

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANSER KEMOTERAPİ DİRENCİNE KARŞI
EMODİN VE ALOE-EMODİNİN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİRİTAN AVCI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. MEHMET KADİR ERDOĞAN

BİNGÖL-2025

**KANSER KEMOTERAPİ DİRENCİNE KARŞI EMODİN VE ALOE-EMODİNİN
ROLÜ**

Doç. Dr. Mehmet Kadir ERDOĞAN danışmanlığında, Biritan AVCI tarafından hazırlanan bu çalışma 19/09/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. Hamid CEYLAN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Mehmet Kadir ERDOĞAN	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, araştırmalarımnda karşılaştığım sorunlara çözüm üretmemde katkı sağlayan, yönlendirmeleriyle çalışmamın gelişimine ışık tutan ve danışmanlığını üstlenen değerli hocalarım Doç. Dr. Mehmet Kadir ERDOĞAN ve Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetli önerileri, bilimsel bakış açıları, yapıcı eleştirileri ve özverili destekleri sayesinde tez sürecinde karşılaştığım zorlukları aşma fırsatı buldum. Bana yalnızca akademik anlamda değil, aynı zamanda araştırmacı kimliğimi geliştirmemde de büyük katkıları oldu. Çalışmamın planlanmasından sonuçların değerlendirilmesine kadar geçen her aşamada verdikleri destek, bu tezin ortaya çıkmasında en önemli etkenlerden biri olmuştur.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Aydın SEVER'e teşekkür ederim.

Ayrıca lisan eğitimimden bu yana her zaman yanımda olan Bingöl Üniversitesi Kanseri Araştırma Laboratuvarı üyesi olan Gözde Viktoriya Yolcu Varolüneş'e teşekkür ederim.

Son olarak bana sevgisini ve desteğini esirgemeyen bütün aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

Biritan AVCI
Bingöl 2025

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ	9
1.1. Kanserin Tanımı ve Tedavi Yöntemleri	1
1.2. Apoptozis.....	7
1.2.1. Ekstrinsik Yolak.....	8
1.2.2. İntrinsik Yolak.....	9
1.3. Hücre Döngüsü.....	10
1.4. Anjiyogenez.....	13
1.5. ROS.....	14
1.6. Rheum türleri ve <i>Rheum ribes</i>	15
1.7. Emodin ve Aloe-emodin.....	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal.....	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Bitki Materyali.....	25
3.2.2. Ekstraksiyon, Fraksiyonlama ve İzolasyon İşlemleri.....	26
3.2.3. Memeli Hücre Kültürü Çalışmaları.....	26
3.2.4. Olaparib Dirençli U2OS Hücrelerinin Geliştirilmesi.....	27
3.2.5. WST-1 Hücre Canlılığı Analizi	27
3.2.6. İzobologram Analizi İle Sinerjizmin Değerlendirilmesi.....	28
3.2.7. 2D Koloni Sağ Kalım Analizi.....	28
3.2.8. Anti-anjiyogenik Etkinin İncelenmesi (Hu-VEGF Analizi).....	29

3.2.9. ROS Analizi.....	30
3.2.10. Hücresel Migrasyon (Yara-Kapanma) Analizi.....	30
3.2.11. Kaspaz-3 ELISA Analizi.....	30
3.2.12. CDDE Yöntemi İle Apoptozun Belirlenmesi.....	31
3.2.13. İstatistiksel Analizler.....	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	47



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AIF	: Apoptoz indükleyici faktör (Apoptosis Inducing Factor)
BT	: Bilgisayarlı tomografi
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
FDA	: Food and Drug Administration
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
DPBS	: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
°C	: Santigrad derece
U2OS/PIR	: PARP inhibitörü olaparibe dirençli insan osteosarkoma hücre hattı
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
mL	: Mililitre
µg	: Mikrogram
nM	: Nanomolar
CO ₂	: Karbondioksit
rpm	: Dakikada devir sayısı
kDa	: Kilo Dalton
RB	: Retinoblastoma
TNFR	: Tümör nekroz faktörü reseptörü
DMEM	: Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri
TNF	: Tümör nekroz faktörü
VEGF	: Vasküler endoteyal büyüme faktörü
P21	: Sikline bağlı kinaz inhibitörü 1
DCFH-DA	: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
BCL-2	: B hücreli lenfoma 2
P53	: Tümör baskılayıcı protein 53
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
TRAIL	: Apoptozisi indükleyici ligand
DL	: Spesifik ölüm domaini

Fas-L	: Fas ligandı
DISC	: Ölüm indükleyen sinyalleme kompleksi
SOD	: Süperoksit dismutaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
OH	: Hidroksil radikali



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Kanserin ayırt edici özellikleri.....	2
Şekil 1.2.	Farklı PARP inhibitörlerinin ilişkin potansiyel direnç mekanizmaları	6
Şekil 1.3.	Klasik şema ve TEM mikroskobu görüntüsüyle apoptotik cisimcikler	8
Şekil 1.4.	Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları ile apoptoz indüksiyonu.....	10
Şekil 1.5.	Hücre döngüsünün mitotik ve interfaz evlerinin gösterimi.....	12
Şekil 1.6.	Işgın bitkisinin bahar aylarında doğada çekilmiş fotoğrafı.....	16
Şekil 1.7.	Emodin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 1.8.	Emodin hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki etki mekanizması.....	18
Şekil 1.9.	Aloe-emodin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 4.1.	Hücre canlılığı bulguları	32
Şekil 4.2.	İzobologram analizi bulguları.....	34
Şekil 4.3.	Kombinasyon indeksi bulguları	35
Şekil 4.4.	Koloni sağkalımı analizi bulguları	36
Şekil 4.5.	U2OS/PIR hücrelerinde tedaviye bağlı % VEGF miktarları	37
Şekil 4.6.	ROS miktarlarındaki kat cinsinden değişim.....	38
Şekil 4.7.	U2OS/PIR hücrelerinin migrasyon kapasiteleri.....	39
Şekil 4.8.	Kaspaz-3 miktarlarındaki değişim ve apoptoza yönelimdeki artış	40

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1 Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	24
---	----



KANSER KEMOTERAPİ DİRENCİNE KARŞI EMODİN VE ALOE-EMODİNİN ROLÜ

ÖZET

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve farklılaşma yeteneklerini kaybetmesiyle ortaya çıkan, yüksek mortalite ve morbiditeye sahip önemli bir sağlık sorunudur. Osteosarkoma, özellikle çocukluk ve ergenlik döneminde görülen, hızlı metastaz yapma eğilimi nedeniyle prognozu kötü olan bir kemik tümörüdür. Günümüzde kemoterapi ve radyoterapi temel tedavi yaklaşımları olsa da, tedaviye karşı gelişen direnç başarıyı sınırlamaktadır.

Doğal kaynaklı bileşikler antikanser potansiyelleri ile öne çıkmaktadır. *Rheum ribes* bitkisinden elde edilen emodin ve aloe-emodin, antiproliferatif ve pro-apoptotik etkileri ile bilinen doğal antrakinon türevleridir. Bu çalışmada, PARP inhibitörüne dirençli osteosarkoma hücre hattı (U2OS/PIR) üzerinde bu bileşiklerin etkileri incelenmiştir. WST-1 analizi, her iki bileşiğin hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığını göstermiştir. Koloni sağkalım analizi, hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerinin baskılandığını ortaya koymuştur. ROS ve VEGF analizleri, oksidatif stresin arttığını ve anjiyogenezin inhibe edildiğini göstermiştir. Ayrıca apoptozla ilişkili proteinlerdeki değişimler, apoptotik süreçlerin aktive olduğunu doğrulamıştır.

Sonuç olarak, emodin ve aloe-emodin osteosarkoma hücrelerinde tek başına antikanser etki gösterdiği; PARP inhibitörleri ile kombine kullanıldığında tedavi etkinliğini artırarak ilaç direncinin kırılmasına katkı sağlayabileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kanser, kemoterapi direnci, U2OS/PIR, *Rheum ribes*, emodin, aloe-emodin.

ROLE OF EMODIN AND ALOE-EMODIN AGAINST CANCER CHEMOTHERAPY RESISTANCE

ABSTRACT

Cancer is a major health concern characterized by uncontrolled cell proliferation and loss of differentiation, associated with high morbidity and mortality. Osteosarcoma, predominantly observed in children and adolescents, has a poor prognosis due to its rapid metastatic potential. Although chemotherapy and radiotherapy remain the primary treatment approaches, therapeutic resistance often limits their effectiveness.

Natural compounds have attracted attention due to their potential anticancer properties. Emodin and aloe-emodin, anthraquinone derivatives isolated from *Rheum ribes*, are known for their antiproliferative and pro-apoptotic effects. In this study, the effects of these compounds were investigated in the PARP inhibitor-resistant osteosarcoma cell line (U2OS/PIR). WST-1 assays demonstrated a significant reduction in cell viability following treatment with both compounds. Colony formation assays revealed marked inhibition of the cells' clonogenic capacity. ROS and VEGF analyses indicated increased oxidative stress and suppressed angiogenesis, respectively. Furthermore, alterations in apoptosis-related protein levels confirmed the activation of apoptotic pathways.

In conclusion, emodin and aloe-emodin exhibited anticancer effects in osteosarcoma cells, and their combination with PARP inhibitors enhanced therapeutic efficacy, suggesting a potential strategy to overcome drug resistance.

Keywords: Cancer, chemotherapy resistance, U2OS/PIR, *Rheum ribes*, emodin, aloe-emodin.

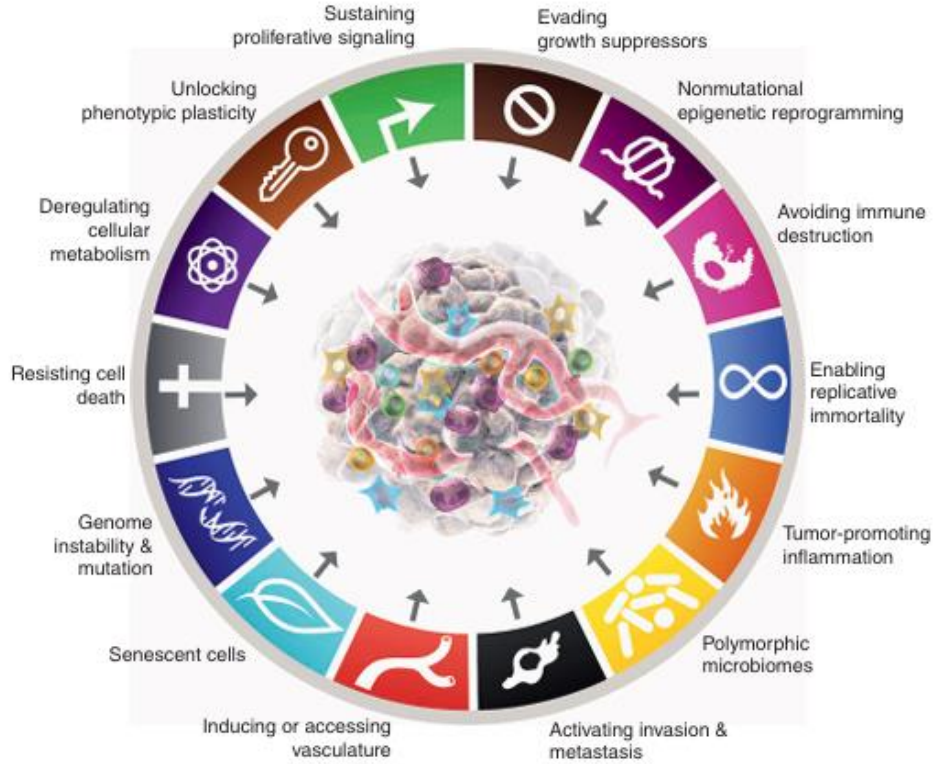
1. GİRİŞ

1.1. Kanserin Tanımı ve Tedavi Yöntemleri

Ortalama kilodaki bir insan vücudunda yaklaşık 37,5 trilyon hücre olduğu tahmin edilmektedir. Hücreler iç dengeyi korumak amacıyla belirli bir büyüklüğe ulaştıklarında bölünme ihtiyacı duyarlar. Bölünme sonucu oluşan yeni hücrelerde kalıtsal materyalin sorunsuz kopyalanması ve eşit bir şekilde paylaşımı gibi birçok hücresel faktör yer almaktadır (Bianconi vd., 2013). Fakat endojen veya eksojen kaynaklı hasarlar sonucunda hücrelerin bölünmesinde, büyümesinde, farklılaşmasında ve kontrollü ölümünde faaliyet gösteren proteinlerde oluşan bozukluklar kanserin oluşumuna yol açar (Şekil 1.1) (Hanahan, 2022). Ayrıca kanserin gelişimi, kanser hücrelerinin hızla çoğalması, hayatta kalma isteği, invazyon ve metastaz yeteneğine dayanmaktadır. Tümör baskılayıcı genler apoptozisi ve hücre bölünmesini kontrol etmektedir. Fakat bu genlerde meydana gelen hasar sonucu kontrolsüz hücre büyümesine neden olup kanserin oluşuma yol açar. Onkogen oluşumunun da kansere neden olduğu görülmektedir. Onkogenler hücre büyümesinde ve bölünmesinde görev alan proto-onkogenlerin değişime uğramış halidir. Proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu normalin üstünde bir aktivite göstererek kanserli hücrelerin çoğalmasına yol açar. Bu hücreler normal doku ve organları istila ederek kanserin yayılmasına neden olur. Sonuç olarak hem proto-onkogenlerde hem de tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar; kontrolsüz hücre çoğalmasına, metastaza, apoptozun baskılanmasına ve anjiyogenesize neden olur (Gariglio, 2012; Sever vd., 2023).

Kanser, primer olarak doğduğu hücre tipine göre türlere ayrılır ve epitel hücrelerde gelişirse karsinom, kemik ya da yumuşak dokuda oluşursa sarkoma, bağışıklık hücrelerinde oluşursa miyeloma şeklinde isimlendirilir. Kanserli hücrelerin temel olarak bazı ayırt edici ortak özellikleri bulunmaktadır. Bunlar: bağışıklık yanıtından kaçınma, genomik kararsızlık, hücre ölümüne karşı direnç, tümör baskılayıcılardan kaçınma, invazyon ve metastazı aktive etme, sürekli poliferatif sinyaller gönderme, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçma ve anjiyogenezisi indüklemeye olarak sıralanabilmektedir

(Şekil 1.1). Son araştırmalara göre bu ayırt edici özelliklere 4 özellik daha eklenmiştir. Bunlar: mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlanma, yaşlanmış hücreler, fenotipik plastisite ve poliformik mikrobiyomlardır (Hanahan, 2022).



Şekil 1.1. Kanserin ayırt edici özellikleri (Hanahan, 2022)

Kanser gelişiminde; genetik yatkınlık, yaş, güneş ışınları, radyasyon, tütün, alkol, obezite, hareketsiz yaşam biçimi, düşük lifli diyetler, aşırı kırmızı et ve işlenmiş gıda tüketimi gibi birçok endojen ve eksojen faktör yatmaktadır (Blackadar, 2016). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının araştırmalarına göre 2022 yılı içinde 20 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç) ve kanser kaynaklı 9,7 milyon ölüm olduğu belirlenmiştir. Araştırmalar sonucu yapılan tahminler neticesinde yaklaşık beş erkek veya kadından birinin hayatı boyunca kansere yakalandığını, dokuz erkekten birinin ve oniki kadından birinin kanser kaynaklı olarak öldüğü belirtilmiştir. 2022 yılında en sık teşhis edilen kanser türü akciğer kanseridir (%18), ve bunu sırasıyla meme (%11,6), kolorektum (%9,6), prostat (%7,3) ve mide kanseri (%4,9) izlemektedir (Bray vd., 2024).

Osteosarkoma, yıllık olarak her bir milyon kişiden 4-6 arası vaka raporlanmaktadır. Son yıllarda tedavi yöntemlerindeki ilerlemelerle birlikte sağ kalım oranlarında bir miktar artış gözlemlenmesine rağmen, veriler hastaların %30'undan fazlasının tanıdan sonraki 5 yıl içerisinde yaşamını yitirdiğini göstermektedir. (Zhang vd., 2024). Çin, Avrupa ve Kuzey Amerika'da osteosarkoma için cerrahi, kemoterapi ve radyoterapiden oluşan kapsamlı tedavi yöntemleri yaygın olarak benimsenmektedir. Fakat pelvis ve eksen bölgeleri gibi karmaşık anatomik alanlarda tümörün cerrahi olarak çıkarılması oldukça güçtür (Dong vd., 2024).

Tedavi süreçlerinde kullanılan ilaçların etkinliğinin artırılması, klinik uygulamalar açısından büyük önem arz etmektedir. Osteosarkomanın biyolojik yapısını ve tedavi seçeneklerini anlamaya yönelik önemli birtakım çalışmalar yapılmasına rağmen mevcut yöntemler halen istenen düzeyde terapötik başarı sağlayamamaktadır (Zhang vd., 2024). Osteosarkoma 15-19 yaş grubunda daha yaygındır. Fakat 60 yaş üstü bireylerde osteosarkomanın tekrar artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu kanser türü kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülmektedir. Bunun sebebi ise erkeklerde kemik büyümesinin kadınlara göre daha uzun sürmesidir. Bu kanser türünün en sık görüldüğü yer diz çevresidir. Genellikle uzun kemiklerin metafiz bölgesinde varlığını göstermektedir. Genel olarak şikayetleri ilerleyen ağrı, hareket kısıtlılığı ve o bölgede kilo kaybıdır. Tıbbi olarak: patolojik kırıklar, anemi yumuşak doku ödemi, genişlemiş venler ve hızla büyüyen bir kitle olarak bulguları teşhis edilir. Bu bölgedeki kanser varlığını tam anlamıyla tespit edebilmek için konvaksiyonel radyografi, bilgisayarlı tomografi (BT) taraması, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve biyopsi yapılabilmektedir. Bu tetkikler sonrası hastalığın evresi belirlenir ve tedavi uygulanır (Refandy, 2022).

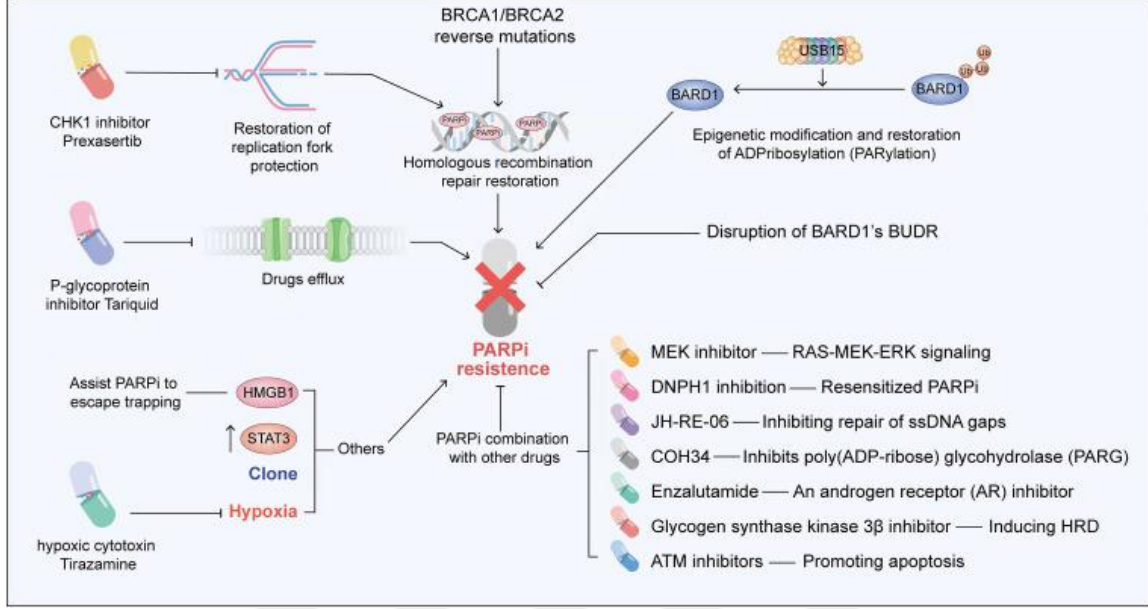
Kanser tedavisinde kullanılan bazı yöntemler bulunmaktadır. Bunlar: cerrahi müdahale, kemoterapi, hormonal terapi, radyoterapi, immünoterapi, adjuvant terapi, hedefe yönelik kanser tedavileri, büyüme sinyali inhibitörleri, apoptozu indükleyen ilaçlar, endojen angi inhibitörler olarak sıralanabilirler (Sudhakar, 2009). Konvaksiyonel kanser tedavilerinden farklı olarak genomik ve proteomik profillemeye yöntemleri sayesinde hastaların belirli kimyasal ya da radyolojik tedavilere ve kişiye özel yaklaşımlara göstereceği tepkinin öngörülmesini mümkün kılarak klinik etkinin artmasını sağlamıştır (Byrum vd., 2019; Imyanitov, 2021).

PARP (poli(ADP-riboz) polimeraz), DNA onarımında görev alan önemli moleküllerden biridir. ADP-riboziltransferazlar (ARTs) ailesinin üyeleri olan PARP'ler, NAD⁺'dan (nikotinamid adenin dinükleotid) alıcı proteinlere ADP-riboz molekülleri aktarabilmekte ve böylece PAR birimleri (ADP-riboz polimerleri; bu süreç PARilasyon olarak adlandırılmaktadır) oluşturarak ilgili DNA onarım proteinlerini hasarlı kromatine yönlendirmektedir. DNA'da hasar meydana geldiğinde aktif hale gelen PARP1, DNA zincirinde oluşan kırıkları tespit ederek baz eksizyon onarım yoluna dahil olup DNA'daki tek zincir kırıklarının giderilmesini sağlar. DNA'da düşük düzeyde hasar varlığında PARP1, tek zincir kırıklarını onararak hücrelerin hayatta kalmasında etkili olur ve tek zincir kırıklarının zararlı olan çift zincir kırıklarına dönüşümünü engeller. Tek zincir kırıklarının çift zincir kırıklarına dönüşmesi durumunda PARP1, H2AX'ı fosforile eder (γ H2AX) ve çift zincir kırıklarının onarımı için ilgili genlerin (BRCA1/2) hasarlı bölgeye yönlendirilmesini sağlar. Dolayısıyla PARP1, hasar almış hücrelerin hayatta kalması açısından kritik olup, kanser hücrelerine anti-apoptotik tedaviler sırasında direnç kazandırabilir (Park vd., 2018; Gundogdu vd., 2023). DNA onarımının engellenmesiyle birlikte PARP inhibisyonu, DNA hasarının artmasına ve sitotoksik etkinin belirgin şekilde yükselmesine yol açar. Bu dirençin gelişmemesi için ve kanserli hücrelerdeki hasar almış DNA'nın onarılmaması için PARP inhibitörleri geliştirilmiştir (Shen vd., 2015). Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri, PARP enzimlerinin aktif bölgesinde NAD⁺ ile yarışarak etki gösteren anti-kanser ilaçlardır PARP'ın baskılanabileceği ilk kez 1971'de, HeLa hücrelerine timin ve nikotinamid işlenmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Sonraki birçok çalışma, NAD⁺ ile rekabet ederek PARP aktivitesini inhibe eden çok sayıda benzamidi tanımlamıştır. Ancak bu bileşikler, düşük etkinlik ve özgüllükleri sebebiyle klinik açıdan uygun görülmemiştir. PARP inhibitörlerinin (PARPi) asıl hedefi genellikle PARP1 olarak kabul edilir, ancak bazı PARP ailesi üyelerinin NAD-bağlanma bölgelerindeki yapısal benzerlik nedeniyle, bazı PARPi'ler PARP2 ve PARP3 dahil olmak üzere diğer PARP'lerin aktivitesini de inhibe edebilmektedir. Ayrıca kinazlar üzerinde bazı hedef dışı etkiler de gözlemlenmiştir (Rose vd., 2020). Olaparib, rucaparib, niraparib ve talazoparib, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış dört PARP inhibitörüdür. Bu ilaçlar arasında sadece olaparib, Hindistan'da ruhsatlandırılmıştır. PARP inhibitörleriyle gerçekleştirilen tedavi yaklaşımı, "sentetik letalite" olarak bilinen kavrama dayanmaktadır. Bu kavram, tek başına zararsız olan iki genetik mutasyonun bir araya geldiğinde hücre ölümüne sebep olabilmesi olgusunu ifade eder. Sentetik letalite

stratejisinin en önemli avantajı, mutasyon taşıyan tümör dokusunun seçici olarak hedeflenebilmesi ve bu sayede normal hücrelerde toksisite düzeyinin azaltılabilmesidir (Desai vd., 2022). Klinikte kullanılan PARPi'lerin katalitik aktiviteleri arasında önemli bir fark bulunmaz; ancak etkinlikleri ve toksisite düzeyleri, esas olarak tuzaklama potansiyelleri ile ilişkilidir (Shen vd., 2015). Tuzaklama etkisi göstermeyen veliparib, en az etkili PARP inhibitörü olmakla birlikte, sitotoksik ajanlarla en kolay kombine edilebilen ilaçtır. Rucaparib, olaparib ve niraparib benzer seviyelerde tuzaklama yaparken, talazoparib en yüksek tuzaklama kapasitesi ile bu sınıftaki en güçlü ve en toksik ilaç olarak bilinir (Murai vd., 2014; Shen vd., 2015). Klinik öncesi ve klinik çalışmalarda en yoğun şekilde incelenen PARP inhibitörleri olaparib ve veliparibtir. Bu PARP inhibitörleri (olaparib, veliparib) yumurtalık ve meme kanserlerinde önemli başarılar elde etmişlerdir (Jelinic ve Levine, 2014). Klinik kullanım için onaylanan ilk PARP inhibitörü, AstraZeneca tarafından geliştirilen Olaparib (AZD2281)'dir. İlk kez Bastiaan Evers ve arkadaşlarının yayınında aktarıldığı gibi, Olaparib BRCA2 mutasyonu taşıyan tümör hücrelerine karşı güçlü bir etki göstermiş ve etkin PARP inhibitörlerinden biri olarak kabul edilmiştir. 2018 yılında Olaparib, BRCA mutasyonlu meme kanserinin tedavisi için kapsamlı onay almıştır. Sonraki süreçte, yalnızca meme kanseriyle sınırlı kalmayıp farklı malignitelere yönelik etki mekanizmalarının da açıklığa kavuşturulmasında önemli mesafeler kat edilmiştir (Che vd., 2025). Ekzom dizileme verileri, osteosarkomun BRCA eksikliği ya da BRCA-benzeri tümörlere karakteristik bir genom instabilitesi imzası taşıyabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda olaparib, BRCA1/2 mutasyonlu veya BRCA benzeri tümörlerin tedavisinde en sık tercih edilen PARP inhibitörüdür (Dong vd., 2024). Olaparib tarafından baz eksizyon onarımı yolunun inhibisyonu, onarılmamış tek zincir kırıklarının birikmesine ve bu da zararlı çift zincir kırıklarının oluşumuna yol açar. Olaparib, tekrarlayan over kanseri ve BRCA mutasyonu olan hastaların tedavisi için FDA tarafından 2014 yılında onaylanmıştır ve kemoterapide yaygın olarak kullanılmıştır (Bochum vd., 2018).

Her ne kadar PARPi, belirli hasta gruplarında hem klinik deneylerde hem de gerçek uygulamada kalıcı sağkalım faydaları sağlayabilse de, bazı durumlarda doğal veya edinilmiş dirençler, umutları azaltmıştır. Tümör hücrelerinin tedaviye karşı direnç kazanma mekanizmaları oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Şekil 1.2'de gösterildiği gibi her

tümörde gözlemlenen ilaç direnci, bağımsız bir mekanizmanın ürünü olmaktan ziyade, çeşitli direnç yollarının bir araya gelmesinden kaynaklanabilir (Fu vd., 2024).



Şekil 1.2. Farklı PARP inhibitörlerine ilişkin potansiyel ilaç direnci mekanizmaları (Fu vd., 2024)

PARPi direncinin mekanizmaları karmaşıktır ve başlıca şu yollarla gerçekleşir:

- İlaç dışı atılımının artması
- BRCA 1/2' nin genomik geri dönüşü
- Replikasyon çatalları korumasının yeniden sağlanması
- Homolog rekombinasyon onarımının herhangi bir nedenle güçlendirilmesi
- Epigenetik değişiklikler
- Yüksek hareketlilik grubu kutusu 3 (HMGB3), STAT3, klonal seçilim ve hipoksi (Fu vd., 2024).

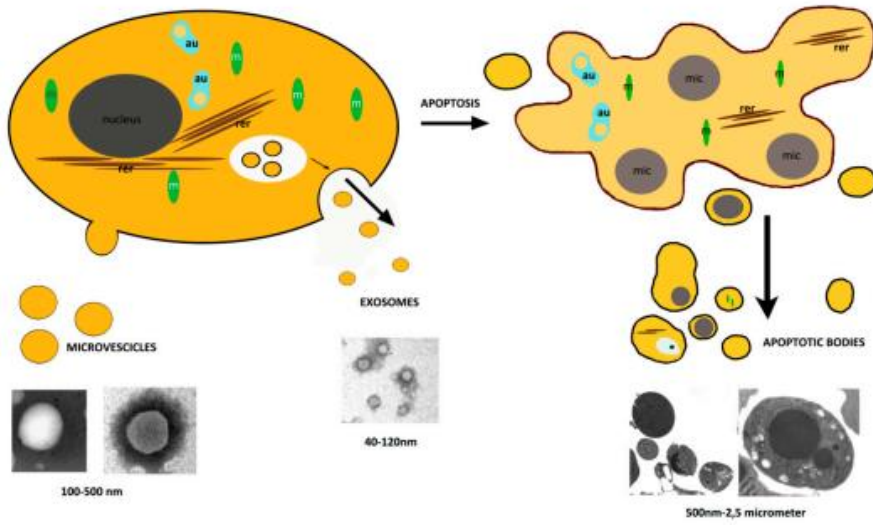
Kemoterapi en yaygın kullanılan tedavi yöntemlerindendir. Kemoterapik tedaviler, apoptozu indüklemeye, hücre döngüsünü durdurma ve antitümör etkisiyle kanser tedavilerinin başında gelir (Zhang ve Guo, 2016). Fakat kanser hücreleri kemoterapiye karşı direnç geliştirebilmektedir. Buda tümörün tekrar oluşmasına ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Kemoterapik tedaviler kanser hücrelerine özgü değildir. Kanser hücrelerine verdiği zararlı etkiyi normal hücrelere de vermektedir. Bu yüzden

kanser hastalarında kusma, bulantı, saç dökülmesi, anemi, yorgunluk gibi önemli yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu ilaçlarda doz azaltılmaya gidildiği takdirde yan etkilerde azalma olmaktadır ancak bu durumda tümör büyümesi inhibe edilemez. Bundan dolayı kemoterapik tedavilerin birtakım ajanlarla kombine edilip doz düşüklüğüne gidilmesi ve bundan sebep yan etkilerin azaltılması ayrıca ilaç direncini aşabilen veya önleyebilen bileşiklerin kombine edilmesi oldukça önemlidir (Zhang ve Guo, 2016). Bu bileşikler genellikle bitkisel kaynaklı olup son zamanlarda bilim insanlarının oldukça ilgisini çekmektedir. Kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinin yanında bitkisel ajanların kullanılması bu tedavilerin toksik etkilerini azalttığı görülmüştür (Kurhan ve Ekici, 2021). Tarihsel kaynaklar, bitkisel ürünlerin eski uygarlıklarda hastalık tedavisinde kullanıldığını göstermektedir Modern kemoterapi uygulamaları ise yüksek toksisite ve ilaç direnci gibi zorluklar barındırmaktadır. Bu nedenle, bitkisel ürünler daha güvenli ve ekonomik bir tamamlayıcı seçenek olarak değerlendirilmektedir (Erdoğan vd., 2025).

1.2. Apoptozis

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, çok hücreli organizmalarda gelişimsel düzenlemenin ve doku bütünlüğünün korunmasında oldukça önemlidir. Hücre içi ve dışı sinyallerle tetiklenen bu süreç, apoptotik yollarla düzenlenir. Maya ve bakterilerde de bu süreç gözlemlenmiştir (Battistelli ve Falcieri, 2021). Apoptoz hem embriyolojik gelişimde hemde yetişkin dokularda homeostazın korunmasında görev alan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Aynı zamanda vücudun kanserle savaşmasında önemli bir tümör baskılayıcı rol üstlenir. Apoptoz, DNA'ya ciddi zararlar veren ilaçlar, radyoterapi, enfeksiyonlar ve diğer hücresel stres faktörleri gibi çeşitli uyaranlara karşı geliştirilen doğal bir hücre ölüm yanıtıdır (Morana vd., 2022). Apoptoz hücre zarında küçük kabarcıkların oluşması, fosfatidilserinin dışa çıkması ve kaspaz proteinlerinin aktive olmasıyla gerçekleşir (Singh ve Lim, 2022). Ayrılan bu kabarcıklar herhangi bir inflamatuvar yanıtı neden olmadan fagositoz yoluyla yok edilir (Şekil 1.3). Bu kabarcıklara apoptotik cisimcikler denir. Apoptotik cisimciklerin hücre zarından ayrılıp temizlenmesi “ayrılıp düşmek” anlamına gelen apoptoz kelimesini ortaya çıkarmıştır (Reed, 2000).

Apoptoz sürecinde kaspazların etkinleşmesi, ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) ya da intrinsik (mitokondriyal) yolak üzerinden gerçekleşebilir (Battistelli ve Falcieri, 2021).



Şekil 1.3. Klasik şema ve TEM mikroskobu görüntüsüyle apoptotik cisimcikler (Battistelli ve Falcieri, 2021)

1.2.1. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik ya da ölüm reseptörü aracılı yolak, özellikle bağışıklık sisteminde olmak üzere, doku homeostazının sağlanmasında kritik bir rol oynamaktadır (Danial ve Korsmeyer, 2004). Ekstrinsik apoptotik sinyal iletimi, tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) süper ailesine ait spesifik ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlar. Bu reseptörler, hücre zarının dış kısmında 2-4 adet sistein yönünden zengin bölgeye sahip tip 1 transmembran proteinlerdir. Tanımlayıcı özellikleri ise sitozolik bölümlerinde bulunan yaklaşık 70 amino asitlik ölüm alanıdır (Nair vd., 2014).

Bu yolağa aynı zamanda kaspaz bağımlı yolak denir. Kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-12, kaspaz-7, kaspaz-3 kaskadı ekstrinsik apoptotik yolda görev alır. Kaspazların yanı sıra birtakım reseptörlerde bu yolda görev alır, örnek olarak: FasL reseptörü, TNF-alfa reseptörü, TLR, ölüm reseptörleri. Bu yolda kalsiyum kanalının açılıp kapanması da hücre canlılığını etkilemektedir. Kalsiyum konsantrasyonu ekstrinsik yolaktaki sinyal iletiminde görev alır (Hongmei, 2012).

Hücre zarının dış yüzeyinde bulunan reseptörler, hücre dışı kaynaklı ölüm sinyallerini algılar. Bu sinyallerin bağlanmasıyla birlikte reseptörlerin stoplazmik bölgeleri bir araya gelerek, hücre ölüm sürecinde görev alan proteinlerle etkileşime girer. Bu süreçte pro-

kaspazların aktif hale gelmesini engelleyen bölümler preolitik olarak uzaklaştırılır ve böylece pro-kaspazlar aktif kaspaz enzimlerine dönüşür (Elmore, 2007).

TNF (Tumor necrosis factor) Fas ligandı (Fas-L) ve TNF ile ilişkili apoptozisi indükleyici ligand (TRAIL) gibi hücre dışı sinyal molekülleri, DR'nin (transmembran reseptörleri) hücre dışı alanına bağlanırlar. TNFR1 (tip1 TNF reseptörü), Fas (CD95/Apo-1) ve TRAIL reseptörlerine bağlandığı zaman ekstrinsik yolak sinyalleri etkinleşir. Spesifik ölüm domaininin (DL) DR'leri harekete geçirmesi DISC'i (ölüm indükleyen sinyalleme kompleksi) oluşturur. Aktif kaspaz 8 DISC'den ayrılarak kaspaz aktivasyon kaskadını aktive eder (Jan, 2019). Aktifleşen kaspazlar DNaz enzimi ile birlikte hareket ederek DNA hasarına neden olmaktadır (Elmore, 2007; Ulukaya vd., 2011).

1.2.2. İntrinsik Yolak

İntrinsik apoptoz yolu, reseptöre bağımlı olmayan ve mitokondrinin temel düzenleyici rol üstlendiği, hücre içi stres sinyalleri sonucunda aktive olan bir mekanizmadır. Bu yolak; DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi, hormonal ya da sitokin eksikliği ve viral enfeksiyonlar gibi çeşitli hücrel bozulmalara yanıt olarak devreye girer (Tait ve Green, 2010). Bu yolağın düzenlenmesinde Bcl-2 protein ailesi temel bir görev almaktadır. Bcl-2 ailesi; Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk gibi hücre ölümünü teşvik eden (proapoptotik) üyeler ile Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 gibi hücre ölümünü engelleyen (anti-apoptotik) üyeleri içerir. Anti-apoptotik üyeler, sitokrom-c'nin salınımını engelleyerek apoptozu önler. Buna karşın, proapoptotik üyeler apoptozu teşvik eder. Hücrenin yaşayıp yaşamayacağını belirleyen bu mekanizma, sadece Bcl-2 seviyeleri değil, özellikle Bcl-2 ile Bax arasındaki denge büyük önem taşır (Ghobrial vd., 2005). Apoptotik uyarılar sonucunda, mitokondrinin dış zarında geçirgenlik artışı meydana gelir, bu dış zarda oluşan porlara 'permability transition pore (PT)' denir. Bu durum sonucunda sitokrom-c ile kaspazların ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü gibi moleküllerin sitozole salınmasına neden olur. İlk olarak sitozole salınan sitokrom-c, serin proteaz HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO'dur. Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) ile sitokrom-c bağlanarak apoptozom kompleksini oluştururlar. Böylece kaspaz-9'un aktif hale gelmesi sağlanır (Elmore, 2007). Apoptoz sırasında mitokondriden salınan HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO programlı hücre ölümünü inhibe eden IAP proteinlerinin işlevlerini

olarak adlandırılırken, M ise mitotik evre olarak adlandırılır (Cecchini vd., 2012). G1 evresi hücrelerin DNA replikasyonuna hazırlık yaptığı evredir. Bu fazda hücre büyümeyi teşvik eden veya engelleyen sinyalleri değerlendirerek döngüye devam etme, duraklama ya da döngüden çıkma kararını verir. G1 evresinde hem maya hem de memeli hücrelerinde kritik kontrol noktaları bulunmuştur. Mayalarda başlangıç ve memelilerde kısıtlama noktası olarak isimlendirilen bu aşama hücrenin DNA'yı eşlemeye ve döngüyü tamamlamaya kendini adanmış evredir (Johnson ve Walker, 1999). G2 ikinci boşluk olarak tanımlanır. S evresiyle mitoz arasında yer alır. G1 ve G2 evreleri hücre döngüsünün düzenlenmesi için önemlidir. Evreler arası geçiş sırasında DNA bütünlüğünün izlenmesi, hücrelerde mutasyon ya da hasar meydana gelmişse ilerlemesinin engellenmesi için iki boşluk fazı (G1 ve G2) önemlidir. Kromozomların çoğaldığı S evresi interfaz safhasında yer alır ve süresi yaklaşık 12 saattir. Bu evre interfazın ortalama yarısını kapsar. Ardından gelen M evresinde ise, kromozomlar birbirinden ayrılarak zıt kutuplara çekilir. M safhası memelilerde ortalama 1 saat sürmektedir (Cecchini vd., 2012).

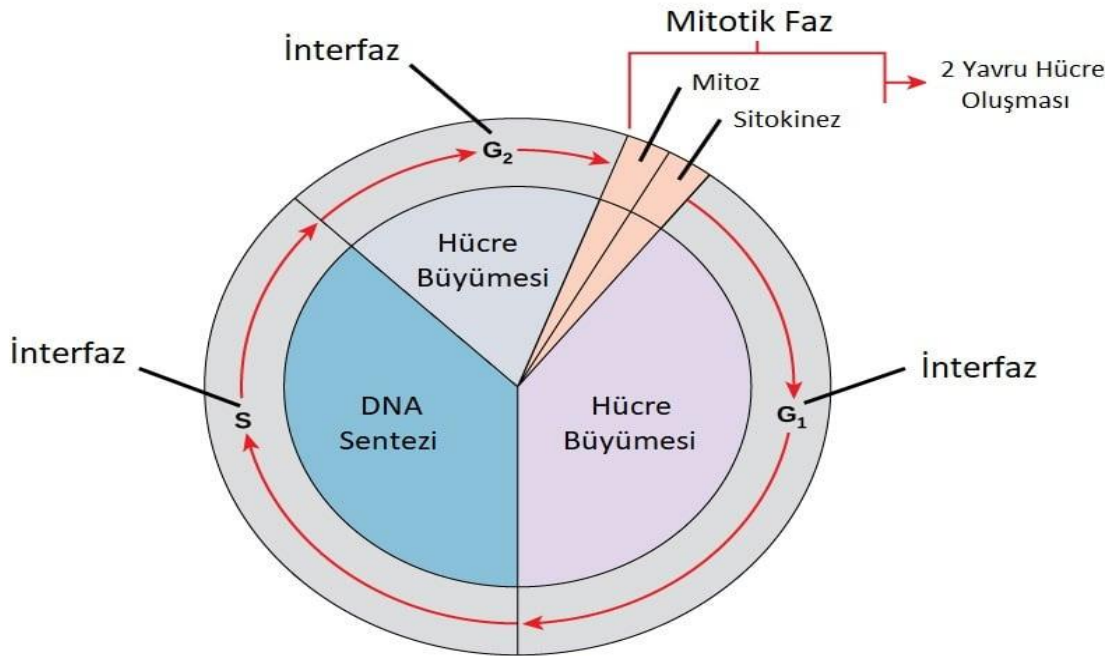
İnterfaz aşaması, hücrenin mitoz girmeden önce hazırlıklarını tamamladığı evredir ve bu sürecin sağlıklı ilerleyebilmesi için gerekli tüm faktörlerin tamamlanması gerekmektedir. G1 fazı, interfazın ilk basamağıdır ve hücre bu evrede bölünme sinyalleri algılamaya yatkındır. G1 evresi, hücrenin büyümesine paralel olarak metabolik faaliyetlerin oldukça yoğun olduğu aşamadır. Hücre G1 safhasında bölünme için ihtiyaç duyulan sinyallerin yeterli olup olmadığını kontrol eder; bu nedenle G1 evresi hücre döngüsünde hayati bir role sahiptir (Chen vd., 2016). Bu evrede hücre bölünüp bölünmeyeceğinin kararını verir. Bölünme için yeteri büyüklüğe ya da yeteri büyüme sinyalleri algılamadıysa hücre döngüden çıkarak G0 evresine yönelir (Lea vd., 2003).

Memeli hücrelerin, besin maddelerinin veya büyüme faktörlerinin azalması, hücresel yapışmanın değişmesi ya da erken G1 evresinde hücre yoğunluğunun artmasına benzer çevresel etkenlere tepki olarak hücre döngüsünden çıktıkları bilinmektedir. Hücre döngüsünde bulunan bir diğer evre ise G0 evresidir. Durgun faz olarak adlandırılan bu evre geri dönüşümlüdür (Oki vd., 2014).

G0 fazındaki hücreler enerji üretimi ve diğer yaşamsal faaliyetlerine devam etmektedirler ancak bölünme sürecine girmezler. Gerekli bölünme uyarıları alındığı takdirde hücre

döngüye yeniden dahil olur (Chen vd., 2016). RNA ve protein sentezinin başladığı G₁ safhasında, DNA replikasyonu henüz başlamaz. Ancak S safhasında DNA kendini eşlemeye başlar; bu süreçte RNA üretimi devam ederken protein sentezi maksimum seviyeye çıkar. G₂ evresi hücrenin mitoz bölünmeye hazırlanmak için geçtiği S evresini takip eden bir aşamadır (Zhao ve Elder, 2005).

Mitoz evresi önce çekirdeğin (karyokinez), ardından sitoplazmanın (sitokinez) bölünmesiyle gerçekleşen iki temel basamaktan oluşur (Şekil 1.5). Bu evrelerin tamamlanmasıyla iki genetik olarak özdeş hücre oluşur (Campbell vd., 2006). Mitoz bölünme dört evreden oluşur: profaz, metafaz, anafaz ve telofaz. Profaz safhasında kardeş kromatitler yoğunlaşarak kromozomları oluşturur ve çekirdek zarı da bu sırada çözünerek kaybolur (Gibcus vd., 2018). Metafaz aşamasında kromozomlar hücrenin ekvator düzleminde dizilir. Anafazda ise kardeş kromatitler sentrozomların yardımıyla karşı kutuplara çekilir. Telofaz aşamasında ise çekirdek zarı yeniden şekillenmeye başlar. Ardından gelen sitoplazma bölünmesiyle iki yavru hücre ortaya çıkar (Carlton vd., 2020).



Şekil 1.5. Hücre döngüsünün mitotik ve interfaz evrelerinin gösterimi (Dalton, 2015)

1.4. Anjiyogenez

Yeni damar oluşumu olarak bilinen anjiyogenez, normal koşullarda erişkin organizmalarda büyüme, gelişim ve yara iyileşmesi süreçlerinde dikkatle denetlenen fizyolojik bir olaydır. Ancak bu sürecin yetersizliği (diyabetik nefropati, kalp yetmezliği) veya aşırı uyarılması (kronik inflamasyon, kanser, diyabetik retinopati, sedef hastalığı, obezite) pek çok hastalığa yol açmaktadır (Zhao vd., 2016).

Tümör anjiyogenezi, tümörün büyümesi ve yayılmasını destekleyen fonksiyonel bir damar ağının oluşumuna neden olan önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Tümör mikroçevresinde gelişen yeni damar sistemi, tümör hücrelerinin yoğun oksijen ve besin gereksinimini karşılamak ve büyüme sürecinde oluşan tümör büyümesini destekleyen katabolitleri ortadan kaldırabilmesi için zorunludur. Bu sistem mevcut kılcal damarlardan çevre dokulara doğru gelişen endotel hücreleri aracılığıyla meydana gelir (Annese vd., 2019).

Fizyolojik durumda inaktif olan endotel hücreleri, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyogenezi teşvik eden ajanların uyarısıyla aktive olarak anjiyogenezin başlamasına neden olurlar (Lugano vd., 2020). VEGF, embriyonik dönemde hemangioblastların kan adacıklarına göçü ve bu hücrelerin endotel hücrelerine farklılaşmasını sağlar. Embriyonik dönem sonrasında ise VEGF etkisiyle endotel hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonu desteklenir. Tübül oluşumunun tetiklenmesi, damar geçirgenliğinin artırılması ve apoptoz sürecinin baskılanması sayesinde bu hücrelerin hayatta kalması sağlanır (Melincovici vd., 2018). VEGF, yaklaşık 45 kDa ağırlığında, çift zincirli bir glikoprotein olup anjiyogenezde önemli bir role sahiptir (Carmeliet, 2005). Anjiyogenezin modülasyonu, VEGF tarafından VEGF reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Tirozin kinaz özellikli VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 reseptörleri farklı VEGF izoformları (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D) ile etkileşime girer. Bu etkileşimler içinde VEGF-A'nın VEGFR-2 ile olan etkileşimi, anjiyogenezdeki hücresel tepkilerin yönetiminde başlıca etkindir. VEGF-A ailesi içinde en çok incelenen alt tipin VEGF-A165 olduğu bilinmektedir. Bu molekül, damar geçirgenliğini artırarak ve endotel hücrelerinin çoğalmasını, hareketini, hayatta kalmasını

ve MMP (Matriks Metallo Proteinaz) salınımını teşvik ederek anjiyogenez sürecine katkıda bulunur (Abhinand vd., 2016).

1.5. ROS

Atmosferik oksijenin kısmi indirgenmesi veya uyarılması sonucu oluşan türlere reaktif oksijen türleri (ROS) denir. ROS hücrelerde sinyal iletiminde rol oynar. Bununla birlikte aerobik metabolizmanın zararlı yan ürünleri olarak görülür. Kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar, aerobik metabolizmanın toksik yan ürünü olan reaktif oksijen türlerinin temel üretim merkezleridir ancak yüksek redoks potansiyeline sahip bileşiklerin atmosferik oksijenle reaksiyona girebildiği diğer hücresel bölgelerde de oluşabilir. Bu moleküller daha sonra antioksidan enzimler ve bileşikler aracılığıyla etkisiz hale getirilir (Mittler, 2017).

ROS, hücresel ortamlarda bulunan ve O_2 içeren biyomoleküllerle (lipid, protein, DNA) etkileşime girebilen kimyasal moleküllerdir. ROS kapsamına O_2^- (süperoksit anyonu), H_2O_2 (hidrojen peroksit) ve $\bullet OH$ (hidroksil radikali) gibi türler girmektedir. Moleküler oksijene göre daha fazla kimyasal reaktivite gösteren bu türler pek çok biyolojik süreci indükleyebilir. Her bir reaktif oksijen türü, sahip olduğu kimyasal özelliklere bağlı olarak özgül biyolojik hedeflerle etkileşime girer ve farklı derecelerde reaktivite sergiler. Süperoksit anyonu, hücresel oksidatif metabolizma sırasında, moleküler oksijenin tek bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan reaktif oksijen türüdür. Süperoksit anyonu (O_2^-), hücrelerde süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerinin etkisiyle kısa bir sürede hidrojen peroksit (H_2O_2) çevrilir. Hidrojen peroksit, hücresel sinyal iletim mekanizmalarını etkileyerek özellikle proteinlerin tiyol gruplarıyla etkileşim gösterebilir. Bu bağlamda sinyal iletiminde görev alan hidrojen peroksit miktarının düşük nanomolar düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir. Süperoksit anyonu hücre zarından difüze olamazken aksine hidrojen peroksit hücre zarından rahatlıkla difüze olabilmektedir. Bu özellik hidrojen peroksit'i önemli bir hücre içi sinyal iletim molekülü yapar. Fakat ortamdaki demir (Fe^{2+}) veya bakır (Cu^+) iyonlarının varlığı hidrojen peroksiti hidroksil radikale ($\bullet OH$) dönüştürebilir. Bu son derece reaktif radikal oksidatif hasar kapasitesiyle lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar vermektedir (Glasauer ve Chandel, 2013).

ROS'un proteinlere lipidlere ve DNA'ya zararının yanı sıra, kanser oluşumunun farklı basamaklarını regüle eden pro- veya anti-inflamatuvar moleküllerin salgılanmasını tetikleyerek inflamasyonda da önemli bir yer edinebilir (Poillet-Perez vd., 2015).

Yapılan birtakım çalışmalarda kanser hücrelerinin yüksek düzeydeki ROS'a karşı hassas hale gelebileceği ortaya konulmuştur. Özellikle glikolitik enzimlerin, kemoterapötiklerin veya radyoterapinin etkisiyle ATP tüketilmesine cevap olarak artan ROS miktarının kanser hücrelerinin duyarlılığını ve apoptozuna yönelimini klinik öncesi bulgulara artmış olduğu vurgulanmaktadır (Kim vd., 2016).

1.6. Rheum türleri ve *Rheum ribes*

Türkiye, coğrafi konumu, iklim yapısı nedeniyle tıbbi ve aromatik bitkiler bulunması konusunda oldukça önemli bir yerdedir (Boztas vd., 2021). Türkiye de geniş engebe arazilerin çoklukla bulunması, farklı yer şekillerinin bulunması endemik bitki çeşitliliğine yol açmaktadır. Endemik bitki bulundurma açısından Anadolu toprakları (Avrupa-Sibirya, Akdeniz-Ege, İran-Turan bölgelerinin kesişim noktası) dünya genelinde önemli yer kaplamaktadır. Anadolu coğrafyasında bulunan bitkilerin %30'u endemik türdür ve yaklaşık 3.800 farklı endemik bitki bulunmaktadır (Çelik, 2017). Dünya genelinde bitkiler; kozmetik, parfüm, sabun, diş macunu gibi alanların dışında sağlık alanında ve ilaç yapımında kullanılmaktadır (Erdoğan vd., 2025).

Doğal ve sentetik bileşikler sınıfında yer alan antrakınonların kullanım yelpazesi oldukça geniştir. Son yıllarda biyolojik etkiler gösterebilen yeni antrakınon türevlerinin bulunması ve geliştirilmesi oldukça önem kazanmıştır. *Rheum ribes*, *Rheum rhabarbarum*, *Frangula purshiana*, *Frangula alnus* ve *Aloe vera* gibi tüketilebilen bitkiler antrakınon açısından zengin olup halk arasında uzun süredir tıbbi olarak kullanılmaktadır (Gecibesler vd., 2021). Rheum cinsi (Polygonaceae) kısa ve kalın yer altı gövdelerinden büyüyen, yaklaşık 60 türü kapsayan çok yıllık otsu bitkilerden oluşur. Tarımsal geçmişi 5.000 yılı aşkın süre olan bu bitki, günümüzde ticari anlamda büyük önem taşımaktadır. Bazı Rheum türlerinin sapları; ravent tatlıları, kek, içecek gibi çeşitli tariflerde kullanılırken, rizom ve kökler tıbbi amaçla kullanılmakta olup farklı ülke ve bölgelerin farmakoterapötik ajanı olarak bilinmektedir (Yang vd., 2024).

Işkın (ışgın), Polygonaceae (kuzukulağıgiller) familyasına dahil olan, 40-150 cm boylarına kadar uzayabilen, 1000-4000 m rakımlarda, çoğunlukla dağlık ve engebeli arazilerde doğal olarak bulunan bir ravent çeşididir (Şekil 1.6). *Rheum ribes* türü, Türkiye florasında özellikle Doğu Anadolu bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bitki; Ağrı, Muş, Bitlis, Bingöl, Diyarbakır, Erzincan, Malatya, Elazığ, Tunceli, Hakkari, Van, Erzurum, Iğdır, Kars, Sivas, Adıyaman, Kahramanmaraş ve Hatay illerinde yayılım göstermektedir. Bölge halkı doğada bulunan yenilebilir bitkilerden yoğun bir şekilde faydalanmaktadır. Yörede bulunan halk ışkını doğadan toplayarak hem sebze olarak hem de halk hekimliğinde çeşitli tedaviler amacıyla kullanmaktadır (Yenikalaycı, 2023). İran'da halk hekimliğinde müsil ilacı ve sedef hastalığında ravent kökleri kullanılır. *R. ribes*'in genç dalları ve sapları, özellikle ishal durumlarında, mide rahatsızlıklarını gidermede ve kusmayı önlemede halk arasında çokça kullanılır. Ayrıca bitkinin bazı bölümlerinden elde edilen ekstrakt ise basur, kızamık, çiçek hastalığı ve safra üretiminin artırılmasında kullanılmaktadır. Bunlar dışında bu bitkinin kökleri; diyabet, hipertansiyon, obezite, ülser hastalıklarında da kullanılır. İran bölgesinde bulunan *R. ribes* bitkisinin kök, gövde ve yaprak ekstraktları incelendiğinde antimikrobiyal ve antibakteriyel aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır. Bunun dışında Herpes simpleks virüse karşı yüksek bir antiviral aktiviteye sahip olduğu yapılan araştırmalar sonucu ortaya konulmuştur (Öztürk vd., 2007).



Şekil 1.6. Işgın bitkisinin bahar aylarında doğada çekilmiş fotoğrafı (Yenikalaycı, 2023)

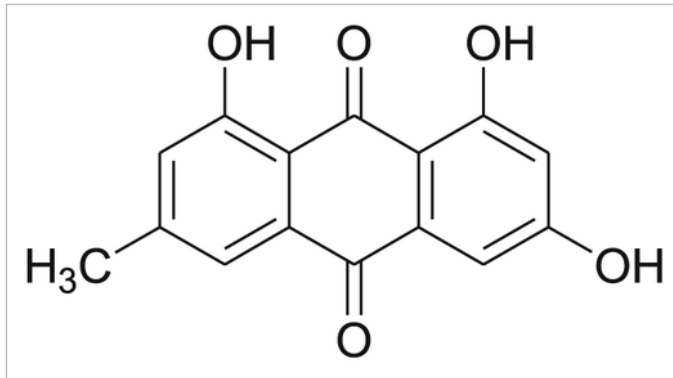
R. ribes Türkiye'de yetişen tek Rheum türüdür. Yapılan bir çalışmada Erzincan ilinden toplanan *R. ribes* bitkisinin köklerinden; krizofanol, fiskeyon, rehin, aloe-emodin,

fiskiyeon-8-O-glukoze, aloe-emodin-8-O- glukoze, sennoze A ve rapontisin elde edilmiştir. Aynı bitki Hakkari ilinden toplanıp üzerinde çalışma yapılmıştır ve krizofanol, fiskiyeon, emodin, kuersetin, 5-desoksikuersetin, kuersetin 3-O-galaktoze, kuersetin 3-O-rutinoze izole edilmiştir (Öztürk vd., 2007).

1.7. Emodin ve Aloe-Emodin

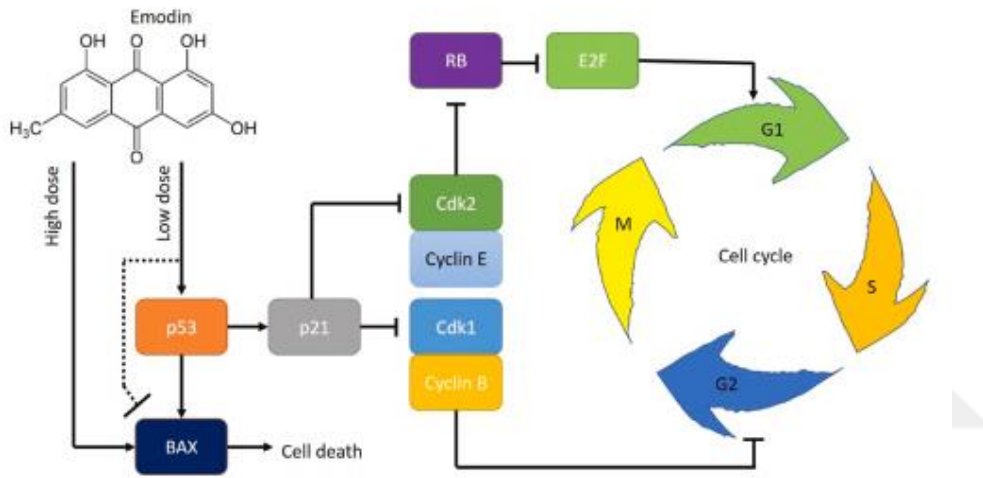
Emodin (1,3,8-trihidroksi-6-metilantrakinon), *Rheum palmatum*, *Polygonum cuspidatum*, *Aloe vera* ve *Rheum ribes* gibi bitkilerde doğal olarak varlığını gösteren bir antrakinon türevidir (Şekil 1.7). Son zamanlarda araştırmacılar emodinin farmakolojik etkisine odaklanmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu emodinin müsil özelliği sayesinde kilo kaybına yardımcı olmasının yanı sıra antiviral, antialerjenik, antiinflamatuvar, kanser önleyici etkisinin de olduğu belirlenmiştir (Dong vd., 2016).

Kanser hastalarında tedavi sonrası karşılaşılan en önemli sorunlardan biri tümör hücrelerinde çoklu ilaç direnci (MDR) ile ilişkili genlerin aşırı ekspresyonudur. Uygulanan kemoterapi ve radyoterapi, tümör hücrelerinde direnç mekanizmalarının aktifleşmesine neden olabilir. Emodin, bu direnç mekanizmalarının faaliyet gösterdiği sinyal yollarını inhibe ederek, hücrelerin tedaviye karşı duyarlılığını artırabilir. Emodinin kemoterapik veya radyoterapik tedaviler esnasında meydana gelen toksisiteye karşı koruyucu bir rol üstlendiği belirlenmiştir. Ayrıca emodin MDR ve HIF-1 α 'nın ROS aracılığıyla inhibisyonunu içeren yolları harekete geçirir (Hsu ve Chung, 2012).



Şekil 1.7. Emodinin kimyasal yapısı (Dong vd., 2016)

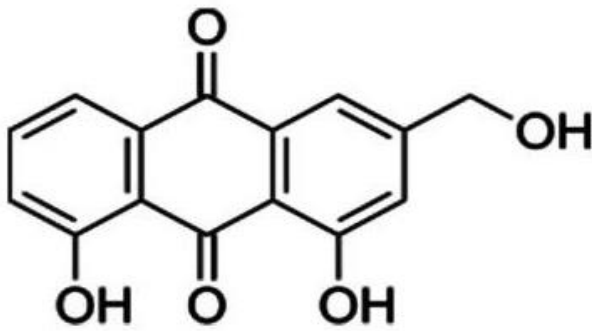
Yapılan çalışmalarda emodinin birçok kanser üzerinde olumlu sonuçlar gösterdiği görülmektedir. Osteosarkom hücre hattı olan U2OS kanser hücrelerinde p53'ü baskılama yoluyla apoptozu indüklediği görülmüştür. Doza bağlı olarak emodinin p53 ve p21'i inhibe ettiği doz yükseldikçe Cdk2, E2F ve Cdk1 ekspresyonunu azalttığı ve RB'yi arttırdığı ancak siklin E ve siklin B üzerinde bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca emodinin hücre döngüsü üzerinde etkisi olduğu da gözlemlenmiştir (Şekil 1.8). Veriler sonucunda emodinin G1/G0 fazında hücre sayısını azalttığı ve S/G2/M fazlarında hücre sayısını arttırdığı raporlanmıştır (Zhang vd., 2024).



Şekil 1.8. Emodinin hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki etki mekanizması (Zhang vd., 2024)

Aloe-emodin (1,8-dihidroksi-3-hidroksimetil-antrakinon), antrakinon türevi bir bileşik olup Çin tıbbında yaygın olarak kullanılan *cassia occidentalis*, *Rheum palmatum* L., *Aloe vera* ve *Polygonum multiflorum* Thunb gibi bitkilerden elde edilen bir bileşiktir (Şekil 1.9). Aloe-emodin, antiviral, antibakteriyal, anti-inflamatuar, antiparazitlik etkilerinin yanı sıra, akciğer, mide, karaciğer, melanom, meme, kolon kanseri hücreleri üzerinde güçlü antineoplastik etkiler göstermesi nedeniyle araştırma konusu haline gelmiştir (Dong vd., 2020b). Yapılan araştırmalar sonucu aloe-emodinin apoptozisin indüklenmesinde, hücre döngüsünün durdurulmasında, hücre dinamiklerindeki değişime etkisi, immün sinyal iletim yollarının düzenlenmesi gibi birçok antineoplastik etkisinin varlığı kanıtlanmıştır. Aloe-emodin mitokondriyal membran geçirgenliği veya oksidatif stres düzeyinde oluşan yıkıcı etkilere paralel olarak ekstrinsik (TNF-a ve FASL) ile intrinsik (sitokrom c/ kaspaz9)

apoptoz yollarını tetikleyerek kanser hücrelerinin canlılığını düşürmektedir. Bunun yanı sıra siklinler ve CDK (siklin bağımlı kinaz) ekspresyonunu azaltarak hücre döngüsünün durdurulmasını sağlar. Transkripsiyon faktörü aktivitesini baskılayan aloe-emodin, ayrıca çoğalma ve metabolizma ile ilişkili birçok hücrel sinyal proteinlerinde ekspresyon veya protein düzeyinde değişikliklere yol açmaktadır. Bu etkilere ek olarak aloe-emodin hücre göçü, invazyon ve hücrel yapışmayı modüle ederek tümör hücrelerinin büyüme potansiyelini baskılamıştır (Sanders vd., 2017).



Şekil 1.9. Aloe-emodin kimyasal yapısı (Sanders vd., 2017)

Yapılan birtakım çalışmalarda aloe-emodin *in vivo* tümör büyümesini baskılamasının yanı sıra kemoterapi direnci kazanmış kanser hücrelerinde de büyümeyi baskıladığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra aloe-emodin, DNA'ya zarar veren ve hücre döngüsünün durmasına sebep olan reaktif oksijen türlerini ürettiği yapılan deneylerle gösterilmiştir (Özenver vd., 2018).

Devamlı ve düzensiz seyreden anjiyogenez, kanser dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumların (oftalmik, dermatolojik, inflamatuvar) temeliyle ilişkilidir. Anjiyogenez kanserin temel özelliklerinden biri olup tümör gelişimi için oldukça önemlidir. Bu yüzden anjiyogenezin inhibe edilmesi kanser ve anjiyogeneze bağlı patolojik durumlar için önem teşkil etmektedir. Pro-anjiyojenik sinyallerin etkisiyle durağan durumda bulunan endotel hücreler aktive olup fenotipik değişime uğrarlar. Böylece proliferasyon yeteneği yüksek, migrasyon yapabilen yeni damar yapıları oluşturan yapıya dönüşürler. Yapılan çalışmalarda aloe-emodin endotel hücre proliferasyonunu önlediği ortaya konulmuştur.

Bunun yanı sıra aloe-emodin tümör hücresi çoğalmasını engellemekle kalmayıp hücre göçü ve invazyonunu da engellemektedir (Cárdenas vd., 2006).

Bu çalışmada *Rheum ribes* bitkisinden izole edilen emodin ve aloe-emodin monoterapik ve olaparib ile kombine etkileri olaparib dirençli U2OS insan osteosarkoma hücreleri (U2OS/PIR) üzerinde analiz edildi. Bu kapsamda mono- ve kombo- tedavi yaklaşımlarının olaparib direncine karşı etkinliği hücre canlılığı, izobologram analizi ile kombinasyon indekslerinin belirlenmesi, koloni oluşumu, VEGF ile anjiyogenezin belirlenmesi, ROS miktarının tayini, hücre göçünün değerlendirilmesi ve apoptoza yönelimin kolorimetrik olarak Kaspaz-3 ELISA ve CDDE (hücre ölümünün ELISA ile belirlenmesi) yöntemleri ile belirlenmesi analizleri gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular olaparib direncinin aşılmasında emodin ve aloe-emodin potansiyel etkilere sahip olduğu *in vitro* olarak ortaya konulmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser, 21. Yüzyılda yalnız sağlık alanında değil, toplumsal ve ekonomik alanda da ciddi etkiler yaratan bir sağlık sorunudur. Küresel ölümlerin yaklaşık %17'sinden bulaşıcı olmayan hastalıklara bağlı ölümlerin dörtte birinden sorumludur. Özellikle 30-69 yaş arasındaki bireylerde erken ölümlerin üçte birini oluşturmaktadır. 183 üklenin büyük çoğunluğunda bu yaş grubundan ilk üç ölüm nedeni olarak yer almaktadır. Kanserın yaşam süresini kısaltmasının yanında ekonomik yükü de oldukça fazladır. Bu ekonomik gider kanser türü, bölgesel farklılıklar ve cisiyete göre değişkenlik göstermektedir (Bray vd., 2024).

Kanser, genellikle belirgin semptomlar göstermeden ilerlediği için birçok hastaya ileri evrede tanı konulmaktadır. Bu durum, tedavilerin etkinliğini azaltmaktadır. Erken evrede spesifik belirtilerin olmaması ve düzenli kanser kontrollerine katılımın düşük olması teşhis sürecinde önemli aksaklıklara yol açmaktadır (Ginsburg vd., 2017).

Bilimsel gelişmeler sayesinde kanseri kontrol altına almak amacıyla tanı yöntemlerinin yanı sıra çeşitli ilaçlar geliştirilmiş ve bu hastalığın tedavisinde kısmen de olsa başarı sağlanmıştır (Chhikara vd., 2023).

Bitkiler, yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesinde önemli doğal kaynaklar olarak öne çıkmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde uzun süredir kullanılan bitkisel bileşikler, geleneksel ilaçların temelini oluşturmuştur. Tümör hücre döngüsünü düzenleyen yeni proteinlerin keşfiyle beraber, bitkilerden elde edilen doğal moleküllerin kanser karşıtı ilaç geliştirmede önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir (Bahmani vd., 2017).

Kanser hücrelerinin kemoterapik ilaçlara karşı direnç geliştirmesi tedavide büyük sorunlara yol açmaktadır. Kanser ilaçlarının çoğu yalnız tümör hücrelerini değil normal proliferatif hücrelere de etki etmektedir. Bu düşük özgüllük ciddi yan etkilere sebep olduğu için yüksek dozda ilaç uygulanmamaktadır. Sonuç olarak, dirençli tümör alt popölasyonları çoğalarak tümörün yeniden ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu tür dirençli hücreler zamanla tedaviye yanıt vermeyip hastalar açısından ölümcül sonuçlar doğurmaktadır. İlaç direncine

karşı kemoterapinin yanında bitkisel ekstraktların kullanılması kanser tedavisine yeni bir boyut kazandırmıştır (Efferth vd., 2017).

Tıbbi olarak değer taşıyan Rheum türleri, antrasen türevi bileşikler yönünden oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. *R. ribes*, İran'da kabızlık giderici ve eklem rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Polygonaceae familyası, Türkiye florasında sekiz cins ve yetmiş türle temsil edilse de, bu familyanın Türkiye'de doğal olarak yetişen tek üyesi *R. ribes*'tir. Türkiyenin yanı sıra Lübnan ve İranda da doğal olarak yetişen bu bitki halk arasında "İşgın", "Kürt Muzu" ve "Uçgun" olarak bilinmektedir (Erdoğan vd., 2020).

R. ribes kabızlık, sarılık, ülser gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakta olup son zamanlarda antibakteriyel, antioksidan, antikanser anti-anjiyogenez etkileriyle ön plana çıkmaktadır. *R. ribes*'in temel aktif bileşenlerinin emodin, aloe-emodin, rhein, krizofanol, fizyon ve dantron gibi antrakininon türevleri bileşikler olduğu bilinmektedir (Hu vd., 2014).

Emodin insan akciğer kanseri (CH27) hücrelerinde inhibitor etki göstermiştir. İnsan promiyeloleukemik (HL-60) hücrelerinde ROS üretimine bağlı olmadan Kaspaz-3 kaskadının aktive ederek apoptozu tetiklemektedir. Emodin insan hepatoma hücre hatlarında (HepG2/C3A, PLC/PRF/5 ve SK-HEP-1) p53 proteinine bağlı olarak apoptozu indüklemektedir. Ayrıca emodin reaktif oksijen türlerinin üretimini teşvik edip hücre yaşam sinyallerini baskılayarak arsenik trioksit ile indüklenen apoptozu indükler. Buna ek olarak emodin, insan kolon kanseri hücrelerinde VEGF reseptörlerinin aktivasyonunu baskılar (Hsu ve Chung, 2012).

Aloe-emodin birçok ülkede ilaç olarak kullanılmaktadır. Günümüzde özellikle antineoplastik etkisiyle ön plana çıkmaktadır. Özellikle akciğer, mide, karaciğer, meme ve kolon kanseri hücrelerinde etkisi oldukça fazladır. Farmakolojik etkileri oldukça fazla olup influenza virüsü, inflamasyon, sepsis, Alzheimer hastalığı, sıtma, karaciğer fibrozu, sedef hastalığı, tip 2 diyabet, büyüme bozuklukları ve birçok kanser türlerinin tedavisinde kullanılmıştır (Dong vd., 2020a). Aloe-emodin çeşitli insan kanseri hücrelerinde güçlü antiproliferatif ve antikanser özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. En göze çarpan etkileri arasında hücre çoğalması, migrasyonu ve invazyonunun baskılanması; hücre siklusunun durdurulmasıdır. Bunlara ek olarak apoptozun tetiklenmesi, mitokondriyal membran

potansiyelinin bozulması, oksidatif dengeyi etkileyen redoks bozuklukları ve bağışıklık sinyallenmesi aloe-emodin'in etkileri arasında yer alır (Sanders vd., 2017).



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmalarda olaparıb direnci kazandırılmış osteosarkom hücre hattı (U2OS/PIR) kullanıldı. Yapılan tüm analizler Bingöl Üniversitesi Kanser Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Kullanılan tüm kimyasal, sarf malzemeler ve kitler ticari olarak satın alındı. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

MALZEMELER	MARKA	KATALOG NUMARASI
DMEM	SIGMA	D6429
dPBS	GIBCO	14190094
Trypsin-EDTA	Biological Industries	03050
10% Fetal Bovine Serum (FBS)	GIBCO	10270106
1% penisilin (64 µg/mL) / streptomisin (100 µg/mL)	GIBCO	15140122
Tripan mavisi	Thermo Fisher	15250061
Aquaguard 1	Biological Industries	018671B
CO ₂ inkübatörü	ESCO	CCL170B8
Otoklav	HIRAYAMA	HVE-50
Santrifüj	Weightlab Instruments	WN-CL6500
Hücre kültürü flask: 75 cm ²	NEST	708003
Hücre kültürü kapları: 60x18mm	LABSOLUTE	7696771

Biyogüvenlik kabini	ESCO Class II	-
Mikropipet	ISO Lab	-
Mini çalkalayıcı	ISO Lab	61311001
Mikrosantrifüj tüpleri	ISOLAB	S.078.03.002.500
Spektrofotometre	Shanghai Metash	UV-5100
Serolojik pipet	Lab Marker	10082019
Sıcak su banyosu	Thermomax	201910103425
Thoma lamı	Thoma ISO Lab	-
Invert Mikroskop	Motic	AE2000
Hassas terazi	ISO Lab	S1909002
Metanol	MERCK KGaA	1.06007.2500

Tüm örnekler ve reaktifler uygun şekilde hazırlanarak ve olması gereken koşullarda saklandı (SEG, Derin Dondurucu -20 °C / Vestel, Derin Dondurucu -86 °C / Buzdolabı 2-8 °C / SEG Nuair Glacier NU-9668GC).

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Materyali

Bingöl iline bağlı yelesen köyünün doğal alanlarında 2.000 m ve üzerindeki rakımlarda yetişen *R. ribes* örnekleri Nisan-Mayıs aylarında çiçeklenme döneminden sonra toplanmıştır. Bitki toplama işlemleri, doğal ekosisteme zarar vermeden gerçekleştirilmiştir. Tür teşhisi Alpaslan Koçak tarafından yapılmış olup, örnek herbaryumda KOÇAK 4003 numarası ile kayıt altına alınmıştır. Uygun koşullarda sahadan alınan *R. ribes* örnekleri

baskısız kâğıt üzerine serilerek gölgeli ve nemli bir ortamda kurutulmuş, ardından laboratuvar tipi değirmende 3 cm'yi aşmayacak boyutta öğütülmüştür (Erdoğan vd., 2020).

3.2.2. Ekstraksiyon, Fraksiyonlama ve İzolasyon İşlemleri

Beş kilogram kurutulup öğütülmüş bitki örneği cam balona konmuş ve üzerine 10,0 L metanol: kloroform (1:1; v/v) çözücü karışımı ilave edilmiştir. Örnek, laboratuvar ortamında iki gün ekstraksiyona bırakıldıktan sonra, ikinci günün sonunda elde edilen ekstrakt, Whatman no.4 filtre kâğıdı ile süzölmüş ve geriye kalan bitki posası aynı çözücü sistemi ile tekrar ekstrakte edilmiştir. Bu işlem üç kez daha tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen tüm ekstraktlar birleştirilmiş, içeriklerindeki çözücüler 35 °C'de, vakum altında rotary evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Çözücülerin uzaklaştırılması sonucunda 523,8 g kuru ekstrakt elde edilmiş olup, bu miktar %10,476 verime karşılık gelmektedir. Elde edilen kuru ekstrakt, antikanser aktivite ve izolasyon çalışmaları için kehribar renkli şişelerde +4 °C'de muhafaza edilmiştir. İzolasyon amacıyla, metanol: kloroform kuru ekstraktından 50 g alınarak 1 L distile suda çözüldükten sonra sulu ekstrakt, kloroform ile (8 x 0,6 L) fraksiyonlanmış ve fraksiyonasyonun sonunda rotary evaporatör ile çözücünün uzaklaştırılmasıyla 15,63 g kuru kloroform ekstraktı elde edilmiştir. İzolasyon işlemlerine bu fraksiyon üzerinden devam edilmiştir. Flash kromatografi sistemi için, sephadex LH-20 kolon dolgu materyali içeren (5x60 cm) ebatlarında farmasötik cam kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak metanol:kloroform (35:65; v/v) çözücü sistemi tercih edilmiş ve elüsyon koşulları dakikada 2 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Her biri 10 mL hacminde olmak üzere toplam 126 alt fraksiyon elde edilmiştir. Kromatografik ayırım sonucunda, sırasıyla 37. alt fraksiyonda 68 mg emodin ve 75. alt fraksiyonda 56 mg aloe-emodin izole edilmiştir (Erdoğan vd., 2020).

3.2.3. Memeli Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında yapılan analizler için memeli hücre kültürü araştırmalarında U2OS/PIR hücre hattı kullanıldı. Hücreler %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 64 µg/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin ile desteklenen DMEM/F12 (Dulbecco Modified Eagle Medium) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre

kültür inkübatöründe çoğaltıldı. Tüm hücre kültürü çalışmaları GCCP (Good Cell Culture Practice) aseptik standartlarına uygun bir şekilde gerçekleştirildi.

3.2.4. Olaparib Dirençli U2OS Hücrelerinin Geliştirilmesi

Olaparib dirençli U2OS hücre klonları, U2OS hücrelerinin literatür araştırmalarıyla belirlenen IC₅₀ olaparib konsantrasyonlarına maruz bırakılmasıyla geliştirildi. Deneysel prosedürde sürekli seçim tekniğini kullandı (Edwards vd., 2008). U2OS hücreleri başlangıçta 60 mm kültür kaplarına ekildi ve bir hafta boyunca 1 µM olaparib ile tedavi edildi. Daha sonra hücreler toplandı ve 2×10^5 hücre olacak şekilde yeniden 60 mm kültür kaplarına ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler tekrar beş gün boyunca 1 µM olaparib ile tedavi edildi. Bu işlem, her beş günde bir artan olaparib konsantrasyonlarıyla tekrarlandı ve sonuçta olaparibe karşı direnç kazanmış olan U2OS hücre hattı (U2OS/PIR) oluşturuldu. U2OS/PIR hücre hattının direnci, hücre canlılığı ve koloni sağkalım deneyleriyle doğrulandı ve olaparib direncinin başarılı bir şekilde oluşturulduğu doğrulandı. Elde edilen U2OS/PIR hücreleri yapılacak çalışmalar için -80 °C'de saklandı.

3.2.5. WST-1 Hücre Canlılığı Analizi

Hücre canlılığı analizi, WST-1 hücre proliferasyon ve sitotoksosite test kiti (Boster) kullanılarak üretici protokollerine göre gerçekleştirildi. Kısaca, 96 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 5×10^3 hücre / kuyucuk olacak şekilde U2OS/PIR hücreleri ekildi. 37 °C, %5 CO₂ koşullarında gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücreler 72 saat süreyle artan konsantrasyonlarda (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 ve 250 µM) olaparib, emodin veya aloe-emodin ile tedavi edildi. Bu sürenin sonunda ortamda bulunan DMEM aspire edilip taze DMEM eklendi ve her kuyucuğa 10 µL WST-1 reaktifi ilave edildi. 3 saat inkübe edildikten sonra metabolik olarak aktif hücreler tarafından üretilen çözünür formazan boyasının miktarı ELISA mikroparka okuyucu (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices) kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri üzerinden ölçüldü. Hücre bulunmayan WST-1 reaktifi ve DMEM karışımı background kontrol olarak değerlendirildi. Elde edilen absorbans değerlerinden background kontrol değerinin çıkarılması ve tedavi uygulanmayan hücrelerin absorbans değerlerine oranlanması ile %

hücre canlılığı değerleri hesaplandı ve IC₅₀ (maksimum inhibitör konsantrasyonunun yarısı) değerleri belirlendi.

3.2.6. İzobologram Analizi İle Sinerjizmin Değerlendirilmesi

96 kuyucuklu mikropiakanın kuyucuklarına 5×10^3 hücre / kuyucuk olacak şekilde U2OS/PIR hücreleri ekildi ve bir gece kültür koşullarında inkübasyondan sonra, 20'şer, 40'ar ve 80'er μM olaparib + aynı konsantrasyonlarda emodin veya konsantrasyonlarda olaparib + konsantrasyonlarda aloe-emodin tedavisi uygulandı. 72 saatlik tedavinin ardından kuyucuklar aspire edildi, kuyucuklara taze besiyeri ve 10 μl WST-1 reaktifi eklendi. 3 saat inkübasyon süresinin ardından 450 nm dalga boyunda mikropiaka ELISA okuyucu cihazı ile absorbanslar ölçüldü ve yüzde sitotoksite değerleri hesaplandı. İzobologram analizi, kombine tedavide iki bileşik veya ilaç arasındaki sinerjizmin belirlenmesini sağlar. Olaparib ile emodin ve aloe-emodin arasındaki etkileşim, CompuSyn programı kullanılarak izobologram ve medyan etki denklemi yöntemiyle kombinasyon indeksi (CI) değerleri kullanılarak belirlendi. CI <1, =1 ve >1 sırasıyla sinerjiyi, aditif etkiyi ve antagonizmi gösterir (Chou, 2006).

3.2.7. 2D Koloni Sağ Kalım Analizi

Hücre koloni formasyon deneyleri (Gomez vd., 2015; Erdoğan vd., 2021)'de belirtilen yöntemler esas alınarak yapıldı. Her bir 6 cm çapındaki steril hücre kültürü petri kaplarına $1,5 \times 10^3$ U2OS/PIR hücrelerinin ekimi yapıldı. Hücreler, ekimden bir gün sonra çeşitli konsantrasyonlarda olaparib, emodin veya aloe-emodin ile mono- ve kombo- tedavi olacak şekilde 72 saat süreyle muamele edildi. Tedavinin ardından besiyerleri aspire edildi ve %5 CO₂ ve %95 nem içeren, 37 °C'de sabitlenmiş kültür inkübatöründe 10-12 gün boyunca inkübe edildi. Besiyeri, 3-4 gün aralıklarla yenilendi ve ardından hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri mikroskop altında incelendi. Deney, kolonilerin arasında temas oluşmaması ve her koloninin en az elli hücre içermeleri esasına dayanılarak sonlandırıldı. Hücre kültürü flakslarındaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS (-Mg/-Ca) çözeltisiyle yıkama işlemi gerçekleştirildi. Takiben, hücrelerin fiksasyonu 5 dakika süreyle metanol-asetik asit (3:1) çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Fiksasyonun ardından, metanol içerisinde hazırlanmış kristal viyole boyası ile 15 dakika boyama gerçekleştirildi. Boyama

sonrası flasklar dikkatlice su altında yıkanarak koloniler mikroskop altında incelenip sayıldı. Koloni tanımı, minimum elli hücre içermesine dayandırıldı. Kontrol grubu dahil bütün gruplar en az iki tekrarla üç bağımsız deneyle incelendi ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.8. Anti-anjiyogenik Etkinin İncelenmesi (Hu-VEGF Analizi)

Uygulanan tedavilerin anjiyogenez üzerindeki etkisi, Human VEGF-A ELISA kiti (YL Biotech) kullanılarak üretici protokollerine göre gerçekleştirilen analizler sonucunda belirlendi. Özetle, 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 3×10^4 U2OS/PIR hücresi ekildikten sonra hücreler standart inkübasyon koşulları altında bir gece bekletildi. Daha sonra hücreler 72 saat boyunca olaparib, emodin veya aloe-emodinün IC₅₀ konsantrasyonu ile mono-terapiye, olaparib + emodin veya olaparib + aloe-emodin ile kombo-terapiye maruz bırakıldı. Tedavi süresinin tamamlanmasının ardından, ortamda bulunan DMEM aspire edildi ve hücreler, soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler tripsinizasyon işleminden sonra toplanarak 50 µL taze DMEM konulmuş tüplere aktarıldı. Ardından, 50 µL inkübasyon tamponu, tedavi uygulamış hücreleri barındıran 50 µL DMEM ve 50 µL standart seyreltici tampon, 96 kuyucuklu mikropakanın 8 kuyucuklu şerit plakalarına ilave edildi. Oda sıcaklığında 2 saatlik inkübasyonun ardından kuyucuklar 4 kez yıkama tamponuyla yıkandı ve 100 µL Hu-VEGF biyotin konjugatı ilave edildi. Hu-VEGF biyotin konjugatı ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Çözelti uzaklaştırıldıktan sonra tekrar dört kez kuyucuklar yıkama tamponuyla yıkandı. Ardından her kuyucuğa 100 µL streptavidin-HRP çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklardaki çözelti aspire edildi ve kuyucuklar 4 defa 1X yıkama tamponuyla yıkandıktan sonra kuyucuklara 100 µL stabilize kromojen çözeltisi eklendi ve 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon tamamlandıktan sonra kuyucuklara 100 µL durdurma çözeltisi (stop solution) ilave edildi ve çözelti homojenize edildi. 2 saatlik inkübasyondan sonra 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri ELISA mikropaka okuyucu ile gerçekleşti. Ölçülen değerler standart eğri grafiğiyle karşılaştırıldı ve her tedavi grubunun VEGF miktarları kontrol grubuna kıyasla % değişim olarak değerlendirildi.

3.2.9. ROS Analizi

Hücrelerdeki reaktif oksijen türleri düzeylerinin ölçümü DCFH-DA (Sigma-Aldrich) probu ile analiz edildi. U2OS/PIR hücreleri, 96 kuyucuklu mikrolakaya 2×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekilerek bir gece inkübasyona alındı. Sonrasında 72 saatlik olaparib, emodin veya aloe-emodin IC_{50} konsantrasyonu ile mono-terapi, olaparib + emodin veya olaparib + aloe-emodin ile kombo-terapi uygulanıp her bir kuyucuğa 10 μM 'lik son konsantrasyona seyreltilmiş 120 μL DCFH-DA probu eklendi ve plakalar 37 °C ve %5 CO_2 'de 40 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Ardından çözelti uzaklaştırılarak absorbands, ELISA mikrolaka okuyucu aracılığıyla 505 nm dalga boyunda kaydedildi. H_2O_2 ile muamele edilen grup pozitif kontrol grubunu oluşturdu. Ölçülen ROS seviyeleri, tedavi görmeyen kontrol grubuyla kıyaslanarak kat cinsinden değişim olarak verildi.

3.2.10. Hücresel Migrasyon (Yara-Kapanma) Analizi

Yara-kapanma analizi (wound healing assay) aracılığıyla tedaviye maruz bırakılan kanser hücrelerinin göç (migrasyon) kapasiteleri değerlendirildi (Jonkman vd., 2014). Hücreler 6 kuyucuklu hücre ekim plakalarına 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve yüzeyin hücreler tarafından tek katman şeklinde tamamen kaplanması beklenildi. Daha sonra, plaka yüzeyi 1000 μL 'lik steril bir pipet ucu kullanılarak çizildi ve hücre kalıntılarını ortadan kaldırmak için kuyucuklar PBS ile yıkandı. Hücrelere olaparib, emodin veya aloe-emodin IC_{50} konsantrasyonu ile mono-terapi, olaparib + emodin veya olaparib + aloe-emodin ile kombo-terapi uygulandı. Oluşturulan çizik alanının 0., 12. ve 24. saatlerdeki kapanma oranları mikroskop altında fotoğrafları çekilerek kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı ve % yara açıklıkları belirlendi.

3.2.11. Kaspaz-3 ELISA Analizi

Apoptozun önemli bir belirteci olan hücresel kaspaz-3 düzeyi, Kaspaz-3 kolorimetrik analiz kiti (BioVision Research Products) kullanılarak üretici protokollerine göre gerçekleştirildi. İlk olarak, U2OS/PIR hücreleri 2×10^5 hücre / kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Bir gece kültür koşullarında inkübasyonun ardından hücreler

olaparib, emodin veya aloe-emodinun IC₅₀ konsantrasyonu ile veya olaparib + emodin ve olaparib + aloe-emodin ile tedavi edildi. Daha sonra medium aspire edildi ve kuyucuklar PBS ile yıkandı. Ardından hücreler tripsinize edilerek toplandı ve santrifüjasyonu takiben pellete proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren soğuk lizis tamponu eklenerek santrifüjlendi. 50 µL süpernatant, 50 µL 10 mM ditiyotritol (DTT) ile karıştırıldı ve 30 dakika buz üstünde bırakıldı. Daha sonra, bu karışım 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Her bir kuyucuğa 5 µL 4 mM DEVD-pNA substratı eklendi ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 405 nm'de ELISA mikrolaka okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü. Kaspaz-3 miktarlarındaki değişim kontrol grubu ile kıyaslanarak kat cinsinden hesaplandı.

3.2.12. CDDE Yöntemi İle Apoptozun Belirlenmesi

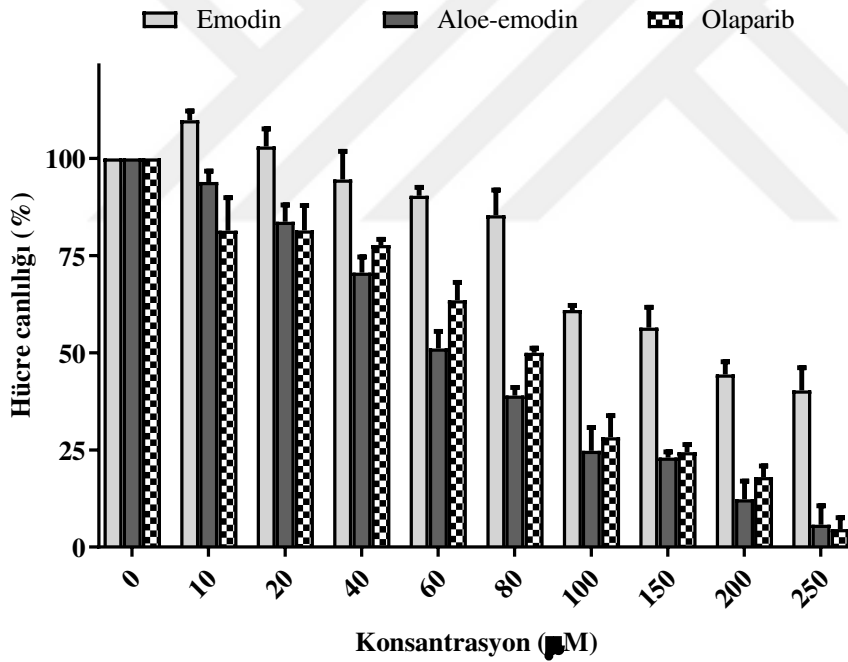
Hücre ölümünün ELISA ile belirlenmesi (CDDE) yöntemi, apoptotik hücre ölümüyle ortaya çıkan sitoplazmik histonun *in vitro* kalitatif ve kantitatif analizini sağlar. Apoptozun belirlenmesi daha önce açıklanan yöntemle göre gerçekleştirildi (Erdoğan vd., 2021). Özetle, hücreler tripsinize edildi ve 72 saatlik tedaviden sonra lizis gerçekleştirildi. Ardından, süpernatantlara anti-histon ve anti-DNA peroksidaz (POD) antikorları eklendi ve absorbanslar 405 nm'de okundu. Tedavi edilen grubun absorbansı, kontrol grubunun absorbansına bölündü ve apoptotik bir belirteç olan zenginleştirme faktörleri hesaplandı.

3.2.13. İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler en az üç tekrar olacak şekilde yapıldı ve standart sapma değerleri hesaplandı. İstatistiksel analizler GraphPad Prism (GraphPad Software) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular t-testi ve One-Way Anova testi ile değerlendirildi ve bulgular ortalama $\pm$ SD olarak verildi. P değeri <0,05 (*), <0,01 (**) ve <0,001 (***) olan bulgular anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

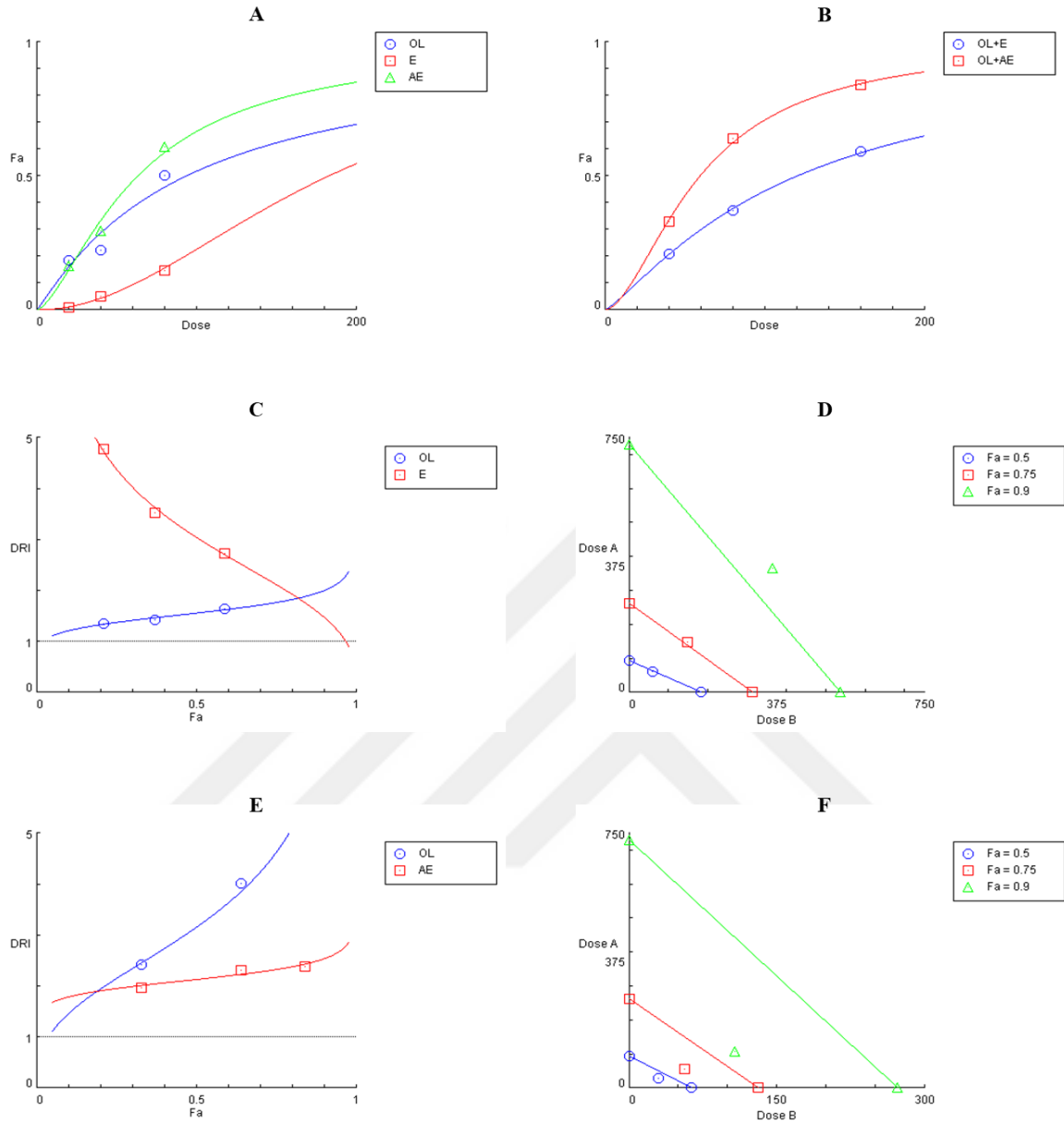
Şekil 4.1’de gösterildiği gibi U2OS/PIR hücreleri üzerinde *R. ribes*’ten izole edilen emodin ve aloe-emodin konsantrasyon bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı görüldü. Özellikle aloe-emodin uygulanan grupta en yüksek konsantrasyon olan 250 μM ’lık tedavinin hücre canlılığını % 94,2 oranında azalttığı belirlendi. Emodin tedavisinin ise 80 μM konsantrasyona kadar hücre canlılığı üzerindeki etkisi düşük düzeyde kalırken, 100 μM ve üstü konsantrasyonlarda daha etkili olduğu görüldü. IC_{50} değerleri emodin, aloe-emodin ve olaparib için sırasıyla $164,29 \pm 10,51 \mu\text{M}$, $62,54 \pm 5,24 \mu\text{M}$ ve $74,16 \pm 2,25 \mu\text{M}$ olarak belirlendi.



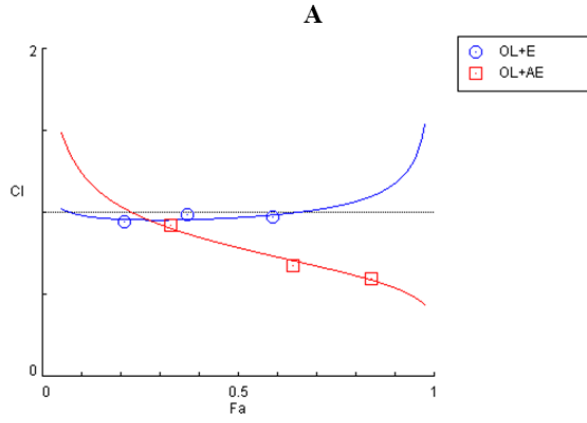
Şekil 4.1. Hücre canlılığı bulguları. U2OS/PIR hücreleri artan konsantrasyonlarda emodin, aloe-emodin veya olaparib ile 72 saat süreyle tedavi edildi ve WST-1 hücre canlılığı analizleri gerçekleştirildi.

Emodin ve aloe-emodin, olaparib ile aralarındaki etkileşimi değerlendirmek amacıyla, 20 μM , 40 μM ve 80 μM olaparib + aynı konsantrasyonlarda olacak şekilde emodin veya aloe-emodin (1:1) ile tedavi edilen U2OS/PIR hücrelerinin canlılık analizi bulguları kullanılarak CompuSyn programı aracılığıyla izoblogram analizleri gerçekleştirildi. Şekil 4.2 olaparib, emodin ve aloe-emodin mono- ve kombo- terapilerine ait doz-etki

grafiklerini (Doz-Fa), DRI (doz-azaltma indeksi) grafiklerini ve izobologram bulgularını göstermektedir. Şekil 4.2.A'da görüldüğü gibi aloe-emodin ile 20 μ M, 40 μ M ve 80 μ M konsantrasyonlarda tedavinin U2OS/PIR hücreleri üzerinde aynı konsantrasyonlarda olaparıb tedavisine yakın veya daha etkili bir sitotoksik etkiye sahip olduğu, emodinin ise sitotoksik etkisinin diğer iki ajana göre düşük kaldığı gözlemlendi. Şekil 4.2.B ise kombine olaparıb tedavisi uygulanan U2OS/PIR hücreleri üzerinde aloe-emodinin emodine kıyasla daha etkili olduğu görülmektedir. DRI >1 değeri olumlu/uygun doz azalmasının gerçekleştiğini gösterirken, DRI değerinin =1 ve <1 olması sırasıyla olumlu/uygun ilaç doz azalmasının gerçekleşmediğini ve olumlu/uygun olmayan ilaç doz artışının gerçekleştiğini gösterir. Şekil 4.2.C, Şekil 4.2.E, Şekil 4.3.B ve Şekil 4.3.C test edilen hem olaparıb+emodin hem de olaparıb+aloe-emodin tedavilerinin her üç konsantrasyonda da DRI değerlerinin DRI >1 olduğunu göstermektedir (Chou, 2006). Bu bulgular emodin ve aloe-emodinin U2OS/PIR hücrelerinde etkili olabilecek olaparıb dozunu azalttığını ortaya koymaktadır. Şekil 4.2.D, Şekil 4.2.F, Şekil 4.3.B ve Şekil 4.3.C, her bir ajan için %90 (Fa 0,9), %75 (Fa 0,75) ve %50 (Fa 0,5) inhibisyon için gereken konsantrasyonları ifade eden izobologram grafiklerini ve değerlerini göstermektedir. Fa değerlerine göre aloe-emodinin emodine kıyasla olaparıble kombine kullanımda daha etkili bir aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Şekil 4.3.A, 4.3.B ve 4.3.C olaparıb + emodin ve olaparıb + aloe-emodin kombinasyonlarına ait kombinasyon indekslerini (CI) göstermektedir. CI <1 sinerjizmi gösterdiğinden (Chou, 2006), her iki kombinasyonun üçer konsantrasyonunun da (20 μ M, 40 μ M ve 80 μ M olaparıb + aynı konsantrasyonda emodin veya aloe-emodin) sinerjik etkileşimlere sahip olduğu görülmektedir. 20'şer μ M olaparıb + emodin, 40'ar μ M olaparıb + emodin ve 80'er μ M olaparıb + emodin tedavileri sonucunda CI değerleri sırasıyla 0,95, 0,99 ve 0,97 olarak belirlendi. Bu değerler U2OS/PIR hücrelerinde emodinin olaparıb ile az-sinerjim ve aditif etkiye sahip olduğunu göstermektedir. 20'şer μ M olaparıb + aloe-emodin, 40'ar μ M olaparıb + aloe-emodin ve 80'er μ M olaparıb + aloe-emodin tedavileri sonucunda ise CI değerleri sırasıyla 0,92, 0,68 ve 0,60 olarak hesaplandı. Bu bulgular ise aloe-emodinin olaparıb ile özellikle yüksek konsantrasyonlar sinerjizm sergilediğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.2. U2OS/PIR hücrelerinde sinerjizmin belirlenmesi için gerçekleştirilen izobologram analizi bulguları. A. Olaparib, emodin ve aloe-emodin mono-terapi uygulamalarına ait doz-etki grafiği. B. Olaparib+emodin veya olaparib+aloe-emodin kombine tedavilerinin doz-etki grafiği. C. Olaparib ile emodin DRI değerlerini gösteren grafik. D. Olaparib ve emodin için %90 (Fa 0,9), %75 (Fa 0,75) ve %50 (Fa 0,5) inhibisyon için gereken konsantrasyonları gösteren izobologram grafiği. E. Olaparib ile aloe-emodin DRI değerlerini gösteren grafik. F. Olaparib ve aloe-emodin için %90 (Fa 0,9), %75 (Fa 0,75) ve %50 (Fa 0,5) inhibisyon için gereken konsantrasyonları gösteren izobologram grafiği. OL; olaparib, E; emodin, AE; aloe-emodin



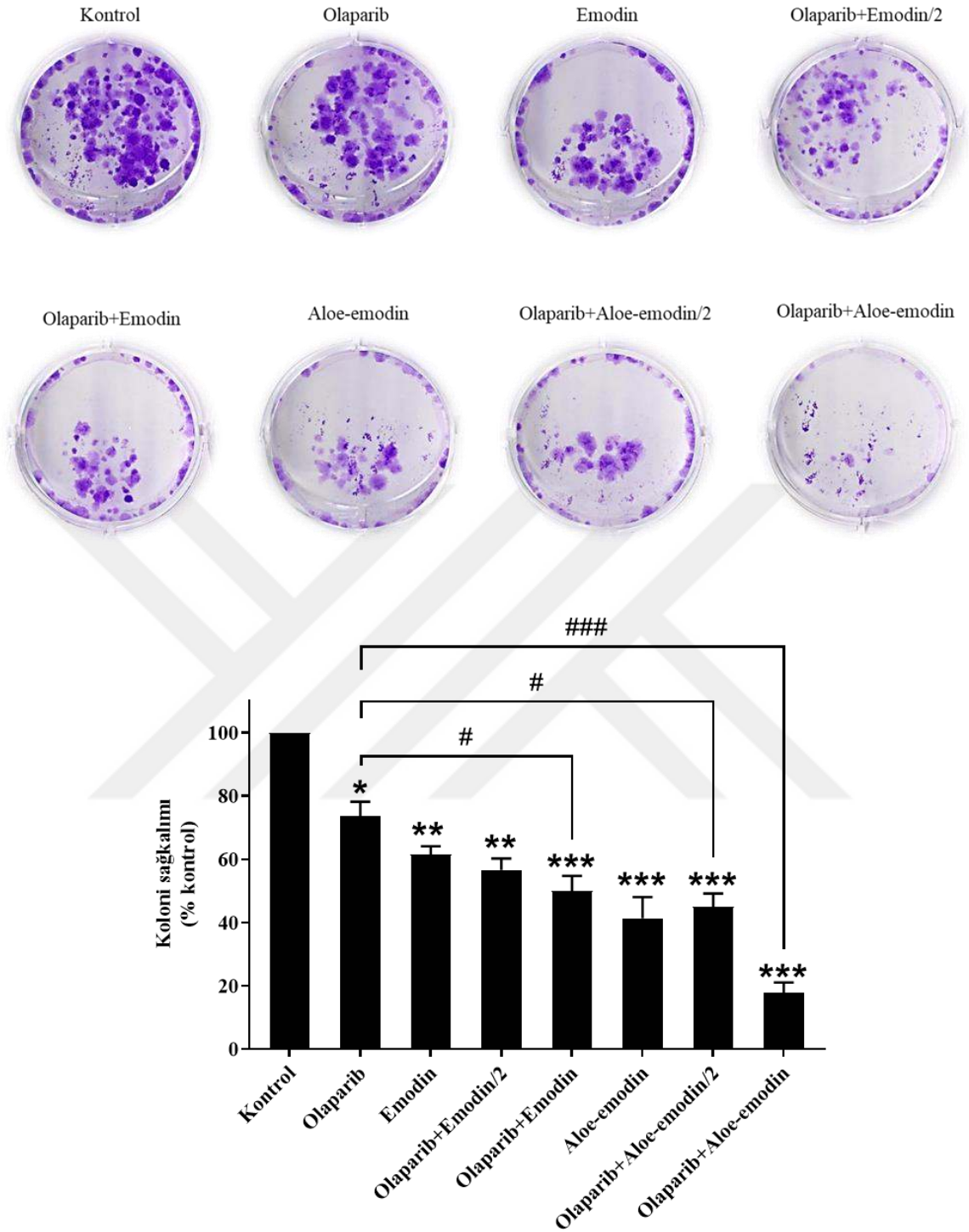
B

Emodin (μM)	20	40	80
Olaparib (μM)	20	40	80
Fa	0.21	0.37	0.59
CI	0.95	0.99	0.97
DRI (Emodin)	4.78	3.52	2.73
DRI (Olaparib)	1.36	1.42	1.65

C

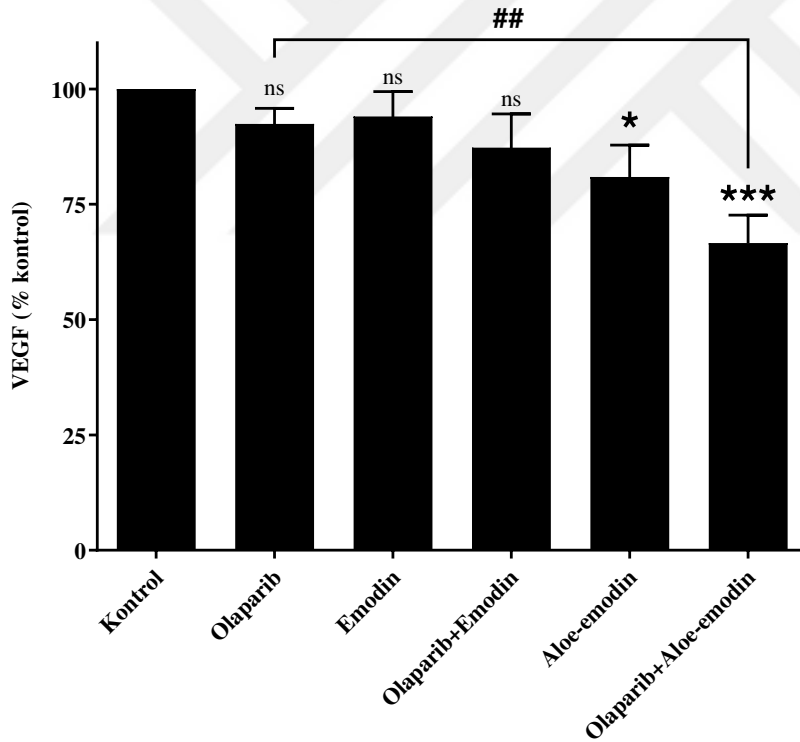
Aloe-emodin (μM)	20	40	80
Olaparib (μM)	20	40	80
Fa	0.33	0.64	0.84
CI	0.92	0.68	0.60
DRI (Aloe-emodin)	1.97	2.32	2.38
DRI (Olaparib)	2.42	4.01	5.52

Şekil 4.3. Kombinasyon indeksi bulguları. A. Olaparib ile emodine veya aloe-emodin kombinasyonu tedavisi uygulanan U2OS/PIR hücreleri için Kombinasyon indeksi (CI) grafiği. B. ve C. Sırasıyla emodin ve aloe-emodin 20, 40 ve 80 μM olaparib ile kombinasyonuna (1:1) ait Fa, CI ve DRI değerleri. OL; olaparib, E; emodin, AE; aloe-emodin



Şekil 4.4. Koloni sağkalımı analizi bulguları. U2OS/PIR hücreleri 7,5 μ M olaparib, 15 μ M emodin, 7,5 μ M olaparib + 7,5 μ M emodin (olaparib + emodin/2), 7,5 μ M olaparib + 15 μ M emodin (olaparib + emodin), 15 μ M aloe-emodin, 7,5 μ M olaparib + 7,5 μ M aloe-emodin (olaparib + aloe-emodin/2) veya 7,5 μ M olaparib + 15 μ M aloe-emodin (olaparib + aloe-emodin) ile tedavi edildi. Tedavi sonrası oluşan koloni sayıları belirlendi ve sonuçlar kontrol grubuna kıyasla % koloni sağkalımı olarak değerlendirildi. Kontrol ile kıyaslandığında; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Olaparib monoterapisi uygulanan hücrelerle kıyaslandığında; # p < 0,05, ### p < 0,001

Uygulanan tedavilerin U2OS/PIR hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesi üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi için koloni sağkalımı analizi gerçekleştirildi. Hücrelere 7,5 μ M olaparib, 15 μ M emodin, 7,5 μ M olaparib + 7,5 μ M emodin (olaparib + emodin/2), 7,5 μ M olaparib + 15 μ M emodin (olaparib + emodin), 15 μ M aloe-emodin, 7,5 μ M olaparib + 7,5 μ M aloe-emodin (olaparib + aloe-emodin/2) veya 7,5 μ M olaparib + 15 μ M aloe-emodin (olaparib + aloe-emodin) tedavileri uygulandı. Bu tedavilerin sonucunda koloni sağkalımının kontrol grubuna göre önemli ölçüde baskılandığı görüldü (Şekil 4.4). Olaparib ile tedavi edilen grupla kıyaslandığında, olaparib + emodin ve olaparib + aloe-emodin/2 tedavileri uygulanan gruplarda koloni oluşumunun anlamlı şekilde azaldığı ($p < 0,05$), olaparib + aloe-emodin uygulanan hücrelerin ise koloni oluşturma kapasitelerinin çok anlamlı oranda ($p < 0,001$) baskılandığı gözlemlendi.

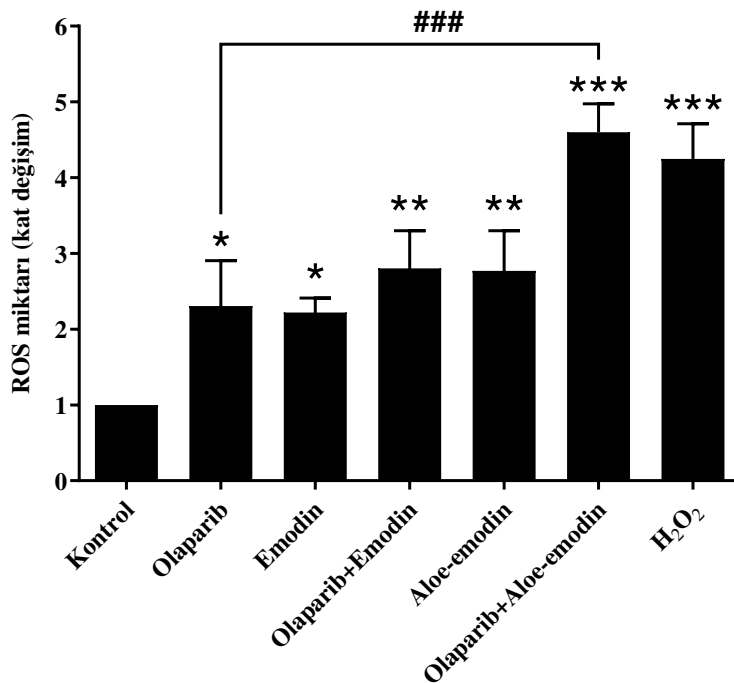


Şekil 4.5. U2OS/PIR hücrelerinde tedaviye bağlı % VEGF miktarları. Kontrol ile kıyaslandığında; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns, anlamlı değil. Olaparib monoterapisi uygulanan hücrelerle kıyaslandığında; ## $p < 0,01$

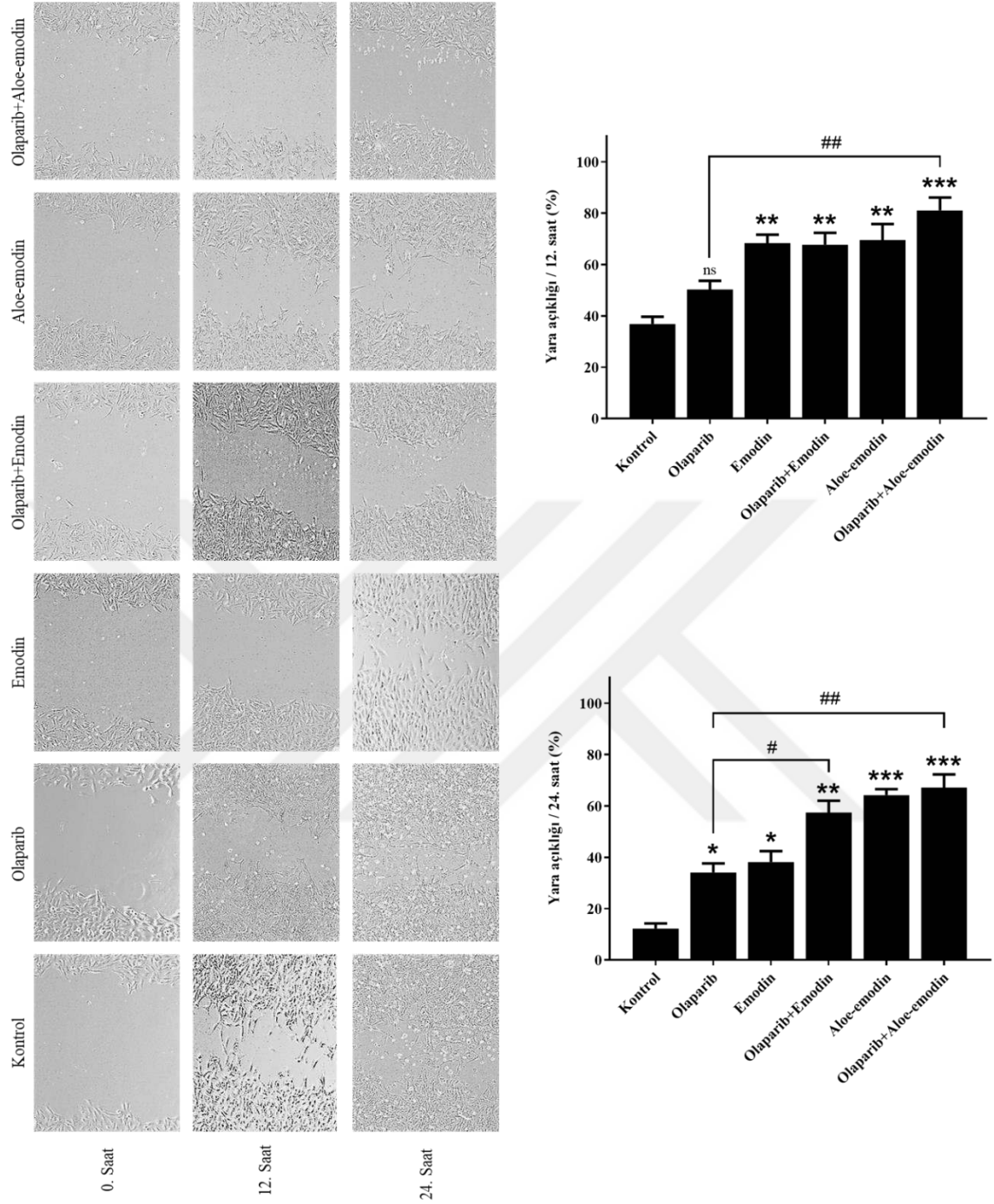
Anjiyogenezin önemli bir belirteci olan VEGF miktarları kontrol grubuna göre olaparib, emodin veya olaparib + emodin tedavisi uygulanan U2OS/PIR hücrelerinde kısmi bir azalma gösterirken, bu değişim istatistiki olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.5). Ancak

aloe-emodin ve olaparib + aloe-emodin tedavilerinin VEGF miktarlarını kontrol grubuna göre sırasıyla %19,1 (p <0,05) ve %33,4 (p <0,001) oranında azalttığı belirlendi. Ayrıca Şekil 4.5’de ifade edildiği gibi olaparib + aloe-emodin uygulanan hücrelerdeki VEGF miktarının sadece olaparib ile tedavi edilen hücrelere göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü (p <0,01).

Şekil 4.6’da görüldüğü gibi ROS miktarları tüm tedavi gruplarında anlamlı şekilde artış gösterdi. Olaparib, emodin ve aloe-emodin tedavisi uygulanan U2OS/PIR hücrelerinde ROS miktarları kontrol grubuna göre sırasıyla 2,31 (p <0,05), 2,22 (p <0,05) ve 2,77 (p <0,01) kat artış gösterdi. Kombine tedavilerde ise ROS miktarının kontrol grubuna göre olaparib + emodin ve olaparib + aloe-emodin uygulanan gruplarda sırasıyla 2,80 (p <0,01) ve 4,60 (p <0,001) katlık bir artış görüldü. Olaparib + aloe-emodin kombine tedavisinin olaparib mono-terapisine göre ROS miktarını anlamlı şekilde arttırdığı (p <0,001), bu artışın pozitif kontrol olarak kullanılan H₂O₂ tedavisi uygulanan gruptan bile yüksek olduğu belirlendi.



Şekil 4.6. U2OS/PIR hücrelerinde tedavilerin ardından ROS miktarlarındaki kat cinsinden değişim. Kontrol ile kıyaslandığında; * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001. Olaparib monoterapisi uygulanan hücrelerle kıyaslandığında; ### p <0,001

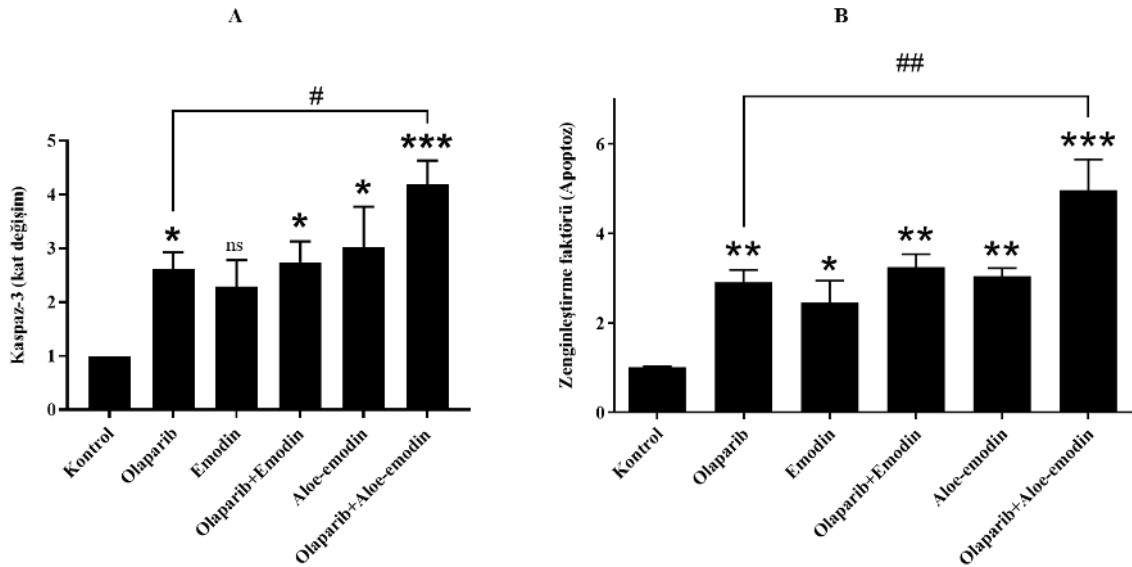


Şekil 4.7. U2OS/PIR hücrelerinin migrasyon kapasiteleri. Kontrol ile kıyaslandığında; * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, ns, anlamlı değil. Olaparib monoterapisi uygulanan hücrelerle kıyaslandığında; # p <0,05, ## p <0,01

Hücrel migrasyonun değerlendirilmesinde yara iyileşmesi (wound healing) analizi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, hücreler tek katmanlı olacak şekilde ekim alanını tamamen doldurduktan sonra 1 mL'lik pipet ucuyla bir çizik alanı oluşturulur. Tedaviler uygulandıktan hemen sonra 0., 12. ve 24. saatlerde çizik alanı mikroskop altında

gözlemlenir ve bu alanın kapanma düzeyi hücrel migrasyonla ilişkilendirilir. Şekil 4.7 U2OS/PIR hücrelerinin uygulanan tedavilere bağlı olarak değişen migrasyon yeteneklerini göstermektedir. 12. saat ve 24. saatte özellikle olaparib ve aloe-emodin kombinasyonunun anlamlı şekilde hücrel migrasyonu baskıladığı görüldü.

U2OS/PIR hücrelerinin tedavilere bağlı olarak apoptoza yönelimlerinin belirlenmesi iki farklı yöntem ile değerlendirildi. Olaparib, emodin ve aloe-emodin mono-terapileri kontrol grubuna göre; kaspaz-3 miktarında sırasıyla 2,62 (p <0,05), 2,28 (ns) ve 3,02 (p <0,01) kat, apoptozda ise yine sırasıyla 2,91 (p <0,01), 2,46 (p <0,05) ve 3,05 (p <0,01) kat artışlara neden oldu (Şekil 4.8.A ve B). Olaparib + emodin kombinasyonu kaspaz-3 miktarını kontrol grubuna göre 2,74 (p <0,05) kat, apoptozu ise 3,25 (p <0,01) kat arttırdı. Çarpıcı şekilde olaparib ile aloe-emodin kombinasyonu kontrol grubuna göre kaspaz-3 miktarında 4,20 kat (p <0,001), apoptozda ise 4,97 (p <0,001) kat artış gözlemlendi. Şekil 4.8.A ve Şekil 4.8.B’de görüldüğü gibi, olaparibin monoterapik olarak uygulandığı gruba kıyasla aloe-emodin ile birlikte uygulanmasının hem kaspaz-3 miktarındaki artışı (p <0,05) hem de apoptozu (p <0,01) anlamlı ölçüde tetiklediği belirlendi.



Şekil 4.8. Uygulanan tedaviye bağlı olarak U2OS/PIR hücrelerinde Kaspaz-3 miktarlarındaki değişim (A) ve apoptoza yönelimdeki artış (B). Kontrol ile kıyaslandığında; * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, ns, anlamlı değil. Olaparib monoterapisi uygulanan hücrelerle kıyaslandığında; # p <0,05, ## p <0,01

Kanser dünya genelinde görülme sıklığı ve ölüm oranlarıyla önemli bir sağlık sorunudur. Özellikle küresel nüfus artışı ve yaşam sürelerinin uzaması, kanser vakalarındaki yükselişi daha da dramatik hale getirmektedir. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan klasik kemoterapötik yaklaşımların yan etkileri ve bu ajanlara karşı hastalarda gelişen ilaç direnci, başa çıkılması gereken önemli bir zorluk olarak görülmektedir. Bu nedenle, kanser tedavisinde yan etkilerin sınırlandırıldığı/olmadığı ve direnç gelişiminin baskılandığı yeni ajanların ortaya konulması hayati önem taşımaktadır (Erdoğan vd., 2025). Kapsamlı araştırmalar, çeşitli tıbbi bitkilerde bulunan doğal bileşiklerin kemopreventif potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Doğrudan kullanılabilen veya fizikokimyasal işlemlerle modifiye edilebilen bu fitokimyasallar, potansiyel olarak etkili antikanser bileşiklerin önemli bir kaynağıdır (Efferth vd., 2017). Bitkilerin kanser tedavisinde kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir ve çok sayıda klinik çalışma, alkaloidler, terpenler, fenoller ve flavonoidler de dahil olmak üzere çeşitli doğal kimyasalların etkililiğini göstermiştir (Sudhakar vd., 2009).

Bitkilerden elde edilen bileşikler, kanser tedavisinde geleceği olabilecek dikkat çekici bileşiklerdir. Normal, sağlıklı hücreler için toksik olmayan yapılarıyla ilgi çekici olmalarının yanı sıra kanser hücrelerinde apoptotik yanıt da üretirler (Pfeffer ve Singh, 2018). Kanser tedavisinde kullanılan birçok bileşiğin düşük terapötik indeksi, ilaç toleransı gelişimi, tedavi sırasında sağlıklı hücrelerde hasar ve yan etkilerin ortaya çıkması, üstesinden gelinmesi gereken sorunlardan bazılarıdır (Akkol vd., 2021).

Fitokimyasalları sinerjik etkinlikleri üzerine test eden çalışmalar, kanser gelişimini ve kemoterapik ilaç direncine karşı daha iyi bir tedavi fırsatı sunma potansiyeline sahiptir (Thakral vd., 2025). Emodin yüklü stearik asit-g-kitosan oligosakkarit nano misellerin, mide kanseri hücrelerine karşı kuvvetli anti-onkojenik özellikleri sergilemiştir. Bu kombinasyonel tedavinin, hücre döngüsünün G2/M fazında MGC803 ve BGC823 mide kanseri hücrelerini önemli ölçüde durdurduğu, *in vitro* ve *in vivo* hedefleme etkisine sahip olduğu rapor edilmiştir (Jiang vd., 2020). Emodin ve berberinin kombinasyonunun AMPK ile ilişkili kinaz SIK3 üzerindeki etkisi, MCF-7, T47D, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde değerlendirilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde SIK3 aktivitesini baskılayan kombine tedavi, hücre döngüsünün G0/G1'de durmasına ve apoptoza neden olmuştur, ancak bu etkiler MCF-10A sağlıklı meme epitel hücrelerinde

gözlenmemiştir (Ponnusamy vd., 2020). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, emodinin 5-fluorourasil direnci oluşturulmuş HCT-8 kolorektal kanser hücrelerinde lipid metabolizmasının yeniden programlanmasına neden olup fosfatidil-etanol-aminleri baskılayarak MAPK sinyal yolağını inhibe ettiği, bu şekilde 5-fluorourasil ile sinerji oluşturduğu ve direnç mekanizmasının aşılması için emodinin umut verici bir bileşik olduğu ortaya konulmuştur (Chen vd., 2025).

Aloe-emodinin HeLa servikal kanser hücre hattında proliferasyonu inhibe ettiği, S ve G2/M fazlarında hücre döngüsünü durdurarak apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Luo vd., 2014). Aynı çalışmada ayrıca aloe-emodinin radyasyon uygulanan HeLa hücrelerinin radyasyona duyarlılığını sinerjik olarak arttırdığı ve radyasyon kaynaklı DNA hasarını büyütürken radyoterapinin HeLa hücreleri üzerindeki etkisini *in vitro* olarak arttırdığı bildirilmiştir.

Merkel hücreli karsinom (MCC) hücre hattında emodin ve aloe-emodinin hücre çoğalmasını engellediği ve aloe-emodinin emodine göre daha yüksek oranda inhibisyon kapasitesi sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca aloe-emodin kemoterapötik ajanlar olan cisplatinol, doksorubisin ve 5-florourasil ile kombine olarak kullanıldığında MCC hücrelerinin proliferasyonunu mono-terapik kullanımlarına göre daha güçlü şekilde inhibe etmiştir (Fenig vd., 2004).

Bir çalışmada *Rumex acetosella*'dan izole edilen ve aralarında emodin ile aloe-emodinin de olduğu ana antrakınonların antikanser aktiviteleri ilaca duyarlı CCRF-CEM ve çoklu ilaç direncine sahip CEM/ADR5000 lösemi hücreleri kullanılarak araştırılmıştır (Özenver vd., 2018). Emodin ve aloe-emodinin IC₅₀ değerleri sırasıyla CCRF-CEM hücrelerinde 35,62 µM ve 9,872 µM olarak, CEM/ADR5000 hücrelerinde ise 35,27 µM ve 12,85 µM olarak bulunmuştur. Çalışılan antrakınonlar arasında en düşük IC₅₀ değerine sahip olan aloe-emodin en sitotoksik bileşik olarak değerlendirilmiştir. Aynı çalışmanın devamında aloe-emodinin farklı tümör tiplerine ve ilaç direnç mekanizmalarına sahip eşleştirilmiş hücre hatları üzerindeki sitotoksitesisi test edilmiştir. MDA-MB-231 meme kanseri ve U87.MG beyin tümörü hücreleri ile bu hücrelerin çoklu ilaç direnci kazandırılmış alt hatları üzerinde aloe-emodinin kuvvetli sitotoksik etki sergilediği ve 16,47 µM ile 33,76 µM arasında IC₅₀ değerlerine sahip olduğu belirtilmiştir (Özenver vd., 2018).

Aloe-emodin normal hücreler üzerindeki toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, sağlıklı bir donörün taze kan örneklerinden insan periferik mononükleer hücreleri (PMNC) izole edilmiş artan aloe-emodin konsantrasyonlarına karşı test edilmiştir. Aloe-emodin test edilen tüm konsantrasyonlarda normal hücrelere karşı sitotoksik aktivite göstermemiştir (Özenver vd., 2018).

Literatürde, aloe-emodin farklı kanser hücre hatlarında ROS artışı, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması, hücre döngüsü durması ve kaspaz aracılı apoptoz ile anti-proliferatif etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin, mesane kanseri hücreleri (T24) aloe-emodin ile tedavi edildiğinde mitokondriyal membran potansiyeli bozulmuş, CDK1, siklin B1 ve BCL-2 seviyeleri azalmış ve apoptoz indüklenmiştir (Sanders vd., 2017). Servikal kanser hücreleri (HeLa) G2/M fazında durarak çoğalmayı azaltmış ve siklin A, CDK2, PKCa ve c-MYC baskılanmıştır. Kolon kanseri hücreleri (SW480, VACO235, WiDr) ürokinaz salgısını, MMP-2/9 aktivitesini ve RHOB ekspresyonunu baskılayarak göç ve invazyonu azaltmış, NF-KB ve VEGF sinyal yollarını inhibe etmiştir. Gastrik kanser hücrelerinde (AGS, NCI-N87, MKN45, MGC-803, SGC-7901) aloe-emodin, AIF salınımı, Kaspaz-3 aktivasyonu ve G0/G1 veya G2/M faz durması yoluyla apoptozu indüklemiştir. Akciğer kanseri hücrelerinde (H460, CH27) ATP azalması, mitokondriyal hasar, sitokrom c salınımı ve kaspaz-3 aktivasyonu gözlenmiştir (Sanders vd., 2017). Hepatoselüler karsinom hücrelerinde (Huh-7, HepG2, HCCM, Hep3B) DNA parçalanması, ROS artışı ve kaspaz-3/9 aktivasyonu ile apoptoz indüklenmiştir. Nazofarenks (NPC), nöroektodermal (SJ-N-KP, SK-N-Be(2c)), ağız (KB), yumurtalık (HO-8910M), prostat (PC3), cilt (A431, SCC25, A375.S2) ve dil (SCC-4) kanseri hücrelerinde de aloe-emodin, hücre döngüsünü durdurarak, hücre göçü ve invazyonu azaltarak ve BCL-2 baskılanması, ROS artışı ve kaspaz aktivasyonu ile apoptozu tetiklemiştir (Sanders vd., 2017).

Tüm bu bulgular, çalışmamızda elde edilen aloe-emodin ve olaparib kombinasyonunun olaparib direnci kazanmış U2OS/PIR osteosarkom hücrelerinde apoptozu indüklemesi ile uyumludur. Çalışmamızda gözlenen ROS artışı ve VEGF baskılanması, literatürde WiDr, H460 ve HO-8910M hücrelerinde bildirilen anti-anjiyojenik ve pro-apoptotik etkileri (Sanders vd., 2017) doğrulamaktadır. Böylece, aloe-emodin ve olaparib kombinasyonu, hem sitotoksik hem de anti-anjiyojenik mekanizmalarla osteosarkom hücrelerinde etkili olmuş ve PARP inhibitörlerine dirençli hücrelerde kombinasyon tedavisinin potansiyel

etkinliğini ortaya koymuştur. Ayrıca, koloni sağkalımı analizleri, özellikle olaparib + aloe-emodin kombinasyonunun U2OS/PIR hücrelerinde koloni oluşturma kapasitesini kontrol grubuna kıyasla çok anlamlı şekilde (% $p < 0,001$) baskıladığını göstermektedir. Olaparib + emodin kombinasyonu da koloni oluşumunu anlamlı şekilde (% $p < 0,05$) azaltırken, tek başına emodin veya olaparib tedavileri göreceli olarak daha düşük etki göstermiştir. Hücrel migrasyon analizleri de benzer şekilde, 12. ve 24. saatlerde olaparib + aloe-emodin uygulanan hücrelerin yara iyileşme kapasitesini belirgin şekilde azaltmış, böylece bu kombinasyonun hücrel göç ve invazyonu etkili biçimde engellediğini ortaya koymuştur. ROS analizleri, olaparib + aloe-emodin kombinasyonunun ROS seviyelerini kontrol grubuna göre 4,6 kat artırarak, tek başına uygulanan olaparib (2,31 kat) ve aloe-emodin (2,77 kat) tedavilerine göre çok daha güçlü pro-apoptotik bir etki oluşturduğunu göstermiştir. Benzer şekilde VEGF ölçümleri, olaparib + aloe-emodin kombinasyonunda %33,4 oranında anlamlı azalma ($p < 0,001$) göstererek, anti-anjiyojenik etkiyi güçlendirmiştir. Bu bulgular, aloe-emodin ve olaparib kombinasyonunun hem proliferasyonu ve koloniyi engelleyen sitotoksik mekanizmaları hem de ROS artışı ve VEGF baskılanması yoluyla anti-anjiyojenik etkileri aynı anda aktive ederek, PARP inhibitörlerine dirençli U2OS/PIR osteosarkom hücrelerinde güçlü bir antikanser potansiyel sergilediğini desteklemektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Küresel ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olan kanser, ilaç direncinin gelişmesi nedeniyle sıklıkla tedavi edilmesinde zorluklarla karşılaşılan bir hastalıktır. Bu nedenle yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal olarak oluşan antrakinonlar çoğunlukla Rheum türlerinde ana bileşikler olarak bulunur ve iyi bilinen antikanser ilaçlar olan antrasiklinlere yapısal benzerlikleri nedeniyle ilgi çekicidir. Bu çalışmada, *R. ribes*'den elde edilen antrakinon aglikonları olan emodin ve aloe-emodin kemoterapik ilaç direnci üzerindeki sitotoksitesinin ve etki mekanizmalarının araştırılmasına odaklanılmıştır.

Emodin ve aloe-emodin, doğal kaynaklı bileşikler olarak, hem proliferasyonu hem de invazyonu hedefleyen çoklu mekanizmalar aracılığıyla kanser hücreleri üzerinde etkili olmaktadır. Literatürde her iki bileşiğin de ROS artışı, kaspaz-3 aktivasyonu, hücre döngüsünün duraklatılması ve VEGF baskılanması yoluyla anti-proliferatif ve anti-anjiyojenik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, özellikle olaparib direnci kazanmış U2OS/PIR osteosarkom hücrelerinde aloe-emodin ve emodinin, tek başına olaparibe kıyasla sitotoksik ve anti-anjiyojenik etkilerini belirgin şekilde artırdığını göstermektedir. Aloe-emodin, olaparib ile kombinasyon halinde, hücre canlılığını anlamlı ölçüde azaltmış, koloni oluşumunu baskılamış ve hücre migrasyonu belirgin biçimde engellemiş; aynı zamanda ROS üretimini arttırarak güçlü pro-apoptotik etkiler oluşturmuş ve VEGF ekspresyonunu azaltarak anti-anjiyojenik etkiyi pekiştirmiştir. Emodin ise kombine tedavide daha sınırlı ancak anlamlı aditif/az-sinerjik etki göstermiştir.

Bu bulgular, doğal bileşiklerin kemoterapi ajanlarıyla kombinasyonunun, PARP inhibitörlerine dirençli kanser hücrelerinde tedavi etkinliğini artırabileceğini açıkça ortaya koymaktadır. Koloni sağkalımı ve yara iyileşmesi analizleri, aloe-emodinin hem proliferatif hem de invazif özellikleriyle karakterize edilen osteosarkom hücrelerinde güçlü antikanser potansiyele sahip olduğunu doğrulamaktadır. ROS artışı ve VEGF baskılanması, kombine tedavinin hem pro-apoptotik hem de anti-anjiyojenik

mekanizmaları aynı anda aktive ettiğini ve tedavi başarısını artırabileceğini göstermektedir.

Gelecek çalışmalar için, bu bileşiklerin farklı kanser hücre hatları ve *in vivo* modellerde özellikle kemoterapik ilaç direncine karşı etkinliklerinin araştırılması, doz-yan etki ilişkilerinin ve moleküler mekanizmalarının detaylandırılması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, kombinasyon tedavilerinin toksisite profilleri ve klinik güvenlik sınırlarının belirlenmesi, bu doğal ajanların klinik uygulamadaki potansiyelini ortaya koyacaktır. Emodin ve aloe-emodin, geleneksel kanser tedavisinin bir parçası olarak sinerjik ve/veya sitoprotektif kullanım potansiyeline sahip anti-neoplastik ajanlar olarak büyük umut vaat etmektedir. Çok sayıda *in vitro* sonuç bu iddiayı desteklemektedir, ancak *in vivo* moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve klinik olarak profilaktik bir ajan olarak potansiyel kullanımının araştırılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmada elde edilen umut verici sonuçlara rağmen, emodin ve aloe-emodin kemoterapik ilaç direnci üzerindeki etki mekanizmaları hakkında daha fazla çalışma yapılması, ilaç direncine karşı klinikte bu iki bileşiğin uygulanabilme potansiyellerinin göz önünde bulundurulabilmesi için gerekli ve zorunludur. Yeni tekniklerin ortaya çıkmasıyla geleneksel tıp araştırmaları önemli ölçüde gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, bitkisel ilaçların klinik uygulamalarını doğrulayan daha güçlü kanıtlar elde etmek için çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkilerin biyolojik aktivite çalışmalarına ek olarak, belirtildiği gibi klinik çalışmalarda kullanılabilmeleri için içeriklerinin belirlenmesi, içeriğindeki bileşiklerin dozaj çalışmalarının yapılması ve etki mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir. Sonuç olarak, emodin ve özellikle de aloe-emodin, PARP inhibitörlerine dirençli osteosarkom gibi zorlayıcı kanser modellerinde, hem sitotoksik hem de anti-anjiyojenik etkileri ile tedavi başarısını artırabilecek umut verici ajanlar olarak değerlendirilmektedir.

KAYNAKLAR

Abhinand, C. S., Raju, R., Soumya, S. J., Arya, P. S., and Sudhakaran, P. R. (2016). VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *Journal of cell communication and signaling*, 10(4), 347–354.

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

Akkol, E. K., Tatlı, I. I., Karatoprak, G. Ş., Açar, O. T., Yücel, Ç., Sobarzo Sánchez, E., and Capasso, R. (2021). Is emodin with anticancer effects completely innocent? Two sides of the coin. *Cancers*, 13(11), 2733.

Annese, T., Tamma, R., Ruggieri, S., and Ribatti, D. (2019). Erythropoietin in tumor angiogenesis. *Experimental cell research*, 374(2), 266–273.

Bahmani, M., Shirzad, H., Shahinfard, N., Sheivandi, L., and Rafieian Kopaei, M. (2017). Cancer phytotherapy: Recent views on the role of antioxidant and angiogenesis activities. *Journal of evidence-based complementary and alternative medicine*, 22(2), 299–309.

Battistelli, M., and Falcieri, E. (2021). Apoptotic bodies: particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Advances in Medical Biochemistry, Genomics, Physiology, and Pathology*, 473–486.

Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., ... Piva, F. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of human biology*, 40(6), 463–471.

Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1), 54–86.

Bochum, S., Berger, S., and Martens, U. M. (2018). Olaparib. *Small molecules in oncology*, 217–233.

Boztas, G., Avcı, A. B., Arabacı, O., and Bayram, E. (2021). Tıbbi ve aromatik bitkilerin dünyadaki ve Türkiye’deki ekonomik durumu. *Theoretical and Applied Forestry*, 1(1), 27–33.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., and Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and

mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229–263.

Byrum, A. K., Vindigni, A., and Mosammaparast, N. (2019). Defining and modulating ‘BRCAness’. *Trends in cell biology*, 29(9), 740–751.

Campbell, N. A., Reece, J. B., Meyers, N., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., ... Jackson, R. B. (2006). *Biology: Australian Version*. New South Wales, Australia: Prentice Education Australia, 955–972.

Cárdenas, C., Quesada, A. R., and Medina, M. A. (2006). Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(24), 3083–3089.

Carlton, J. G., Jones, H., and Eggert, U. S. (2020). Membrane and organelle dynamics during cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(3), 151–166.

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69(Suppl. 3), 4–10.

Cecchini, M. J., Amiri, M., and Dick, F. A. (2012). Analysis of cell cycle position in mammalian cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 59, e3491.

Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., and Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 24(3), 103–111.

Çelik, K. (2017). Endemic beauty of anatolia. *Journal of Awareness*, 2(3S), 541–544.

Che, H., Wang, L.W., Ye, X.Y., and He, X. (2025). Olaparib research update: Mechanism, structure and clinical trials. *Medicinal Chemistry Research*, 34(3), 535–548.

Chen, Y. W., Chen, Y. F., Chen, Y. T., Chiu, W. T., and Shen, M. R. (2016). The STIM1-Orail pathway of store-operated Ca²⁺ entry controls the checkpoint in cell cycle G1/S transition. *Scientific reports*, 6(1), 1–13.

Chen, Y., Liu, Y., Gong, Z., and Huang, Z. (2025). Emodin is a novel phosphatidylethanolamine anabolism inhibitor that reprograms lipid metabolism to overcome 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 101343.

Chhikara, B. S., Parang, K., and Etters, L. (2023). Global Cancer Statistics 2022 : the trends projection analysis. *10(1)*, 1–16.

Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews* 58(3): 621-681.

Dalton, S. (2015). Linking the cell cycle to cell fate decisions. *Trends in cell biology*, 25(10), 592–600.

Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116(2), 205–219.

Desai, C., Pathak, A., Limaye, S., Maniar, V., and Joshi, A. (2022). A review on mechanisms of resistance to PARP inhibitors. *Indian journal of cancer*, 59(Suppl 1), S119–S129.

Dong, M., Luo, H., Liu, R., Zhang, J., Yang, Z., Wang, D., ... Zhang, Q. (2024). Radiosensitization of osteosarcoma cells using the PARP inhibitor olaparib combined with X-rays or carbon ions. *Journal of Cancer*, 15(3), 699.

Dong, X., Fu, J., Yin, X., Cao, S., Li, X., Lin, L., Huyiligeqi, and Ni, J. (2016). Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*, 30(8), 1207–1218.

Dong, X., Zeng, Y., Liu, Y., You, L., Yin, X., Fu, J., and Ni, J. (2020a). Aloe-emodin: a review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*, 34(2), 270–281.

Dong, X., Zeng, Y., Liu, Y., You, L., Yin, X., Fu, J., and Ni, J. (2020b). c. *Phytotherapy Research*, 34(2), 270–281.

Edwards, S.L., Brough, R., Lord, C.J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D.A., ... Ashworth, A. (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*, 451, 1111–1115.

Efferth, T., Saeed, M. E. M., Mirghani, E., Alim, A., Yassin, Z., Saeed, E., ... Daak, S. (2017). Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. *Oncotarget*, 8(30), 50284.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.

Erdoğan, M. K., Agca, C. A., and Geçibesler, İ. H. (2020). The antiproliferative potential of isolated emodin and aloe-emodin from *Rheum ribes* on different cancer cell lines. *Biological Diversity and Conservation*, 13(2), 160–168.

Erdoğan, M. K., Gecibesler, I. H., Yapar, Y., Gundogdu, R., Kirici, M., Behcet, L., and Taslimi, P. (2021). Fatty acid composition, enzyme inhibitory effect, antioxidant and anticancer activity of extract from *Saponaria prostrata* WILLD. subsp. *anatolica* HEDGE. *Bioorganic Chemistry*, 113, 105032.

Erdoğan, M. K., Toy, Y., Gundogdu, R., Gecibesler, I. H., Sever, A., Yapar, Y., Behcet, L., and Zengin, G. (2025). Assessment of cytotoxic, apoptotic, enzyme inhibitory, and antioxidant properties, and phytochemical characterization of ethanolic extract from *Cionura erecta*. *Food Bioscience*, 65, 106082.

Fenig, E., Nordenberg, J., Beery, E., Sulkes, J., and Wasserman, L. (2004). Combined effect of aloe-emodin and chemotherapeutic agents on the proliferation of an adherent variant cell line of Merkel cell carcinoma. *Oncology reports*, 11(1), 213-217.

Fu, X., Li, P., Zhou, Q., He, R., Wang, G., Zhu, S., ... Li, J. (2024). Mechanism of PARP inhibitor resistance and potential overcoming strategies. *Genes and diseases*, 11(1), 306–320.

Gariglio, P. (2012). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Molecular Oncology Principles and Recent Advances*, 64–82.

Gecibesler, I. H., Disli, F., Bayindir, S., Toprak, M., Tufekci, A. R., Yaglioglu, A. S., ... Adem, S. (2021). The isolation of secondary metabolites from *Rheum ribes* L. and the synthesis of new semi-synthetic anthraquinones: Isolation, synthesis and biological activity. *Food Chemistry*, 342, 128378.

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., and Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(3), 178–194.

Gibcus, J. H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., ... Earnshaw, W. C. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science*, 359(6376), eaao6135.

Ginsburg, O., Bray, F., Coleman, M. P., Vanderpuye, V., Eniu, A., Kotha, S. R., ... Conteh, L. (2017). The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *Lancet (London, England)*, 389(10071), 847–860.

Glasauer, A., and Chandel, N. S. (2013). Ros. *Current Biology*, 23(3), R100–R102.

Gomez, V., Gundogdu, R., Gomez, M., Hoa, L., Panchal, N., O'Driscoll, M., and Hergovich, A. (2015). Regulation of DNA damage responses and cell cycle progression by hMOB2. *Cellular signalling*, 27(2), 326–339.

- Gundogdu, R., Erdoğan, M. K., Sever, A., and Toy, Y. (2023). Synergistic effect of RAD50 downregulation on combination of rucaparib and doxorubicin. *Ege Tıp Dergisi*, 62(2), 289–300.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46.
- Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. *Apoptosis and medicine*. InTechOpen.
- Hsu, S. C., and Chung, J.-G. (2012). Anticancer potential of emodin. *BioMedicine*, 2(3), 108–116.
- Hu, B., Zhang, H., Meng, X., Wang, F., and Wang, P. (2014). Aloe-emodin from rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264. 7 macrophages. *Journal of ethnopharmacology*, 153(3), 846–853.
- Imyanitov, E. N. (2021). Cytotoxic and targeted therapy for BRCA1/2-driven cancers. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 19(1), 36.
- Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(2), 205.
- Jelinic, P., and Levine, D. A. (2014). New insights into PARP inhibitors' effect on cell cycle and homology-directed DNA damage repair. *Molecular cancer therapeutics*, 13(6), 1645–1654.
- Jiang, X., Ma, M., Li, M., Shao, S., Yuan, H., Hu, F., ... Huang, X. (2020). Preparation and evaluation of novel emodin-loaded stearic acid-g-chitosan oligosaccharide nanomicelles. *Nanoscale research letters*, 15(1), 93.
- Johnson, D. G., and Walker, C. L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 295–312.
- Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., and Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion and migration*, 8(5), 440–451.
- Kim, J., Kim, J., and Bae, J. S. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy. *Experimental and molecular medicine*, 48(11), e269–e269.
- Kurhan, İ., and Ekici, H. (2021). Tamamlayıcı geleneksel tıp kapsamında fitoterapi ve kanser yaklaşımı. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 12(1), 15–20.

- Lea, N. C., Orr, S. J., Stoeber, K., Williams, G. H., Lam, E. W. F., Ibrahim, M. A. A., ... Thomas, N. S. B. (2003). Commitment point during G0→G1 that controls entry into the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(7), 2351–2361.
- Lugano, R., Ramachandran, M., and Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and molecular life sciences*, 77(9), 1745–1770.
- Luo, J., Yuan, Y., Chang, P., Li, D., Liu, Z., and Qu, Y. (2014). Combination of aloe-emodin with radiation enhances radiation effects and improves differentiation in human cervical cancer cells. *Molecular medicine reports*, 10(2), 731–736.
- Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mihu, C., Istrate, M., ... Mihu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*, 59(2), 455–467.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11–19.
- Morana, O., Wood, W., and Gregory, C. D. (2022). The apoptosis paradox in cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1328.
- Murai, J., Huang, S. Y. N., Renaud, A., Zhang, Y., Ji, J., Takeda, S., ... Pommier, Y. (2014). Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Molecular cancer therapeutics*, 13(2), 433–443.
- Nair, P., Lu, M., Petersen, S., and Ashkenazi, A. (2014). Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods in enzymology*, 544, 99–128. Elsevier.
- Oki, T., Nishimura, K., Kitaura, J., Togami, K., Maehara, A., Izawa, K., ... Aburatani, H. (2014). A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0–G1 transition. *Scientific reports*, 4(1), 4012.
- Özenver, N., Saeed, M., Demirezer, L. Ö., and Efferth, T. (2018). Aloe-emodin as drug candidate for cancer therapy. *Oncotarget*, 9(25), 17770.
- Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M. E., and Topçu, G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food chemistry*, 103(2), 623–630.
- Park, H. J., Bae, J. S., Kim, K. M., Moon, Y. J., Park, S. H., Ha, S. H., ... Park, B. H. (2018). The PARP inhibitor olaparib potentiates the effect of the DNA damaging agent doxorubicin in osteosarcoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1), 107.

Pfeffer, C. M., and Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.

Poillet Perez, L., Despouy, G., Delage Mourroux, R., and Boyer Guittaut, M. (2015). Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox biology*, 4, 184–192.

Ponnusamy, L., Kothandan, G., and Manoharan, R. (2020). Berberine and Emodin abrogates breast cancer growth and facilitates apoptosis through inactivation of SIK3-induced mTOR and Akt signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(11), 165897.

Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 157(5), 1415–1430.

Refandy, T. D. (2022). Osteosarkoma dengan Metastasis Pada Sistem Digestif. *Jurnal Kedokteran*, 11(3), 1112–1116.

Rose, M., Burgess, J. T., O’Byrne, K., Richard, D. J., and Bolderson, E. (2020). PARP inhibitors: clinical relevance, mechanisms of action and tumor resistance. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 564601.

Sanders, B., Ray, A. M., Goldberg, S., Clark, T., McDaniel, H. R., Atlas, S. E., ... Lopez, J. (2017). Anti-cancer effects of aloe-emodin: a systematic review. *Journal of clinical and translational research*, 3(3), 283.

Sever, A., Toy, Y., Erdoğan, M. K., and Gundogdu, R. (2023). Kemoterapide Kullanılan Güncel Fitokimyasallar. *Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 64–76.

Shen, Y., Aoyagi-Scharber, M., and Wang, B. (2015). Trapping poly (ADP-ribose) polymerase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 353(3), 446–457.

Singh, P., and Lim, B. (2022). Targeting apoptosis in cancer. *Current oncology reports*, 24(3), 273–284.

Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Cancer Science and Therapy*, 1(02), i–iv.

Tait, S. W. G., and Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621–632.

Thakral, F., Prasad, B., Sehgal, R., Gupta, S., Sharma, U., Singh, B. J., ... and Ahmad, F. (2025). Role of emodin to prevent gastrointestinal cancers: recent trends and future prospective. *Discover Oncology*, 16(1), 1-14.

Toy, Y., Gundogdu, R., Sever, A., and Erdoğan, M. K. (2022). Defektif Homolog Rekombinasyon DNA Tamiri ve PARP İnhibisyonu Arasındaki Sentetik Letal Etkileşim. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 12(4), 2459–2475.

Ulukaya, E., Acilan, C., Ari, F., Ikitimur, E., and Yilmaz, Y. (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36(3), 261–269.

Yang, X., Dai, L., Yan, F., Ma, Y., Guo, X., Jenis, J., ... Shang, X. (2024). The phytochemistry and pharmacology of three Rheum species: a comprehensive review with future perspectives. *Phytomedicine*, 155772.

Yenikalaycı, A. (2023). Işgın (*Rheum ribes* L.) Bitkisinin Önemi, Kullanım Alanları ve Sorunları. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 13(3), 515–520.

Zhang, H. H., and Guo, X. L. (2016). Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 78, 13–26.

Zhang, Q., Hao, S., Wei, G., Liu, X., and Miao, Y. (2024). The p53-mediated cell cycle regulation is a potential mechanism for emodin-suppressing osteosarcoma cells. *Heliyon*, 10(5).

Zhao, J., Niu, H., Li, A., and Nie, L. (2016). Acetylbritannilactone modulates vascular endothelial growth factor signaling and regulates angiogenesis in endothelial cells. *Plos one*, 11(2), e0148968.

Zhao, R. Y., and Elder, R. T. (2005). Viral infections and cell cycle G2/M regulation. *Cell research*, 15(3), 143–149.