topoizomeraz IA enzimi, DNA 5'-fosforil grubuna kovalent bir bağ ile tirozini bağlamaktadır. Serbest 3'-OH ucuna topoizomeraz IA takılır ve serbestçe dönemez. Bu durum, başka bir DNA segmentinin oluşmasına izin veren bir boşluk oluşmasına sebep olur. Oluşan yeni DNA segmenti boşluktan geçtikten sonra, kırık DNA'nın her iki ucu da yeniden birleştirilir. Bu olaya iplik geçişi mekanizması denilmektedir (Dekker *et al.*, 2002; Viard *et al.*, 2004). Tip IA topoizomerazın aksine, tip IB ve IC topoizomerazlar, dubleks DNA sarmalının her iki zincirini de parçalamaktadır; aktif bölge tirozinini bir 3'-fosforil grubuna kovalent olarak bağlar ve DNA süper sarmallarını gevşetmek için 'dönme' mekanizması vasıtasıyla DNA topolojisini düzenler (Delgado *et al.*, 2018).

Ökaryotik topoizomeraz II (Topo II) enzimleri, hem mitoz hem de mayoz esnasında etkin ve doğru kromozom ayrımı için gereklidir ve bu onları sitotoksik ajanlar için hedef haline getirir. Tüm Topo II enzimleri, DNA'nın çift zincirinde geçici kırılmalar meydana getirerek bir DNA çift sarmalının diğerinden geçişini katalize eder (Hammonds *et al.*, 1998). Homodimerik enzim olan Topo II enzimi işlevi için magnezyum ve ATP hidrolizine ihtiyaç duyar (A. L. Li *et al.*, 2020). Topo II, çift zincirli DNA'ya bağlanır ve 5'-DNA uçları arasında kovalent bir bağ oluşturarak DNA'da kademeli bir kırılma meydana getirir. Oluşan DNA segmenti, ATP ile çalışan bir klemp tarafından tutulur, sonrasında kırık yeniden birleştirilir (Hammonds *et al.*, 1998). İnsan topoizomeraz II'nin topoizomeraz II α (TOP2 α) ve topoizomeraz II β (TOP2 β) olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Topoizomerazın α -izozim formu 17q21-22 kromozomu üzerindeki bir gen tarafından kodlanmaktadır ve 170 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahiptir. β izoformu ise 3p24 kromozomu üzerindeki bir gen tarafından kodlanmaktadır ve 180 kDa'lık moleküler kütleyle sahiptir (Hammonds *et al.*, 1998). TOP2 α , mitoz sırasında DNA replikasyonu ve kromozom ayrımında görev almaktadır. (Matias-Barrios *et al.*, 2021). TOP2 β , hücre canlılığı için vazgeçilmezdir; gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve ifadesi hücre döngüsünden bağımsız gerçekleşir (Madabhushi *et al.*, 2015; Matias-Barrios *et al.*, 2021). Topoizomerazlar hücre canlılığının korunmasında kritik bir öneme sahip olmalarından dolayı kemoterapötikler için ilgi çekici bir hedef haline gelmiştir (Thomson *et al.*, 2014).

Topoizomeraz 2 (TOP2) İnhibitörleri

DNA topoizomeraz II (TOP2), canlı hücrelerde DNA topolojisini ve kromatin organizasyonunu düzenleyen temel bir nükleer enzimdir. Enzim, her iki DNA zincirinin kontrollü kırılması ve yeniden birleştirilmesi yolu ile DNA'daki burulma stresini azaltır. TOP2'yi hedef alan topoizomeraz inhibitörleri, bu katalitik döngünün en az bir adımına müdahale etmektedir (Lemke *et al.*, 2005). DNA TOP2'nin antitümör ilaçlar tarafından inhibe edilmesi, bölünebilme yetisi olan hücrelerin replikasyon ve transkripsiyon sırasında doğrudan DNA lezyonlarına dönüşmesine ve DNA zincir kırılmaları da dahil olmak üzere birçok farklı hücresel etkinin oluşmasına neden olur. Bununla birlikte bu ajanlar G2 ve mitoz sırasında DNA topolojisi ve kromozom kondenzasyonunda bozulmalara neden olarak da etki göstermektedir (Lemke *et al.*, 2005). DNA TOP2'yi hedef alan ilaçlar, kliniklerde çeşitli hematolojik ve katı tümörler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, şu anda klinikte kullanılan mevcut katalitik inhibitörlerin önemli hedef dışı etkileri, zayıf stabilite ve düşük etkinlik gibi olumsuz etkileri de bulunmaktadır (Matias-Barrios *et al.*, 2021). TOP2 inhibitörleri, TOP2 zehirleri ve katalitik inhibitörler olmak üzere iki ana grupta

sınıflandırılmaktadır (Bergant Loboda *et al.*, 2020). TOP2 zehirleri kovalent TOP2-DNA bölünme kompleksini stabilize ederek, DNA zincir kırıklarının oluşumuna ve birikmesine yol açar ve hücre ölümüne neden olabilecek DNA hasarı ile sonuçlanır (Schroeder *et al.*, 2003). Bununla birlikte TOP2 zehirlerinin etki mekanizması, ikincil malignite ve kardiyotoksisite gibi önemli yan etkilerin oluşumuna da sebep olmaktadır (Azarova *et al.*, 2007). Diğer bir TOP2 inhibitör sınıfı olan katalitik inhibitörler, kovalent TOP2-DNA bölünme kompleksini indüklemeyiz ve minimal DNA hasarına sebep olurlar; fakat çeşitli etki mekanizmaları yoluyla TOP2'nin DNA'ya bağlanmasını bloke ederek TOP2 aktivitesini inhibe ederler. Bu inhibitörlerin genotoksisitesi düşüktür, fakat hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe edebilmektedir. Bu verilere dayanarak, tümör hücresi büyümesini inhibe etmek için katalitik TOP2 inhibitörlerinin daha seçici olması ve insan vücudundaki sağlıklı hücrelere daha düşük genotoksisite gösterecek şekilde tasarlanması en büyük hedeflerden biridir (Matias-Barrios *et al.*, 2021).

Çoklu İlaç Terapisi

Kemoterapi, kanser tedavisinde uzun bir geçmişe sahiptir ve primer ve metastatik kanserler için standart bir tedavi yöntemidir. Bununla birlikte, özellikle tek bir ajan (monoterapi) uygulandığında klinik yararları oldukça sınırlıdır. Tümörlü hücrelerde ilaç direnci, tümör heterojenliği, ilaç penetrasyonunu ve etkinliğini engelleyen katı tümör mikro ortamı ve doz sınırlayıcı toksisite monoterapi ile ilişkili yaygın sorunlar arasındadır (R. X. Zhang *et al.*, 2016). Bu olumsuz etkiler göz önüne alındığında kanser tedavisinde maksimum terapötik etkinlik ve minimum toksisite elde etmek için monoterapiden çok çoklu ilaç terapileri kullanılarak kanserle mücadele etmek en önemli adımlardan biridir. Bununla birlikte bir kombinasyon tedavisinin antikanser etkisi her zaman sinerjistik olmayabilir, aksine antagonist bir etkide gösterebilir (Shuhendler *et al.*, 2010). Kombine edilecek ilaçların dozları farklı farmakokinetik ve hücre alımındaki ve doku yerleşimindeki farklılıklar nedeniyle uygulandıktan kısa bir süre sonra dolaşımda ve tümör dokusunda korunmayabilir. Bu sebepten dolayı kombine edilecek olan ilaçların seçimi önemlidir ve etkin bir tedavi elde edebilmek için entegre bir yaklaşımın kullanılması gerekmektedir (Panczyk, 2014). Kombinasyon ilaç terapileri tek bir hedefin iki veya daha fazla ilaç kullanılarak inhibe edilmesine dayalı olabileceği gibi, iki veya daha fazla farklı hedefin eş zamanlı bloke edilmesine dayanarak da etki gösterebilir. Farklı mekanizmaları hedef alacak şekilde seçilen ve uygulanan ilaçlar hedef mekanizmaları bloke ederek sinerjik antikanser etkiler oluştururlar, bu ise kanseri tedavi etmede daha etkin bir yoldur (Bevins & Zimmer, 2005; Kim *et al.*, 2003). Antitümör etkilerini kabul edilebilir toksisite sınırları içerisinde artırabilmeleri, ilaç

direnci gelişimini geciktirebilmeleri veya bloke edebilmeleri, heterojen bir tümör popülasyonuna karşı daha etkili olabilmeleri gibi kombinasyon tedavi rejimlerinin monoterapiye oranla birçok avantajı vardır (Clarke *et al.*, 2019). Çoklu ilaç terapileri gösterdikleri bu olumlu etkiler ile tedavi etkisini iyileştirebilir, hastaların daha uzun ve kaliteli bir yaşam sürdürebilmesi için metastaz ve nüksü önleyebilir (J. Wang *et al.*, 2021).

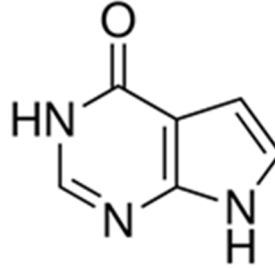
Deniz Alkaloidleri

Deniz ortamı, son 50 yılda yeni biyoaktif bileşiklerin araştırılmasında çok geniş ve önemli bir faaliyet alanına sahip, güçlü molekülleri barındıran ilaç öncüleri kaynağı haline gelmiştir. Alkaloidler, en geniş doğal ürün sınıflarından birini oluşturur ve tüm karasal ve deniz organizmaları tarafından sentezlenmektedir (Kochanowska-Karamyan & Hamann, 2010). Alkaloidler düşük moleküler ağırlığa sahip yapılardır (Kaur & Arora, 2015). Genel olarak bazik nitrojen atomlarından oluşmakla birlikte bazı nötr veya zayıf asidik bileşikler de içerebilirler ve doğal olarak oluşan kimyasal bileşiklerin bir birleşimidirler. Alkaloidler ilk olarak 4000 yıl önce keşfedilen ve kullanılan zengin, terapötik potansiyele sahip önemli ikincil metabolitlerdir (Dey *et al.*, 2020). Alkaloidler organizmalarda genellikle aynı biyosentetik kökenli olup sadece fonksiyonel gruplarda farklılık gösteren bir yapıda bulunmaktadır. Bu bileşik grubu tüm canlı formlarda esas olarak yırtıcılara karşı bir savunma mekanizması olarak geliştirilen oldukça güçlü ve toksik moleküllerdir (Kochanowska-Karamyan & Hamann, 2010). Alkaloidler, heterosiklik halka yapılarına ve biyosentetik öncülerine göre indol, pürin, kinolin, izokinolin, tropan, imidazol gibi çeşitli gruplara ayrılmaktadır (Kaur & Arora, 2015; Roy, 2017). Birçok alkaloid, farmakolojik ve terapötik araçlar olarak kullanılmaktadır. Alkaloidlerin emetik, antikolinergik, antitümör, diüretik, sempatomimetik, antiviral, antihipertansif, hipno-analjezik, antidepresan, miyo-gevşetici, anti-tussigen, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar dahil olmak üzere pek çok etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Aiello *et al.*, 2011; Ezell *et al.*, 2010).

7-Deazahipoksantin (7-DHX)

Çeşitli deniz organizmalarından elde edilen alkaloidler, önemli biyolojik aktiviteleri ve daha spesifik olarak umut verici antikanser etkilere sahip olmaları sebebiyle büyük ilgi görmüştür (Medellin *et al.*, 2016). Bir alkaloid olan 7-DHX (Şekil 7) ve türevleriyle ilgili çalışmalar sınırlıdır; ancak 7-DHX iskeletine dayalı sentetik analogların, insan kanser hücrelerinde mikrotübül dinamiklerini inhibe ederek umut verici çift ila tek haneli nanomolar seviyede antiproliferatif etkilere sahip olduğu yapılan bir çalışmayla ortaya konulmuştur (Frolova *et al.*, 2013).

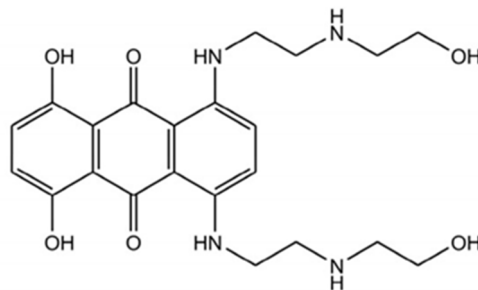
7-DHX'lerin ilaca dirençli kanser hücre dizilerine karşı etkinliklerinin anlaşılabilmesi için 7-DHX ile etkileşime girerek sinerjik etki oluşturacak ek hedeflerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır; çünkü tek tübülün hedeflemesi ile kanser hücrelerinin ölümünü indüklemek yeterli olmayabilmektedir (Scott *et al.*, 2014).



Şekil 7. 7-DHX'in kimyasal yapısı (Frolova *et al.*, 2013)

Mitoksantron (MTX)

Mitoksantron (1,4-dihidroksi-5,8-bis[2-(2-hidroksietilamino)etilamino]-antrasen-9,10-dion; MTX), antrasenedion türevlerine ait sentetik bir kemoterapötik ajandır (Şekil 8) (Enache *et al.*, 2017). MTX 1980'lerde geliştirilmiştir ve 1996 yılında kemik ağrısında kullanıldığında analjezik etki göstererek iyilişme sağladığından, palyatif fayda sağlamak için metastatik dirençli prostat kanserinde kullanılmak üzere ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Green *et al.*, 2015). MTX'in yapısında, tetrasiklik halka (A) ve antrasiklinlerin amino şeker parçası bulunmamaktadır, fakat DNA baz çiftleri ve azot içeren yan zincirler arasında DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarını bağlayan düzlemsel bir antrakınon halkası bulunmaktadır (Hajihassan & Rabbani-Chadegani, 2009). Düzlemsel antrakınon halkası, DNA'nın baz çiftleri ile MTX molekülü arasında interkalasyonu sağlarken; bazik yan gruplar, negatif yüklü DNA fosfat omurgası ile elektrostatik bağlanmaya katkıda bulunmaktadır (Bhattacharyya *et al.*, 2014).



Şekil 8. MTX'in kimyasal yapısı (Enache *et al.*, 2017)

MTX'e duyulan ilgi doğal olarak oluşan antrasiklinlere kıyasla antineoplastik aktivite gösterirken, kardiyotoksik etkisinin daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır (Delgado *et*

al., 2018; Hajihassan & Rabbani-Chadegani, 2009). MTX antrasiklinlere oranla daha tolere edilebilir olsa da; uzun süreli tedavide kardiyomiyopati hala çözülmesi gereken bir sorundur (Delgado *et al.*, 2018). MTX klinikte lösemi, lenfoma, meme ve prostat kanserinde ve multipl skleroz (MS) ve akut miyeloid lösemi (AML) tedavisi için kullanılmıştır (Patel *et al.*, 2013). Bu ilacın vücutta kalma süresi uzundur (yarılanma ömrü 75 saat) ve düşük kan sayımı, bulantı, kusma, halsizlik, düşük tansiyon ve saç dökülmesi gibi çeşitli yan etkilerin oluşmasına sebep olmaktadır. Bununla birlikte yüksek dozlarda uygulanan MTX konsantrasyonları kalp, karaciğer ve tiroide tespit edilmiştir (Alizadeh *et al.*, 2020).

MTX, DNA replikasyonu ve onarım süreçlerinde çok önemli görevlere sahip bir enzim olan topoizomerez II'nin inhibitörüdür. MTX'in antikanser aktivitesi, DNA kırılmalarına yol açan DNA-topoizomerez II kovalent kompleksinin stabilizasyonu ile topoizomerez II aktivitesinin inhibisyonuna dayanır; bu durum ise DNA'nın tek ve çift sarmalında kopmaların oluşmasına neden olmaktadır (Rossato *et al.*, 2013). MTX'in DNA'ya bağlanması DNA yoğunlaşmasına sebep olmaktadır ve hem sağlıklı hücrelerde hem de kanser hücrelerinde DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu inhibe ederek (Hajihassan & Rabbani-Chadegani, 2009) DNA sentezini ve DNA onarımını bozmaktadır (Bu *et al.*, 2020). MTX'in sitotoksitesi hücre döngüsü fazından bağımsızdır; bu sebepten dolayı yavaş büyüyen tümörlere karşı da etkili olabilir (Legut *et al.*, 2014). MTX ilaç uygulamasından sonra geniş bir biyodağılım gösterdiğinden dolayı güçlü bir sistemik toksisiteye ve özellikle uzun süreli kullanımında ciddi bir kardiyotoksisitenin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu olumsuz sebepler MTX'in kanser tedavisinde uygulanabilirliğini sınırlandırmaktadır (Bu *et al.*, 2020).

Amaç

Kolorektal kanser (CRC) multifaktöriyel etiyojolojiye sahip heterojen bir hastalıktır. Dünyada hem kadınlarda hem de erkeklerde en sık görülen kanserlerden biridir ve insidans açısından üçüncü, mortalite açısından ise ikinci sırada yer almaktadır. 2020'de 1,9 milyondan fazla yeni kolorektal kanser (anüs dahil) vakası ve 935.000 ölümün meydana geldiği tahmin edilmektedir; bu ise yaklaşık 10 kanser vakasından ve ölümden birini temsil etmektedir ve bu oran her geçen gün artmaktadır. Evre IV CRC hastalarında beş yıllık sağkalım oranı oldukça düşüktür (%13). Kemoterapi kolorektal kanser tedavisinde diğer kanser türlerinde olduğu gibi birincil tedavi yöntemidir; fakat kanser hücrelerini seçicilikteki eksikliği, sistemik toksisite ve hücrelerin bu ajanlara direnç geliştirmesi gibi nedenler kemoterapinin etkinliğini azaltmakta ve özellikle evre IV CRC tedavisinde önemli bir etkinliğe sahip olmamaktadır. CRC tedavisinde monoterapi ile tek hedefli inhibisyonlar çoğunlukla istenen terapötik etkiyi

sağlamamaktadır. Bundan dolayı maksimum etkinlik ve minimum toksisite sağlamak ve direnç gelişimi gibi durumları önlemek için sinerjik ilaç kombinasyonları ile hedef mekanizmaların inhibe edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında da farklı etki mekanizmalarına sahip bir mikrotübül inhibitörü olan 7-DHX ile topoizomera 2 inhibitörü olan MTX'in insan kolon kanser hücre hattında (Caco-2) *in vitro* olarak antikanser üzerindeki sinerjik etkilerinin araştırılması amaçlanmış ve bu kombine iki ajanın kemoterapötik ajan olarak kullanılabilme potansiyelinin olup olmayacağı araştırılmıştır. 7-DHX ile MTX'in kombinasyon tedavisi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup, tez çalışması kapsamında ilk defa çalışılıyor olması teze özgün değer katmaktadır. Tez çalışmasından elde edilen verilerin literatüre önemli katkılar sağlayacağı ve bu alandaki eksikliğin giderilebileceği düşünülmektedir.

KURAMSAL TEMELLER

Kanser tedavisine yönelik *in vitro* ve *in vivo* birçok farklı çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar arasında FDA tarafından onaylı ilaçların veya kimyasal olarak sentezlenen bileşiklerin tek başına ya da başka ilaç/sentezlenen bileşikle kombinlenerek kanser hücreleri üzerindeki antikanser etkilerinin araştırılması yaygın olarak yer almaktadır. Tez çalışması kapsamında da Caco-2 hücrelerinde antikanser üzerinde sinerjik etkileri araştırılan 7-DHX ve MTX ile ilgili yapılan birkaç çalışmadan ve elde edilen verilerden devam eden bölümde bahsedilmiştir.

Flaig ve arkadaşları (2007) tarafından ham deve diken i ekstresi olan ve yaygın olarak karaciğer hastalığının tedavisinde kullanılan silibin ile MTX'in sinerjik etkileri DU145, LNCaP ve PC-3 (prostat kanseri) hücreleri üzerinde MTT ve apoptoz testleri ile analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda silibin ve MTX'in birlikte DU145 ve LNCaP hücrelerinin canlılığını azalttığı, PC3 hücrelerinin canlılığında ise çok önemli bir azalmaya sebep olmadığı gösterilmiştir. Silibin ile muamele edilen tüm hücrelerde ve MTX ile muamele edilen DU145 ve LNCaP hücrelerinde apoptozun indüklendiği, buna karşın PC3 hücrelerinin apoptozu üzerinde etki göstermediği belirlenmiştir. Silibin ile MTX'in birlikte uygulanmasında ise tüm kanser hücre hatlarında apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (Flaig *et al.*, 2007).

Golubovskaya ve arkadaşları (2013) tarafından bir MTX türevi olan A18'in (1,4-bis(dietilamino)-5,8-dihidroksi antraknon) BT-474 (insan meme kanseri) ve HCT-116 (insan kolon kanseri) hücre hatlarında, birçok tümör tipinde aşırı eksprese edilen reseptör olmayan kinaz olan Fokal Adezyon Kinaz'ın (FAK) ATP bağlanma bölgesi olan K454 ile EGFR, Pyk-2 (FAK'ın homoloğu), c-Src ve IGF-1R kinazları üzerindeki etkisi MTT testi, kinaz aktivite testi ve western blot analizi ile *in vitro* olarak araştırılmıştır. A18'in HCT-116 ve BT-474 hücrelerinde K454 bölgesini bloke ederek FAK'ın fosforilasyonunu engellediği ve buna bağlı olarak hücre canlılığını doz bağımlı olarak azalttığı belirlenmiştir. A18'in EGFR aktivitesini etkilemediği; Pyk-2, c-Src ve IGF-1R'nin enzim aktivitelerini ise önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (M. Golubovskaya *et al.*, 2013).

Senbabaoglu ve arkadaşları (2016) U87MG, U87MG-R50 ve U373 (insan glioblastoma) ile KUFibro5 ve KUFibroMNG (insan fibroblast hücreleri) hücre hatları üzerinde tümör nekroz faktörü ile ilgili apoptozu indükleyen ligan dın (TRAIL) farklı rekombinant formları ile MTX'in sinerjik etkilerini *in vitro* olarak incelemişlerdir. MTX ve

TRAIL ayrı uygulandığında kanser hücrelerinin canlılığında bir azalma gözlenmediği; TRAIL ve MTX birlikte uygulandığında ise kanser hücrelerinde canlılığın azaldığı, kaspaz aktivitesinde artış meydana geldiği ve buna bağlı olarak apoptozun indüklendiği ve DR4 ve DR5 reseptörlerinin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. TRAIL ve MTX'in birlikte kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerine karşın KUFibro5 ve KUFibroMNG fibroblast hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermedikleri bildirilmiştir (Senbabaoglu *et al.*, 2016).

Luo ve arkadaşları (2017) tarafından HCC-78 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) ve CCD19-Lu (normal akciğer fibroblast hücresi) hücre hatlarında MTX'in onkojenik c-ros onkogen 1 (ROS1) üzerindeki etkisi MTT, apoptoz ve ELISA kinaz tahlili yöntemleri ile araştırılmıştır. MTX'in doz bağımlı olarak HCC-78 hücrelerinin canlılığını azalttığı, apoptozu önemli ölçüde indüklediği ve ROS1 tirozin kinaz aktivitesini baskıladığı gösterilmiş; CC19-Lu hücrelerinde ise toksik bir etki göstermediği belirlenmiştir. MTX'in HCC-78 hücrelerinde MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları üzerindeki etkisi ise western blot analizi ile incelenmiş ve bu analiz sonucunda sinyal yolağını bloke ettiği saptanmıştır. Sonuç olarak MTX'in HCC-78 hücrelerinde ROS1 fosforilasyonunu inhibe ettiği, böylece MTX'in *in vitro* olarak ROS1 inhibitörü olabileceğini önermişlerdir (Luo *et al.*, 2017).

Park ve arkadaşları (2018) MTX'in U2OS ve MG63 osteosarkom hücrelerinde, çeşitli kanser türlerinde hücre döngüsü durması, apoptoz ve tümör baskılanması dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri kontrol eden tümör baskılayıcı bir transkripsiyon faktörü olan Forkhead-box O3 (FOXO3) üzerindeki etkisini *in vitro* deneylerle araştırmışlardır. Araştırma sonucunda MTX'in doz ve zaman bağımlı olarak osteosarkom hücrelerinde FOXO3'ün nükleer lokalizasyonunu ve aktivasyonunu indüklediği, hücre proliferasyonunu baskıladığı, apoptozu indüklediği ve koloni oluşturma yeteneğini belirgin şekilde inhibe ettiği belirtilmiştir (S. H. Park *et al.*, 2018).

Merli ve arkadaşları (2018) metalik elementler olan galyum maltolat (GaMal) ve indiyum (III) maltolatın (InMal) MTX ile birlikte MDA-MB-231 (insan meme kanseri) hücreleri üzerindeki sinerjik etkilerini *in vitro* testlerle incelemişlerdir. Araştırma sonucunda GaMal ve InMal'ın ayrı ayrı uygulandığında doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı, GaMal ve InMal'ın MTX ile birlikte uygulandığında ise hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sinerjik etki göstermediği saptanmıştır. Apoptoz analizi sonucunda ise sitotoksik etkiden ziyade sitostatik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bu veriler metalik elementlerin MTX ile birlikte değil de ayrı ayrı uygulanması gerektiğini göstermiştir (Merli *et al.*, 2018).

Yapılan bir başka çalışmada ise kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen ve stresli hücrelerin hayatta kalması için gerekli olan ökaryotik uzama faktörü-2 kinaz (eEF-2K) ve bununla ilişkili olarak mTOR sinyal yolağındaki Akt aktivasyonu üzerinde MTX ile mTOR inhibitörlerinin (rapamisin ve everolimus) MCF-7 ve MDA-MB-231 (insan meme kanseri) hücreleri üzerindeki sinerjik etkileri hücre canlılığı, koloni oluşumu, hücre döngüsü, western blot ve immünohistokimya gibi çeşitli yöntemler kullanılarak *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılmıştır. Araştırma sonucunda mTOR inhibitörleri ile sinerjik etkilerine bakılan MTX'in Akt sinyallemesinde ve sitoprotektif otofajide eEF-2K kaynaklı artışı baskılayarak kanser hücreleri üzerinde gelişmiş inhibitör etkiler sergilediği gösterilmiştir (Guan *et al.*, 2020).

Frolova ve arkadaşları (2013) 7-DHX iskeletine dayanan birçok rijidin analog sentezi yapmış ve bu analogların HeLa (servikal kanser), MCF-7 (insan meme kanseri), U373 ve Hs683 (insan glioma), SKMEL-28 (insan melanom), A549 (insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri), UM-SCC-10A ve UM-SCC-22A (baş boyun kanseri) hücre hatları üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak araştırmışlardır. Sentezlenen rijidin analoglarının tüm hücrelerde antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu analogların antiproliferatif etki göstermesinin mitotik durmayı indükleyerek tübül dinamiklerinin inhibisyonu yoluyla olabileceğini düşünmüşler ve kanser hücre hatları üzerinde hücre döngüsü ve tübül polimerizasyonunu incelemişlerdir. Çalışma sonucunda bu analogların kanser hücrelerinde mikrotübül dinamiklerini inhibe ederek antiproliferatif etki sergilediklerini göstermişlerdir. 7-DHX ana iskeletine sahip doğal rijidin ise kanser hücreleri üzerinde düşük antikanser aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Frolova *et al.*, 2013).

Scott ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, C2-aril ve C2-alkil 7-DHX rijidin analogları sentezlenmiş ve bu analogların HeLa (insan servikal kanseri), MCF-7 (insan meme kanseri), U-87 (insan glioblastomu) ve A549 (insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktiviteleri ve mikrotübül organizasyonu üzerindeki etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Araştırma sonucunda bu rijidin analoglarının kanser hücreleri üzerinde önemli ölçüde antiproliferatif etki gösterdiği ve mikrotübül dinamiklerinin oluşumunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Scott *et al.*, 2014).

7-DHX analoglarının antikanser etkileri üzerine yapılan bir başka çalışmada ise, tübülini hedef alan C2 ikameli 7-DHX analogları sentezlenmiş ve bu analogların *in vitro* ve *in vivo* olarak antikanser etkileri araştırılmıştır. RKO, SKCO1, SW48 ve SW620 (insan kolon kanseri) ve WI38 (normal insan fibroblast hücresi) hücreleri üzerinde yapılan *in vitro* antiproliferatif testler sonucunda, sentezlenen 7-DHX analoglarının kanser hücreleri üzerinde güçlü antiproliferatif etki gösterdiği buna karşın sağlıklı fibroblast hücrelerinde ise sitotoksik

etki göstermediği belirtilmiştir. Sentezlenen 7-DHX analoglarından en fazla antiproliferatif etkiye sahip olan analog *in vivo* çalışmada kullanılmıştır. Kolon kanseri (SW620) fare modeli oluşturularak yapılan *in vivo* çalışma sonucunda ise, analogun tümör boyutunda anlamlı bir azalmaya sebep olarak antikanser aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Medellin *et al.*, 2016).

Yapılan literatür araştırmalarına göre 7-DHX ile MTX'in sinerjik etkilerini konu alan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan tez çalışmasından elde edilen verilerin literatüre katkı sağlayacağı ve bu alandaki eksikliğin giderilebileceği düşünülmektedir.



MATERYAL VE METOT

Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve kitlerin listesi Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

KİMYASAL ADI	ŞİRKET
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)	Nutri Culture
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biowest
Penisilin/Streptomisin	Gibco
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco
Dimetil sülfoksit (DMSO)	ChemCruz
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich
Tripsin-EDTA (%0,25)	Gibco
Triton x-100	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
LDH Reaktifi	Cell Biolabs, INC.
Trikloroasetik Asit (TCA)	EMSURE
Sulforhodamine B (SRB)	ChemCruz
Asetik Asit	Sigma-Aldrich
Tris Bazı	Sigma-Aldrich
Kristal Viole	Fluka Analytical
7-deazahipoksantin (7-DHX)	Alfa Aesar
Mitoksantron (MTX)	MedChemExpress
MTT	Sigma
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI	Biolegend

Kullanılan Materyal ve Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar Tablo 2 ve Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyaller

MATERYAL	ŞİRKET / MARKA
T-25 ve T-75'lik Flask	Isolab
1,5 mL'lik Mikrofüj Tüp	Isolab
10, 200 ve 1000 µL'lik Pipet Uçları	Isolab
15 ve 50 mL'lik Santrifüj Tüpü	Isolab
5 ve 10 mL'lik Serolojik Pipet	Lp Italiana
6, 12 ve 96 Kuyucuklu Plate	Costar
Thoma Lamı	Heinz Herenz Hamburg
Kriyo Tüp	Isolab

Tablo 3. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar

CİHAZ ADI	ŞİRKET / MARKA
Steril Kabin	ESCO Class II BSC
Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	Arçelik
Derin Dondurucu (-20 °C)	Profilo
Derin Dondurucu (-80 °C)	Nuaire
Distile Su Üretme Cihazı	Milipore Direct-Q8UV
Ettüv	Memmert
Hassas Terazî	Shimadzu
İnkübatör	Nuaire
İnvert Mikroskop	Zeis
Vorteks	Heidolph
Otoklav Cihazı	Hirayama
Santrifüj	Hettich
Su Banyosu	Memmert
Sonikatör	Isolab
Mikropipet Takımı	Eppendorf
Sıvı Azot Tankı	Taylor-Wharton LS750
Shaker	IKA
UV- VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter
Mikroplate Okuyucu	Epoch Mikroplaka Spektrofotometresi
Flow (Akım) Sitometri	Beckman Coulter CytoFLEX

Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Tez kapsamında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı Tablo 4'te gösterilmiştir.

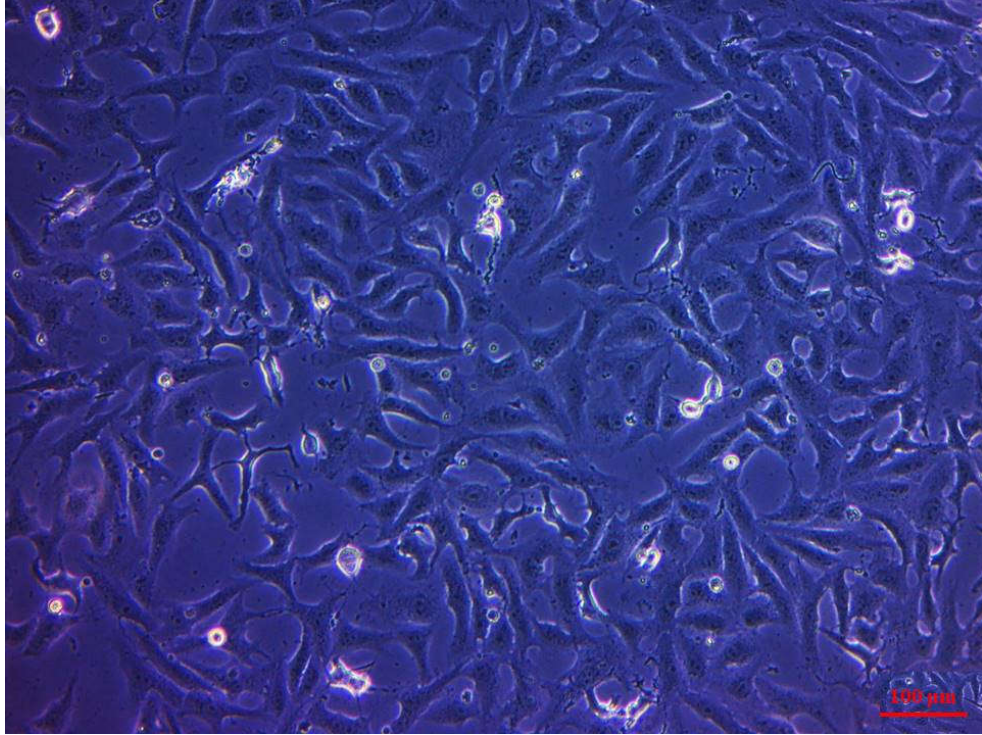
Tablo 4. Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

ÇÖZELTİ ADI	HAZIRLANIŞI
1. DMEM Besiyeri	Hazırlanacak besiyeri miktarının %10'u kadar FBS, %1'i kadar penisilin/streptomisin ve %1'i kadar L-Glutamin bazal DMEM besiyeri içerisine eklenerek hazırlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.
2. PBS	500 mL dH ₂ O içerisinde 1 tablet çözüldü ve otoklavlandı. +4 °C'de muhafaza edildi.
3. Dondurma Besiyeri	DMEM besiyerine %8 oranında DMSO eklenmesi ile hazırlandı.
4. MTT Solüsyonu	0,2 g MTT, 20 mL PBS içerisinde çözüldü (10 mg/mL). 20 mL'lik hacim filtreden geçirildi. Çözelti 4 adet 15 mL'lik santrifüj tüpüne 5'er mL olacak şekilde alikotlara ayrıldı. Her bir santrifüj tüpün üzerine 5 mL PBS eklenerek son konsantrasyon 5 mg/mL'ye ayarlandı. MTT solüsyonu -20 °C'de muhafaza edildi.
5. %0,4'lük SRB Boyası	0,08 g SRB, 20 mL %1'lik asetik asit içerisinde çözüldü. +4 °C'de ışıktan korunacak şekilde muhafaza edildi.
6. %10'luk TCA	9 mL dH ₂ O içerisine 1 mL TCA eklenerek 10 mL'lik hacim hazırlandı. +4 °C'de muhafaza edildi.
7. %1'lik Asetik Asit	495 mL dH ₂ O içerisine 5 mL asetik asit eklenerek 500 mL'lik hacim hazırlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.
8. 10 mM'lık Tris Bazı	0,0121 g tris bazı 10 mL dH ₂ O içerisinde çözüldü. Çözelti vortekslendi ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.
9. %1'lik Triton x-100	10 mL PBS içerisine 100 µL triton x-100 eklenerek hazırlandı. +4 °C'de muhafaza edildi.
10. %0,5'lik kristal viole	0,025 g kristal viole, 1 mL saf metanol ve 4 mL dH ₂ O içerisinde çözülerek hazırlandı. Çözelti vortekslendi ve +4 °C'de muhafaza edildi.

İnsan Kolon Kanser Hücre Hattının (Caco-2) Kültüre Alınması; 7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX ile Muamele Edilmesi ve Antikanser Etkilerinin Araştırılması

Caco-2 kanser hücre hattının kültüre alınması

Tez çalışması kapsamında Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DAYTAM) temin edilen insan kolon kanser hücre hattı olan Caco-2 kullanıldı (Şekil 9). Caco-2 hücreleri T-25'lik ve T-75'lik flasklarda %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ilave edilerek hazırlanan Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri içerisinde 37 °C'lik %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilerek çoğaltıldı. Deneysel amaca bağlı olarak flask yüzeyi %70-80 doluluğa ulaşıncaya kadar her 2-3 günde bir hücrelerin besiyeri değiştirildi.



Şekil 9. İnsan kolon kanser hücre hattının (Caco-2) 10X büyütmedeki mikroskop görüntüsü (Ölçek çubuğu: 100 µm)

Deneysel aşamada kullanılmayan fazla hücreler, %8 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) içeren DMEM besiyeri içerisine alınarak kriyo tüplere aktarıldı. Hücreler +4 °C'de 30 dk. -20 °C'de 60 dk. bekletildikten sonra -80 °C'ye konuldu ve bir gece bekletildi. Hücrelerin uzun süre muhafaza edilebilmesi için ertesi gün sıvı azot tankına alındı.

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm deneylerde Caco-2 hücreleri sınırlı bir pasaj aralığında (p28-p30) kullanıldı.

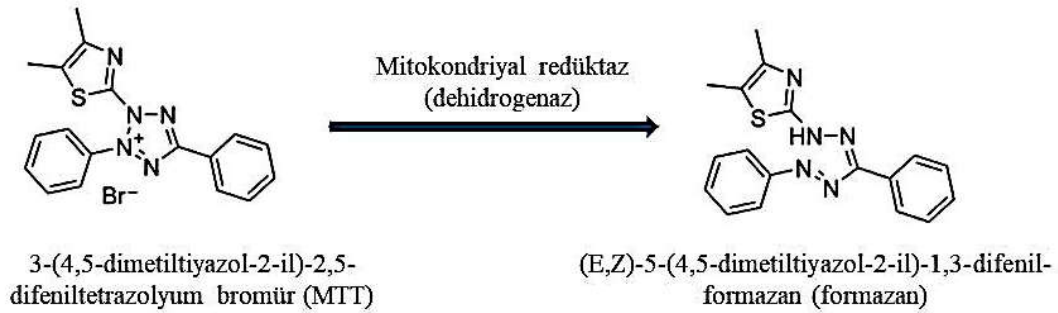
7-DHX ve MTX'in hazırlanması

Ticari olarak satın alınan katı toz halindeki 7-DHX'den 10 mg tartılarak 125 µL DMSO içerisinde çözüldü. Tamamen çözünebilmesi için iyice vortekslendi. 30 µL'lik hacimler halinde 1,5 mL'lik mikrofüj tüplere alikotlara ayrıldı ve -20 °C'de ışıktan korunacak şekilde muhafaza edildi.

Ticari olarak satın alınan katı toz halindeki MTX'den 10,5 mg tartılarak 400 µL DMSO içerisinde çözüldü. Ardından tamamen çözünebilmesi için iyice vortekslendi ve sonikatörde 10 sn. bekletildi. 20 µL'lik hacimler halinde 1,5 mL'lik mikrofüj tüplere alikotlara ayrıldı ve -80 °C'de ışıktan korunacak şekilde muhafaza edildi.

MTT testi

MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi, Mosmann tarafından 1983 yılında oluşturulmuş ve tanımlanmıştır. Potansiyel antikanser bileşiklerin aktivitesini değerlendirmek ve bileşik etkileşimlerini incelemek için kullanılan en yaygın kolorimetrik testlerden biridir (Śliwka *et al.*, 2016). Test metabolik olarak aktif hücrelerin dehidrogenaz enzim aktivitesi ile suda çözünür, sarı renkli tetrazolyum tuzunu (MTT) suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine indirgemesi temeline dayanır (Şekil 10) (Buranaamnuy, 2021). Oluşan renk değişiminin absorbansı ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülür.



Şekil 10. MTT'nin formazana enzimatik redüksiyonu (Kuate *et al.*, 2017)

Bu tez çalışmasında 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX uygulamalarının hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri MTT testi ile belirlendi ve bu süreç aşağıdaki protokol izlenerek gerçekleştirildi:

1. Deneysel amaca uygun olarak T-25'lik flasklarda büyütülen ve %70-80 doluluk oranına ulaşan Caco-2 hücrelerinin besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 2 mL PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreleri yüzeyden kaldırmak için 1,5 mL Tripsin-EDTA (%0.25) eklendi ve 3 dk. 37 °C'lik %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin

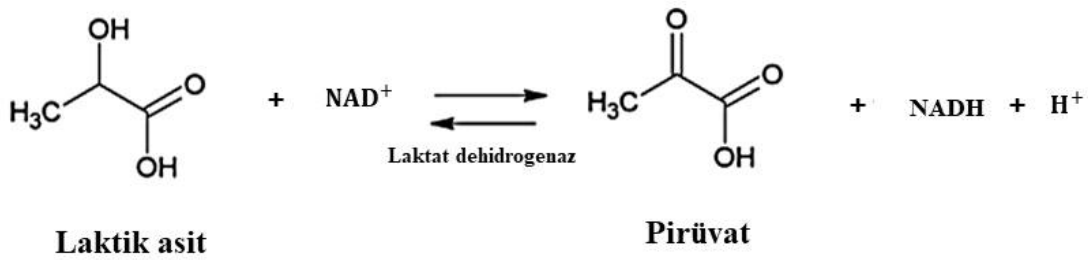
- ardından flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin üzerine tripsini inhibe etmek için 2 mL besiyeri eklendi ve tüm hücreler 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktararak 1.300 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 4 mL besiyerinde çözüldü. Çözülen miktardan 10 µL alındı ve thoma lamına yüklenerek sayım yapıldı.
2. Sayım sonrasında 96 kuyucuklu platelere her bir kuyucukta 200 µL besiyeri içerisinde 24 saat için 7.000, 48 saat için 6.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin plate yüzeylerine tutunmaları için bir gece boyunca 37 °C'lik %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.
 3. İnkübasyon süresinin ardından hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyudaki hücre 160 µL PBS ile yıkandı.
 4. Besiyeri ile hazırlanan 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX farklı konsantrasyonlarda (0,05-50 µM) hücrelerin bulunduğu 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna 3 tekrerr olacak şekilde 170 µL uygulandı. Kontrol grubu olarak yalnızca besiyerinden 170 µL ve pozitif kontrol olarak %1 DMSO içeren besiyerinden 170 µL ilave edildi. Ardından hücreler 24 ve 48 saat olmak üzere inkübe edildi.
 5. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklarda bulunan kontrol ve uygulama gruplarının besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler 160 µL PBS ile yıkandı. Ardından her kuyucuğa besiyeri ve MTT ile hazırlanan solüsyondan 100 µL eklendi. Platelere alüminyum folyaya sarıldı ve 37 °C'lik %5 CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübe edildi.
 6. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuktaki solüsyon uzaklaştırıldı. Oluşan formazan kristallerini çözebilmek için her bir kuyucuğa 150 µL DMSO eklendi. Kristallerin homojen bir şekilde çözünebilmesi için shakerda 240 rpm'de 15 dk. çalkalandı.
 7. Süre sonunda oluşan rengin absorbansı 570 nm'de ELISA okuyucu ile ölçüldü.
 8. Doz ve zaman bağımlı olarak 7-DHX ve MTX'in ayrı ayrı uygulandığında hücre proliferasyonunda %50'den fazla canlılık gösteren konsantrasyonu ile 7-DHX ve MTX'in birlikte uygulandığında hücre proliferasyonunu %50 azaltması için gereken ilaç konsantrasyonunu ifade eden IC₅₀ değeri, uygulanan ilaç grupları ve kontrol grubunun absorbans değerleri kıyaslanarak analiz edildi ve hücrelerdeki % canlılık aşağıda belirtilen formül yardımı ile hesaplandı.

$$\% \text{ canlılık} = \frac{[\text{Abs}_{(\text{bileşikler ile muamele edilen hücreler})} - \text{Abs}_{(\text{hücresiz ortamdaki MTT reaktifi})}]}{[\text{Abs}_{(\text{kontrol grubu hücreler})} - \text{Abs}_{(\text{hücresiz ortam})}]} \times 100$$

9. Hesaplama sonucunda 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX ilaçlarının uygun konsantrasyonları belirlendi ve daha sonraki deneysel süreçlerde Caco-2 hücrelerinde belirlenen konsantrasyonlar kullanıldı.

Laktat dehidrogenaz (LDH) testi

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan ve plazma zarının hasar görmesi sonucu kültür veya ekstrasellüler ortama salınan laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin aktivitesini ölçmeye dayanan bir yöntemdir. LDH tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücre kültürü süpernatantında LDH aktivitesinin varlığı, hasar gören veya ölen hücrelerin olduğunu gösterir (L. Zhang *et al.*, 2010). LDH enzimi oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında görev alır. Bu enzim nikotinamit adenin dinükleotit (NAD⁺) yardımıyla laktatın pirüvata oksidasyonunu katalizleyen bir hidrojen taşıyıcısı olarak görev yapar. Bu reversibl bir reaksiyondur ve ters yönde ilerlerken pirüvatın laktata redüksiyonunu katalizler (Şekil 11) (Allison *et al.*, 2014).



Şekil 11. Laktik asitin pirüvata katalizlenme reaksiyonu (MacK *et al.*, 2017)

7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini analiz etmek ve MTT testini doğrulamak için LDH testi aşağıdaki protokol izlenerek gerçekleştirildi:

1. Tripsinle yüzeyden kaldırılan ve sayımı yapılan Caco-2 hücreleri 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğunda 200 µL besiyeri olacak şekilde 24 saat için 7.000, 48 saat için 6.000 hücre ekim yapıldı ve hücrelerin plate yüzeyine yapışması için 37 °C'lik %5 CO₂'li inkübatörde bir gece inkübe edildi.
2. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 160 µL PBS ile yıkandı.
3. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in MTT testi sonucunda belirlenen konsantrasyonları besiyeriyle hazırlandı ve hücrelerin bulunduğu 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna 3 tekerrür olacak şekilde 170 µL uygulandı. Kontrol grubu olarak yalnızca 170 µL besiyeri ve pozitif kontrol olarak %1 triton x-100 içeren

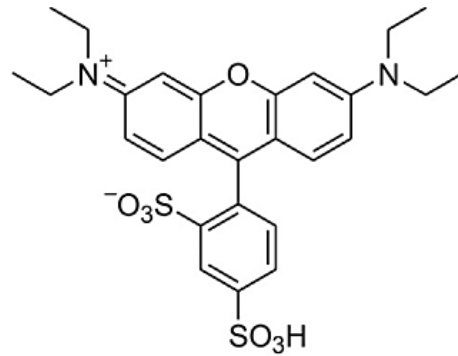
besiyerinden 170 µL ilave edildi. Ardından hücreler 24 ve 48 saat olmak üzere inkübe edildi.

4. 24 ve 48 saat ilaç uygulamasının ardından kuyucuklardaki ortam (besiyeri) ayrı bir plate'e alındı.
5. Uygulama ve kontrol gruplarının ortamlarından 50'şer µL alındı ve her bir grubun ortamına 50'şer µL LDH reaktifi ilave edilerek karıştırıldı.
6. Plate oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk. boyunca inkübe edildi.
7. İnkübasyon süresinin sonunda 450 nm'de ELISA okuyucuda ölçüm alındı.
8. Elde edilen sonuçlardan hücrelerdeki % LDH aktivitesi aşağıda belirtilen formül yardımıyla hesaplandı (Ramezanpour *et al.*, 2019).

$$\% \text{ LDH aktivitesi} = \frac{[\text{Abs (bileşikler ile muamele edilen hücreler)} - \text{Abs (hücresiz ortamdaki LDH reaktifi)}]}{[\text{Abs (kontrol grubu hücreler)} - \text{Abs (hücresiz ortam)}]} \times 100$$

Sulforhodamine B (SRB) testi

SRB testi, hücrelerin total protein içeriğinin *in vitro* olarak ölçülmesine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem, 1985 yılında hücre proliferasyonu ve sitotoksitenin ölçülmesi amacıyla geliştirilmiştir. SRB elektrostatik ve pH bağımlı olarak proteinlere bağlanan pembe renkli, katı ve suda çözünebilir bir boyadır (Şekil 12) (Vichai & Kirtikara, 2006).



Şekil 12. SRB'nin kimyasal yapısı (Kuate *et al.*, 2017)

SRB testi, hücresel proteinlerdeki bazik amino asitlere bağlanan SRB molekülünün gösterdiği spektrofotometrik değişikliğin polipeptid zincirlerinde ölçülmesine dayanır. Boya, zayıf asidik şartlar altında hücrelere bağlanırken; bazik şartlar altında hücrelerden ayrılabilir. Renk oluşumu hızlı ve stabildir. Fikse olan boya, çözündürme aşamasından sonra spektrofotometrik olarak ölçülür. Yapılan kolorimetrik ölçüm sonucu alınan değerler total protein miktarını dolayısıyla canlı hücrelerin oranını gösterir (Voigt, 2008).

7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 kanser hücrelerinde total protein miktarı üzerinde gösterdiği etkiyi analiz edebilmek için aşağıda belirtilen protokol adımları izlendi:

1. Sayımı yapılan hücrelerden 96 kuyucuklu plate'e 24 saat için 7.000, 48 saat için 6.000 hücre her kuyuda 200 μ L besiyeri olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin plate tabanına yapışması için bir gece boyunca 37 °C'lik %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.
2. Ertesi gün plate tabanına yapışan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 160 μ L PBS ile yıkandı.
3. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in belirlenen konsantrasyonları besiyeriyle hazırlandı ve her bir kuyuya 170 μ L olacak şekilde uygulama yapıldı. Kontrol grubu olarak yalnızca 170 μ L besiyeri ve pozitif kontrol olarak %1 DMSO içeren besiyerinden 170 μ L ilave edildi. Ardından hücreler 24 ve 48 saat olmak üzere inkübe edildi.
4. İlaç uygulama süresi sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 160 μ L PBS ile yıkandı.
5. Hücresel proteinleri fikse etmek için her kuyuya %10'luk soğuk TCA'dan 100 μ L eklendi ve +4 °C'de 1 saat fikse edildi.
6. Fiksasyon süresi sonunda TCA plate'den uzaklaştırıldı.
7. Kuyularda kalan TCA kalıntılarını uzaklaştırmak için kuyular 5 kez deiyonize su (dH₂O) ile yıkandı. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek döküldü.
8. Yıkama sonunda SRB boyasından her kuyuya 50 μ L eklendi ve 30 dk. boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
9. İnkübasyon süresi sonunda SRB plate'den dökülerek uzaklaştırıldı.
10. Bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için kuyular, 5 kez %1'lik asetik asit ile yıkandı. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek döküldü.
11. Yıkama sonunda plate, kuyular içerisinde hiç damla kalmayacak şekilde havada kurutuldu.
12. Kurutma işleminin ardından proteinlere bağlanan boyanın çözünebilmesi için her kuyuya 200 μ L 10 mM'lık tris bazı eklendi.
13. Boya solüsyonunu homojenize hale getirmek için plate 150 rpm'de 15 dk. shakerda çalkalandı.
14. Süre sonunda ELISA okuyucuda 564 nm'de ölçüm alındı (Voigt, 2008).
15. Elde edilen sonuçlardan hücrelerdeki total protein miktarı aşağıda belirtilen formül yardımıyla hesaplandı.

$$\text{Total protein miktarı (\%)} = \frac{[\text{Abs}_{(\text{bileşikler ile muamele edilen hücreler})} - \text{Abs}_{(\text{hücresiz ortamdaki SRB})}]}{[\text{Abs}_{(\text{kontrol grubu hücreler})} - \text{Abs}_{(\text{hücresiz ortam})}]} \times 100$$

Apoptoz testi

Hücre zarında yer alan fosfolipit asimetrisinin bozulması erken apoptoz belirteçlerinden biridir. Sağlıklı hücrelerde hücre zarının sitoplazmaya bakan kısmında yer alan ve membran lipitlerinden biri olan fosfatidilserin bulunur. Apoptotik hücrelerde hücre zarının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin hücre zarının dış yüzeyine transloke olur. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Söz konusu hücrelerin flow sitometri ile belirlenmesinde, Ca^{+2} varlığında fosfatidilserine bağlanma özelliği bulunan Annexin V FITC-PI kullanılır. Annexin V hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir. Bu protein floresan bir boya olan Annexin V FITC ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir. Fakat nekrotik hücrelerin yüzeyinde de Annexin V bağlanması görülebildiği için bu boya tek başına apoptotik ve nekrotik hücreleri birbirinden ayırt etmede yeterli değildir. Bu problem ise ikinci bir boya olan ve sadece nekrotik hücrelerde hücre içeriğinin sızması sonucu açığa çıkan DNA'yı boyayan propidyum iyodürün (PI) kullanılması ile ortadan kaldırılır. Böylelikle apoptoza ve nekroza giden hücreler doğru bir şekilde saptanmış olur. Apoptoz veya nekroz geçirmeyen sağlıklı hücrelere ise Annexin V-FITC ve PI nüfuz edemediğinden dolayı boyanmazlar (Annexin V-FITC ve PI ile negatif boyama) ve bu durum hücrelerin canlı olduğunu gösterir. Erken apoptotik evrede yalnızca fosfatidilserin hücre zarının dışına transloke olduğu için erken apoptotik sürece giren hücreler Annexin V-FITC ile pozitif, PI ile negatif boyama gösterir. Apoptotik süreç devam edip geç apoptotik evreye geçilmesi ise kromatin yoğunlaşması, hücre büzüşmesi ve plazma membran bütünlüğünün kaybı ile sonuçlanır. Bunun bir sonucu olarak PI, açığa çıkan DNA'ya bağlanır; böylelikle geç apoptotik hücreler hem Annexin V-FITC hem de PI ile pozitif boyama gösterir. Nekrotik hücreler ise membran bütünlüğü tamamen bozulduğu için Annexin V-FITC ile negatif PI ile pozitif boyama göstererek diğer hücrelerden ayırt edilmiş olur (Güleş *et al.*, 2008).

7- DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 kanser hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkileri Annexin V FITC-PI kiti kullanılarak aşağıda belirtilen prosedür doğrultusunda belirlendi:

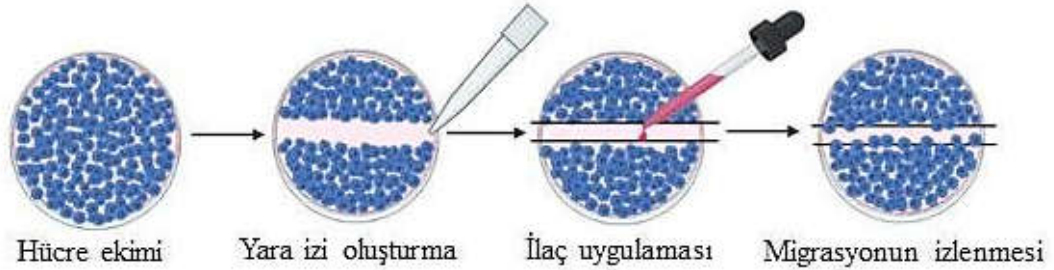
1. Kontrol ve uygulama grupları için 2'şer tekrerrür olacak şekilde 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğuna sayımı yapılan hücrelerden 2 mL (125.000 hücre/mL) ekim

- yapıldı ve hücrelerin yapışması için plateler 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde bir gece inkübe edildi.
2. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 1 mL PBS ile yıkandı.
 3. Hücrelere muamele edilecek 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX’in belirlenen konsantrasyonları besiyeri ile hazırlandı ve 24 saatlik uygulama için 1,5 mL; 48 saatlik uygulama için 2 mL olacak şekilde her bir kuyuya eklendi. Kontrol grubundaki hücrelere yalnızca besiyeri eklenirken; pozitif kontrol grubundaki hücrelere 1.000 µM konsantrasyonda H₂O₂ ile hazırlanan besiyeri eklendi. Sonrasında plateler 24 ve 48 saat inkübasyon için 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildi.
 4. İnkübasyon sürelerinin ardından kontrol ve muamele gruplarının besiyerleri ayrı santrifüj tüplerine alındı.
 5. Kuyucuklar 0,5 mL PBS ile yıkandı ve PBS santrifüj tüplerine aktarıldı.
 6. Her bir kuyucuğa 0,5 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde 3 dk. inkübe edildi.
 7. İnkübasyondan sonra yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri eklendi ve hücreler santrifüj tüplerine alındı.
 8. Hücreler 1.300 rpm’de 5 dk. santrifüjlendi. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
 9. Her bir santrifüj tüpüne 0,5 mL soğuk PBS eklenerek hücrelere zarar vermeden hafif bir şekilde pipetaj yapıldı. Ardından 1.300 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi ve santrifüjden sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı (Bu aşamadaki işlemler iki kez tekrarlandı).
 10. Daha sonra her bir santrifüj tüpüne 100 µL Annexin V Binding Buffer eklendi ve hücre peleti çözdürüldü.
 11. Her bir santrifüj tüpüne 5 µL Annexin V-FITC ve 10 µL PI boyası eklendi, nazıkçe pipetaj yapılarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında karanlıkta 15 dk. inkübe edildi.
 12. İnkübasyon süresinin ardından her bir santrifüj tüpüne 400 µL Annexin V Binding Buffer eklendi ve flow sitometri cihazı kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdesi belirlendi.

Yara iyileştirme (wound healing assay) testi

Yara iyileştirme testi; hücre göçünü, hücreler arası etkileşimi ve hücrelerin çoğalmasını analiz etmek için kullanılan *in vitro* bir tekniktir (Alishahedani *et al.*, 2021). Yara iyileştirme testinin temeli, büyüyen hücrelerin plakalarda tek tabaka halinde yüzeyi kaplamasının ardından hücrelere çizik atılması ve bu çizigin kenarlarında kalan hücrelerin

uygun büyüme koşulları altında hücre-hücre temaslarıyla hücresiz alana göç etmesine dayanır. Belirli saat aralıklarında görüntüleri alınan hücrelerin ImageJ gibi software programlar ile alan hesaplamaları yapılarak yaranın ne kadar kapandığı belirlenir, böylelikle hücrelerin migrasyon etkinliği ölçülür (Şekil 13) (Pusnik *et al.*, 2016).



Şekil 13. Yara iyileştirme testi aşamalarının şematik gösterimi

7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 kanser hücreleri üzerinde migrasyonu engelleyici etkilerinin olup olmadığını belirlemek için aşağıda belirtilen protokol izlenerek yara iyileştirme testi gerçekleştirildi:

1. Yara iyileştirme testinde 6 kuyucuklu plate kullanıldı. Hücreler sayıldıktan sonra 6 kuyucuklu plate'in her bir kuyucuğuna 2'şer mL olacak şekilde (125.000 hücre/mL) hücre ekildi. Hücrelerin yüzeye yapışması için 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde bir gece inkübe edildi.
2. Ertesi gün %90-95 konfluensiye ulaşmış hücrelere 10 µL'lik pipet ucu (tip) ile çizikler atıldı.
3. Platede bulunan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 1 mL PBS ile yıkandı. Her bir uygulama grubu 2 tekerrür olacak şekilde 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in belirlenen konsantrasyonları besiyeri ile hazırlandı ve uygulama yapıldı. Kontrol grubu olarak sadece besiyeri içeren hücreler kullanıldı.
4. Uygulama yapıldıktan hemen sonra platedeki hücrelerin 0. saatteki görüntüleri ters ışık (inverted) mikroskop kullanılarak alındı. 6, 12, 24 ve 48. saat görüntüleri için 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi ve bu saat aralıklarında inverted mikroskopta görüntü alındı.
5. Oluşturulan yara izlerinin alanı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı (Bobadilla *et al.*, 2019).

$$\hat{A}(t)=A(t)/A(0)\times 100$$

$\hat{A}(t)$: Yara alanı yüzdesi

$A(t)$: t zamanındaki yara alanı

A(0): 0. saatteki başlangıç alanı

Klonojenik test

Klonojenik veya koloni oluşum testi *in vitro* koşullarda tek bir hücrenin koloni ya da klon oluşturacak şekilde proliferatif kabiliyetini koruma ve süresiz olarak proliferate olabilmeye yeteneğini ölçmeye dayanan bir yöntemdir. Bu şekilde çoğalan hücrelere klonojenik hücre denilmektedir. En az 50 hücre içeren koloni formları klonojenik hücre olarak sayılmaktadır (Fabre *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 2011).

7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 kanser hücrelerinin çoğalma ve koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisinin analiz edilebilmesi için klonojenik test uygulandı ve aşağıda belirtilen protokol izlendi:

1. Kontrol ve uygulama grupları için 2'şer tekerrür olacak şekilde 12 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğuna sayımı yapılan hücrelerden 60.000 hücre 1'er mL olacak şekilde ekildi ve hücrelerin yapışması için plateler 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde bir gece inkübe edildi.
2. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 0,5 mL PBS ile yıkandı.
3. Hücrelere muamele edilecek 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in belirlenen konsantrasyonları besiyeri ile hazırlandı ve her kuyucuğa 1'er mL eklendi. Kontrol grubu olarak kullanılan hücrelere sadece besiyeri, pozitif kontrol olarak kullanılan hücrelere ise 450 µM konsantrasyonda besiyeri ile hazırlanan H₂O₂ uygulandı.
4. Uygulamadan sonra ilaçların hücrelerin içerisine nüfuz edebilmesi için 6 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.
5. İnkübasyon süresinin ardından hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 0,5 mL PBS ile yıkandı.
6. Her bir kuyucuğa 0,3 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 3 dk. inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine tripsini inhibe edebilmek için 0,6 mL besiyeri eklendi ve hücrelerin tamamı santrifüj tüplerine aktarıldı.
8. Hücreler 1.300 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi ve santrifüjden sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
9. Muamele ve kontrol grupları 2 tekerrür olacak şekilde 12 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğuna sayımı yapılan hücrelerden 1'er mL olacak şekilde 500 hücre/kuyu ilaç içermeyen besiyeri ile yeniden kültüre alındı.

10. Hücreler invert mikroskopta düzenli aralıklarla incelendi ve koloni oluşumu gözlemlenene kadar hücrelerin her 2-3 günde bir besiyeri değiştirildi ve 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildi.
11. Koloni oluşumu 10. günde gözlemlendi; bu aşamadan sonra hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez 0,5 mL PBS ile yıkandı.
12. Daha sonra kuyucuklardaki hücreleri fikse etmek için her bir kuyuya 0,5 mL soğuk metanol eklendi ve hücreler -20 °C’de 20 dk. fikse edildi.
13. Süre sonunda fikse edilen hücreler iki kez 0,5 mL PBS ile yıkandı.
14. %0,5’lik hazırlanan kristal viyole boyasından her bir kuyudaki hücreye 0,5 mL eklendi ve 20 dk. oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
15. İnkübasyon süresinin ardından bağlanmayan boyayı uzaklaştırmak için hücreler iki kez 0,5 mL PBS ile yıkandı ve boyanan hücrelerin görüntüleri alındı.
16. Uygulama gruplarının kontrol grubuna kıyasla relatif koloni oluşum yüzdesini belirlemek amacıyla öncelikle optimum dalga boyu belirlendi. Bunun için kristal viole ile kristal violenin çözücüsü olarak kullanılan DMSO karıştırıldı ve yüksek ve düşük konsantrasyonda farklı dalga boylarında (470, 490, 570 ve 590 nm) spektrofotometrede absorbansları ölçüldü. Ölçüm sonucunda optimum dalga boyunun 590 nm olduğu belirlendi.
17. Dalga boyu optimize edildikten sonra her bir kuyuya 300 µL DMSO eklendi ve boya çözüldü, daha sonra ELISA okuyucuda 590 nm’de ölçüm alındı. Elde edilen değerler aşağıda belirtilen formül yardımıyla hesaplandı.

$$\text{Relatif koloni oluşumu (\%)} = \frac{[\text{Abs}_{(\text{bileşikler ile muamele edilen hücreler})} - \text{Abs}_{(\text{hücresiz ortamdaki kristal viyole})}]}{[\text{Abs}_{(\text{kontrol grubu hücreler})} - \text{Abs}_{(\text{hücresiz ortam})}]} \times 100$$

İstatistiksel Analiz

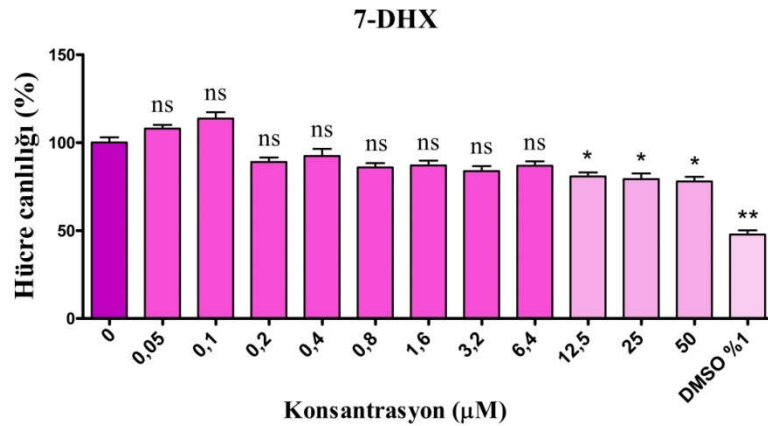
Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ImageJ software programı ve GraphPad Prism 5.00 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA) istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. p>0,05 = ns (not significant) önemsiz, *p<0,05 (significant) önemli, **p<0,01 (very significant) çok önemli, ***p<0,001 (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında 7-DHX ve MTX'in ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında insan kolon kanser hücre hattı (Caco-2) üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etkileri metabolik sitotoksosite testi olan MTT testiyle *in vitro* olarak araştırıldı. MTT test sonuçlarına göre doz ve zaman bağımlı olarak 7-DHX ve MTX'in ayrı ayrı uygulandığında %50'den fazla canlılık gösteren konsantrasyonları ile 7-DHX ve MTX'in birlikte uygulandığında hücre canlılığını %50 azaltan konsantrasyonu ifade eden IC₅₀ değeri belirlendi. MTT test sonuçlarını doğrulamak için belirlenen konsantrasyonların Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri diğer metabolik sitotoksosite testi olan LDH testi ile, hücrelerdeki total protein miktarı üzerindeki etkileri SRB testi ile, hücrelerin apoptozu üzerindeki etkileri Annexin V-FITC/PI boyama metodu ile, hücrelerin migrasyonu üzerindeki etkileri yara iyileştirme (wound healing assay) testi ile ve koloni oluşturabilme yetenekleri üzerindeki etkileri ise klonojenik test ile incelendi.

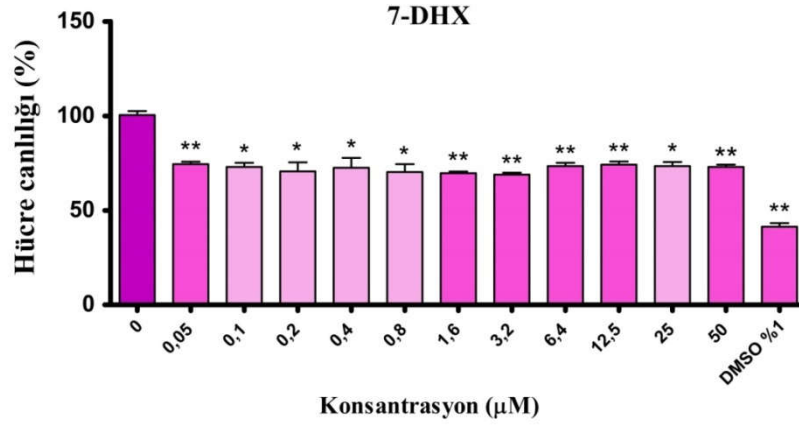
7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif Etkileri

Caco-2 hücrelerinin 7-DHX ile 24 saat boyunca 0,05-50 µM konsantrasyonlarda muamele edilmesinin ardından yapılan MTT testinin sonuçlarına göre 7-DHX'in 0,05 ile 0,1 µM konsantrasyonlarda herhangi bir antiproliferatif etki göstermediği ($p>0,05$), 0,2 ile 6,4 µM arasındaki konsantrasyonlarda ($p>0,05$) ve 12,5 ile 50 µM arasındaki konsantrasyonlarda ($p<0,05$) antiproliferatif etki gösterdiği fakat hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği saptanmıştır (Şekil 14).



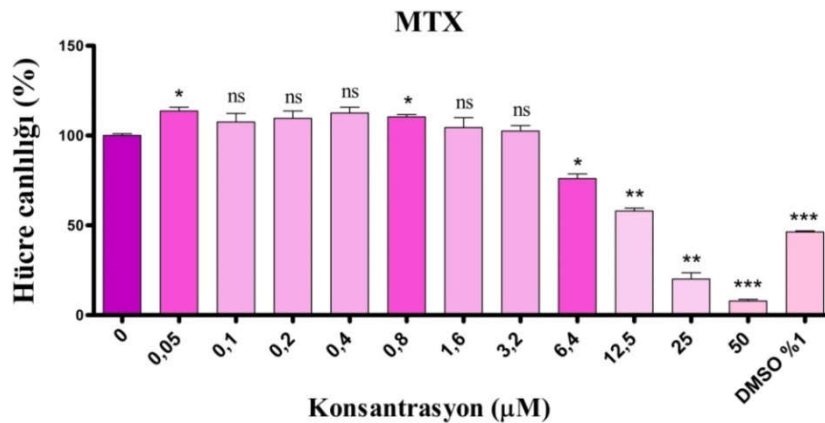
Şekil 14. 7-DHX'in doz (0,05-50 µM) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri ($p>0,05$ =ns, $*p<0,05$, $**p<0,01$)

Caco-2 hücrelerinin 7-DHX ile 48 saat boyunca 0,05-50 μM konsantrasyonlarda muamele edilmesinin ardından 7-DHX'in 0,05 μM , 1,6-12,5 μM ve 50 μM konsantrasyonlarda ($p<0,01$) ve 0,1-0,8 μM ile 25 μM konsantrasyonlarda ($p<0,05$) antiproliferatif etki gösterdiği fakat hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği saptanmıştır (Şekil 15).



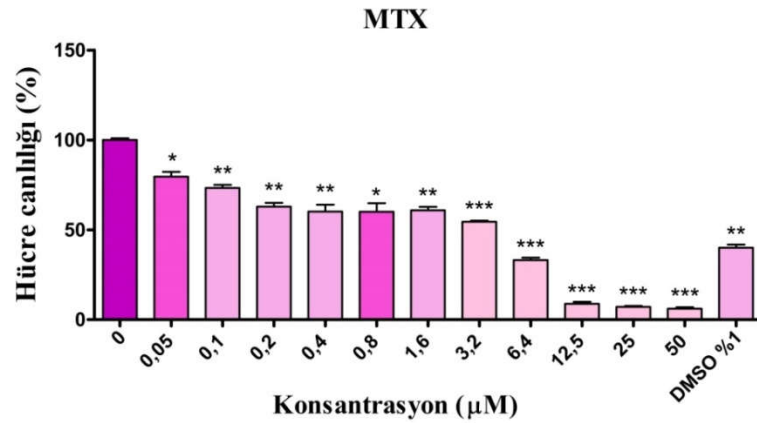
Şekil 15. 7-DHX'in doz (0,05-50 μM) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

Caco-2 hücrelerinin MTX ile 0,05-50 μM konsantrasyonlarda 24 saat muamele edilmesinin ardından 0,05 ile 3,2 μM arasında antiproliferatif etki göstermediği ($p>0,05$, $p<0,05$); 6,4 μM konsantrasyonda ($p<0,05$) ve 12,5 μM konsantrasyonda ($p<0,01$) ise antiproliferatif etki gösterdiği fakat hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği belirlenmiştir. 25 μM (IC_{50} :16,21 $\pm$ 1,23) ($p<0,01$) ve 50 μM (IC_{50} :46,18 $\pm$ 0,15) ($p<0,001$) konsantrasyonlarda ise antiproliferatif etki gösterdiği ve hücre canlılığını %50'nin altına önemli derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. MTX'in doz (0,05-50 μM) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri ($p>0,05$ =ns, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

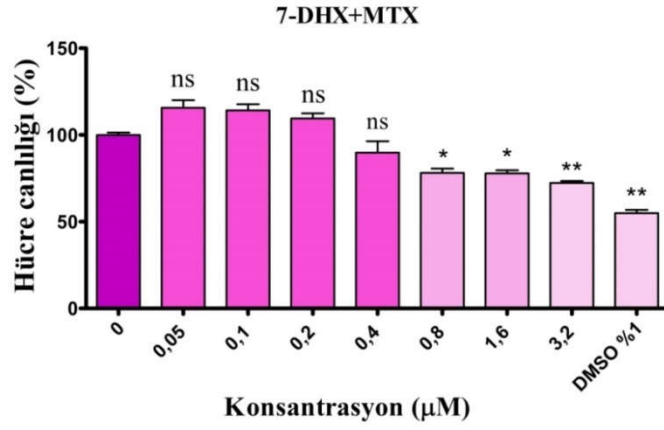
MTX'in Caco-2 hücreleri üzerinde 0,05-50 μM konsantrasyonlarda 48 saatlik uygulamalarının ardından 0,05 μM ($p<0,05$) ile 50 μM ($p<0,001$) arasındaki tüm konsantrasyonlarda antiproliferatif etki gösterdiği; 6,4 μM ($\text{IC}_{50}:2,53\pm0,02$), 12,5 μM ($\text{IC}_{50}:7,1\pm0,24$), 25 μM ($\text{IC}_{50}:12,7\pm0,01$) ve 50 μM ($\text{IC}_{50}:42,35\pm0,19$) konsantrasyonlarda ($p<0,001$) ise hücre canlılığını %50'nin altına önemli ölçüde düşürdüğü saptanmıştır (Şekil 17).



Şekil 17. MTX'in doz (0,05-50 μM) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

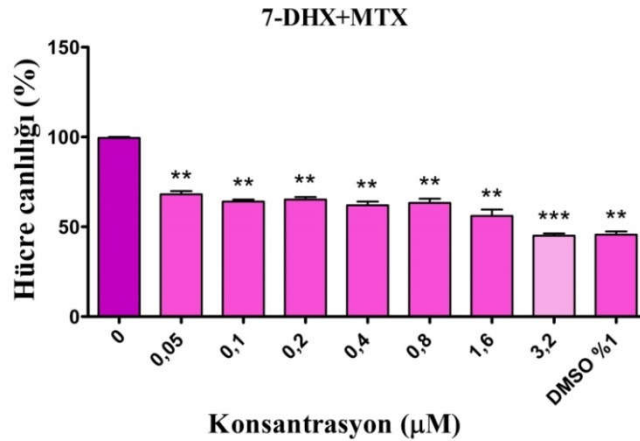
Elde edilen verilere dayanarak 7-DHX ve MTX'in ayrı ayrı uygulandığında doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığının %50'nin üzerinde olduğu konsantrasyonlar (0,05-3,2 μM) seçildi ve 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulaması yapılarak düşük dozlarda sinerjik etkileri araştırıldı.

7-DHX ve MTX'in birlikte 0,05-3,2 μM konsantrasyonlarda Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saatlik uygulamalarının ardından 0,05 ile 0,2 μM arasındaki konsantrasyonlarda antiproliferatif etki göstermediği ($p>0,05$); 0,4 ile 3,2 μM arasındaki konsantrasyonlarda antiproliferatif etki gösterdiği ($p>0,05$; $p<0,01$) fakat hücre canlılığının %50'nin üzerinde olduğu saptanmıştır (Şekil 18).



Şekil 18. 7-DHX ve MTX'in birlikte doz (0,05-3,2 µM) ve zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki sinerjik antiproliferatif etkileri (p>0,05=ns, *p<0,05, **p<0,01)

Şekil 19'da gösterildiği üzere 7-DHX ve MTX'in birlikte 0,05-3,2 µM konsantrasyonlarda 48 saatlik uygulamalarının ardından 0,05 ile 1,6 µM arasındaki konsantrasyonlarda antiproliferatif etki gösterdiği (p<0,01) fakat hücre canlılığının %50'nin üzerinde olduğu gözlemlendi. 3,2 µM konsantrasyonda ise hücre canlılığını %46'ya düşürdüğü (p<0,001) belirlendi ve IC₅₀ değeri 2,68±0,10 olarak hesaplandı (Şekil 19).



Şekil 19. 7-DHX ve MTX'in birlikte doz (0,05-3,2 µM) ve zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki sinerjik antiproliferatif etkileri (**p<0,01, ***p<0,001)

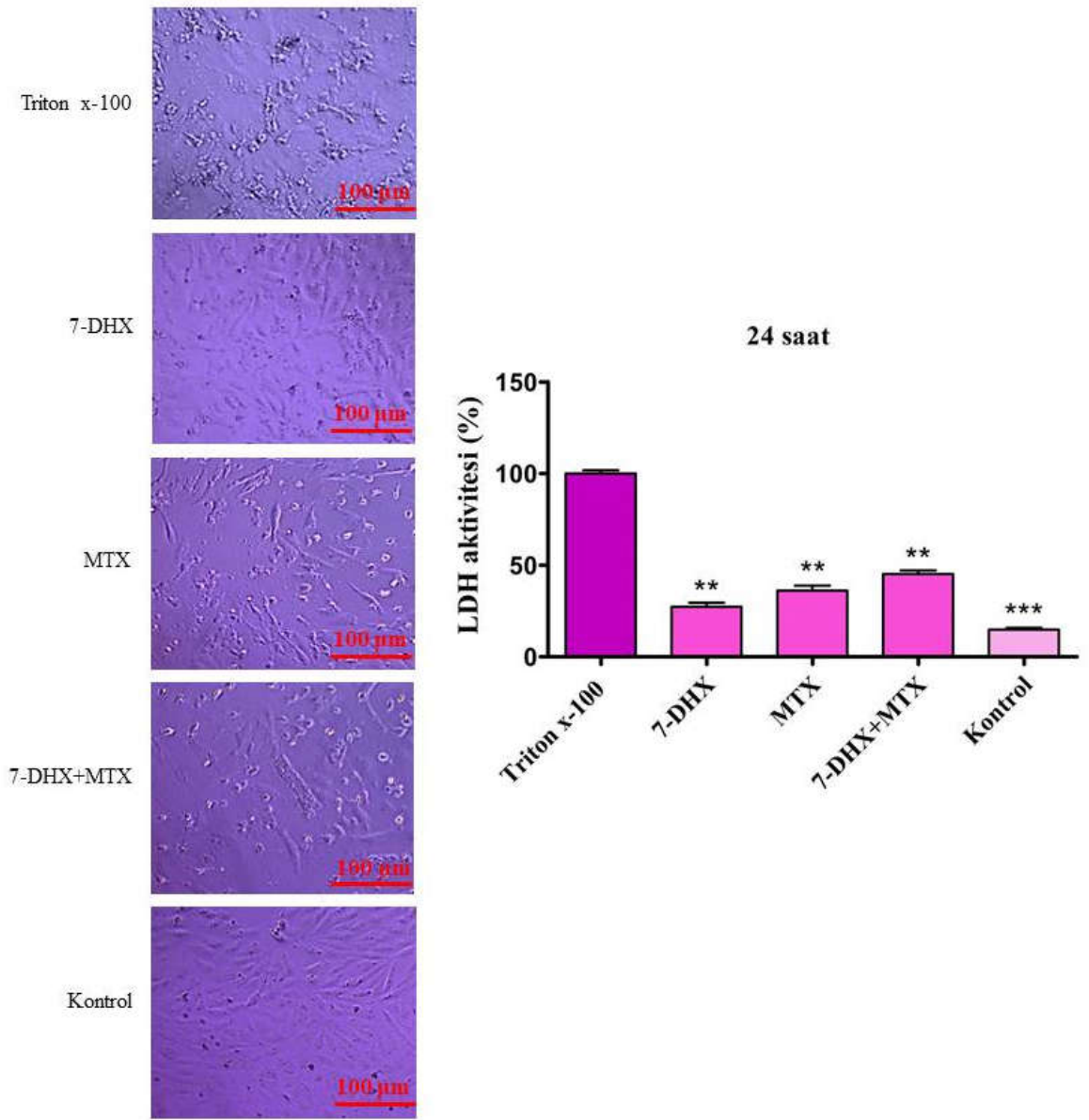
Elde edilen tüm verilere dayanarak, 7-DHX'in tek başına Caco-2 hücreleri üzerinde 24 ve 48 saatlik uygulamalarının ardından hücre proliferasyonunu azalttığı fakat hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği saptanmıştır. MTX'in Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saatlik uygulamalarının ardından 25 µM konsantrasyona kadar hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği; 25 ve 50 µM konsantrasyonlarda ise büyük ölçüde sitotoksik etki göstererek hücrelerin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği ve hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü belirlenmiştir. MTX'in Caco-2 hücreleri üzerinde 48 saatlik uygulamalarının ardından ise 0,05 ile 3,2 µM arasındaki konsantrasyonlarda antiproliferatif etki gösterdiği

fakat hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği; 6,4 ile 50 μ M arasındaki konsantrasyonlarda ise hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaltarak hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü belirlendi. 7-DHX ve MTX'in Caco-2 hücrelerinde sinerjik etkilerini araştırabilmek için doz ve zaman bağımlı olarak her iki ilaç grubunda da hücre canlılığının %50'nin üzerinde olan konsantrasyonları (0,05-3,2 μ M) 1:1 oranında kombinlenerek Caco-2 hücrelerine uygulandı. 7-DHX ve MTX'in birlikte 24 saatlik uygulamalarının ardından 0,05 ile 3,2 μ M arasındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği; 48 saatlik uygulamanın ardından ise sadece 3,2 μ M konsantrasyonda hücre canlılığını %46'ya düşürdüğü belirlendi. Bu sonuçlar göz önüne alındığında doz ve zaman bağımlı olarak 7-DHX ve MTX'in ayrı uygulamalarında hücre canlılığının %50'nin üzerinde olan en düşük konsantrasyonu 3,2 μ M olarak belirlendi ve bundan sonraki deneylerde 7-DHX ve MTX için bu konsantrasyonun 24 ve 48. saatlerde optimum doz olarak kullanılmasına karar verildi. 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulandığında 48. saatteki IC₅₀ değeri 2,68 $\pm$ 0,10 μ M olarak hesaplandı ve bu konsantrasyon sonraki deney aşamalarında bu iki ilacın sinerjik etkilerini araştırmak için kullanıldı.

7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

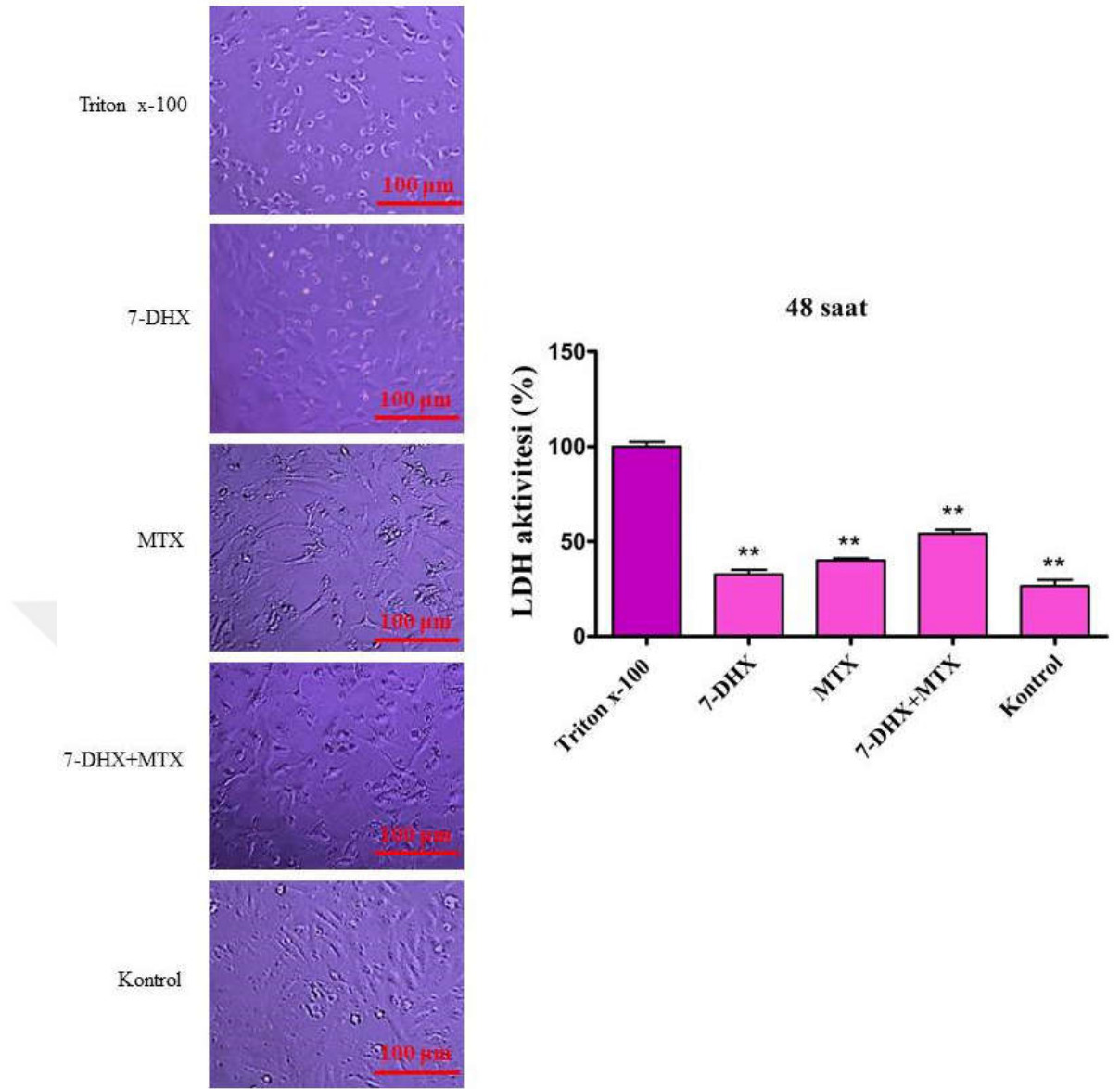
MTT testini doğrulamak amacıyla hasar gören veya ölen hücrelerde LDH aktivitesi ölçümüne dayanan LDH testi yapıldı. MTT testi sonucunda belirlenen konsantrasyonlar uygulanarak 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in insan kolon kanser hücre hattı (Caco-2) üzerindeki sitotoksik etkileri belirlendi ve LDH testi sonuçları Şekil 20 ve 21'de gösterildi.

Caco-2 hücrelerinin 7-DHX (3,2 μ M), MTX (3,2 μ M) ve kombine 7-DHX/MTX (IC₅₀: 2,68 μ M) ile 24 saat muamele edilmesinin ardından 7-DHX ile muamele edilen hücrelerdeki LDH aktivitesinin %27 (p<0,01), MTX ile muamele edilen hücrelerdeki LDH aktivitesinin %35 (p<0,01), 7-DHX ve MTX ile birlikte muamele edilen hücrelerdeki LDH aktivitesinin ise %45 (p<0,01) olduğu belirlendi (Şekil 20).



Şekil 20. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri (Ölçek çubuğu: 100 µm) (**p<0,01, ***p<0,001)

Caco-2 hücrelerinin 7-DHX (3,2 µM), MTX (3,2 µM) ve kombine 7-DHX/MTX (IC₅₀: 2,68 µM) ile 48 saat muamele edilmesinin ardından ise 7-DHX ile muamele edilen hücrelerdeki LDH aktivitesinin %32 (p<0,01), MTX ile muamele edilen hücrelerdeki LDH aktivitesinin %39 (p<0,01), 7-DHX ve MTX ile birlikte muamele edilen hücrelerdeki LDH aktivitesinin ise %53 (p<0,01) olduğu belirlendi (Şekil 21).



Şekil 21. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri (Ölçek çubuğu: 100 µm) (**p<0,01)

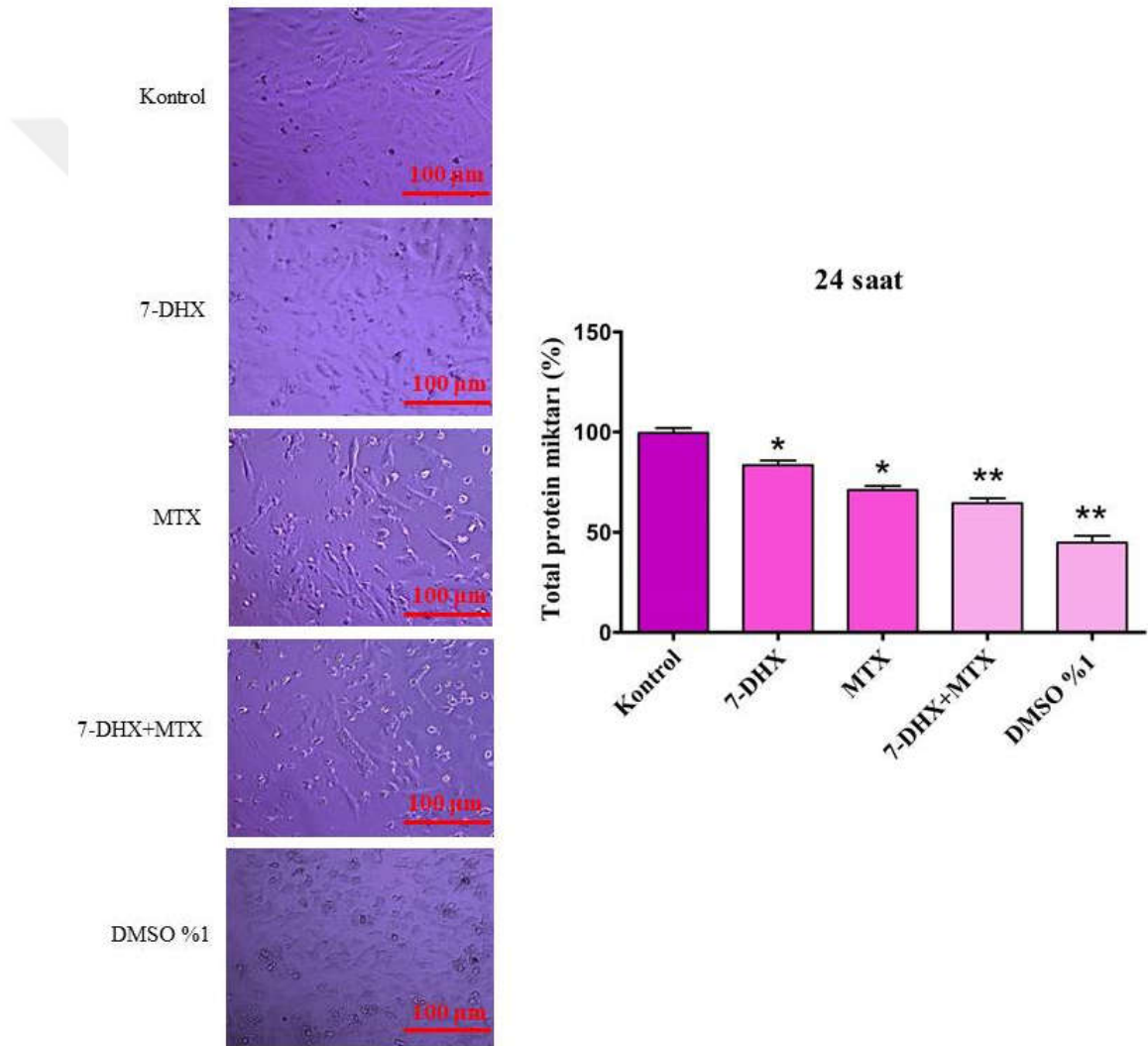
Bu veriler ışığında 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat uygulanmasının ardından her üç uygulama grubunda da zaman bağımlı olarak LDH aktivitesinde artış meydana geldiği; fakat her iki zaman diliminde de (24 ve 48 saat) en yüksek LDH aktivitesinin 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulandığında görüldüğü, böylelikle Caco-2 hücreleri üzerinde 7-DHX ve MTX'in birlikte uygulanmasının bu ajanların ayrı ayrı uygulanmasından daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu ve sinerjik etki gösterdiği belirlendi.

7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX /MTX'in Caco-2 Hücrelerinin Total Protein Miktarı Üzerindeki Etkileri

7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 kanser hücrelerinin total protein miktarı üzerinde gösterdiği etkiyi ve buna bağlı olarak hücre canlılığı üzerindeki etkisini

belirlemek için SRB testi yapıldı. LDH testi, hücrelerin kültür ortamı kullanılarak gerçekleştirildiği için SRB testinde LDH testi için uygulama yapılan hücreler kullanıldı. SRB testi sonuçları Şekil 22 ve 23'te gösterildi.

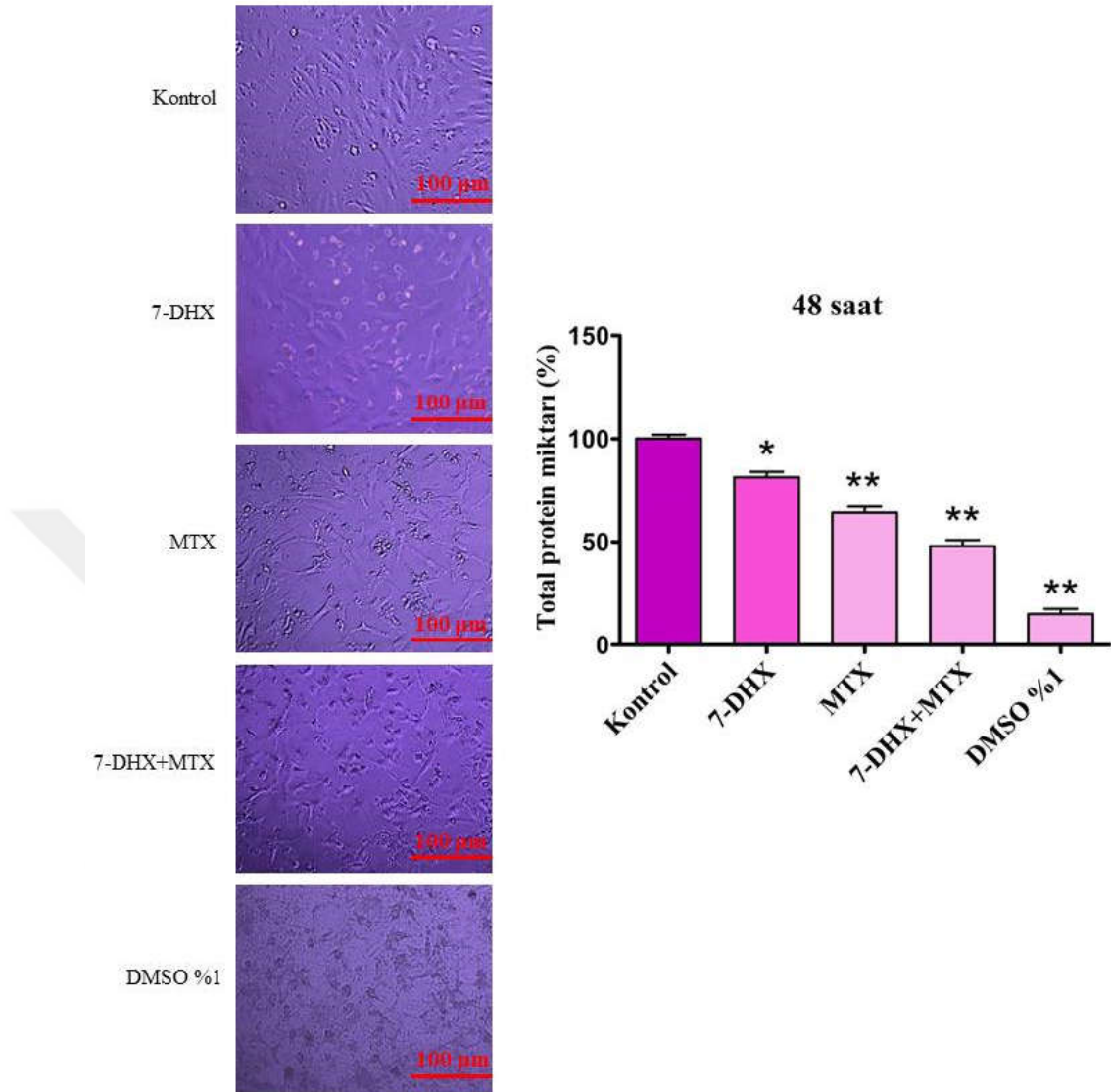
7-DHX (3,2 μ M), MTX (3,2 μ M) ve kombine 7-DHX/MTX'in (IC₅₀: 2,68 μ M) Caco-2 hücreleri ile 24 saat muamele edilmesinin ardından 7-DHX ile muamele edilen hücrelerin, hücre canlılığıyla orantılı olarak total protein miktarının %83 (p<0,05), MTX ile muamele edilen hücrelerdeki total protein miktarının %70 (p<0,05), 7-DHX ve MTX ile birlikte muamele edilen hücrelerdeki total protein miktarının ise %64 (p<0,01) olduğu saptandı (Şekil 22).



Şekil 22. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin total protein miktarı üzerindeki etkileri (Ölçek çubuğu: 100 μ m) (*p<0,05, **p<0,01)

Caco-2 hücrelerinin 7-DHX (3,2 μ M), MTX (3,2 μ M) ve kombine 7-DHX/MTX (IC₅₀: 2,68 μ M) ile 48 saat muamele edilmesinin ardından ise 7-DHX ile muamele edilen hücrelerdeki total protein miktarının %81 (p<0,05), MTX ile muamele edilen hücrelerdeki

total protein miktarının %64 ($p<0,01$), 7-DHX ve MTX ile birlikte muamele edilen hücrelerdeki total protein miktarının ise %47 ($p<0,01$) olduğu belirlendi (Şekil 23).



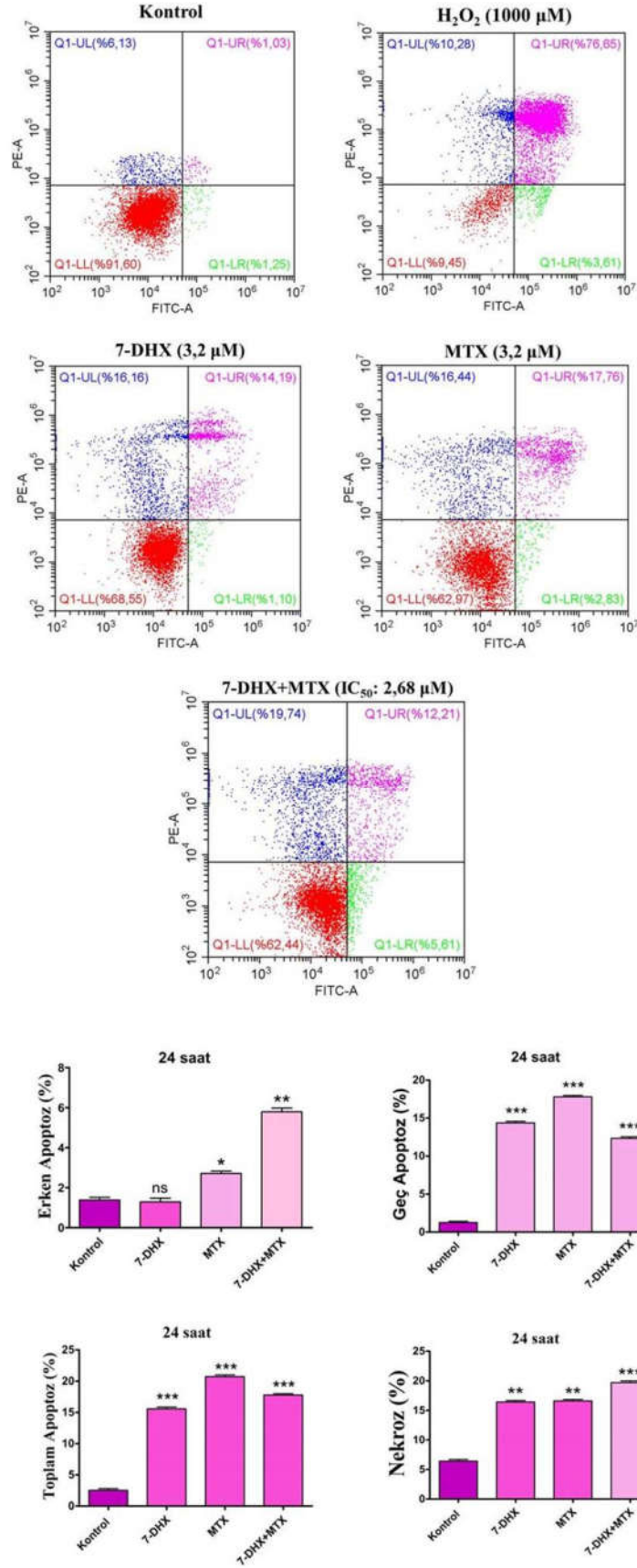
Şekil 23. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin total protein miktarı üzerindeki etkileri (Ölçek çubuğu: 100 µm) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

SRB testi sonucunda elde edilen verilere dayanarak 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat muamele edilmesinin ardından hücrelerdeki total protein miktarının her üç uygulama grubunda da zaman bağımlı olarak azaldığı; fakat 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulandığında gösterdiği sitotoksik etkinin, 7-DHX ve MTX'in ayrı ayrı uygulandığında gösterdiği etkiden daha fazla olduğu ve bunun bir sonucu olarak özellikle 48. saat sonunda total protein miktarında çok önemli bir azalışa sebep olarak Caco-2 hücreleri üzerinde sinerjik etki gösterdiği belirlendi.

7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücrelerinin Apoptozu ve Nekrozu Üzerindeki Etkileri

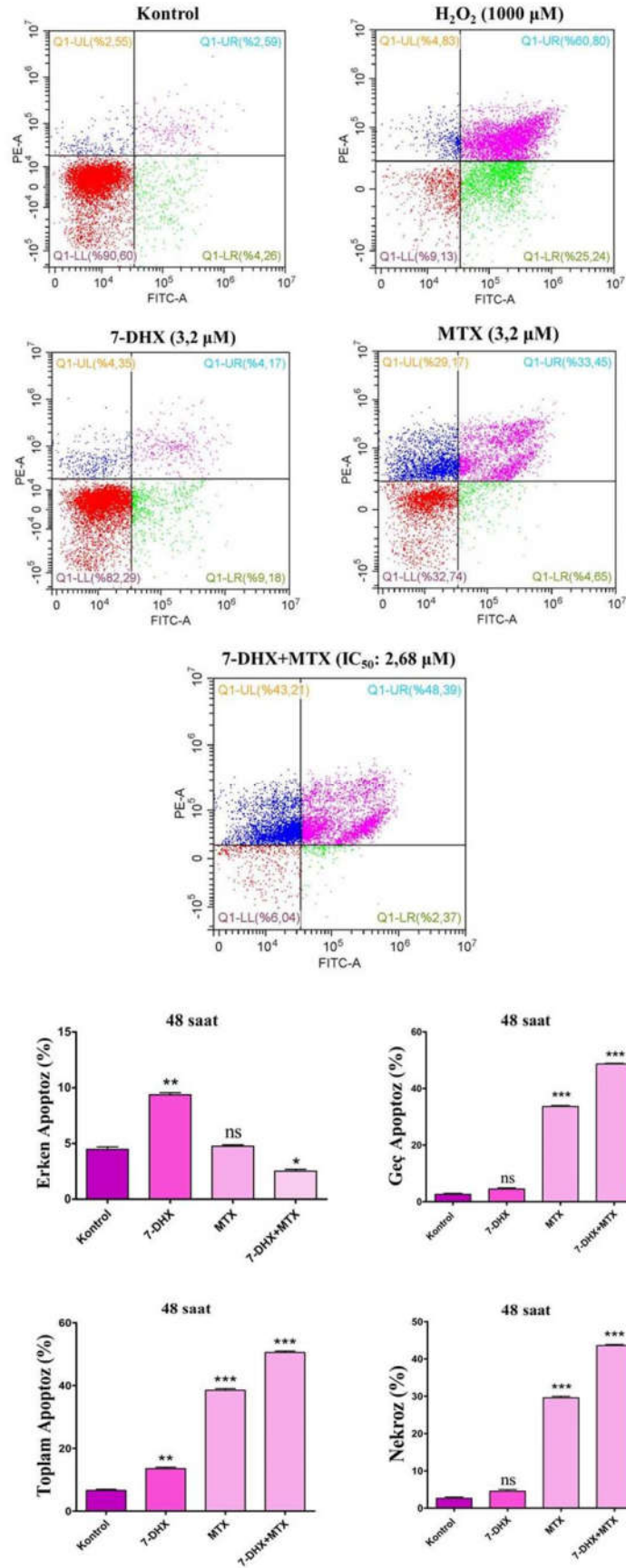
Sitotoksik etki gösteren 7-DHX (3,2 μ M), MTX (3,2 μ M) ve kombine 7-DHX/MTX'in (IC₅₀: 2,68 μ M) Caco-2 kanser hücrelerinde gösterdiği antiproliferatif etkilerin apoptoz indüksiyonu ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için Annexin V-FITC/PI kiti kullanıldı; bu sitotoksik ajanların hücrelerin apoptozu ve nekrozu üzerindeki etkileri değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 24 ve 25'te gösterildi.

Caco-2 hücrelerinin 7-DHX ve MTX ile ayrı ayrı ve birlikte 24 saat muamele edilmesinin ardından 7-DHX'in hücreleri %1,10 oranında erken, %14,19 oranında geç apoptoza; MTX'in %2,83 oranında erken, %17,76 oranında geç apoptoza ve 7-DHX ile MTX'in birlikte %5,61 oranında erken, %12,21 oranında geç apoptoza götürdüğü belirlenmiş ve toplamda 7-DHX'in %15,29, MTX'in %20,59 ve 7-DHX ile MTX'in birlikte %17,82 oranında Caco-2 hücrelerini apoptoza götürdüğü belirlenmiştir. Bu oranlar göz önüne alındığında 24 saatlik uygulamanın ardından diğer uygulama gruplarına kıyasla 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulanmasının Caco-2 hücrelerini erken apoptoza daha fazla götürdüğü, MTX'in ise geç apoptoza daha fazla götürdüğü saptanmıştır. Uygulama grupları arasında toplam apoptoz oranlarına bakıldığında ise MTX'in diğer uygulama gruplarına kıyasla Caco-2 hücrelerini daha fazla apoptoza götürdüğü; 7-DHX ve MTX'in birlikte ise Caco-2 hücrelerinin toplam apoptozu üzerinde önemli bir etki göstermediği gözlemlenmiştir. 7-DHX ve MTX'in ayrı ayrı ve birlikte uygulamalarında sırasıyla %16,16, %16,44 ve %19,74 oranında hücreleri nekroza götürdüğü gözlemlenmiş ve 24 saatlik uygulamanın sonunda Caco-2 hücrelerine birlikte uygulanan 7-DHX ve MTX'in, ayrı ayrı uygulanan 7-DHX ve MTX'e oranla hücrelerin nekroza gitmesinde artışa sebep olarak sinerjik bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (24 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin apoptozu ve nekrozu üzerindeki etkileri (p>0,05=ns, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

Caco-2 hücrelerinin 7-DHX ve MTX ile ayrı ayrı ve birlikte 48 saat muamele edilmesi sonucunda ise 7-DHX'in hücreleri %9,18 oranında erken, %4,17 oranında geç apoptoza; MTX'in %4,65 oranında erken, %33,45 oranında geç apoptoza ve 7-DHX ile MTX'in birlikte hücreleri %2,37 oranında erken, %48,39 oranında ise geç apoptoza götürdüğü saptanmış ve toplamda 7-DHX, MTX ve 7-DHX ile MTX'in birlikte sırasıyla %13,35, %38,1 ve %50,76 oranlarında Caco-2 hücrelerini apoptoza götürdüğü belirlenmiştir. Elde edilen oranlar göz önüne alındığında 48 saatlik uygulamanın ardından Caco-2 hücrelerini diğer uygulama gruplarına kıyasla yüksek oranda erken apoptoza 7-DHX'in, geç apoptoza ise birlikte uygulanan 7-DHX ile MTX'in götürdüğü; bununla birlikte Caco-2 hücrelerinde diğer uygulama gruplarına kıyasla toplam apoptoz oranının en yüksek olduğu grubun yine 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulandığında görüldüğü belirlenmiştir. 7-DHX ve MTX'in ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonucu Caco-2 hücrelerinin nekrozu üzerindeki etkilerinin ise sırasıyla %4,35, %29,17 ve %43,21 oranında olduğu saptanmış ve 48 saatlik uygulamanın ardından Caco-2 hücrelerinde birlikte uygulanan 7-DHX ile MTX'in, ayrı ayrı uygulanan 7-DHX ve MTX'e oranla hücrelerin nekroza gitmesinde önemli bir artışa sebep olarak sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin apoptozu ve nekrozu üzerindeki etkileri (p>0,05=ns, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

Elde edilen veriler doğrultusunda 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin apoptozu ve nekrozu üzerinde zaman bağımlı olarak etki gösterdiği belirlenmiştir. 24 saatlik muamelenin ardından kombine 7-DHX/MTX'in, hücreleri nekroza apoptoza oranla çok az bir farkla daha fazla götürdüğü saptanmıştır. Özellikle 48 saatlik muamelenin ardından 7-DHX ile MTX'in birlikte hücrelerin hem toplam apoptozu hem de nekrozu üzerinde diğer uygulama gruplarına kıyasla önemli derecede sinerjik etki göstererek hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir.

7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücrelerinin Migrasyonu Üzerindeki Etkileri

7-DHX ile MTX'in ayrı ayrı ve birlikte Caco-2 hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için yara iyileştirme testi (wound healing assay) yapıldı. Şekil 26'da gösterildiği üzere 6. saatin sonunda 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in kontrol grubuna kıyasla yara alan yüzdesinde bir değişikliğe sebep olmadığı dolayısıyla bu zaman diliminde migrasyon üzerinde herhangi bir etki göstermediği belirlenmiştir ($p>0.05$) (Şekil 26).

12. saat sonunda 7-DHX'in kontrol grubuna kıyasla yara alan yüzdesinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığı böylece Caco-2 hücrelerinin migrasyonunu engellemede önemli bir etki göstermediği ($p>0,05$); MTX'in ise yara alan yüzdesinde çok küçük bir artmaya sebep olduğu ($p<0,05$) ve bu zaman diliminde migrasyonu az da olsa engellediği belirlenmiştir. 7-DHX ile MTX birlikte uygulandığında ise yara alan yüzdesinde kontrole kıyasla önemli bir artış meydana geldiği gözlemlenmiş ($p<0,01$) ve kombine 7-DHX/MTX'in 12. saat sonunda hücrelerin migrasyonunu azalttığı saptanmıştır (Şekil 26).

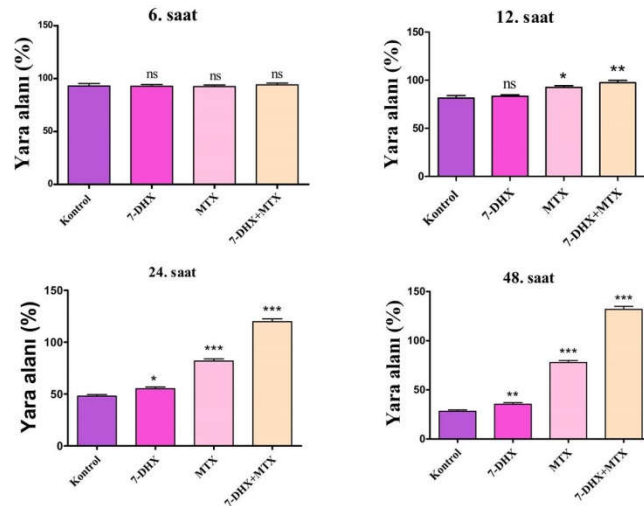
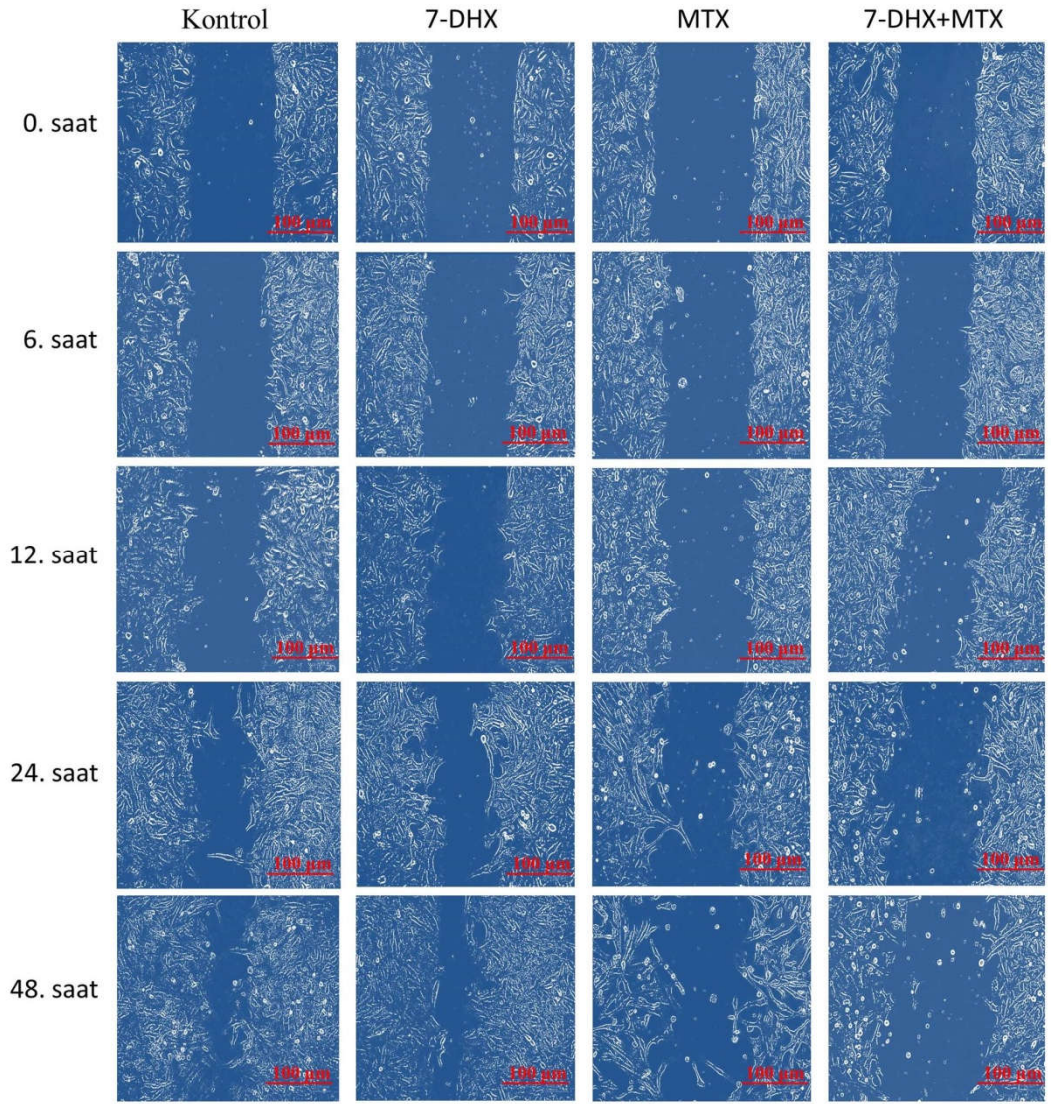
24. saatin sonunda 7-DHX ile muamele edilen hücrelerin yara alan yüzdesinde önemli derecede ($p<0,05$) azalma meydana geldiği, böylelikle 7-DHX'in migrasyonu engelleyemediği; MTX'in ise yara alan yüzdesinde önemli bir artışa sebep olarak hücrelerin migrasyonunu önemli ölçüde ($p<0,001$) azalttığı belirlenmiştir. Kombine 7-DHX ile MTX'in ise yine yara alan yüzdesinde artışa sebep olduğu ve migrasyonu yüksek derecede ($p<0,001$) engellediği gözlemlenmiştir (Şekil 26).

48. saatin sonunda ise 7-DHX ile muamele edilen hücrelerin yara alan yüzdesinde önemli ölçüde azalma meydana geldiği, bunun sonucu olarak 7-DHX'in migrasyonu engelleyemediği ($p<0,01$); MTX ile muamele edilen hücrelerin yara alan yüzdesinde ise artış meydana geldiği ve MTX'in Caco-2 hücrelerinde yüksek derecede ($p<0,001$) migrasyonu engellediği belirlenmiştir. 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulandığı hücrelerde ise yara alanı

yüzdesinde kontrol grubuna kıyasla çok önemli derecede ($p<0,001$) artış meydana geldiği böylelikle migrasyonu engellediği saptanmıştır (Şekil 26).

Elde edilen verilere dayanarak kombine 7-DHX ile MTX'in ayrı ayrı uygulanan 7-DHX ve MTX'e kıyasla zaman bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin migrasyonunu inhibe etmede daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 26).

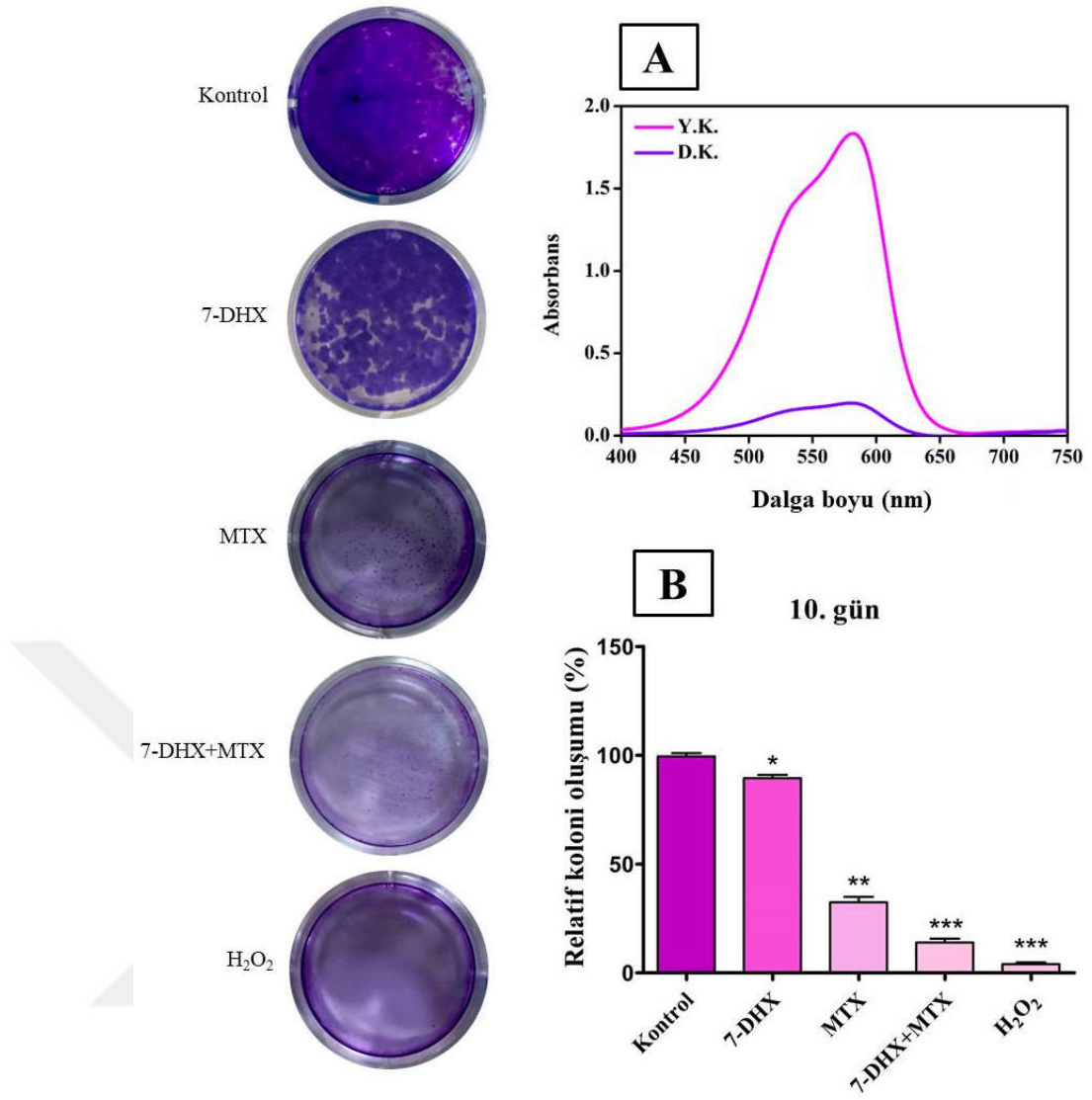




Şekil 26. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman (6, 12, 24 ve 48 saat) bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkileri (Ölçek çubuğu: 100 µm) ($p>0,05=ns$, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$).

7-DHX, MTX ve Kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yetenekleri Üzerindeki Etkileri

7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin proliferasyon ve koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkilerinin araştırılması için klonojenik test yapıldı. 7-DHX ve MTX ile ayrı ayrı ve birlikte muamele edilen Caco-2 hücreleri 10. günde incelendi. Şekil 27'de gösterildiği gibi 7-DHX ile muamele edilen hücrelerin yüzeye yayılarak proliferasyon olduğu ve koloni oluşturduğu gözlemlenmiştir. MTX'in ve 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulandığı hücrelerde ise bölgesel olarak koloni oluşumu gözlemlenmemiş olup hücreler uygulama gruplarının toksisitesine bağlı olarak yüzeye yayılarak proliferasyon olmuştur. Uygulama gruplarıyla muamele edilen Caco-2 hücrelerinin relatif koloni oluşturma yüzdesi belirlenmiş ve 7-DHX, MTX ve 7-DHX ile MTX'in birlikte muamele edildiği Caco-2 hücrelerinin sırasıyla %89 ($p<0,05$), %32 ($p<0,01$) ve %13 ($p<0,001$) oranlarında koloni oluşturduğu saptanmıştır. Bu oranlar göz önüne alındığında 7-DHX'in Caco-2 hücrelerinin proliferasyonunu ve koloni oluşturmalarını engelleyemediği; MTX'in ise hücrelerin proliferasyonunu ve koloni oluşturmalarını önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. 7-DHX ve MTX ile birlikte muamele edilen Caco-2 hücrelerinde ise proliferasyonun ve koloni oluşumunun çok önemli derecede azaldığı ve bunun sonucu olarak 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulanmasının Caco-2 hücrelerinin koloni oluşturmalarını engelleyici yönde önemli bir sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 27. (A) Kristal violenin 590 nm dalga boyunda, düşük ve yüksek konsantrasyonda gösterdiği pikin spektrofotometrik analiz sonucu. (B) 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin koloni oluşturmaları üzerindeki etkileri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Tartışma ve Sonuç

Kanser, herhangi bir doku veya organda kontrolsüz bir şekilde büyüyen anormal hücrelerin, orjinlendikleri bölgeden kan veya lenf sistemi yoluyla vücudun diğer doku veya organlarına yayılması sonucu ortaya çıkan ölümcül bir hastalıktır (Jiramongkol & Lam, 2020). Dünya çapında her bölgede düzeye bakılmaksızın önemli morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir (Bray *et al.*, 2018). Kanser hücreleri aşırı proliferasyon, anjiyogenez, metastaz, farklılaşma, telomeraz aktivitesinin indüksiyonu, immortalize olma, apoptoz ve immün sistemden kaçma, tümör teşvik eden iltihaplanmanın oluşması, hücreler arası iletişimin artması ve gelen sinyallere yanıt vermeme ve tedaviye direnç gösterme gibi birçok özelliğe sahiptir (Block *et al.*, 2015; Hanahan & Weinberg, 2011).

CRC genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu gelişen ve çoğunlukla benign bir polipin malign forma dönüşmesi sonucu oluşan heterojen bir hastalıktır (Klimczak *et al.*, 2016). CRC'nin çoğu sporadiktir; hastaların yaklaşık dörtte üçünün aile öyküsü negatiftir (Kuipers *et al.*, 2015). Dünyada hem kadınlarda hem de erkeklerde en sık görülen kanserlerden biridir ve kadınlarda en sık görülen üçüncü, erkeklerde en sık görülen dördüncü kanserdir (Klimczak *et al.*, 2016). Evre I-III CRC için beş yıllık sağkalım oranı %80 iken, tüm vakaların %20'sini oluşturan evre IV CRC için bu oran yaklaşık %13'tür (Siegel *et al.*, 2020).

Kemoterapi tüm kanser türlerinde olduğu gibi CRC'de de ilk tercih edilen tedavi yöntemidir. Metastatik CRC tedavisinde kemoterapi, cerrahi tedavi öncesi neoadjuvan tedavi olarak veya ileri evrede rezektabl şansı olmayan durumlarda palyatif tedavi olarak kullanılmaktadır (Binefa *et al.*, 2014). Kemoterapide kullanılan ilaçlar hızla büyüyen kanser hücrelerini başarılı bir şekilde ortadan kaldırabilse de; sistemik toksisite, kanser hücrelerini seçicilikteki eksiklik ve kanser hücrelerinin ilaç direnci geliştirmesi gibi nedenler kemoterapinin etkinliğini sınırlandırmakta ve ileri evre CRC tedavisinde tatmin edici etkinliğe sahip olmamaktadır (Oun *et al.*, 2018; P. Yang *et al.*, 2019). Kemoterapinin bu olumsuz etkilerini azaltmak ve kanser hücreleri üzerinde daha etkili bir tedavi sağlamak için yeni kemoterapötik stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Kolorektal kanser çok heterojen bir hastalık olduğu için monoterapi ile tek hedefli inhibisyonlar genellikle istenen terapötik etkiyi sağlamada yetersiz kalmaktadır. Bundan dolayı maksimum terapötik etkinlik ve minimum toksisite için monoterapiden ziyade çoklu

ilaç kombinasyonları ile hedef mekanizmalar bloke edilerek sinerjik antikanser etkilerin oluşturulması kanserle mücadelede daha etkin bir yol olarak görülmektedir (Shuhendler *et al.*, 2010). Kombinasyon ilaç terapileri iki veya daha fazla farklı hedefin birden fazla ilaç kullanılarak eş zamanlı bloke edilmesine dayalı olabileceği gibi, tek bir hedefin iki veya daha fazla ilaç kullanılarak bloke edilmesine dayalı da olabilmektedir (Bevins & Zimmer, 2005; Kim *et al.*, 2003). Kanser tedavisinde mikrotübül inhibitörleri ve topoizomera 2 inhibitörleri kemoterapötik ajan olarak klinikte antitümör ilaçların en önemli iki sınıfını oluşturmaktadır ve farklı etki mekanizmaları nedeniyle sıklıkla kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Yi *et al.*, 2015).

Bu tez çalışması kapsamında da bir deniz alkaloidi olan ve mikrotübül inhibitörü sınıfına ait olan 7-DHX ile FDA tarafından onaylanan ve klinikte birçok kanserin tedavisinde kullanılan topoizomera 2 inhibitörü MTX'in, Caco-2 hücreleri üzerindeki sinerjik etkileri antiproliferatif test olan MTT testi ile incelenmiş ve yapılan analizler sonucunda 7-DHX'in tek başına 24 ve 48 saat muamelesinin ardından Caco-2 hücreleri üzerinde düşük antiproliferatif etki gösterdiği ve bunun sonucu olarak önemli bir antikanser etkisinin olmadığı belirlenmiştir. 7-DHX'in bu düşük antiproliferatif etkisi Frolova ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışma sonucunda gösterilmiş ve çalışmamızdan elde ettiğimiz verileri desteklemiştir (Frolova *et al.*, 2013). Caco-2 hücrelerinin MTX ile muamele edilmesinin ardından ise doz ve zaman bağımlı olarak hücreler üzerinde antiproliferatif etki gösterdiği özellikle yüksek konsantrasyonlarda önemli antikanser aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Yapılan *in vitro* bir çalışmada MTX'in HCC-78 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) hücrelerinde (Luo *et al.*, 2017), U2OS ve MG63 osteosarkom hücrelerinde (S. H. Park *et al.*, 2018) doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği ve bu hücre hatları üzerinde antikanser aktiviteye sahip olduğu; bununla birlikte Senbabaoglu ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise MTX'in U87MG, U87MG-R50 ve U373 (insan glioblastoma) hücreleri üzerinde herhangi bir antiproliferatif etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (Senbabaoglu *et al.*, 2016). 7-DHX ile MTX'in sinerjik etkilerinin araştırılması için 7-DHX ile MTX'in hücre canlılığının %50'nin üzerinde olan konsantrasyonları seçilerek 1:1 oranında kombinlenmiş ve Caco-2 hücrelerine uygulanmıştır. 24 saatlik uygulamanın ardından kombine 7-DHX/MTX'in hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği; 48 saatlik uygulamanın ardından ise yalnızca 3,2 μ M konsantrasyonda hücre canlılığını %46'ya düşürdüğü belirlenmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında 24 ve 48 saat için 7-DHX ile MTX'in optimum dozun 3,2 μ M, kombine 7-DHX/MTX'in ise IC_{50} değeri $2,68 \pm 0,10$ μ M olduğu saptanmış ve 7-DHX ile MTX'in birlikte 48. saatte sinerjik etki göstererek kemoterapötik ajan olma potansiyeline sahip olduğu kanısına varılmıştır. MTX'in farklı

ajanlarla sinerjik etkilerine bakılan birkaç çalışma mevcuttur. Flaig ve arkadaşları (2007) tarafından MTX ile silibinin sinerjik etkileri DU145, LNCaP ve PC3 (prostat kanseri) hücreleri üzerinde araştırılmış; araştırma sonucunda MTX ile silibinin birlikte uygulanmasının DU145 ve LNCaP hücrelerinin canlılığını azalttığı, PC3 hücrelerinin canlılığında ise önemli bir azalışa sebep olmadığı gösterilmiştir (Flaig *et al.*, 2007). Yapılan bir başka çalışmada MTX'in TRAIL rekombinantı ile olan sinerjik etkileri U87MG, U87MG-R50 ve U373 (insan glioblastoma) hücreleri üzerinde araştırılmış ve TRAIL rekombinatının MTX ile uygulanmasının kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı sonucuna varılmıştır (Senbabaoglu *et al.*, 2016). MTX'in mTOR inhibitörleri (rapamisin ve everolimus) ile olan sinerjik etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise MCF-7 ve MDA-MB-231 (insan meme kanseri) hücreleri kullanılmış ve kombine MTX ile mTOR inhibitörlerinin bu kanser hücrelerinin canlılığını azaltarak sinerjik bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Guan *et al.*, 2020). Merli ve arkadaşları tarafından (2018) MTX ile metal elementlerinin (GaMal ve InMal) MDA-MB-231 (insan meme kanseri) hücreleri üzerindeki sinerjik etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise MTX ile metal elementlerinin birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sinerjik etki göstermediği belirtilmiştir (Merli *et al.*, 2018).

7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi ve MTT testinin doğrulanması amacıyla yapılan LDH testi sonucunda, bu üç uygulama grubunun da zaman bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin LDH aktivitesinde artış meydana getirdiği; bununla birlikte her iki zaman diliminde de (24 ve 48 saat) LDH aktivitesinin en yüksek olduğu uygulama grubunun kombine 7-DHX/MTX'in olduğu ve bunun sonucu olarak 7-DHX ile MTX'in birlikte sinerjik etki göstererek bu ajanların ayrı ayrı uygulandığında gösterdikleri sitotoksik etkiden daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 kanser hücrelerinin total protein miktarı üzerinde gösterdiği etkiyi ve buna bağlı olarak hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan SRB testi sonuçlarına göre, 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in zaman bağımlı olarak Caco-2 hücrelerinin total protein miktarında azalmaya sebep olduğu, bununla birlikte kombine 7-DHX/MTX'in özellikle 48. saat sonunda ayrı ayrı uygulanan 7-DHX ile MTX'e oranla total protein miktarında çok önemli bir azalışa sebep olarak Caco-2 hücreleri üzerinde sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Kanser hücrelerinin apoptoza direnç göstererek prolifer olma kabiliyetlerini sürdürmesi en tipik özelliklerinden biridir. Tez çalışması kapsamında 7-DHX, MTX ve

kombine 7-DHX/MTX'in ilaç toksisitesine bağılı olarak gösterdikleri antiproliferatif etkilerin apoptoz veya nekroz indüksiyonu ile gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla yapılan flow sitometri analiz sonucunda, 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin apoptozu ve nekrozu üzerinde zaman bağımlı olarak etki gösterdiği belirlenmiştir. 24 saat sonunda kombine 7-DHX/MTX'in hücrelerin toplam apoptozu üzerinde etkiye sahip olduğu, fakat hücrelerin nekrozu üzerinde apoptoza oranla çok az bir farkla daha fazla etkili olduğu belirlenmiş olup, 24 saatlik muamelede kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini hücreleri daha çok nekroza götürerek gösterdiği sonucuna varılmıştır. 48 saatlik uygulamanın ardından ise 7-DHX/MTX'in birlikte önemli sinerjik etki göstererek hücrelerin hem toplam apoptozu hem de nekrozu üzerinde diğer uygulama gruplarına kıyasla daha fazla etki gösterdiği ve bu zaman diliminde hücreleri nekrozdan ziyade apoptoza daha fazla götürerek hücreler üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu saptanmıştır. MTX'in silibin ile DU145, LNCaP ve PC3 (prostat kanseri) hücrelerinin apoptozu üzerinde sinerjik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bu iki ajanın tüm hücre hatlarında apoptozu indükleyerek sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir (Flaig *et al.*, 2007). Senbabaoglu ve arkadaşlarının (2016) rekombinant TRAIL ile MTX'in U87MG, U87MG-R50 ve U373 (insan glioblastoma) hücrelerinin apoptozu üzerindeki sinerjik etkilerinin *in vitro* olarak incelendiği çalışmada ise TRAIL ve MTX'in bu hücre hatları üzerinde sinerjik etki göstererek kaspaz aktivitesinde ve DR4 ile DR5 reseptörlerinin ekspresyonunda artış meydana getirdiği ve buna bağılı olarak apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (Senbabaoglu *et al.*, 2016). Metal elementleri (GaMal ve InMal) ile MTX'in MDA-MB-231 (insan meme kanseri) hücrelerinin apoptozu üzerindeki sinerjik etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise bu ajanların kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkiden ziyade sitostatik etki gösterdiği bildirilmiştir (Merli *et al.*, 2018).

7-DHX ile MTX'in ayrı ayrı ve birlikte Caco-2 hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan yara iyileştirme testi (wound healing assay) sonuçlarına göre, 6. saatin sonunda her üç uygulama grubunun da hücrelerin migrasyonu üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı; 12. saat sonunda 7-DHX'in migrasyonu engellemede önemli bir etki göstermediği, MTX'in çok az da olsa migrasyonu azalttığı, kombine 7-DHX/MTX'in ise diğer uygulama gruplarına kıyasla Caco-2 hücrelerinin migrasyonunu daha fazla engellediği belirlenmiştir. 24. saat sonunda 7-DHX'in migrasyonu engelleyemediği, MTX'in hücrelerin migrasyonunu önemli ölçüde azalttığı, kombine 7-DHX/MTX'in ise migrasyonu yüksek derecede engellediği saptanmıştır. 48. saat sonunda ise 7-DHX'in Caco-2 hücrelerinin migrasyonu üzerinde engelleyici bir etkisinin olmadığı, MTX'in hücrelerin migrasyonunu yüksek derecede engellediği, kombine 7-DHX/MTX'in ise çok önemli

derecede sinerjik etki göstererek hücrelerin migrasyonu üzerinde önemli bir azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Elde edilen tüm veriler göz önüne alındığında 12. saatten itibaren tüm zaman dilimlerinde kombine 7-DHX/MTX'in diğer uygulama gruplarına kıyasla Caco-2 hücrelerinin migrasyonunu dikkate değer oranda engellediği ve hücrelerin migrasyonu üzerinde önemli bir sinerjik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Tez çalışması kapsamında son olarak 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin proliferere olma ve koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkilerinin araştırılması için klonojenik test yapılmış ve Caco-2 hücreleri uygulamadan 10 gün sonra incelenmiştir. 7-DHX ile muamale edilen hücrelerin proliferere olduğu ve yüzeye yayılarak koloni oluşturduğu gözlemlenmiş; 7-DHX'in Caco-2 hücrelerinin proliferasyonunu ve koloni oluşumunu engelleyemediği belirlenmiştir. MTX ile muamele edilen hücrelerde ise koloni oluşumunun çok az gözlemlendiği ve bunun sonucu olarak MTX'in Caco-2 hücrelerinin proliferasyonunu ve koloni oluşumunu önemli ölçüde engellediği saptanmıştır. MTX'in U2OS ve MG63 osteosarkom hücrelerinin koloni oluşturabilme yetenekleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, MTX'in osteosarkom hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini belirgin şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (S. H. Park *et al.*, 2018). Park ve arkadaşlarının osteosarkom hücrelerinin koloni oluşturma üzerinde elde ettiği bu sonuç, tez çalışmamız sonucunda Caco-2 hücrelerinin koloni oluşturma üzerinde gösterdiği etkiyle benzer olup, çalışmamızı destekler niteliktedir. 7-DHX ile MTX'in birlikte uygulandığı hücrelerde ise proliferasyonun ve koloni oluşumunun çok önemli derecede azaldığı gözlemlenmiş olup, kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin koloni oluşturma üzerinde önemli sinerjik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Guan ve arkadaşlarının (2020) MTX ile mTOR inhibitörlerinin (rapamisin ve everolimus) MCF-7 ve MDA-MB-231 (insan meme kanseri) hücrelerinin koloni oluşturma üzerindeki sinerjik etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise bu kombinasyon tedavisinin kanser hücre hatları üzerinde sinerjik etki göstererek koloni oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Guan *et al.*, 2020).

Sonuç ve Öneriler

1. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in doz ve zaman bağımlı olarak Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri MTT testi ile incelenmiş, yapılan analizler sonucunda 7-DHX ile MTX'in ayrı ayrı ve birlikte uygulamalarında optimum doz belirlenmiştir. Kombine 7-DHX/MTX'in 48 saat sonunda Caco-2 hücreleri üzerinde sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur.
2. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin LDH aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmış ve araştırma sonucunda bu üç ajanın

zaman bağımlı olarak LDH aktivitesinde artış meydana getirdiği, bununla birlikte kombine 7-DHX/MTX ile muamele edilen hücrelerin LDH aktivitesinin diğer iki uygulama grubuna kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. LDH testinin antiproliferatif test sonucunu doğruladığı ve kombine 7-DHX/MTX'in bu kanser hücre hattı üzerinde sinerjik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

3. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin total protein miktarı üzerindeki etkisi araştırılmış ve bu üç ajanın zaman bağımlı olarak kanser hücrelerinin total protein miktarı üzerinde azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte kombine 7-DHX/MTX'in sinerjik etki göstererek 7-DHX ve MTX'e oranla daha fazla antikanser aktiviteye sahip olduğu ve total protein miktarını daha fazla azalttığı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin total protein miktarı üzerindeki antikanser etkileri araştırılmış olup, ileri çalışmalarla daha spesifik proteinler hedeflenerek bu ajanların antikanser etkileri araştırılabilir.
4. Caco-2 hücrelerinde 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in apoptotik ve nekrotik etkileri göz önüne alındığında, 24 saatin sonunda kombine 7-DHX/MTX'in diğer uygulama gruplarına kıyasla hücrelerin apoptozu üzerinde daha az etkili olduğu, hücrelerin nekrozu üzerinde ise diğer uygulama gruplarına kıyasla daha fazla etkili olduğu ve bu zaman diliminde antiproliferatif etkisini daha çok hücreleri nekroza götürerek gösterdiği belirlenmiştir. Kombine 7-DHX/MTX'in 48 saat sonunda ise hücreleri hem apoptoza hem de nekroza diğer uygulama gruplarına kıyasla önemli ölçüde daha fazla götürdüğü ve antiproliferatif etkisini apoptoz indüksiyonu ile sağladığı sonucuna varılmıştır. Bu tez çalışmasında 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin apoptozu ve nekrozu üzerindeki sinerjik etkileri flow sitometri ile belirlenmiş olup, ileri çalışmalar yapılarak bu ajanların proapoptotik ve antiapoptotik genler üzerindeki etkileri incelenebilir ve gen seviyesinde oluşturduğu etki hakkında fikir sahibi olunabilir.
5. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, kombine 7-DHX/MTX'in ayrı ayrı uygulanan 7-DHX ve MTX'e kıyasla 12. saatten itibaren sinerjik etki göstererek hücrelerin migrasyonunu önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir.

6. 7-DHX, MTX ve kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücrelerinin proliferere olma ve koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkileri incelenmiş, kombine 7-DHX/MTX'in diğer iki uygulama grubuna kıyasla hücrelerin proliferasyonunu ve koloni oluşumunu önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir.
7. Tez çalışması kapsamında yapılan tüm deneylerden elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, kombine 7-DHX/MTX'in Caco-2 hücreleri üzerinde özellikle 48. saatte önemli sinerjik etki göstererek kanser hücreleri üzerinde antikanser aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. *In vitro* olarak kanser hücre hattında çalışılan bu kombinasyon tedavisinin umut verici bir kemoterapötik ajan olma potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Bu kombinasyon tedavisinin detaylı etkileri daha kapsamlı çalışmalar ile araştırılabilir ve sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri çalışılarak daha etkin sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca bu kombinasyon ilaç tedavisi deney hayvanları üzerinde uygulanarak, kemoterapötik ajan olma potansiyeli olan bu kombine ilaçların *in vivo*daki etkileri ortaya konulabilir.

KAYNAKLAR

- Abdou, P., Wang, Z., Chen, Q., Chan, A., Zhou, D. R., Gunadhi, V., & Gu, Z., 2020. Advances in engineering local drug delivery systems for cancer immunotherapy. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(5), 100–106.
- Adams, G., Zhou, J., Wang, W., Wu, H., Quan, J., Liu, Y., Xia, P., Wang, Z., Zhou, S., Jiang, J., Mo, F., Zhuang, X., Thomas, K., Hill, D. L., Aikhionbare, F. O., He, P., Liu, X., Ding, X., & Yao, X., 2016. The microtubule plus end tracking protein TIP150 interacts with cortactin to steer directional cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 291(39), 20692–20706.
- Ahmed, S., & Rai, K. R., 2003. Interferon in the treatment of hairy-cell leukemia. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 16(1), 69–81.
- Aiello, A., Fattorusso, E., Imperatore, C., Irace, C., Luciano, P., Menna, M., Santamaria, R., & Vitalone, R., 2011. Zorrimidazolone, a bioactive alkaloid from the non-indigenous Mediterranean stolidobranche *Polyandrocarpa zorritensis*. *Marine Drugs*, 9(6), 1157–1165.
- Alfarouk, K. O., Muddathir, A. K., & Shayoub, M. E. A., 2011. Tumor acidity as evolutionary spite. *Cancers*, 3(1), 408–414.
- Ali, O. a, Emerich, D., Dranoff, G., & Mooney, D. J., 2009. In situ regulation of dc subsets and t cells mediates tumor regression in mice. *Science Translational Medicine*, 1(8), 8ra19-8ra19.
- Alishahedani, M. E., Yadav, M., McCann, K. J., Gough, P., Castillo, C. R., Matriz, J., & Myles, I. A., 2021. Therapeutic candidates for keloid scars identified by qualitative review of scratch assay research for wound healing. In *PLoS ONE* 16 (6).
- Alizadeh, M., Azar, P. A., Mozaffari, S. A., Karimi-Maleh, H., & Tamaddon, A. M., 2020. A DNA based biosensor amplified with zif-8/ionic liquid composite for determination of mitoxantrone anticancer drug: an experimental/docking investigation. *Frontiers in Chemistry*, 8, 1–10.
- Allison, S. J., Knight, J. R. P., Granchi, C., Rani, R., Minutolo, F., Milner, J., & Phillips, R. M., 2014. Identification of LDH-A as a therapeutic target for cancer cell killing via (i) p53/NAD(H)-dependent and (ii) p53-independent pathways. *Oncogenesis*, 3(5), e102-11.
- Alonso, A., Greenlee, M., Matts, J., Kline, J., Davis, K. J., & Miller, R. K., 2015. Emerging roles of sumoylation in the regulation of actin, microtubules, intermediate filaments, and septins. *Cytoskeleton*, 72(7), 305–339.
- Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., & Iyer, A. K., 2017. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Frontiers in Pharmacology*, 8(561), 1–15.
- Anchoori, R. K., Susanne, M., Kortenhorst, Q., Hidalgo, M., Sarkar, T., Hallur, G., Bai, R., Diest, P. J. Van, & Hamel, E., 2008. Novel microtubule-interacting phenoxy pyridine and phenyl sulfanyl pyridine analogues for cancer therapy. 51(19), 5953–5957.
- Arnst, K. E., Banerjee, S., Chen, H., Deng, S., Hwang, D., Li, W., & Miller, D. D., 2019. Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 39(4), 1398–1426.

- Atkin, W. S., Edwards, R., Kralj-Hans, I., Wooldrage, K., Hart, A. R., Northover, J. M., Parkin, D. M., Wardle, J., Duffy, S. W., & Cuzick, J., 2010. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*, 375(9726), 1624–1633.
- Awortwe, C., Fasinu, P. S., & Rosenkranz, B., 2014. Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: Current approaches and challenges. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 1–19.
- Azarova, A. M., Lyu, Y. L., Lin, C. P., Tsai, Y. C., Lau, J. Y. N., Wang, J. C., & Liu, L. F., 2007. Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), 11014–11019.
- Barak, P., Rai, A., Dubey, A. K., Rai, P., & Mallik, R., 2014. Reconstitution of microtubule-dependent organelle transport. In *Methods in Enzymology*, 1(540).
- Bayir, E., & Sendemir, A., 2021. Role of intermediate filaments in blood–brain barrier in health and disease. *Cells*, 10(6), 1–16.
- Beatty, G. L., & O'Hara, M., 2016. Chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of solid tumors: Defining the challenges and next steps. *Pharmacology & Therapeutics*, 166(12), 30–39.
- Ben-David, U., & Benvenisty, N., 2011. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 11(4), 268–277.
- Ben-Sasson, S. Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C. A., & Paul, W. E., 2009. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(17), 7119–7124.
- Bergant Loboda, K., Janežič, M., Štampar, M., Žegura, B., Filipič, M., & Perdih, A., 2020. Substituted 4,5'-bithiazoles as catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase II α . *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(7), 3662–3678.
- Beurel, E., & Jope, R. S., 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in Neurobiology*, 79(4), 173–189.
- Bevins, R. L., & Zimmer, S. G., 2005. It's about time: scheduling alters effect of histone deacetylase inhibitors on camptothecin-treated cells. *Cancer Research*, 65(15), 6957–6966.
- Bhattacharyya, J., Basu, A., & Suresh Kumar, G., 2014. Intercalative interaction of the anticancer drug mitoxantrone with double stranded DNA: A calorimetric characterization of the energetics. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 75, 45–51.
- Binefa, G., Rodríguez-Moranta, F., Teule, À., & Medina-Hayas, M., 2014. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*, 20(22), 6786–6808.
- Block, K., Gyllenhaal, C., Lowe, L., Amedei, A., Amin, R., Amin, A., & Aquilano, K., 2015. A broad-spectrum integrative design for cancer prevention and therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S276–S304.
- Bobadilla, A. V. P., Arévalo, J., Sarró, E., Byrne, H. M., Maini, P. K., Carraro, T., Balocco, S., Meseguer, A., & Alarcón, T., 2019. In vitro cell migration quantification method for scratch assays. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(151).

- 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.
- Bu, Y. Z., Xu, J. R., Luo, Q., Chen, M., Mu, L. M., & Lu, W. L., 2020. A precise nanostructure of folate-overhung mitoxantrone dna tetrahedron for targeted capture leukemia. *Nanomaterials*, 10(5).
- Buranaamnuay, K., 2021. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Veterinary Journal*, 11(2), 251–269.
- Byun, D. J., Wolchok, J. D., Rosenberg, L. M., & Girotra, M., 2017. Cancer immunotherapy — immune checkpoint blockade and associated endocrinopathies. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(4), 195–207.
- Cameron, B. J., Gerry, A. B., Dukes, J., Harper, J. V., Kannan, V., Bianchi, F. C., Grand, F., Brewer, J. E., Gupta, M., Plesa, G., Bossi, G., Vuidepot, A., Powlesland, A. S., Legg, A., Adams, K. J., Bennett, A. D., Pumphrey, N. J., Williams, D. D., Binder-Scholl, G., Jakobsen, B. K., 2013. Identification of a titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Science Translational Medicine*, 5(197), 197ra103-197ra103.
- Care, C., Author, M., February, P. M. C., Fitzgerald, J. C., Weiss, S. L., Maude, S. L., Barrett, D. M., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Berg, R. A., June, C. H., Porter, D. L., Frey, N. V., Grupp, S. A., & Teachey, D. T., 2017. Cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor t cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Critical Care Medicine*, 45(2), 1–15.
- Carniel, E. L., Gramigna, V., Fontanella, C. G., Frigo, A., Stefanini, C., Rubini, A., & Natali, A. N., 2014. Characterization of the anisotropic mechanical behaviour of colonic tissues: experimental activity and constitutive formulation. *Experimental Physiology*, 99(5), 759–771.
- Carrero, J. A., Vivanco-Cid, H., & Unanue, E. R., 2008. Granzymes drive a rapid Listeriolysin O-induced T cell apoptosis. *The Journal of Immunology*, 181(2), 1365–1374.
- Casanova, M. J., Chaparro, M., Molina, B., Merino, O., Batanero, R., Dueñas-Sadornil, C., Robledo, P., Garcia-Albert, A. M., Gómez-Sánchez, M. B., Calvet, X., Trallero, M. del R., Montoro, M., Vázquez, I., Charro, M., Barragán, A., Martínez-Cerezo, F., Megias-Rangil, I., Huguet, J. M., Bonmati, E. M., Gisbert, J. P., 2017. Prevalence of malnutrition and nutritional characteristics of patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(12), 1430–1439.
- Chang, L., Barlan, K., Chou, Y. H., Grin, B., Lakonishok, M., Serpinskaya, A. S., Shumaker, D. K., Herrmann, H., Gelfand, V. I., & Goldman, R. D., 2009. The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport. *Journal of Cell Science*, 122(16), 2914–2923.
- Chowdhury, D., Beresford, P. J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J. S., Demple, B., Perrino, F. W., & Lieberman, J., 2006. The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Molecular Cell*, 23(1), 133–142.
- Chuang, C. H., Wang, W. J., Li, C. F., Ko, C. Y., Chou, Y. H., Chuu, C. P., Cheng, T. L., & Wang, J. M., 2014. The combination of the prodrugs perforin-CEBPD and perforin-granzyme B efficiently enhances the activation of caspase signaling and kills prostate cancer. *Cell Death and Disease*, 5(5), 1–11.

- Clarke, P. A., Roe, T., Swabey, K., Hobbs, S. M., McAndrew, C., Tomlin, K., Westwood, I., Burke, R., van Montfort, R., & Workman, P., 2019. Dissecting mechanisms of resistance to targeted drug combination therapy in human colorectal cancer. *Oncogene*, 38(25), 5076–5090.
- Coch, R., & Leube, R., 2016. Intermediate filaments and polarization in the intestinal epithelium. *Cells*, 5(3), 32.
- Corradini, P., Tarella, C., Zallio, F., Doderio, A., Zanni, M., Valagussa, P., Gianni, A. M., Rambaldi, A., Barbui, T., & Cortelazzo, S., 2006. Long-term follow-up of patients with peripheral T-cell lymphomas treated up-front with high-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation. *Leukemia*, 20(9), 1533–1538.
- Cortesini, R., 2005. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. *Transplant Immunology*, 15(2), 81–89.
- Cox, M. A., Harrington, L. E., & Zajac, A. J., 2011. Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends in Immunology*, 32(4), 180–186.
- D'Amore, F., Relander, T., Lauritzsen, G. F., Jantunen, E., Hagberg, H., Anderson, H., Holte, H., Österborg, A., Merup, M., Brown, P., Kuittinen, O., Erlanson, M., Østenstad, B., Fagerli, U. M., Gadeberg, O. V., Sundström, C., Delabie, J., Ralfkiaer, E., Vornanen, M., & Toldbod, H. E., 2012. Up-front autologous stem-cell transplantation in peripheral T-cell lymphoma: NLG-T-01. *Journal of Clinical Oncology*, 30(25), 3093–3099.
- Dahm, C. C., Keogh, R. H., Spencer, E. A., Greenwood, D. C., Key, T. J., Fentiman, I. S., Shipley, M. J., Brunner, E. J., Cade, J. E., Burley, V. J., Mishra, G., Stephen, A. M., Kuh, D., White, I. R., Luben, R., Lentjes, M. A. H., Khaw, K. T., & Rodwell, S. A., 2010. Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case-control study using food diaries. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 614–626.
- De Saint Basile, G., Ménasché, G., & Fischer, A., 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature Reviews Immunology*, 10(8), 568–579.
- Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S., & Kinnally, K. W., 2006. Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell Death and Differentiation*, 13(8), 1387–1395.
- Dekker, N. H., Rybenkov, V. V., Duguet, M., Crisona, N. J., Cozzarelli, N. R., Bensimon, D., & Croquette, V., 2002. The mechanism of type IA topoisomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12126–12131.
- Delgado, J. L., Hsieh, C.-M., Chan, N.-L., & Hiasa, H., 2018. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochemical Journal*, 475(2), 373–398.
- Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., Dash, S., & Kim, H. S., 2020. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In *Recent Advances in Natural Products Analysis* (Issue January, pp. 505–567). Elsevier.
- Di Stasi, A., Tey, S.-K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A. G., Grilley, B., Liu, H., Cruz, C. R., Savoldo, B., Gee, A. P., Schindler, J., Krance, R. A., Heslop, H. E., Spencer, D. M., Rooney, C. M., & Brenner, M. K., 2011. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *New England Journal of Medicine*, 365(18), 1673–1683.
- Egorov, V. I., Schastlivtsev, I. V., Prut, E. V., Baranov, A. O., & Turusov, R. A., 2002. Mechanical properties of the human gastrointestinal tract. *Journal of Biomechanics*, 35(10), 1417–1425.

- Elkin, E. R., Harris, S. M., & Loch-Caruso, R., 2018. Trichloroethylene metabolite S-(1,2-dichlorovinyl)- L-cysteine induces lipid peroxidation-associated apoptosis via the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in a first-trimester placental cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 338(1), 30–42.
- Ellis, P. M., Vella, E. T., & Ung, Y. C., 2017. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review. *clinical lung cancer*, 18(5), 444-459.
- Enache, M., Toader, A. M., Neacsu, V., Ionita, G., & Enache, M. I., 2017. Spectroscopic investigation of the interaction of the anticancer drug mitoxantrone with sodium taurodeoxycholate (NaTDC) and sodium taurocholate (NaTC) bile salts. *Molecules*, 22(7).
- England, T. N., 2000. A Comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy. 1766–1772.
- Ewen, C. L., Kane, K. P., & Bleackley, R. C., 2012. A quarter century of granzymes. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 28–35.
- Ezell, S. J., Li, H., Xu, H., Zhang, X., Gurpinar, E., Zhang, X., Rayburn, E. R., Sommers, C. I., Yang, X., Velu, S. E., Wang, W., & Zhang, R., 2010. Preclinical pharmacology of BA-TPQ, a novel synthetic iminoquinone anticancer agent. *Marine Drugs*, 8(7), 2129–2141.
- Fabre, K. M., Saito, K., DeGraff, W., Sowers, A. L., Thetford, A., Cook, J. A., Krishna, M. C., & Mitchell, J. B., 2011. The effects of resveratrol and selected metabolites on the radiation and antioxidant response. *Cancer Biology and Therapy*, 12(10), 915–923.
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Panagiotis, Vlachostergios, Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Nowsheen, S., 2016. Sustained proliferation in cancer: mechanism and novel therapeutic targets. *Seminars Cancer Biology*, 35, 25–54.
- Flaig, T. W., Su, L. J., Harrison, G., Agarwal, R., & Glodé, L. M., 2007. Silibinin synergizes with mitoxantrone to inhibit cell growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, 120(9), 2028–2033.
- Froelich, C. J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R., Babior, B., Shah, G. M., Bleackley, R. C., Dixit, V. M., & Hanna, W., 1996. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29073–29079.
- Frolova, L. V., Magedov, I. V., Romero, A. E., Karki, M., Otero, I., Hayden, K., Evdokimov, N. M., Banuls, L. M. Y., Rastogi, S. K., Smith, W. R., Lu, S.-L., Kiss, R., Shuster, C. B., Hamel, E., Betancourt, T., Rogelj, S., & Kornienko, A., 2013. Exploring natural product chemistry and biology with multicomponent reactions. 5. discovery of a novel tubulin-targeting scaffold derived from the rigidin family of marine alkaloids. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(17), 6886–6900.
- Furumoto, K., Soares, L., Engleman, E. G., & Merad, M., 2004. Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *Journal of Clinical Investigation*, 113(5), 774–783.

- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Bachrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Kroemer, G., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107–120.
- Gao, M., Berghaus, M., Möbitz, S., Schuabb, V., Erwin, N., Herzog, M., Julius, K., Sternemann, C., & Winter, R., 2018. On the origin of microtubules' high-pressure sensitivity. *Biophysical Journal*, 114(5), 1080–1090.
- Gao, Y., Zong, C., Liu, F., Fang, L., Cai, R., Shi, Y., Chen, X., & Qi, Y., 2015. Evaluation of the intestinal transport of a phenylethanoid glycoside-rich extract from *cistanche deserticola* across the caco-2 cell monolayer model. *PLoS ONE*, 10(2), 1–12.
- Goldman, R. D., Grin, B., Mendez, M. G., & Kuczmarski, E. R., 2008. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(1), 28–34.
- Goldring, C. E. P., Duffy, P. A., Benvenisty, N., Andrews, P. W., Ben-David, U., Eakins, R., French, N., Hanley, N. A., Kelly, L., Kitteringham, N. R., Kurth, J., Ladenheim, D., Lavery, H., McBlane, J., Narayanan, G., Patel, S., Reinhardt, J., Rossi, A., Sharpe, M., & Park, B. K., 2011. Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell*, 8(6), 618–628.
- Green, A. K., Corty, R. W., Wood, W. A., Meenaghan, M., Reeder-Hayes, K. E., Basch, E., Milowsky, M. I., & Dusetzina, S. B., 2015. Comparative effectiveness of mitoxantrone plus prednisone versus prednisone alone in metastatic castrate-resistant prostate cancer after docetaxel failure. *The Oncologist*, 20(5), 516–522.
- Guan, Y., Jiang, S., Ye, W., Ren, X., Wang, X., Zhang, Y., Yin, M., Wang, K., Tao, Y., Yang, J. M., Cao, D., & Cheng, Y., 2020. Combined treatment of mitoxantrone sensitizes breast cancer cells to rapalogs through blocking eEF-2K-mediated activation of Akt and autophagy. *Cell Death and Disease*, 11(11).
- Güleş, Ö., Eren, Ü., & Kelimeler, A., 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. 2008(2), 73–78.
- Guo, C., Manjili, M. H., Subjeck, J. R., Sarkar, D., Fisher, P. B., & Wang, X. Y., 2013. Therapeutic cancer vaccines. Past, present, and future. In *Advances in Cancer Research* 119(804).
- Guo, Y., & Yixian, Z., 2015. Lamins position the nuclear pores and centrosomes by modulating dynein. *Molecular Biology of the Cell*, 26(19), 3379–3389.
- Hagn, M., Sutton, V. R., & Trapani, J. A., 2014. A colorimetric assay that specifically measures Granzyme B proteolytic activity: hydrolysis of Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 93, 1–9.
- Hajihassan, Z., & Rabbani-Chadegani, A., 2009. Studies on the binding affinity of anticancer drug mitoxantrone to chromatin, DNA and histone proteins. *Journal of Biomedical Science*, 16(1), 1–7.
- Hall, M. L., Liu, H., Malafa, M., Centeno, B., Hodul, P. J., Pimiento, J., Pilon-Thomas, S., & Sarnaik, A. A., 2016. Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1), 1–12.
- Hammonds, T. R., Maxwell, A., & Jenkins, J. R., 1998. Use of a rapid throughput in vivo screen to investigate inhibitors of eukaryotic topoisomerase II enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(4), 889–894.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hege, K. M., Bergsland, E. K., Fisher, G. A., Nemunaitis, J. J., Warren, R. S., McArthur, J. G., Lin, A. A., Schlom, J., June, C. H., & Sherwin, S. A., 2017. Safety, tumor trafficking and immunogenicity of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells specific for TAG-72 in colorectal cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5(22), 1–14.
- Henley, S. J., Ward, E., Scott, S., Ma, J., Anderson, R. N., Firth, A. U., Thomas, C. C., Islami, F., Weir, H. K., Lewis, D. R., Sherman, R. L., Wu, M., Benard, V. B., & Richardson, L. C., 2021. Annual report to the nation on the status of cancer, Part1: National cancer statistics. 126(10), 2225–2249.
- Hentze, H., Graichen, R., & Colman, A., 2007. Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends in Biotechnology*, 25(1), 24–32.
- Herberts, C. A., Kwa, M. S. G., & Hermesen, H. P. H., 2011. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 29.
- Hiebl, V., Schachner, D., Ladurner, A., Heiss, E. H., Stangl, H., & Dirsch, V. M., 2020. Caco-2 cells for measuring intestinal cholesterol transport-possibilities and limitations. *Biological Procedures Online*, 22(1),
- Hodge, G., Barnawi, J., Jurisevic, C., Moffat, D., Holmes, M., Reynolds, P. N., Jersmann, H., & Hodge, S., 2014. Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)- γ by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 178(1), 79–85.
- Hoff, G., Grotmol, T., Skovlund, E., & Bretthauer, M., 2009. Risk of colorectal cancer seven years after flexible sigmoidoscopy screening: Randomised controlled trial. *BMJ* (Online), 338(7707), 1363–1365.
- Hoves, S., Trapani, J. A., & Voskoboinik, I., 2010. The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(2), 237–243.
- Ilghami, R., Barzegari, A., Mashayekhi, M. R., Letourneur, D., Crepin, M., & Pavon-Djavid, G., 2019. The conundrum of dietary antioxidants in cancer chemotherapy. *Nutrition Reviews*, 78(1), 65–76.
- Jaffee, E. M., Dang, C. Van, Agus, D. B., Alexander, B. M., Anderson, K. C., Ashworth, A., Barker, A. D., Bastani, R., Bhatia, S., Bluestone, J. A., Brawley, O., Butte, A. J., Coit, D. G., Davidson, N. E., Davis, M., DePinho, R. A., Diasio, R. B., Draetta, G., Frazier, A. L., Yung, A., 2017. Future cancer research priorities in the USA: a Lancet Oncology Commission. *The Lancet Oncology*, 18(11), e653–e706.
- Jang, M. H., Shin, M. C., Shin, H. S., Kim, K. H., Park, H. J., Kim, E. H., & Kim, C. J., 2002. Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via bax-dependent caspase-3 activation. *European Journal of Pharmacology*, 449(1–2), 39–45.
- Janin, A., Murata, H., Leboeuf, C., Cayuela, J. M., Gluckman, E., Legrès, L., Desveaux, A., Varna, M., Ratajczak, P., Soulier, J., De Thé, H., Bertheau, P., & Socié, G., 2009. Donor-derived oral squamous cell carcinoma after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 113(8), 1834–1840.
- Ji, J., Ng, S., Sharma, V., Neculai, D., Hussein, S., Sam, M., Trinh, Q., Church, G. M., McPherson, J. D., Nagy, A., & Batada, N. N., 2012. Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 30(3), 435–440.

- Ji, Y., Shen, J., Li, M., Zhu, X., Wang, Y., Ding, J., Jiang, S., Chen, L., & Wei, W., 2019. RMP/URI inhibits both intrinsic and extrinsic apoptosis through different signaling pathways. *International Journal of Biological Sciences*, 15(12), 2692–2706.
- Jiramongkol, Y., & Lam, E. W. F., 2020. FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(3), 681–709.
- K. A. Akhmetova, I. N. Chesnokov, and S. A. F., 2018. Functional characterization of septin complexes. *Molecular Biology*, 52(2), 155–171.
- Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W., 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 65–80.
- Kasi, P. M., Thanarajasingam, G., Finnes, H. D., Villasboas Bisneto, J. C., Hubbard, J. M., & Grothey, A., 2015. Chemotherapy in the setting of severe liver dysfunction in patients with metastatic colorectal cancer. *Case Reports in Oncological Medicine*, 2015, 1–7.
- Katze, M. G., He, Y., & Gale, M., 2002. Viruses and interferon: A fight for supremacy. *Nature Reviews Immunology*, 2(9), 675–687.
- Kauffman, K. J., Webber, M. J., & Anderson, D. G., 2016. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 240, 227–234.
- Kaufmann, S. H., & Hengartner, M. O., 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology*, 11(12), 526–534.
- Kaur, R., & Arora, S., 2015. Alkaloids- important therapeutic secondary metabolites of plant origin. *Journal of Critical Reviews*, 2(3), 2394–5125.
- Kaverina, I., & Straube, A., 2011. Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(9), 968–974.
- Kawamura, H., Yamaguchi, T., Yano, Y., Hozumi, T., Takaki, Y., Matsumoto, H., Nakano, D., & Takahashi, K., 2018. Characteristics and prognostic factors of bone metastasis in patients with colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, 61, 673–678.
- Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B., & Hämmerling, G. J., 2001. NK- and CD8 + T Cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of cpg-containing oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*, 167(9), 5247–5253.
- Kikumoto, M., Kurachi, M., Tosa, V., & Tashiro, H., 2006. Flexural rigidity of individual microtubules measured by a buckling force with optical traps. *Biophysical Journal*, 90(5), 1687–1696.
- Kim, M. S., Blake, M., Baek, J. H., Kohlhagen, G., Pommier, Y., & Carrier, F., 2003. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Research*, 63(21), 7291–7300.
- Klimczak, M., Dziki, A., Kilanowicz, A., Sapota, A., Duda-Szymańska, J., & Daragó, A., 2016. Concentrations of cadmium and selected essential elements in malignant large intestine tissue. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 11(1), 24–29.
- Kochanowska-Karamyan, A. J., & Hamann, M. T., 2010. Marine indole alkaloids: potential new drug leads for the control of depression and anxiety. *Chemical Reviews*, 110(8), 4489–4497.

- Kosinski, C., Li, V. S. W., Chan, A. S. Y., Zhang, J., Ho, C., Wai, Y. T., Tsun, L. C., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Siu, T. Y., Suet, Y. L., & Chen, X., 2007. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15418–15423.
- Kowalczyk, M., Orłowski, M., Klepacki, Ł., Zinkiewicz, K., Kurpiewski, W., Kaczerska, D., Pesta, W., Zieliński, E., & Siermontowski, P., 2020. Rectal aberrant crypt foci (ACF) as a predictor of benign and malignant neoplastic lesions in the large intestine. *BMC Cancer*, 20(1), 1–10.
- Kranz, D., & Boutros, M., 2014. A synthetic lethal screen identifies FAT1 as an antagonist of caspase-8 in extrinsic apoptosis. *EMBO Journal*, 33(3), 181–197.
- Kreso, A., O'Brien, C. A., Van Galen, P., Gan, O. I., Notta, F., Brown, A. M. K., Ng, K., Jing, M., Wienholds, E., Dunant, C., Pollett, A., Gallinger, S., McPherson, J., Mullighan, C. G., Shibata, D., & Dick, J. E., 2013. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science*, 339(6119), 543–548.
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H., 2017. Anticancer activities of african medicinal spices and vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, 271–297.
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J. H., & Watanabe, T., 2015. Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15065.
- Lalier, L., Cartron, P. F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., & Vallette, F. M., 2007. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, 12(5), 887–896.
- Lauss, M., Donia, M., Harbst, K., Andersen, R., Mitra, S., Rosengren, F., Salim, M., Vallon-Christersson, J., Törngren, T., Kvist, A., Ringnér, M., Svane, I. M., & Jönsson, G., 2017. Mutational and putative neoantigen load predict clinical benefit of adoptive T cell therapy in melanoma. *Nature Communications*, 8(1), 1–11.
- Lawrie, T. A., Green, J. T., Beresford, M., Wedlake, L., Burden, S., Davidson, S. E., Lal, S., Henson, C. C., & Andreyev, H. J. N., 2018. Interventions to reduce acute and late adverse gastrointestinal effects of pelvic radiotherapy for primary pelvic cancers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Lawton, C., 2013. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *Yearbook of Oncology*, 366(25), 127–128.
- Lee, A. S., Tang, C., Rao, M. S., Weissman, I. L., & Wu, J. C., 2013. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nature Medicine*, 19(8), 998–1004.
- Lee, S., & Margolin, K., 2011. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*, 3(4), 3856–3893.
- Lee Ventola, C., 2017. Cancer immunotherapy, part 3: Challenges and future trends. *P and T*, 42(8), 514–521.
- Legut, M., Lipka, D., Filipczak, N., Piwoni, A., Kozubek, A., & Gubernator, J., 2014. Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines - in vitro studies. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 653–668.

- Lemke, K., Wojciechowski, M., Laine, W., Bailly, C., Colson, P., Baginski, M., Larsen, A. K., & Skladanowski, A., 2005. Induction of unique structural changes in guanine-rich DNA regions by the triazoloacridone C-1305, a topoisomerase II inhibitor with antitumor activities. *Nucleic Acids Research*, 33(18), 6034–6047.
- Letort, G., Nedelec, F., Blanchoin, L., & Théry, M., 2016. Centrosome centering and decentering by microtubule network rearrangement. *Molecular Biology of the Cell*, 27(18), 2833–2843.
- Levine, B. L., Miskin, J., Wonnacott, K., & Keir, C., 2017. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 4, 92–101.
- Li, A. L., Hao, Y., Wang, W. Y., Liu, Q. S., Sun, Y., & Gu, W., 2020. Design, synthesis, and anticancer evaluation of novel indole derivatives of ursolic acid as potential topoisomerase II inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8).
- Li, H., Corrales, C. E., Edge, A., & Heller, S., 2004. Stem cells as therapy for hearing loss. *Trends in Molecular Medicine*, 10(7), 309–315.
- Li, H., Fan, X., Kovi, R. C., Jo, Y., Moquin, B., Konz, R., Stoicov, C., Kurt-Jones, E., Grossman, S. R., Lyle, S., Rogers, A. B., Montrose, M., & Houghton, J. M., 2007. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: A model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Research*, 67(22), 10889–10898.
- Li, L., Goedegebuure, S. P., & Gillanders, W. E., 2017. Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines. *Annals of Oncology*, 28(12), xii11–xii17.
- Li, S., Fernandez, J. J., Marshall, W. F., & Agard, D. A., 2012. Three-dimensional structure of basal body triplet revealed by electron cryo-tomography. *EMBO Journal*, 31(3), 552–562.
- Li, X. Y., Li, Z., An, G. J., Liu, S., & Lai, Y. D., 2014. Co-expression of perforin and granzyme B genes induces apoptosis and inhibits the tumorigenicity of laryngeal cancer cell line Hep-2. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(3), 978–986.
- Lickwar, C. R., Camp, J. G., Weiser, M., Cocchiaro, J. L., Kingsley, D. M., Furey, T. S., Sheikh, S. Z., & Rawls, J. F., 2017. Genomic dissection of conserved transcriptional regulation in intestinal epithelial cells. In *PLoS Biology* 15(8).
- Lim, W. A., & June, C. H., 2017. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell*, 168(4), 724–740.
- Linette, G. P., Stadtmauer, E. A., Maus, M. V., Rapoport, A. P., Levine, B. L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B. M., Cimino, P. J., Binder-Scholl, G. K., Smethurst, D. P., Gerry, A. B., Pumphrey, N. J., Bennett, A. D., Brewer, J. E., Dukes, J., Harper, J., Tayton-Martin, H. K., June, C. H., 2013. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood*, 122(6), 863–871.
- Linnemann, C., Heemskerk, B., Kvistborg, P., Kluin, R. J. C., Bolotin, D. A., Chen, X., Bresser, K., Nieuwland, M., Schotte, R., Michels, S., Gomez-Eerland, R., Jahn, L., Hombrink, P., Legrand, N., Shu, C. J., Mamedov, I. Z., Velds, A., Blank, C. U., Haanen, J. B. A. G., Schumacher, T. N. M., 2013. High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nature Medicine*, 19(11), 1534–1541.
- Liu, M. A., 2011. DNA vaccines: An historical perspective and view to the future. *Immunological Reviews*, 239(1), 62–84.

- Liu, Y., Yang, M., Luo, J., & Zhou, H., 2020. Radiotherapy targeting cancer stem cells “awakens” them to induce tumour relapse and metastasis in oral cancer. *International Journal of Oral Science*, 12(19).
- Lopez, J. A., Susanto, O., Jenkins, M. R., Lukyanova, N., Sutton, V. R., Law, R. H. P., Johnston, A., Bird, C. H., Bird, P. I., Whisstock, J. C., Trapani, J. A., Saibil, H. R., & Voskoboinik, I., 2013. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, 121(14), 2659–2668.
- Lovell, J. F., Billen, L. P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., & Andrews, D. W., 2008. Membrane binding by tbid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by bax. *Cell*, 135(6), 1074–1084.
- Lowe, T., Bhatia, S., & Somlo, G., 2007. Second malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 13(10), 1121–1134.
- Lu, F., Lamontagne, J., Sun, A., Pinkerton, M., Block, T., & Lu, X., 2011. Role of the inflammatory protein serine protease inhibitor Kazal in preventing cytolytic granule granzyme A-mediated apoptosis. *Immunology*, 134(4), 398–408.
- Luo, L. X., Fan, X. X., Li, Y., Peng, X., Ji, Y. C., Hsiao, W. W. L., Liu, L., Leung, E. L. H., & Yao, X. J., 2017. Identification of mitoxantrone as a new inhibitor of ROS1 fusion protein in non-small cell lung cancer cells. *MedChemComm*, 8(3), 621–624.
- M. Golubovskaya, V., Ho, B., Zheng, M., Magis, A., Ostrov, D., & G. Cance, W., 2013. Mitoxantrone targets the ATP-binding site of FAK, binds the FAK kinase domain and decreases FAK, Pyk-2, c-Src, and IGF-1R in vitro kinase activities. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(4), 546–554.
- MacK, N., Mazzio, E. A., Bauer, D., Flores-Rozas, H., & Soliman, K. F. A., 2017. Stable shRNA silencing of lactate dehydrogenase a (ldha) in human mda-mb-231 breast cancer cells fails to alter lactic acid production, glycolytic activity, atp or survival. *Anticancer Research*, 37(3), 1205–1212.
- Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A. R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T. X., Yamakawa, H., Pao, P.-C., Stott, R. T., Gjoneska, E., Nott, A., Cho, S., Kellis, M., & Tsai, L.-H., 2015. Activity-induced DNA breaks govern the expression of neuronal early-response genes. *Cell*, 161(7), 1592–1605.
- Maier, F., Siri, S., Santos, S., Chen, L., Feng, B., & Pierce, D. M., 2021. The heterogeneous morphology of networked collagen in distal colon and rectum of mice quantified via nonlinear microscopy. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 113, 104116.
- Mani, S. A., Yang, J., Brooks, M., Schwaninger, G., Zhou, A., Miura, N., Kutok, J. L., Hartwell, K., Richardson, A. L., & Weinberg, R. A., 2007. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), 10069–10074.
- Marin-Acevedo, J. A., Soyano, A. E., Dholaria, B., Knutson, K. L., & Lou, Y., 2018. Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. *Journal of Hematology and Oncology*, 11(8).

- Matias-Barrios, V. M., Radaeva, M., Song, Y., Alperstein, Z., Lee, A. R., Schmitt, V., Lee, J., Ban, F., Xie, N., Qi, J., Lallous, N., Gleave, M. E., Cherkasov, A., & Dong, X., 2021. Discovery of new catalytic topoisomerase II inhibitors for anticancer therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 10, 1–16.
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., ... Grupp, S. A., 2018. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 378(5), 439–448.
- Medellin, D. C., Zhou, Q., Scott, R., Hill, R. M., Frail, S. K., Dasari, R., Ontiveros, S. J., Pelly, S. C., van Otterlo, W. A. L., Betancourt, T., Shuster, C. B., Hamel, E., Bai, R., LaBarbera, D. V., Rogelj, S., Frolova, L. V., & Kornienko, A., 2016. Novel microtubule-targeting 7-deazahypoxanthines derived from marine alkaloid rigidins with potent in vitro and in vivo anticancer activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(1), 480–485.
- Mehta, H. M., Malandra, M., & Corey, S. J., 2015. G-CSF and GM-CSF in neutropenia. *The Journal of Immunology*, 195(4), 1341–1349.
- Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G., 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), 480–489.
- Merli, D., Profumo, A., Bloise, N., Risi, G., Momentè, S., Cucca, L., & Visai, L., 2018. Indium/Gallium maltolate effects on human breast carcinoma cells: in vitro investigation on cytotoxicity and synergism with mitoxantrone. *ACS Omega*, 3(4), 4631–4640.
- Migliorini, D., Dietrich, P. Y., Stupp, R., Linette, G. P., Posey, A. D., & June, C. H., 2018. CAR T-cell therapies in glioblastoma: A first look. *Clinical Cancer Research*, 24(3), 535–540.
- Milling, L., Zhang, Y., & Irvine, D. J., 2017. Delivering safer immunotherapies for cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114(3), 79–101.
- Mishra, P. K., Singh, S. R., Joshua, I. G., & Tyagi, S. C., 2010. Stem cells as a therapeutic target for diabetes. *Frontiers in Bioscience*, 15(2), 461–477.
- Mohammadi Farsani, T., Motevaseli, E., Neyazi, N., Khorramizadeh, M. R., Zafarvahedian, E., & Ghahremani, M. H., 2018. Effect of passage number and culture time on the expression and activity of insulin-degrading enzyme in caco-2 cells. *Iranian Biomedical Journal*, 22(1), 70–75.
- Moiseeva, A. A., 2019. Anthracycline derivatives and their anticancer activity. *Ineos Open*, 2(1), 9–18.
- Moon, Y. W., Rha, S. Y., Shin, S. J., Chang, H., Shim, H. S., & Roh, J. K., 2010. Adenocarcinoma of the small bowel at a single Korean institute: Management and prognosticators. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(3), 387–394.
- Morris, E. J. A., Rutter, M. D., Finan, P. J., Thomas, J. D., & Valori, R., 2015. Post-colonoscopy colorectal cancer (PCCRC) rates vary considerably depending on the method used to calculate them: A retrospective observational population-based study of PCCRC in the English National Health Service. *Gut*, 64(8), 1248–1256.
- Morris, R. J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J. S., Sawicki, J. A., & Cotsarelis, G., 2004. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature Biotechnology*, 22(4), 411–417.

- Mostowy, S., & Cossart, P., 2012. Septins: The fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3), 183–194.
- Mousavinejad, M., Andrews, P. W., & Shoraki, E. K., 2016. Current biosafety considerations in stem cell therapy. *Cell Journal*, 18(2), 281–287.
- Mueller, S., Yang, X., Sottero, T. L., Gragg, A., Prasad, G., Polley, M. Y., Weiss, W. A., Matthay, K. K., Davidoff, A. M., DuBois, S. G., & Haas-Kogan, D. A., 2011. Cooperation of the HDAC inhibitor vorinostat and radiation in metastatic neuroblastoma: Efficacy and underlying mechanisms. *Cancer Letters*, 306(2), 223–229.
- Mukhtar, E., Adhami, V. M., & Mukhtar, H., 2014. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer. 13(2), 275–284.
- Mullard, A., 2016. The cancer vaccine resurgence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(10), 663–665.
- Munn, D. H., & Bronte, V., 2016. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*, 39(12), 1–6.
- Myers, S. M., & Collins, I. 2016. Recent findings and future directions for interpolar mitotic kinesin inhibitors in cancer therapy. *Future Medicinal Chemistry*, 8(4), 463–489.
- Neelapu, S. S., Locke, F. L., Bartlett, N. L., Lekakis, L. J., Miklos, D. B., Jacobson, C. A., Braunschweig, I., Oluwole, O. O., Siddiqi, T., Lin, Y., Timmerman, J. M., Stiff, P. J., Friedberg, J. W., Flinn, I. W., Goy, A., Hill, B. T., Smith, M. R., Deol, A., Farooq, U., Go, W. Y., 2017. Axicabtagene ciloleucel CAR T-Cell Therapy in refractory large b-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 377(26), 2531–2544.
- Ngo, K. X., Kodera, N., Katayama, E., Ando, T., & Uyeda, T. Q., 2015. Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *ELife*, 2015(4), 1–22.
- Ngo, K. X., Umeki, N., Kijima, S. T., Kodera, N., Ueno, H., Furutani-Umezu, N., Nakajima, J., Noguchi, T. Q. P., Nagasaki, A., Tokuraku, K., & Uyeda, T. Q. P., 2016. Allosteric regulation by cooperative conformational changes of actin filaments drives mutually exclusive binding with cofilin and myosin. *Scientific Reports*, 6, 1–11.
- Nguyen, L. H., Goel, A., & Chung, D. C., 2020. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291–302.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., & Smith, A., 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3), 379–391.
- Nishihama, R., Onishi, M., & Pringle, J. R., 2011. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biological Chemistry*, 392(8–9), 681–687.
- Okushi, Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., & Dou, Q. P., 2015. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35(0), S78–S103.
- Oun, R., Moussa, Y. E., & Wheate, N. J., 2018. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton Transactions*, 47(19), 6645–6653.
- Overman, M. J., Hu, C. Y., Kopetz, S., Abbruzzese, J. L., Wolff, R. A., & Chang, G. J., 2012. A population-based comparison of adenocarcinoma of the large and small intestine: Insights into a rare disease. *Annals of Surgical Oncology*, 19(5), 1439–1445.

- Pacheco, A., & Gallo, G., 2016. Actin filament-microtubule interactions in axon initiation and branching. *Brain Research Bulletin*, 126(5), 300–310.
- Palchoudhuri, R., Lambrecht, M. J., Botham, R. C., Partlow, K. C., Ham, T. J. Van, Putt, K. S., Nguyen, L. T., Kim, S.-H., Peterson, R. T., Fan, T. M., & Hergenrother, P. J., 2015. A small molecule that induces intrinsic pathway apoptosis with unparalleled speed graphical abstract hhs public access. *Cell Rep*, 13(9), 2027–2036.
- Pallavicini, C., Levi, V., Wetzler, D. E., Angiolini, J. F., Benseñor, L., Despósito, M. A., & Bruno, L., 2014. Lateral motion and bending of microtubules studied with a new single-filament tracking routine in living cells. *Biophysical Journal*, 106(12), 2625–2635.
- Pan, F., Malmberg, R. L., & Momany, M., 2007. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evolutionary Biology*, 7(103), 1–17.
- Panczyk, M., 2014. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World Journal of Gastroenterology*, 20(29), 9775–9827.
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D., 2018. mRNA vaccines-a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 261–279.
- Pardoll, D. M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252–264.
- Park, C., Hong, S. H., Kim, G. Y., & Choi, Y. H., 2015. So-Cheong-Ryong-Tang induces apoptosis through activation of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways, and inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway in non-small-cell lung cancer A549 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1–13.
- Park, S. H., Lee, J., Kang, M. A., Jang, K. Y., & Kim, J. R., 2018. Mitoxantrone induces apoptosis in osteosarcoma cells through regulation of the Akt/FOXO3 pathway. *Oncology Letters*, 15(6), 9687–9696.
- Paschos, K. A., Majeed, A. W., & Bird, N. C., 2014. Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer - Pathobiological pathways with clinical significance. *World Journal of Gastroenterology*, 20(14), 3719–3737.
- Patel, K. J., Trédan, O., & Tannock, I. F., 2013. Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72(1), 127–138.
- Peng, J., Tan, C., Roberts, G. J., Nikolaeva, O., Zhang, Z., Lapolla, S. M., Primorac, S., Andrews, D. W., & Lin, J., 2006. Tbid elicits a conformational alteration in membrane-bound Bcl-2 such that it inhibits Bax pore formation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35802–35811.
- Peter, M. E., & Krammer, P. H., 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation*, 10(1), 26–35.
- Pimm, M. L., Hotaling, J., & Henty-Ridilla, J. L., 2020. Profilin choreographs actin and microtubules in cells and cancer. In *Physiology & behavior* 176(1) 155–204.
- Potten, C. S., Schofield, R., & Lajtha, L. G., 1979. A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *BBA - Reviews on Cancer*, 560(2), 281–299.
- Pox, C. P., Altenhofen, L., Brenner, H., Theilmeier, A., Stillfried, D. Von, & Schmiegell, W., 2012. Efficacy of a nationwide screening colonoscopy program for colorectal cancer. *Gastroenterology*, 142(7), 1460-1467.e2.

- Prathipati, P., Nandi, S. S., & Mishra, P. K., 2017. Stem cell-derived exosomes, autophagy, extracellular matrix turnover, and miRNAs in cardiac regeneration during stem cell therapy. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(1), 79–91.
- Pusnik, M., Imeri, M., Deppierraz, G., Bruinink, A., & Zinn, M., 2016. The agar diffusion scratch assay - A novel method to assess the bioactive and cytotoxic potential of new materials and compounds. *Scientific Reports*, 6, 1–10.
- Raducka-Jaszul, O., Bogusławska, D. M., Jędruchiewicz, N., & Sikorski, A. F., 2020. Role of extrinsic apoptotic signaling pathway during definitive erythropoiesis in normal patients and in patients with β -thalassemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 1–20.
- Ramezanpour, M., Smith, J. L. P., Ooi, M. L., Gouzos, M., Psaltis, A. J., Wormald, P. J., & Vreugde, S., 2019. Deferiprone has anti-inflammatory properties and reduces fibroblast migration in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9.
- Rao, P. V., & Maddala, R., 2016. Ankyrin-B in lens architecture and biomechanics: Just not tethering but more. *BioArchitecture*, 6(2), 39–45.
- Raychaudhuri, S., Skommer, J., Henty, K., Birch, N., & Brittain, T., 2010. Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death. *Apoptosis*, 15(4), 401–411.
- Revell, C. M., & Athanasiou, K. A., 2009. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 15(1), 1–15.
- Riihimäki, M., Hemminki, A., Sundquist, J., & Hemminki, K., 2016. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Scientific Reports*, 6, 1–9.
- Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., & Mitchell, M. J., 2019. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3), 175–196.
- Rodriguez, R., Rubio, R., Masip, M., Catalina, P., Nieto, A., de la Cueva, T., Arriero, M., San Martín, N., de la Cueva, E., Balomenos, D., Menendez, P., & García-Castro, J., 2009. Loss of p53 induces tumorigenesis in p21-deficient mesenchymal stem cells. *Neoplasia*, 11(4), 397–407.
- Rosenberg, S. A., 2014. IL-2: The First effective immunotherapy for human cancer. *The Journal of Immunology*, 192(12), 5451–5458.
- Rossato, L. G., Costa, V. M., De Pinho, P. G., Arbo, M. D., De Freitas, V., Vilain, L., De Lourdes Bastos, M., Palmeira, C., & Remião, F., 2013. The metabolic profile of mitoxantrone and its relation with mitoxantrone-induced cardiotoxicity. *Archives of Toxicology*, 87(10), 1809–1820.
- Roy, A., 2017. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. 3(2).
- S. Rosenberg, J. Yang, N. R., 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine*, 10(9), 909–915.
- Saarikangas, J., & Barral, Y., 2011. The emerging functions of septins in metazoans. *EMBO Reports*, 12(11), 1118–1126.
- Salti, S. M., Hammelev, E. M., Grewal, J. L., Reddy, S. T., Zemple, S. J., Grossman, W. J., Grayson, M. H., & Verbsky, J. W., 2011. Granzyme B regulates antiviral CD8 + T cell responses. *The Journal of Immunology*, 187(12), 6301–6309.

- Sato, H., Demaria, S., & Ohno, T., 2021. The role of radiotherapy in the age of immunotherapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 51(4), 513–522.
- Sayagués, J. M., Corchete, L. A., Gutiérrez, M. L., Sarasquete, M. E., Abad, M. del M., Bengoechea, O., Ferminán, E., Anduaga, M. F., del Carmen, S., Iglesias, M., Esteban, C., Angoso, M., Alcazar, J. A., García, J., Orfao, A., & Muñoz-Bellvis, L., 2016. Genomic characterization of liver metastases from colorectal cancer patients. *Oncotarget*, 7(45), 72908–72922.
- Schlake, T., Thess, A., Fotin-Mleczek, M., & Kallen, K. J., 2012. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biology*, 9(11), 1319–1330.
- Scholler, J., Brady, T. L., Gwendolyn Binder-Scholl, W.-T. H., Plesa, G., Hege, K. M., Vogel, A. N., Kalos, M., Riley, J. L., Deeks, S. G., Mitsuyasu, R. T., Bernstein, W. B., Aronson, N. E., Levine, B. L., D, F., & June, C. H., 2015. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T-cells. *Science Translational Medicine*, 34(3), 132ra53.
- Schroeder, P. E., Jensen, P. B., Sehested, M., Hofland, K. F., Langer, S. W., & Hasinoff, B. B., 2003. Metabolism of dexrazoxane (ICRF-187) used as a rescue agent in cancer patients treated with high-dose etoposide. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 52(2), 167–174.
- Schwarz, N., & Leube, R., 2016. Intermediate filaments as organizers of cellular space: how they affect mitochondrial structure and function. *Cells*, 5(3), 30.
- Scott, R., Karki, M., Reisenauer, M. R., Rodrigues, R., Dasari, R., Smith, W. R., Pelly, S. C., van Otterlo, W. A. L., Shuster, C. B., Rogelj, S., Magedov, I. V., Frolova, L. V., & Kornienko, A., 2014. Synthetic and biological studies of tubulin targeting c2-substituted 7-deazahypoxanthines derived from marine alkaloid rigidins. *ChemMedChem*, 9(7), 1428–1435.
- Secchiero, P., Bernardi, S., Severini, G. M., & Zauli, G., 2012. Cell-based therapies for diabetic complications. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 1–10.
- Segnan, N., Armaroli, P., Bonelli, L., Risio, M., Sciallero, S., Zappa, M., Andreoni, B., Arrigoni, A., Bisanti, L., Casella, C., Crosta, C., Falcini, F., Ferrero, F., Giacomini, A., Giuliani, O., Santarelli, A., Visioli, C. B., Zanetti, R., Atkin, W. S., & Senore, C., 2011. Once-only sigmoidoscopy in colorectal cancer screening: Follow-up findings of the italian randomized controlled trial - SCORE. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(17), 1310–1322.
- Seltmann, K., Roth, W., Kröger, C., Loschke, F., Lederer, M., Hüttelmaier, S., & Magin, T. M., 2013. Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(1), 181–190.
- Senbabaoglu, F., Cingoz, A., Kaya, E., Kazancioglu, S., Lack, N. A., Acilan, C., & Bagci-Onder, T., 2016. Identification of mitoxantrone as a TRAIL-sensitizing agent for glioblastoma multiforme. *cancer biology and therapy*, 17(5), 546–557.
- Shafik, A. A., Ahmed, I. A., Shafik, A., Wahdan, M., Asaad, S., & El Neizamy, E., 2011. Ileocecal junction: Anatomic, histologic, radiologic and endoscopic studies with special reference to its antireflux mechanism. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 33(3), 249–256.
- Shamsuddin, A. M., Phelps, P. C., & Trump, B. F., 1982. Human large intestinal epithelium: Light microscopy, histochemistry, and ultrastructure. *Human Pathology*, 13(9), 790–803.

- Shantanam, S., 2018. Cytoreduction for colorectal metastases: liver, lung, peritoneum, lymph nodes, bone, brain. when does it palliate,prolong survival, and potentially cure? *Physiology & Behavior*, 55(9), 330–379.
- Shantanam, S., 2019. Physical activity in cancer prevention and survival: a systematic review. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148.
- Sheen, M. R., & Fiering, S., 2019. In situ vaccination: Harvesting low hanging fruit on the cancer immunotherapy tree. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 11(1), 1–12.
- Shi, L., Mai, S., Israels, S., Browne, K., Trapani, J. A., & Greenberg, A. H., 1997. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *Journal of Experimental Medicine*, 185(5), 855–866.
- Shuhendler, A. J., Cheung, R. Y., Manias, J., Connor, A., Rauth, A. M., & Wu, X. Y., 2010. A novel doxorubicin-mitomycin C co-encapsulated nanoparticle formulation exhibits anti-cancer synergy in multidrug resistant human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 119(2), 255–269.
- Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H., 2015. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, 89(3), 289–317.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Fedewa, S. A., Butterly, L. F., Anderson, J. C., Cercek, A., Smith, R. A., & Jemal, A., 2020. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(3), 145–164.
- Sihag, R. K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T. B., & Pant, H. C., 2007. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2098–2109.
- Sikirzhyski, V., Renda, F., Tikhonenko, I., Magidson, V., McEwen, B. F., & Khodjakov, A., 2018. Microtubules assemble near most kinetochores during early prometaphase in human cells. *Journal of Cell Biology*, 217(8), 2647–2659.
- Simmons., 2017. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148.
- Siri, S., Zhao, Y., Maier, F., Pierce, D. M., & Feng, B., 2020. The macro-and micro-mechanics of the colon and rectum I: Experimental evidence. *Bioengineering*, 7(4), 1–16.
- Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K., Cierpień, T., Łyzwa, P., Kielbasiński, P., Jaromin, A., Flis, A., & Chilmonczyk, Z., 2016. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS ONE*, 11(5), 1–17.
- Socié, G., Salooja, N., Cohen, A., Rovelli, A., Carreras, E., Locasciulli, A., Korthof, E., Weis, J., Levy, V., & Tichelli, A., 2003. Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 101(9), 3373–3385.
- Soffietti, R., Abacioglu, U., Baumert, B., Combs, S. E., Kinhult, S., Kros, J. M., Marosi, C., Metellus, P., Radbruch, A., Freixa, S. S. V., Brada, M., Carapella, C. M., Preusser, M., Le Rhun, E., Rudà, R., Tonn, J. C., Weber, D. C., & Weller, M., 2017. Diagnosis and treatment of brain metastases from solid tumors: Guidelines from the European Association of neuro-oncology (EANO). *Neuro-Oncology*, 19(2), 162–174.
- Soko, G. F., Burambo, A. B., Mngoya, M. M., & Abdul, B. A., 2019. Public awareness and perceptions of radiotherapy and their influence on the use of radiotherapy in Dar es Salaam, Tanzania. *Journal of Global Oncology*, 2019(5), 1–10.

- Song, M., Garrett, W. S., & Chan, A. T., 2015. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*, 148(6), 1244-1260.e16.
- Sosna, J., Morrin, M. M., Kruskal, J. B., Lavin, P. T., Rosen, M. P., & Raptopoulos, V., 2003. CT colonography of colorectal polyps: a metaanalysis. *American Journal of Roentgenology*, 181(6), 1593-1598.
- Sp, N., Kang, D. Y., Jo, E. S., Rugamba, A., Kim, W. S., Park, Y. M., Hwang, D. Y., Yoo, J. S., Liu, Q., Jang, K. J., & Yang, Y. M., 2020. Tannic acid promotes TRAIL-induced extrinsic apoptosis by regulating mitochondrial ros in human embryonic carcinoma cells. *Cells*, 9(2), 1-17.
- Spakman, D., Bakx, J. A. M., Biebricher, A. S., Peterman, E. J. G., Wuite, G. J. L., & King, G. A., 2021. Unravelling the mechanisms of Type 1A topoisomerases using single-molecule approaches. *Nucleic Acids Research*, 49(10), 5470-5492.
- Spencer, K., Parrish, R., Barton, R., & Henry, A. 2018. Palliative radiotherapy. *BMJ (Online)*, 360, 1-12.
- Stewart, S. L., Wike, J. M., Kato, I., Lewis, D. R., & Michaud, F., 2006. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. *Cancer*, 107, 1128-1141.
- Sun, Z., Wu, Y., Yang, B., Zhu, B., Hu, S., Lu, Y., Zhao, B., & Du, S., 2018. Inhibitory influence of panax notoginseng saponins on aspirin hydrolysis in human intestinal Caco-2 cells. *Molecules*, 23(2).
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F., 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- Tan, H. Y., Trier, S., Rahbek, U. L., Dufva, M., Kutter, J. P., & Andresen, T. L., 2018. A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies. *PLoS ONE*, 13(5), 1-23.
- Tan, Y., Ooi, S., & Wang, L., 2014. Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells and their derivatives: genetic and epigenetic perspectives. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 1-10.
- Tanuj Sapra, K., & Medalia, O., 2021. Bend, push, stretch: Remarkable structure and mechanics of single intermediate filaments and meshworks. *Cells*, 10(8), 1-18.
- Tardu, A., Kayaalp, C., Yilmaz, S., Tolan, K., Ersan, V., Karagul, S., Ertuğrul, I., & Kirmizi, S., 2016. Reresection of colorectal liver metastasis with vena cava resection. *Case Reports in Surgery*, 2016, 1-4.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I. S., Bleackley, R. C., Kirchhausen, T., & Lieberman, J., 2011. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature Immunology*, 12(8), 770-777.
- Thomas, S., & Prendergast, G. C., 2016. Cancer vaccines: A brief overview. *Methods in Molecular Biology*, 1403, 755-761.
- Thomson, N. H., Santos, S., Mitchenall, L. A., Stuchinskaya, T., Taylor, J. A., & Maxwell, A., 2014. DNA G-segment bending is not the sole determinant of topology simplification by type II DNA topoisomerases. *Scientific Reports*, 4.

- Tian, L., Deng, Y. T., Dong, X., Fan, J. Y., Li, H. L., Ding, Y. M., Peng, W. X., Chen, Q. X., & Shen, D. Y., 2017. Siamese crocodile bile induces apoptosis in NCI-H1299 human non-small cell lung cancer cells via a mitochondria-mediated intrinsic pathway and inhibits tumorigenesis. *Molecular Medicine Reports*, 15(4), 1727–1737.
- Tokuda, S., Higashi, T., & Furuse, M., 2014. ZO-1 knockout by talen-mediated gene targeting in MDCK cells: Involvement of ZO-1 in the regulation of cytoskeleton and cell shape. *PLoS ONE*, 9(8).
- Torsvik, A., Røslund, G. V., Svendsen, A., Molven, A., Immervoll, H., McCormack, E., Lønning, P. E., Primon, M., Sobala, E., Tonn, J. C., Goldbrunner, R., Schichor, C., Mysliwietz, J., Lah, T. T., Motaln, H., Knappskog, S., & Bjerkvig, R., 2010. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: Putting the research field on track - Letter. *Cancer Research*, 70(15), 6393–6396.
- Viard, T., Cossard, R., Duguet, M., & Bouthier De La Tour, C., 2004. Thermotoga maritima-Escherichia coli chimeric topoisomerases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30073–30080.
- Vichai, V., & Kirtikara, K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116.
- Voigt, W., 2008. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. In *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics* 110, 326–326. Springer Netherlands.
- Von Wagner, C., Ghanouni, A., Halligan, S., Smith, S., Dadswell, E., Lilford, R. J., Morton, D., Atkin, W., & Wardle, J., 2012. Patient acceptability and psychologic consequences of CT colonography compared with those of colonoscopy: Results from a multicenter randomized controlled trial of symptomatic patients. *Radiology*, 263(3), 723–731.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A., 2015. Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 388–400.
- Wang, C., Ye, Y., Hu, Q., Bellotti, A., & Gu, Z., 2017. Tailoring biomaterials for cancer immunotherapy: Emerging trends and future outlook. *Advanced Materials*, 29(29), 1–24.
- Wang, J., Sui, L., Huang, J., Miao, L., Nie, Y., Wang, K., Yang, Z., Huang, Q., Gong, X., Nan, Y., & Ai, K., 2021. MoS₂-based nanocomposites for cancer diagnosis and therapy. *Bioactive Materials*, 6(11), 4209–4242.
- Wang, M., Guo, L., Wu, Q., Zeng, T., Lin, Q., Qiao, Y., Wang, Q., Liu, M., Zhang, X., Ren, L., Zhang, S., Pei, Y., Yin, Z., Ding, F., & Wang, H. R., 2014. ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. *Nature Communications*, 5.
- Wang, Y. J., Li, Q., Xiao, H. Bin, Li, Y. J., Yang, Q., Kan, X. X., Chen, Y., Liu, X. N., Weng, X. G., Chen, X., Cai, W. Y., Guo, Y., Huang, H. F., & Zhu, X. X., 2015. Chamaejasmin B exerts anti-MDR effect in vitro and in vivo via initiating mitochondria-dependant intrinsic apoptosis pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 5301–5313.
- Wang, Z., Matsudaira, P., & Gong, Z., 2010. Storm: A general model to determine the number and adaptive changes of epithelial stem cells in teleost, murine and human intestinal tracts. *PLoS ONE*, 5(11).

- Wang, Z., Tang, Y., Tan, Y., Wei, Q., & Yu, W., 2019. Cancer-associated fibroblasts in radiotherapy: Challenges and new opportunities. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 1–12.
- Ward, E., Islami, F., Wu, M., Weir, H. K., Scott, S., Sherman, R. L., Ma, J., & Richardson, L. C., 2021. Annual report to the nation on the status of cancer, Part2: Progress toward healthy people 2020 objectives for 4 common cancers. 126(10), 2250–2266.
- Wawro, M. E., Chojnacka, K., Wieczorek-Szukała, K., Sobierajska, K., & Niewiarowska, J., 2019. Invasive colon cancer cells induce transdifferentiation of endothelium to cancer-associated fibroblasts through microtubules enriched in Tubulin- β 3. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1).
- Webb, E. S., Liu, P., Baleeiro, R., Lemoine, N. R., Yuan, M., & Wang, Y., 2019. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *The Journal of Biomedical Research*, 32(5), 317–326.
- Yamada, T., Tomita, T., Weiss, L. M., & Orlofsky, A., 2011. *Toxoplasma gondii* inhibits granzyme B-mediated apoptosis by the inhibition of granzyme B function in host cells. *International Journal for Parasitology*, 41(6), 595–607.
- Yan, W. L., Shen, K. Y., Tien, C. Y., Chen, Y. A., & Liu, S. J., 2017. Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 9(4), 347–360.
- Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C. F., 2014. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 10(11), 3153–3164.
- Yang, F., Shi, K., Jia, Y. peng, Hao, Y., Peng, J. rong, & Qian, Z. yong., 2020. Advanced biomaterials for cancer immunotherapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(7), 911–927.
- Yang, P., Yu, D., Zhou, J., Zhuang, S., & Jiang, T., 2019. TGM2 interference regulates the angiogenesis and apoptosis of colorectal cancer via Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Cycle*, 18(10), 1122–1134.
- Yi, J. M., Zhang, X. F., Huan, X. J., Song, S. S., Wang, W., Tian, Q. T., Sun, Y. M., Chen, Y., Ding, J., Wang, Y. Q., Yang, C. H., & Miao, Z. H., 2015. Dual targeting of microtubule and topoisomerase II by α -carboline derivative YCH337 for tumor proliferation and growth inhibition. *Oncotarget*, 6(11), 8960–8973.
- Yu, C. H., Redemann, S., Wu, H. Y., Kiewisz, R., Yoo, T. Y., Conway, W., Farhadifar, R., Müller-Reichert, T., & Needleman, D., 2019. Central-spindle microtubules are strongly coupled to chromosomes during both anaphase A and anaphase B. *Molecular Biology of the Cell*, 30(19), 2503–2514.
- Zauber, A. G., Winawer, S. J., O'Brien, M. J., Lansdorp-Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., Hankey, B. F., Shi, W., Bond, J. H., Schapiro, M., Panish, J. F., Stewart, E. T., & Wayne, J. D., 2012. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *New England Journal of Medicine*, 366(8), 687–696.
- Zhang, L., Yu, H., Zhao, X., Lin, X., Tan, C., Cao, G., & Wang, Z., 2010. Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochemistry International*, 57(5), 547–555.
- 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(3), 489–503.
- Zhang, W., Lu, Q., Dong, Y., Yue, Y., & Xiong, S., 2018. Rv3033, as an emerging anti-apoptosis factor, facilitates mycobacteria survival via inhibiting macrophage intrinsic apoptosis. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–11.

- Zhang, X., Raghavan, S., Ihnat, M., Hamel, E., Zammiello, C., Bastian, A., Mooberry, S. L., & Gangjee, A., 2015. The design, synthesis and biological evaluation of conformationally restricted 4-substituted-2,6-dimethylfuro[2,3-d]pyrimidines as multi-targeted receptor tyrosine kinase and microtubule inhibitors as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(10), 2408–2423.
- Zhao, M., Liao, D., & Zhao, J., 2017. Diabetes-induced mechanophysiological changes in the small intestine and colon. *World Journal of Diabetes*, 8(6), 249–269.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Elif AKSAKAL
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	İMKB Lisesi
Lisans:	Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Genetik Bilim Dalı (2022)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi