

**T.C.  
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**PAKLİTAKSEL/ALOE-EMODİN KOMBİNASYONUNUN MCF-7  
VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA  
SİNERJİSTİK ETKİLERİ**

**Tuğba ATICI**

**Danışman: Doç. Dr. DENİZ ALTUN ÇOLAK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN  
2022  
Her Hakkı Saklıdır.**

## ÖZET

Doktora Tezi

### **PAKLİTAKSEL/ALOE-EMODİN KOMBİNASYONUNUN MCF-7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA SİNERJİSTİK ETKİLERİ**

Tuğba ATICI

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Kanser hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucunda oluşan klinik görünüşleri ve tedavileri birbirinden farklı olan hastalıklar grubudur. Kansere bağlı ölümlerde, akciğer kanserinden sonra ikinci sırada meme kanseri yer almaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerin yüksek maliyeti ve endişe verici yan etkilerinden dolayı son yıllarda doğal ve bitkisel alternatiflere karşı artan bir ilgi vardır. Kanser tedavisine yönelik çalışmalar genellikle bitkisel moleküllerden ilaç keşiflerine dayanmaktadır. Bu noktadan hareketle bu tez çalışmasında, aloe-emodin ve paklitakselin östrojen reseptörü (+) ve östrojen reseptörü (-) insan meme kanser hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerindeki sinerjik, sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bitkisel bir antrakınon türevi olan aloe-emodinün paklitaksel ile kombinasyon tedavisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi MTT ve Neutral Red yöntemleriyle belirlenmiş ve hücre canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilebilecek azalmalara yol açtığı bulunmuştur. Apoptotik yollarla hücre ölümü ise anneksin V, total kaspaz aktivitesi ve hücre döngüsü analizleriyle kanıtlanmıştır. Hesaplanan kombinasyon indeks değerlerinin analizleri, madde kombinasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücreleri üzerinde sinerjistik etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

2022, 91 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Aloe-emodin, Meme kanseri, Paklitaksel, Sinerjik etki, Sitotoksiste

## **ABSTRACT**

Ph.D. Thesis

### **SYNERGISTIC EFFECTS OF PACLITAXEL/ALOE-EMODIN COMBINATION IN MCF-7 AND MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL LINES**

Tuğba ATICI

Erzincan Binali Yıldırım University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Cancer is a group of diseases with different clinical manifestations and treatments, which occur as a result of the uncontrolled proliferation of cells. Breast cancer ranks second in cancer-related deaths after lung cancer. There has been an increasing interest in natural and herbal alternatives in recent years due to the high cost and worrying side effects of methods used in cancer treatment. Studies for cancer treatment are generally based on drug discoveries from herbal molecules. From this point of view, in this thesis study, the synergistic, cytotoxic, and apoptotic effects of aloe-emodin and paclitaxel on estrogen receptor (+) and estrogen receptor (-) human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) were investigated. The effect of the combination treatment of aloe-emodin, a herbal anthraquinone derivative, with paclitaxel on the viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells was determined by MTT and Neutral Red methods, and it was found that it led to statistically significant decreases in cell viability. Cell death by apoptotic ways was demonstrated by annexin V, total caspase activity, and cell cycle analysis. Analysis of the calculated combination index values revealed that the combination of the substance showed a synergistic effect on MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells.

**2022, 91 Pages**

**Keywords:** Aloe-emodin, Breast cancer, Cytotoxicity, Paclitaxel, Synergistic effect

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak hazırladığım bu çalışma, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş olup FDK-2019-605 numaralı ve “Paklitaksel/Aloe-Emodin Kombinasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sinerjistik Etkileri” isimli proje kapsamında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Doktora çalışmalarımın başından beri kalbimin sesini dinlememe izin veren, bana güvenen, süreç boyunca karşılaştığımız tüm engellere karşı beni cesaretlendirip mücadele etmemi sağlayan, öğrencisi olmaktan gurur ve onur duyduğum danışman hocam Sayın Doç. Dr. Deniz Altun Çolak'a teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca laboratuvar çalışmalarımızda yardımlarını ve desteklerini gördüğüm Sayın Prof. Dr. Engin Ulukaya ve değerli ekibine, Sayın Prof. Dr. Ayşe Nalbantsoy ve değerli ekibine, Sayın Doç. Dr. Selcen Çelik Uzuner ve değerli ekibine, Sayın Doç. Dr. Ahmet Altay'a ve bilgisi, tecrübesi, bilim aşkı ve arkadaşlığından istifade ettiğim doktora öğrencisi Sayın Esmâ Kübra Kağan Yeniçeri'ye teşekkür ederim.

Bu süreçte hem doktora çalışmalarımı hem de gönülden bağlı olduğum öğretmenlik mesleğimi aksatmadan yapabilmem için elinden gelen desteği veren İpekyolu Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi idarecilerine teşekkür ederim. Özellikle ders programlarımı ayarlayan müdür yardımcımız Sayın Kenan Yalçın'a ayrıca teşekkür ederim. Tez sürecim boyunca olumlu ve teşvik edici düşünceleriyle yanımda olan, beni her zaman motive eden Sayın Songül Güler nezdinde tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Beni yetiştirip bugünlere getiren, başarılı bir insan olmam için emek harcayan kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte sınıdığım, düştüğüm, vazgeçtiğim anlarım çok oldu. Ancak bu anlarda her zaman yanımda kitaplarım vardı. Ne zaman düşsem bir cümle “kalk” dedi bana... Son teşekkürüm de altı çizili cümlelerime gelsin...

Tuğba ATICI

Eylül, 2022

## İÇİNDEKİLER

|                                                     | Sayfa       |
|-----------------------------------------------------|-------------|
| <b>ÖZET</b> .....                                   | <b>i</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....                               | <b>ii</b>   |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....                               | <b>iii</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....                            | <b>iv</b>   |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....                       | <b>vi</b>   |
| <b>TABLolar LİSTESİ</b> .....                       | <b>viii</b> |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....                | <b>ix</b>   |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                               | <b>1</b>    |
| <b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....                   | <b>3</b>    |
| 2.1. Kanser.....                                    | 3           |
| 2.1.1. Kanser istatistikleri .....                  | 7           |
| 2.1.2. Meme kanseri.....                            | 11          |
| 2.1.2.1. Meme kanserinin sınıflandırılması.....     | 11          |
| 2.1.2.2. Meme kanserinin moleküler mekanizması..... | 13          |
| 2.1.2.3. Meme kanseri risk faktörleri .....         | 13          |
| 2.2. Hücre Döngüsü.....                             | 17          |
| 2.2.1. Hücre döngüsünün kontrolü .....              | 18          |
| 2.2.2. Hücre döngüsü ve kanser.....                 | 19          |
| 2.3. Apoptozis.....                                 | 21          |
| 2.3.1. Apoptozisin indüklenmesi .....               | 23          |
| 2.3.2. Apoptozisin genetik kontrolü .....           | 26          |
| 2.3.3. Kaspazlar .....                              | 27          |
| 2.4. Bitkisel Kökenli Anti-Kanser Ajanlar .....     | 29          |
| 2.5. Aloe-emodin .....                              | 29          |
| 2.6. Paklitaksel .....                              | 31          |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....                  | <b>33</b>   |
| 3.1. Materyal.....                                  | 33          |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve kitler ..... | 33          |
| 3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar ..... | 34          |
| 3.1.3. Kullanılan hücre hatları .....               | 34          |
| 3.2. Yöntem .....                                   | 36          |

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.1. Paklitaksel ve aloe-emodin stok çözeltilerinin hazırlanması..... | 36        |
| 3.2.2. Hücre kültürü .....                                              | 36        |
| 3.2.2.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için besiyeri hazırlanması.....  | 37        |
| 3.2.2.2. Hücrelerin çözündürülmesi .....                                | 37        |
| 3.2.2.3. Hücrelerin pasajlanması .....                                  | 37        |
| 3.2.2.4. Hücrelerin dondurulması.....                                   | 38        |
| 3.2.3. Sitotoksosite analizleri.....                                    | 38        |
| 3.2.3.1. Hücrelerin sayılması.....                                      | 38        |
| 3.2.3.2. MTT testi.....                                                 | 39        |
| 3.2.3.3. Neutral red testi .....                                        | 39        |
| 3.2.3.4. Kombinasyon indeksinin hesaplanması .....                      | 40        |
| 3.2.5. Apoptotik analizler .....                                        | 41        |
| 3.2.5.1. Hücre döngüsü analizi.....                                     | 41        |
| 3.2.5.1. Anneksin V Analizi.....                                        | 41        |
| 3.2.5.2. Multicaspase aktivasyon analizi.....                           | 42        |
| 3.2.5. İstatistiksel yöntemler .....                                    | 43        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>                                      | <b>44</b> |
| 4.1. Sitotoksosite Bulguları .....                                      | 44        |
| 4.1.1. Kombinasyon çalışmaları .....                                    | 44        |
| 4.1.2. MTT Testi ile Sitotoksosite Tayini Bulguları.....                | 47        |
| 4.1.2.1. MCF-7 hücre hattı için MTT test bulguları .....                | 47        |
| 4.1.2.2. MDA-MB-231 hücre hattı için MTT test bulguları .....           | 51        |
| 4.1.3. Neutral Red ile sitotoksosite tayini bulguları .....             | 54        |
| 4.1.3.1. MCF-7 hücre hattı için Neutral Red test bulguları.....         | 54        |
| 4.1.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı için Neutral Red test bulguları .....   | 56        |
| 4.2. Apoptotik Bulgular.....                                            | 58        |
| 4.2.1. Hücre döngüsü analizi bulguları.....                             | 58        |
| 4.2.2. Anneksin V testi bulguları .....                                 | 60        |
| 4.2.3. Multicaspase aktivasyon analizi bulguları.....                   | 64        |
| <b>5. SONUÇ ve TARTIŞMA .....</b>                                       | <b>67</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                  | <b>76</b> |
| <b>EKLER.....</b>                                                       | <b>91</b> |
| Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar .....         | 91        |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                    | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin genel özellikleri .....                                                                                             | 4     |
| Şekil 2.2. Tümör gelişimi.....                                                                                                                     | 5     |
| Şekil 2.3. Kansere sebep olan faktörler.....                                                                                                       | 6     |
| Şekil 2.4. Dünyada 2020’de farklı kanser türlerinin yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranları.....                                           | 7     |
| Şekil 2.5. 2020 yılında dünya genelinde görülen toplam yeni kanser vaka sayısı .....                                                               | 8     |
| Şekil 2.6. 2020 yılında Türkiye’de görülen toplam kanser vaka dağılımı .....                                                                       | 9     |
| Şekil 2.7. 2020 yılı Türkiye kanser insidansı.....                                                                                                 | 9     |
| Şekil 2.8. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri.....                                                                                           | 10    |
| Şekil 2.9. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri .....                                                                                          | 10    |
| Şekil 2.10. Meme kanseri hücre dizileri ve tümörler arasındaki mevcut alt tip şemalarının karşılaştırılması.....                                   | 12    |
| Şekil 2.11. Hücre döngüsü modeli .....                                                                                                             | 18    |
| Şekil 2.12. Hücre döngüsü ve kanser ilişkisi .....                                                                                                 | 20    |
| Şekil 2.13. Apoptozis ve kanser .....                                                                                                              | 22    |
| Şekil 2.14. Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile uyarılan ekstrinsik yol .....                                                                   | 24    |
| Şekil 2.15. Mitokondri aracılı içsel yol.....                                                                                                      | 25    |
| Şekil 2.16. Kaspaz ailesinin alt üyeleri .....                                                                                                     | 28    |
| Şekil 2.17. Aloe emodin (1,8-dihidroksi-3-hidroksimetilantrakinon) .....                                                                           | 30    |
| Şekil 2.18. Pasifik porsuk ağacı .....                                                                                                             | 31    |
| Şekil 2.19. Paklitakselin kimyasal yapısı .....                                                                                                    | 32    |
| Şekil 3.1. MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü .....                                                                                          | 35    |
| Şekil 3.2. MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....                                                                                      | 36    |
| Şekil 4.1. A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 24 saatlik yüzde canlılık grafiği.....       | 48    |
| Şekil 4.2. A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 48 saatlik yüzde canlılık grafiği .....      | 49    |
| Şekil 4.3. A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 72 saatlik yüzde canlılık grafiği .....      | 50    |
| Şekil 4.4. A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 24 saatlik yüzde canlılık grafiği ..... | 51    |
| Şekil 4.5. A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 48 saatlik yüzde canlılık grafiği ..... | 52    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.6.A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 72 saatlik yüzde canlılık grafiği .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 53 |
| Şekil 4.7. MCF-7 hücrelerine uygulanan A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonrası hücre canlılığının 48 saat sürede doza bağlı değişimi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 55 |
| Şekil 4.8. MCF-7 hücrelerine uygulanan A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonrası hücre canlılığının 72 saat sürede doza bağlı değişimi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 56 |
| Şekil 4.9.MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonrası hücre canlılığının 48 saat sürede doza bağlı değişimi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 57 |
| Şekil 4.10.MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonrası hücre canlılığının 72 saat sürede doza bağlı değişimi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 58 |
| Şekil 4.11. 60 $\mu$ M A-EMO ve 1,2 $\mu$ M PTX uygulamasının MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonuçları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 59 |
| Şekil 4.12. 80 $\mu$ M A-EMO ve 1,6 $\mu$ M PTX uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonuçları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 60 |
| Şekil 4.13. 60 $\mu$ M A-EMO ve 1,2 $\mu$ M PTX uygulamasının MCF-7 hücrelerinde Anneksin V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Dead): Nekroz, (Late Apoptotic/Dead): Geç apoptoz, (Live): % canlılık, (Early Apoptotic): Erken apoptoz.....                                                                                                                                                                                           | 61 |
| Şekil 4.14. 80 $\mu$ M A-EMO ve 1,6 $\mu$ M PTX uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde Anneksin V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Dead): Nekroz, (Late Apoptotic/Dead): Geç apoptoz, (Live): % canlılık, (Early Apoptotic): Erken apoptoz .....                                                                                                                                                                                     | 63 |
| Şekil 4.15. 60 $\mu$ M A-EMO ve 1,2 $\mu$ M PTX uygulamasının MCF-7 hücrelerinde Multicaspase değerlendirmesi ile elde edilen yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Sol alt bölge apoptotik olmayan kaspaz negatif canlı hücre popülasyonunu, sol üst bölge apoptotik olmayan kaspaz negatif ölü hücre popülasyonunu, sağ alt bölge apoptotik kaspaz pozitif canlı hücre popülasyonunu, sağ üst bölge apoptotik kaspaz pozitif ölü hücre popülasyonunu göstermektedir.) .....      | 64 |
| Şekil 4.16. 80 $\mu$ M A-EMO ve 1,6 $\mu$ M PTX uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde Multicaspase değerlendirmesi ile elde edilen yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Sol alt bölge apoptotik olmayan kaspaz negatif canlı hücre popülasyonunu, sol üst bölge apoptotik olmayan kaspaz negatif ölü hücre popülasyonunu, sağ alt bölge apoptotik kaspaz pozitif canlı hücre popülasyonunu, sağ üst bölge apoptotik kaspaz pozitif ölü hücre popülasyonunu göstermektedir.) ..... | 65 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitler .....                                                                                                                                         | 33 |
| Tablo 3.2. Kombinasyon indeksi sonuçlarına göre, uygulanan kimyasalların hücre hattı üzerine sinerjik, aditif ya da antagonistik etkisi .....                                                             | 40 |
| Tablo 4.1. MCF-7 hücrelerinde EMO+PTX kombinasyon tedavisi 24 saat uygulamasının doz- etki verileri.....                                                                                                  | 45 |
| Tablo. 4.2. MCF-7 hücrelerinde EMO+PTX kombinasyon tedavisi 48 saat uygulamasının doz- etki verileri.....                                                                                                 | 45 |
| Tablo 4.3. MCF-7 hücrelerinde EMO+PTX kombinasyon tedavisi 72 saat uygulamasının doz- etki verileri.....                                                                                                  | 45 |
| Tablo 4.4.MDA-MB-231 hücrelerinde EMO+PTX kombinasyon tedavisi 24 saat uygulamasının doz- etki verileri .....                                                                                             | 46 |
| Tablo 4.5.MDA-MB-231 hücrelerinde EMO+PTX kombinasyon tedavisi 48 saat uygulamasının doz- etki verileri .....                                                                                             | 46 |
| Tablo 4.6.MDA-MB-231 hücrelerinde EMO+PTX kombinasyon tedavisi 72 saat uygulamasının doz- etki verileri .....                                                                                             | 46 |
| Tablo 4.7. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarına EMO ve PTX tedavisi uygulaması sonunda 24, 48 ve 72 saatleri için IC <sub>50</sub> değerleri.....                                                          | 47 |
| Tablo 4.8. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarına EMO ve PTX tedavisi uygulaması sonunda 48 ve 72 saatleri için IC <sub>50</sub> değerleri.....                                                              | 54 |
| Tablo 4.9. MCF-7 hücre hattı hücre döngüsü (%) değerleri .....                                                                                                                                            | 59 |
| Tablo 4.10. MDA-MB-231 hücre hattı hücre döngüsü (%) değerleri.....                                                                                                                                       | 60 |
| Tablo 4.11. EMO, PTX ve EMO+PTX kombinasyonlarının 48 saatlik tedavisi sonucu MCF-7 hücre soyunda anneksin V testi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerleri .....                        | 61 |
| Tablo 4.12. EMO, PTX ve EMO+PTX kombinasyonlarının 72 saatlik tedavisi sonucu MDA-MB-231 hücre soyunda anneksin V testi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerleri .....                   | 62 |
| Tablo 4.13. EMO, PTX ve EMO+PTX kombinasyonlarının 48 saatlik uygulaması sonucunda MCF-7 hücre soyunda total kaspaz aktivitesi testi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerleri .....      | 64 |
| Tablo 4.14. EMO, PTX ve EMO+PTX kombinasyonlarının 72 saatlik uygulaması sonucunda MDA-MB-231 hücre soyunda total kaspaz aktivitesi testi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerleri ..... | 66 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

|           |             |
|-----------|-------------|
| <i>C</i>  | Celsius     |
| <i>°</i>  | Derece      |
| <i>%</i>  | Yüzde       |
| <i>cm</i> | Santimetre  |
| <i>Da</i> | Dalton      |
| <i>Dk</i> | Dakika      |
| <i>g</i>  | Gram        |
| <i>μg</i> | Mikro gram  |
| <i>μM</i> | Mikro molar |
| <i>μL</i> | Mikro litre |
| <i>mg</i> | Mili gram   |
| <i>mL</i> | Mili litre  |
| <i>nm</i> | Nanometre   |

### Kısaltmalar

|       |                                                                       |
|-------|-----------------------------------------------------------------------|
| ACS   | American Community Survey                                             |
| AIF   | Apoptosis Inducing Factor (Apoptoz İndükleyici Faktör)                |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin D                                                  |
| BCL   | B- Cell Lymphoma (B- Lenfosit)                                        |
| BRCA  | Breast Cancer Susceptibility (Meme Kanserine Yatkınlık Genleri)       |
| CDK   | Cyclin Dependent Kinase (Siklin Bağımlı Kinaz)                        |
| CI    | Combination Index (Kombinasyon İndeksi)                               |
| CSF   | Colony Stimulating Factor (Koloni Uyarıcı Faktör)                     |
| DED   | Death Effector Domain (Ölüm Effektör Domaini)                         |
| DISC  | Death Inducing Signalling Complex (Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi) |

|                  |                                                                                                 |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DMSO             | Dimethyl sulfoxide (Dimetil sülfoksit)                                                          |
| EDTA             | Ethylenediaminetetraacetic Acid (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)                               |
| EGFR             | Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)                           |
| ER               | Estrogen Receptor (Östrojen Reseptörü)                                                          |
| FADD             | Fas Associated Death Domain (Fas İlişkili Ölüm Domaini)                                         |
| FBS              | Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)                                                         |
| GLOBOCAN         | Global Cancer Observatory (Uluslararası Kanser Gözlemevi)                                       |
| HER2             | Human Epidermal Growth Factor Receptor- 2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör-2)           |
| HSGM             | Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü                                                                    |
| IARC             | International Agency Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)                  |
| IC <sub>50</sub> | Half- Maximal Inhibitory Concentration (Yüzde Elli İnhibisyon Konsantrasyonu)                   |
| IGF              | Insulin Like-Growth Factor (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü)                                     |
| MCF-7            | Michigan Cancer Foundation-7 (Östrojen Reseptör Pozitif İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)         |
| MDA-MB-231       | M.D. Anderson- Metastatic Breast 231 (Östrojen Reseptör Negatif İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı) |
| M.Ö.             | Milattan önce                                                                                   |
| M.S.             | Milattan sonra                                                                                  |
| MTT              | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid                                       |
| NGF              | Neuron Growth Factor (Nöron Büyüme Faktörü)                                                     |
| PBS              | Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)                                               |
| PR               | Progesterone Receptor (Progesteron Reseptörü)                                                   |
| RB               | Retinoblastoma Protein (Retinoblastoma Proteini)                                                |
| RPMI 1640        | Roswell Park Memorial Medium                                                                    |
| TNBC             | Triple Negative Breast Cancer (Üçlü Negatif Meme Kanseri)                                       |
| TNF              | Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekrozis Faktör)                                                   |
| TRADD            | Tumor Necrosis Factor Associated Death Domain (Tümör Nekroz Faktör ile İlişkili Ölüm Domaini)   |

TÜİK  
WHO

Türkiye İstatistik Kurumu  
World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)



## 1. GİRİŞ

Kanser, vücutta bir hücrenin farklılaşarak kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıdır. Bu durum kromozomal, genetik ya da epigenetik değişiklikler sonucunda oluşan bir süreçtir. Kanser; hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, apoptoz ve DNA tamiri gibi temel hücresel işlevleri de etkileyen bir hastalıktır (Lodish vd., 2000). Kanserler ortaya çıkma yaşı, yayılımları, evreleri ve tedavilere verdikleri yanıtlara göre çeşitlilik göstermektedir. Bununla birlikte tüm kanser tipleri, moleküler olarak ortak karakteristik özelliğe sahiptir (Tuncer, 2014).

Meme kanseri, özellikle kadınlarda en çok tanı alan ve kansere bağlı ölüm sebeplerinde birinci sırada olan kanser türüdür. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2020 yılı verilerinde, meme kanserinin kadınlarda en sık gözlemlenen malign tümörlerden biri olduğu ve bütün kanser çeşitleri içinde görülme oranının %24,2 olduğu açıklanmıştır (GLOBOCAN, 2020). Meme kanseri insidansının büyük ve yoğun nüfuslu bazı ülkelerde diğer ülkelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca ileri yaşlarda meme kanseri riskinin artmakla birlikte son yıllarda gençler arasında da kanser insidansının belirgin bir şekilde artış gösterdiğini belirten raporlar bulunmaktadır (Zhang vd., 2019).

Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi, cerrahi ve güncel tedavi yöntemlerinden sinyal iletim sistemi inhibitörleri, gen tedavisi, anjiyogenez inhibitörleri ve immünoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Kanser uzun süreli tedavisinde kullanılan bu yöntemlerin maliyetlerinin yüksek olması ve olası toksik etkilerinden dolayı araştırmalar bu yöntemlere oranla daha az yan etki riskine sahip doğal ve bitkisel ürünlere çevrilmiştir (Tekin vd., 2012). Yapılan laboratuvar araştırmaları, çeşitli biyoanaliz ve hayvan modellerinde doğal bitkisel ekstre ve bileşiklerin anti-kanser potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Balachandran ve Govindarajan, 2005; Gullett vd., 2010; Sung vd., 2012; Majdalawieh vd., 2017). 1950'lerden bu yana bitkisel ajanlar kullanılarak yapılan anti-kanser ilaç araştırmaları sonucunda sitotoksik etki gösteren birçok tür keşfedilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız aloe-emodin antrakınon türevidir. Doğal ürünlerin kimyasal sınıfları arasında bulunan antrakınonlar, büyük yapısal çeşitlilikleri, belirgin biyolojik aktiviteleri ve düşük toksisiteyi ile

karakterize edilirler (Eyong vd., 2013). Antrakinonlar çoğunlukla Liliaceae (*Aloe*), Rhamnaceae (*Rhamnus*), Fabaceae (*Cassia*), Rubiaceae (*Asperula*, *Gallium*, *Rubia*) Polygonaceae (*Rumex*), ve Scrophulariaceae familyalarında bulunmaktadır (Seigler, 2012). Bilimsel araştırmalar antrakinonların meme, akciğer, serviks, prostat ve kolon tümör hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiğini göstermektedir (Özenver vd., 2018). Yine çalışmamızda kullandığımız paklitaksel ise Pasifik porsuk ağacı olarak bilinen *Taxus brevifolia* kabuğundan elde edilmiş olup tübülünleri hedef alan bir hücre iskeleti ajanıdır. Paklitaksel mitoz bölünmede iğ ipliklerinin birleşmesi, kromozom ayrılması ve hücre bölünmesi süreçlerinde hasarlar gerçekleştirir. Paklitaksel, mikrotübülleri stabilize ederek ayrılmalarını engeller. Böylece metafaz evresinde iğ ipliği oluşumu gerçekleşmez. Sonuçta da mitoz bölünme durarak hücre döngüsü kontrol noktalarının devreye girmesiyle birlikte ya apoptozis başlar ya da hücre G0 evresine geri döner (Loo vd., 2005).

Kanser tedavisinde daha etkili sonuçlar almak için ya da ilaca karşı direnç geliştirmiş hücrelerde ilaç etkinliğini artırmak amacıyla başka bir sitotoksik ajanla kombine edilerek sinerjik etki oluşturulması üzerine yapılan çalışmalar oldukça yaygındır. Tedavi sürecinde kombinasyon şeklinde ilaç kullanımında amaç, tedavinin başarı ihtimalini artırmak ve ilacın muhtemel yan etkileri en aza indirmektir (Bulut, 2012). Literatürde aloe-emodinin paklitaksel ile birlikte kullanımına bağılı oluşan sinerjik etkiye ilişkin yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu doğrultuda hazırlanan tez çalışmasında, aloe-emodin ve paklitakselin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücre hatları üzerindeki sinerjik, sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

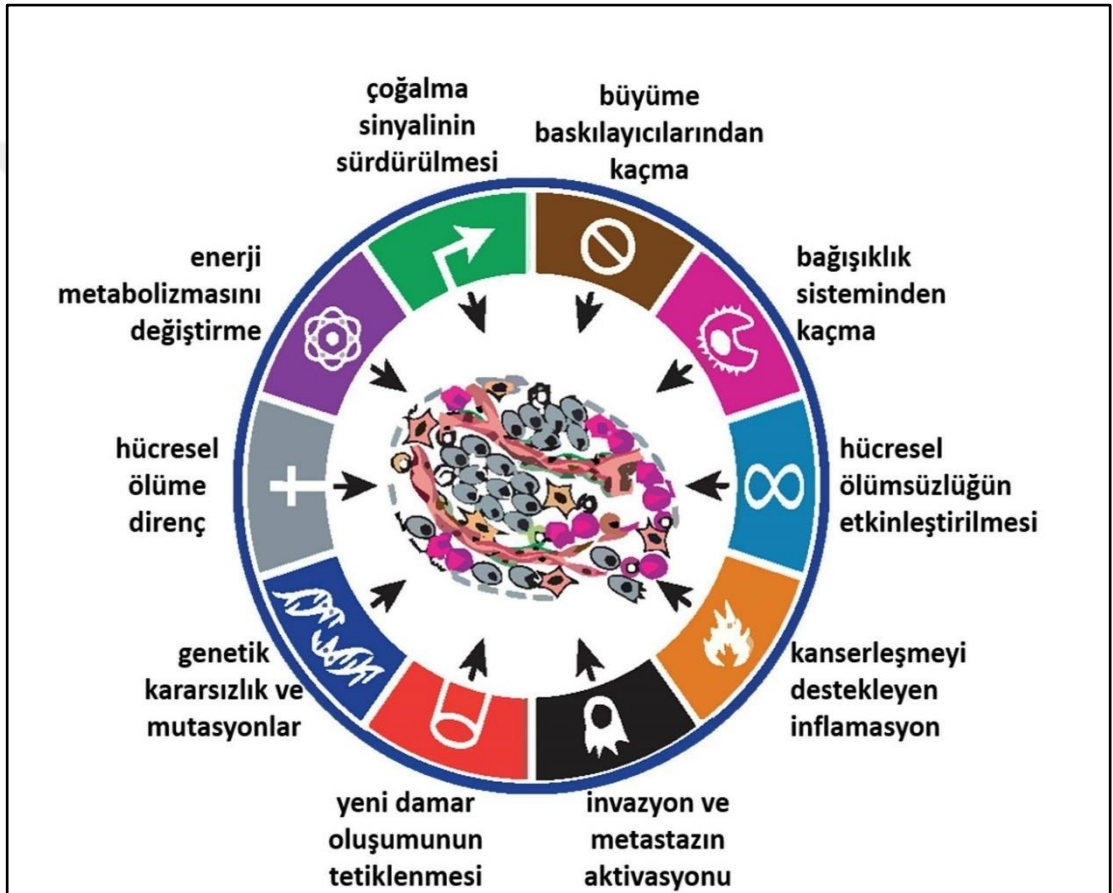
### 2.1. Kanser

Kanser kavramı ilk kez M.Ö. 460-370 yılları arasında Hipokrat tarafından ‘carcinoma’ adıyla iyileşmeyen yaralar için kullanılmıştır. İnsanlık tarihi kadar eski bir hastalık olan kanser, ismini solid bir tümörün yengece benzetilmesiyle almıştır. Daha sonra ünlü bir hekim ve filozof olan Galen (M.S. 130-210) yengeç ısırığı ile kanser ağrısının benzerliğinden yola çıkarak Latince yengeç anlamına gelen “cancer” kelimesini kullanarak, özelliklerine göre tümörleri sınıflandırmıştır (Sudhakar, 2009). Türk tıp tarihinde ise ilk kez 13. yüzyılda “seratan” kelimesi ile tanımlanan kanser kavramı, ağrılı şişlikler olarak ifade edilmiştir (Atıcı, 2007).

Kanser, genetik mutasyonların neden olduğu anormal ve kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen hastalıklar topluluğudur (Martínez-Jiménez vd., 2020). Söz konusu genetik hasar, hücre çoğalmasını destekleyen; proto-onkogenler, hücre çoğalmasını baskılayan tümör supresör genler, programlı hücre ölümünü kontrol edip düzenleyen genler ve gen replikasyon hatalarını onaran DNA tamir genlerinde meydana gelmektedir. Proto-onkogenler, normal hücrelerde proliferasyon ve farklılaşmayı düzenleyen genlerdir. Bir proto-onkogen, mutasyona uğradığında aktivasyon kazanırsa onkogen adını almaktadır (Alberts vd., 2002). Tümör supresör genler ise, hücre büyümesini regüle ederek tümör gelişimini önleyen genlerdir. Bu genlerin mutasyonlar sonucu heterozigot olma durumunu kaybetmesi; kontrolsüz hücre çoğalmasına, anormal hücre büyümesine ve apoptozise sebebiyet vermektedir (Cooper ve Hausman, 2004). DNA tamir genleri, replikasyon sırasında DNA polimerazın kusurlu bir baz eklediği an hatalı baza müdahale edip düzelten genlerdir. Bu genlerde mutasyonların meydana gelme durumlarında mikrosatellit instabilitesi olarak bilinen genomik kararsızlıklar ortaya çıkmaktadır (Nicolai vd., 2015). Tümör gelişimine katkı sağlayan bir diğer etken ise, telomerin sabit kalmasını sağlayarak tümöre “ölümsüzlük” kazandıran telomerase aktivitesidir (Rodríguez Bigas vd., 2000).

Kanser sınırsız bir çoğalmadır. Çok hücreli organizmalarda, organlar uygun boyuta ulaştığında hücreler bölünmeyi durdururken kanserli hücreler bölünmeye devam eder. Kanserli hücreler, hayatta kalmak için yüksek adaptif yeteneklere sahiptir. Kendilerini

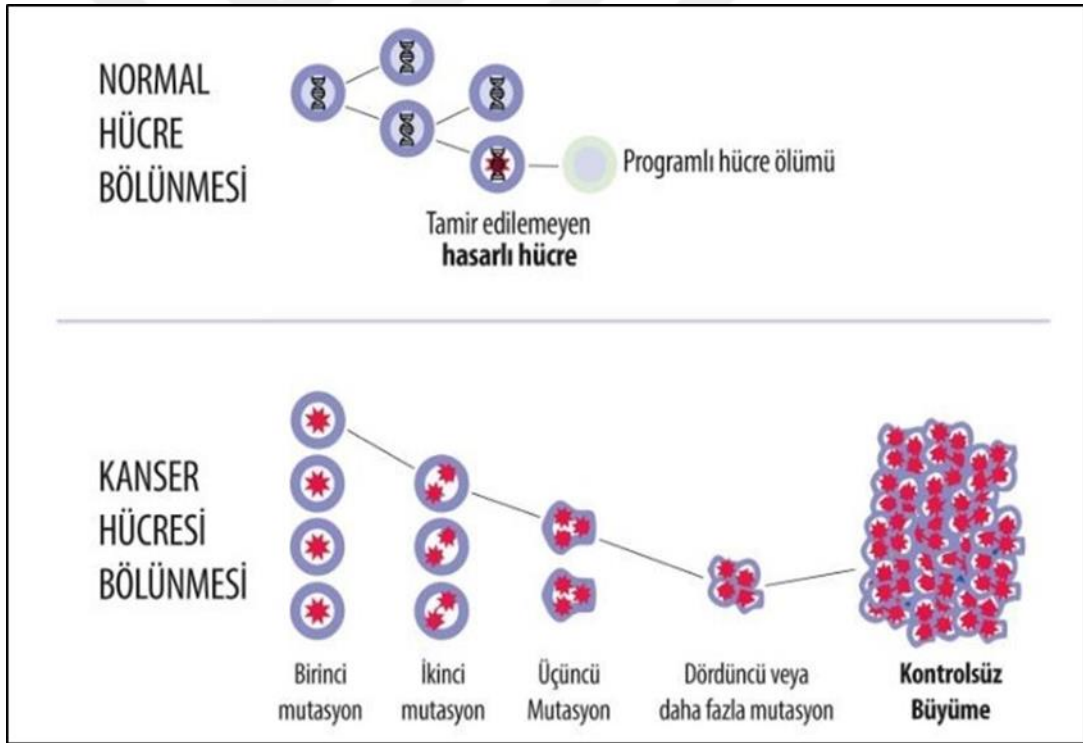
çevreleyen hücelere etki ederek onları yok edip kendilerine hızlandırılmış çoğalmaları ve büyümeleri için alan yaratırlar (Tripathy ve Pradhan, 2020). Kanser hüceleri, karsinogenez sürecinde bazı temel özellikler kazanmaktadır. Hanahan ve Weinberg (2011) tarafından bu özellikler; gen yapısında mutasyonlar, kendi kendine büyüme faktörlerine ve sürekli bölünme potansiyeline sahip olma, apoptozdan kaçma, anjiyogenez, invazyon ve metastaz yapma gibi başlıklar altında tanımlanmıştır (Bkz. Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kanser hücelerinin genel özellikleri

Özdoğan (2022) kanser sürecinde, hücelerin çok hızlı çoğalması ve bu çoğalmaya karşılık hücre kaybının olmaması nedeniyle hücelerin birikip tümör adı verilen yapıları oluşturduğunu belirtmiştir (Bkz. Şekil 2.2). Kanserleşme hem hücelerdeki genetik mutasyonlardan hem de bağışıklık sisteminin bu hüceleri tanıma ve yok etme noktasındaki yetersizliğinden kaynaklanmaktadır (Yılmaz ve Altunok, 2011). Mutasyona uğramış tek bir hücrenin çoğalmasıyla ortaya çıkan ilk tümör iyi huylu

(benign) tümör olarak adlandırılıp bu tümörlerin yayılma yetenekleri bulunmamaktadır. İlerleyen süreçte başka dokulara yayılabilme yeteneği kazanan (metastaz) ve kendi dolaşım ve sindirim sistemlerini geliştirerek gittiği dokularda kansere neden olan tümörlere ise kötü huylu (malign) tümör denir (Clark, 1991; Alberts vd., 2002; Yokota ve Kohno, 2004). Tüm malign tümörler kanser olarak nitelendirilir. Malign tümörler metastaz yapan, apoptoz yollarını kapatmış ve yaşam süresini kısaltan hatta ölüme sebep olan tümör türleridir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Malign tümör hücreleri telomer kısalması sonucu hücre ölümünü engellemek için telomeraz enziminin yüksek ifadesini sağlayarak sınırsız replikasyon yeteneğine sahip olurlar (Lowe ve Lin, 2000). Malign tümörlerin başka bir önemli özelliği ise besin alımı ve metabolik atıklardan kurtulmak için anjiyogenez (damar oluşumu) yapmalarıdır (Hanahan ve Weinberg, 2011).



**Şekil 2.2.** Tümör gelişimi

Özdoğan (2022)'ın yaptığı tanıma göre hücrelerde gen hasarlarına sebep olarak kanserleşme sürecine zemin hazırlayan maddelere karsinogen denilmektedir (Bkz. Şekil 2.3). Kansere sebep olan etmenler fiziksel (UV, güneş ışınları, radyasyon vb.), kimyasal

(nitrozaminler, alkol, sigara vb.) ve biyolojik (hormonal bozukluklar, virüsler, genetik yatkınlık, mutasyonlar vb.) olarak sınıflandırılabilirler (Clavel, 2007).

HSGM (2017)'ye göre kanser kaynaklı ölümlerin üçte birini tütün kullanımı, aşırı kilo, sebze ve meyve tüketiminin az olması, yetersiz fiziksel aktivite ve alkol tüketimi olmak üzere beş risk faktörü oluşturmaktadır. Kanserdeki en önemli risk faktörü tütün kullanımı olup kanserden kaynaklanan ölümlerin %22'sini oluşturmaktadır (WHO, 2019).



**Şekil 2.3.** Kansere sebep olan faktörler

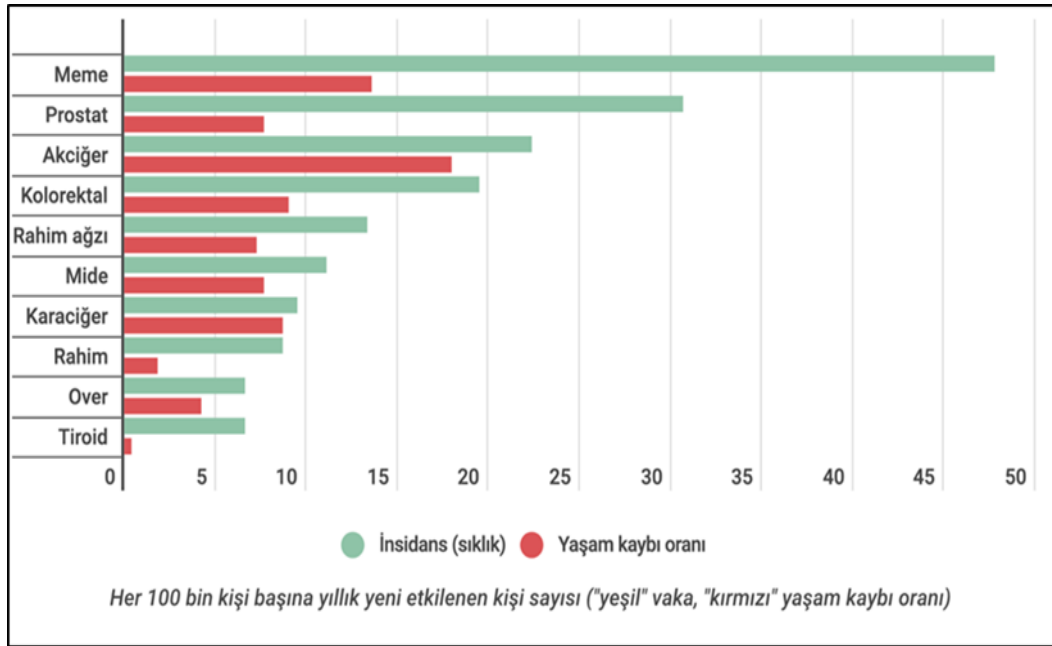
Kanser hastalarındaki belirtiler, tümörün konumuna ve diğer organlara yayılıp yayılmadığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (McPhee ve Papadakis, 2010). Kanser tedavisinde tümörün organizmadaki konumuna ve evresine bağlı olarak cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve gen terapisi gibi birçok yöntem başvurulmaktadır. Tedavide öncelikli amaç, tümör hücrelerinin sağlıklı çevre dokuya minimum derecede hasar vererek öldürülmesidir. Cerrahi rezeksiyon tercih edilen en temel yaklaşımdır. Tümörün ilaçla tedavi edilmesi anlamına gelen kemoterapi ise en sık kullanılan yöntemdir. Bütün bu yöntemlerin tedavi edici yönlerinin yanı sıra

dezavantajları da bulunmaktadır. Ayrıca bu tedavi yöntemleri için, uzun zaman ve yüksek maliyet gerekmektedir (Cai vd., 2015).

Kanser kişilerde sosyal, ruhsal ve fiziksel sorunlara yol açarken bir yandan da tedavinin pahalılığı sosyoekonomik sorunları ortaya çıkarmaktadır. Bu açıdan bakıldığında kanser bir toplum sorunudur. Kanserle mücadelenin temel önceliği hastalığın tedavi ve önlenmesini büyük ölçüde iyileştirmek için yeni mekanizmalar keşfetmek ve geliştirmektir.

### 2.1.1. Kanser istatistikleri

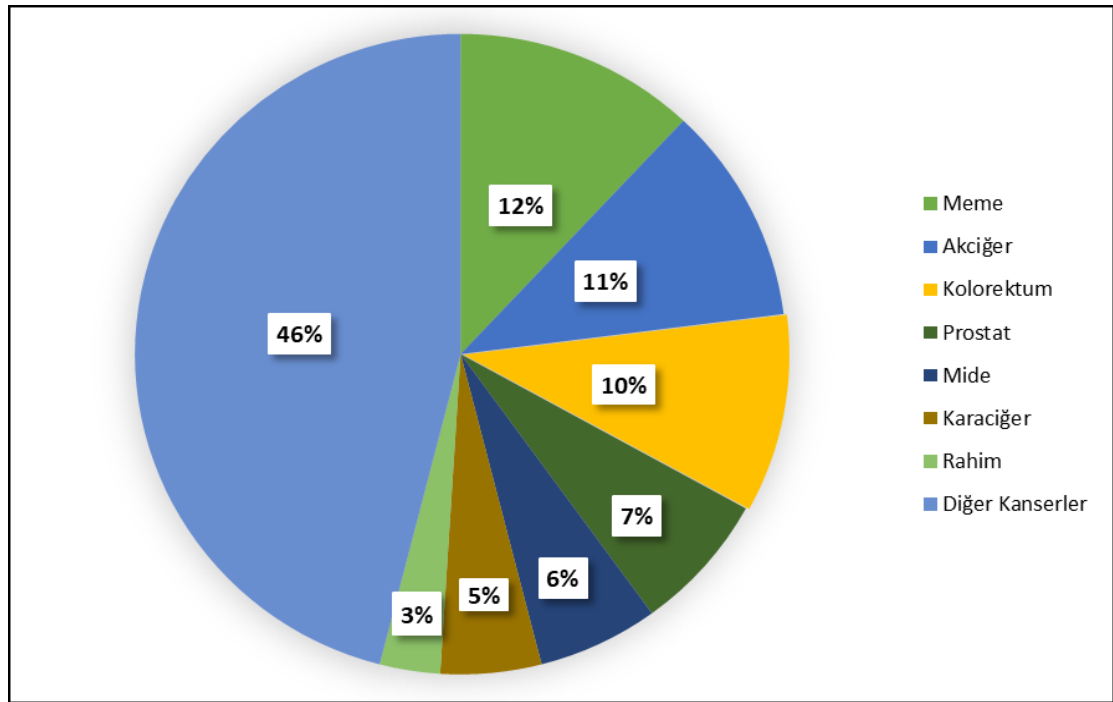
Dünya genelinde kanser önemli bir sağlık problemidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün alt kuruluşlarından Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) bir parçası olan GLOBOCAN, dünya genelinde tüm kanser türleri için istatistiki verileri sağlamaktadır. Bu veriler doğrultusunda 2020 yılında 50,6 milyon kanser vakasının bulunduğu, yeni vaka sayısının (insidans) 19,3 milyon olduğu ve kanser sebebiyle 10 milyon kişinin hayatını kaybettiği bildirilmiştir (GLOBOCAN, 2020). Yine GLOBOCAN (2020) verilerine göre nüfus artışıyla birlikte küresel kanser yükünün de artış gösterdiği görülmektedir (Bkz. Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Dünyada 2020'de farklı kanser türlerinin yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranları

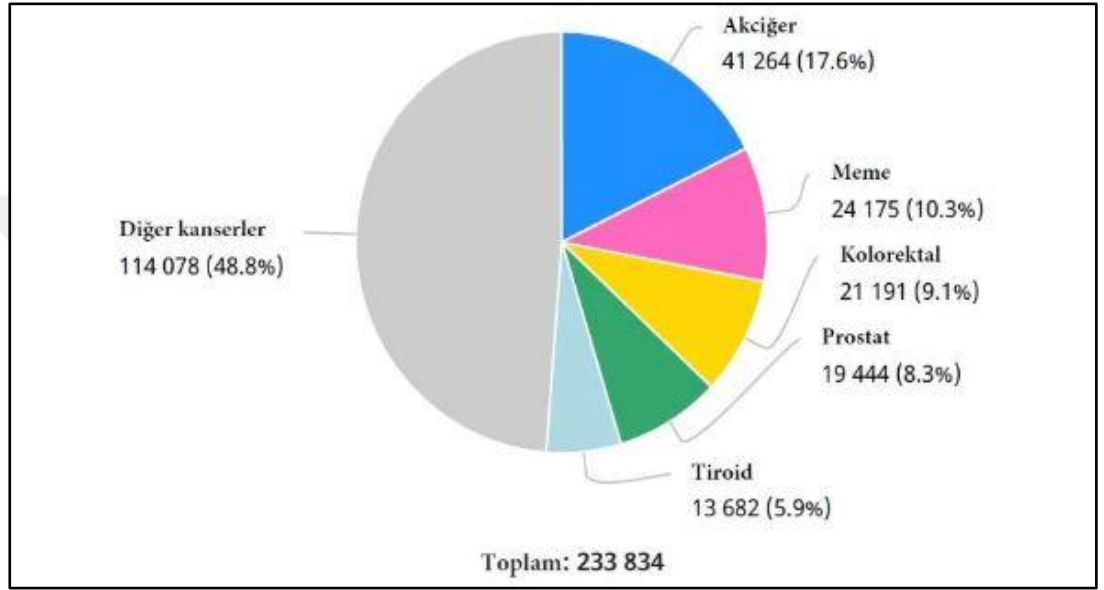
2040 yılına dek insidans oranının 30,2 milyon olacağı ve bir yılda 16,3 milyon kanser ölümünün gerçekleşeceği tahmin edilmektedir (GLOBOCAN, 2020). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2020 yılında yapılan ve istatistiksel veri sunan bir çalışmada her gün yaklaşık 4.950 yeni vakanın tespit edildiği bildirilmiştir (Siegel vd., 2020).

GLOBOCAN (2020) verilerine bakıldığında kanser türleri içinde en yaygın olanı meme kanseri olup (yeni vakaların %11,7'si), meme kanserini akciğer kanseri (%11,4), kolorektal kanser (%10,0), prostat kanseri (%7,3) ve mide kanseri (%5,6) izlemekte olup kansere bağlı ölümlerde ilk sırada akciğer kanseri gelmekte (kansere bağlı ölümlerin %18'ine akciğer kanseri sebep olmaktadır) daha sonra sırasıyla kolorektal kanser (%9,4), karaciğer kanseri (%8,3), mide kanseri (%7,7) ve meme kanserinin (%6,9) geldiği görülmektedir (Bkz. Şekil 2.5). Cinsiyete göre bakıldığında erkeklerde; ilk sırada akciğer kanseri gelmektedir. İnsidans sıralamasında ise akciğer kanserin, prostat kanseri ve kolorektal kanser izlemektedir. Kadınlarda en sık tanı konulan ve kansere bağlı ölümlerin başlıca sebebi meme kanseridir. Kolorektal kanser ve akciğer kanseri ise insidans sıralamasında meme kanserinden sonra gelmektedir (GLOBOCAN, 2020).

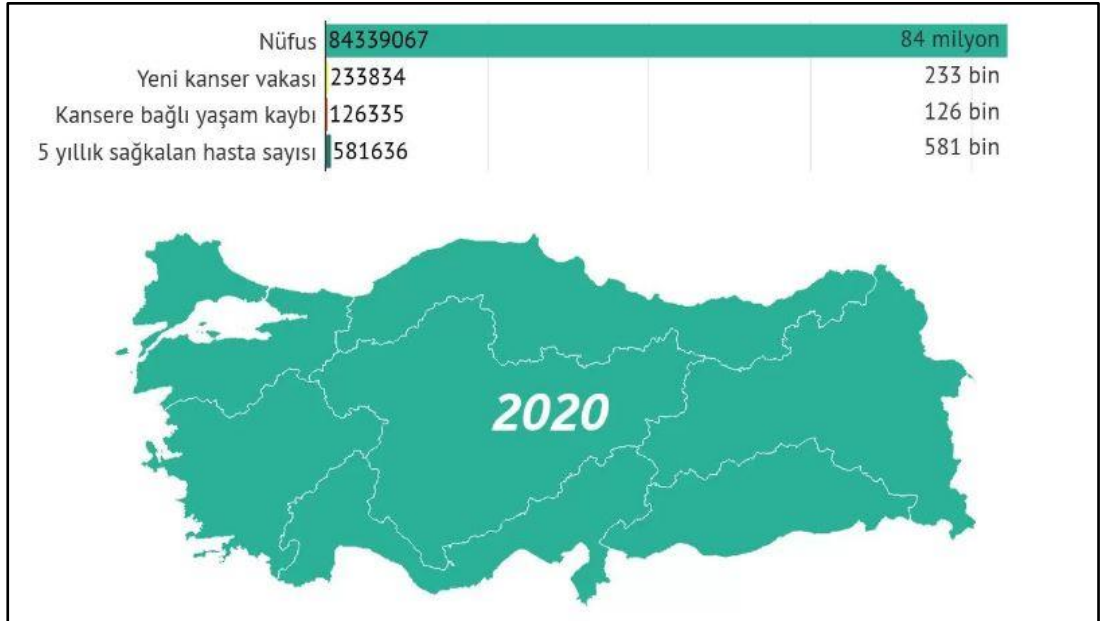


Şekil 2.5. 2020 yılında dünya genelinde görülen toplam yeni kanser vaka sayısı

Özdoğan (2022) kanser istatistikleri Türkiye’de kanser insidansının, dünya insidansının üzerinde yer aldığını, Amerika ve Avrupa Birliği ülkeleri gibi gelişmiş ülkelere göre daha düşük bir seviyede olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 2.6). Yine Özdoğan (2022) istatistiklerine göre Türkiye nüfusu 2020 yılında 84.339.067 iken, yıllık yeni kanser vaka sayısı 233.834 ve kansere bağlı yaşam kaybı sayısı 126.335 olarak raporlanmıştır (Bkz. Şekil 2.7).

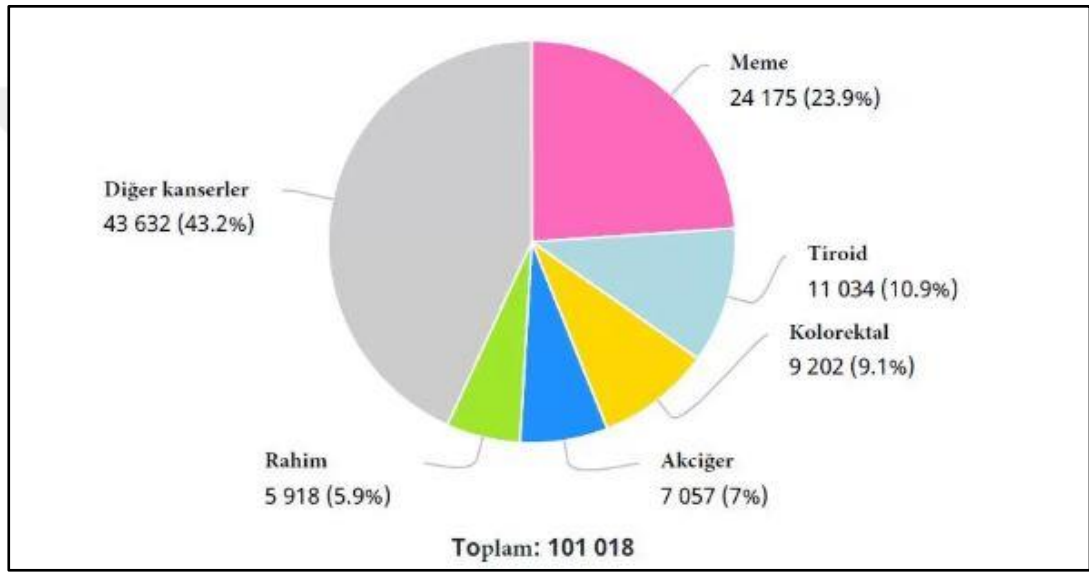


**Şekil 2.6.** 2020 yılında Türkiye’de görülen toplam kanser vaka dağılımı

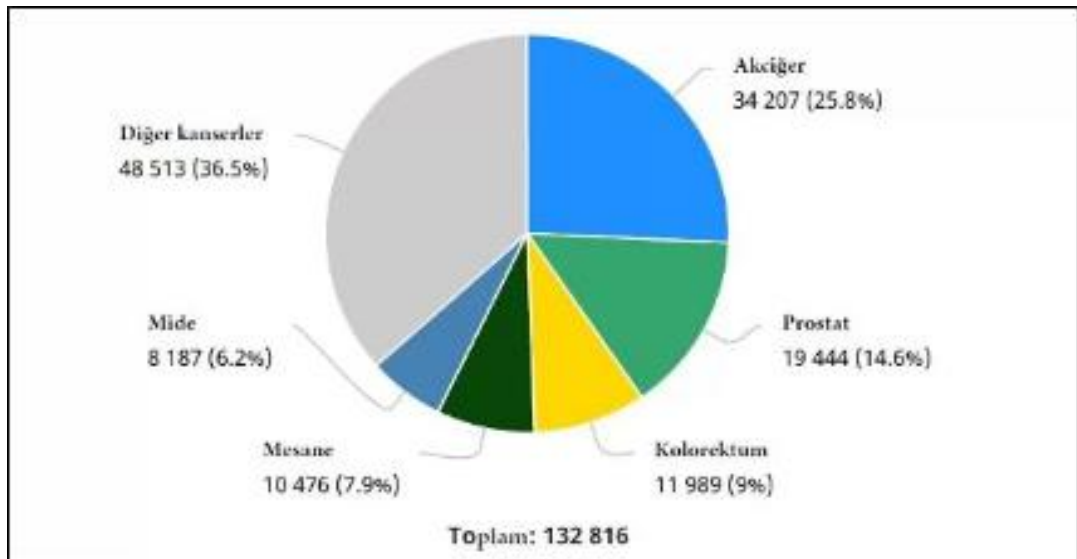


**Şekil 2.7.** 2020 yılı Türkiye kanser insidansı

2020 yılında ülkemizde akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal (kalın bağırsak) kanser, prostat kanseri ve tiroit kanseri en sık görülen ilk beş kanser türleridir. Tüm kanserlerin %50'den fazlasını bu beş kanser türü oluşturmaktadır. Bu veriler dünya geneli ve diğer gelişmiş ülkeler ile benzerlikler göstermektedir. Özdoğan (2022)'ye göre kadınlarda en çok görülen ilk beş kanser türü meme kanseri, tiroit kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri ve rahim kanseriyken (Bkz. Şekil 2.8) erkeklerde bu sıralama akciğer kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser, mesane kanseri ve mide kanseri şeklindedir (Bkz. Şekil 2.9).



**Şekil 2.8.** Kadınlarda en sık görülen kanser türleri



**Şekil 2.9.** Erkeklerde en sık görülen kanser türleri

### **2.1.2. Meme kanseri**

Meme kanseri hem kadınlarda hem de erkeklerde meme hücrelerindeki düzensizliklerin sebep olduğu bir kanser tipidir. Birçok doku ve organ embriyogenez sırasında modellenir ve yetişkin yaşamı boyunca bu modelleme değişmeden kalır. Oysa meme bezi ergenlik, hamilelik, emzirme ve menopozal dönemlerde belirgin değişiklikler geçiren dinamik bir organdır (Dontu vd., 2003).

Meme kanseri özellikle kadınlarda en çok tanı alan ve kansere bağlı ölüm sebeplerinde birinci sırada yer alan kanser türüdür. 2020 yılında yaklaşık olarak 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası olduğu bildirilmiştir. Meme kanseri 2020 yılında 685.000 yaşam kaybına sebep olarak dünya genelinde ölüme neden olan kanserler içinde 5. sırada yerini almıştır. Meme kanseri hem kadınlarda hem de erkeklerde görülmekte olup erkeklerde görülmesi nadir rastlanan bir olaydır. Erkek meme kanserleri, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %0,6'sını oluşturmaktadır (GLOBOCAN, 2020).

Meme kanseri hastalık biyobelirteçleri olarak tümör morfolojisi ve sınıflandırma derecesi, tümör büyüklüğü, lenf nodu metastazı, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), östrojen ve progesteron reseptör varlığı (ER-PR) gibi etmenler belirtilmektedir. Bu tür belirteçlerin varlığında immünohistokimya ve gen ekspresyon tekniklerinin kullanılmasıyla moleküler alt tiplendirme yapılmıştır. Bu moleküler alt tipler biyolojik tedaviye verdiği yanıt ve hastalığa özgü değişiklikler ile birbirinden ayrılırlar. Farklı tipler meme kanserinin biyolojik çeşitliliğini yansıttığı gibi tedavide kişiselleştirilmiş bir yaklaşıma yönelmeyi de zorunlu kılmaktadır (Akram vd., 2017).

#### **2.1.2.1. Meme kanserinin sınıflandırılması**

Her biri farklı bir histolojik görünüm ve klinik davranış ile ilişkili yirmiden fazla özel histolojik meme kanseri alt tipi vardır. Bunlar invaziv lobüler karsinom, tübüler karsinom, müsinöz karsinom, adenoid kistik karsinom ve salgı karsinomu gibi birçok histolojik alt tipe sahiplerdir (Provenzano vd., 2018). Meme kanserlerinin moleküler düzeyde sınıflandırması ise dört gruptan oluşmaktadır. Bunlar; Luminal A (ER+, PR+, HER2-), Luminal B (ER+, PR+, HER2+), HER2 pozitif (ER-, PR-, HER2+) ve Bazal benzeri (ER-, PR-, HER2-) olarak sınıflandırılmaktadır (Reis-Filho ve Pusztai, 2011).



hedeflerin eksikliği nedeniyle diğer meme kanserli hastalara göre nispeten daha düşük bir tedavi sonucuna sahiplerdir. Bu nedenle, etkili ilaç keşfetmek bu hastaların tedavisi için çok önemlidir (Liu vd., 2019).

#### **2.1.2.2. Meme kanserinin moleküler mekanizması**

Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) dahil olmak üzere hormon reseptörlerinin ekspresyonuna bağlı olarak farklı alt tiplere sahip olan meme kanseri karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Östrojen, normal meme bezinin büyüme ve farklılaşmasında görev yapan bir hormondur. Yüksek östrojen seviyelerinin meme kanseri oluşumunda bir risk faktörü olduğuna dair araştırmalar vardır. Bu araştırmalar östrojen uygulamasının tümör büyümesini artırırken östrojen yoksunluğunun tümörleri azalttığını ortaya koymaktadır (Cos vd., 2006). Meme kanseri vakalarının %76'sını 50 yaşın üzerindeki insanların oluşturması östrojene maruz kalma süresinin meme kanseri oluşumunda önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Menopoz sonrası periferik dokulardaki östrojen konsantrasyonunun yüksek olması da menopoz dönemindeki kadınlarda meme kanserinin daha sık görülmesinin bir diğer sebebidir (Yager ve Davidson, 2006).

Meme kanserinin genetik temeline dair araştırmalar spesifik genlere yönelmiş durumdadır. Bu genler onkogenler (ras, c-myc genleri), tümör supresör genleri (p53, BRCA1, BRCA2, nm23), büyüme faktörü reseptör genleri (HER2), hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev yapan genler (telomeraz) ve apoptozisde görev yapan genler (BCL gen ailesi) olarak belirtilebilir. Tümör supresör genlerin ailesel meme kanserlerinin yaklaşık %50'sinde önem taşıdığı düşünülmektedir. BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin devamlılığı, DNA hasarı tamiri için hücresel cevap olarak transkripsiyonel düzenlemeye ve hücresel proliferasyona katkıda bulunmaktadır (Oesterreich ve Fuqua, 1999; Cui ve Hopper, 2000).

#### **2.1.2.3. Meme kanseri risk faktörleri**

Meme kanseri risk faktörleri arasında adet görme yaşı, çocuk doğurma, aile öyküsü, yüksek yağlı beslenme, menopoz sonrası hormon kullanımı, kilo durumu, alkol ve tütün kullanımı gibi çevresel faktörler yer almaktadır (Madigan vd., 1995). Gebelikte geç yaş,

düşük fiziksel aktivite, ırk/etnik köken, menopo  sonrası obezite ve yüksek dozda radyasyona maruz kalma gibi faktörlerde meme kanserine neden olabilmektedir. Meme kanseri riski kadınlarda erkeklerden daha fazla meme dokusuna sahip oldukları ve östrojene maruz kaldıkları için daha yüksektir. Aile geçmişinde 50 yaşından önce meme kanseri öyküsünün bulunması meme kanseri riskini arttırır (Claus vd., 2003). DNA tamir genlerindeki kalıtsal mutasyonlar meme ve yumurtalık kanseri gelişme riskini %30-40 oranında arttırmakta olup meme kanserlerinin yaklaşık %5 ila %10'u BRCA1, BRCA2 proteinlerinin mutasyonu sonucu oluşmaktadır (Madigan vd., 1995; Venkitaraman, 2002). 25 yaşında meme kanseri riski oldukça düşüktür, 45 yaşında ise meme kanserine yakalanma olasılığı 100 kat artmaktadır (Hulka ve Moorman, 2001). Meme kanseri 30'lu yaşlardan sonra menopo  dönemine kadar hızlı bir artış gösterir, menopo  döneminde biraz azalır ve sonrasında yavaş bir artış olur. Yaş ilerledikçe meme kanserinin artması üreme hormonlarından kaynaklanmaktadır (Dumitrescu ve Cotarla, 2005).

Meme kanseri açısından beyaz tenli kadınlar, esmer tenli kadınlara göre %20 daha fazla risk altındadır. En az bir yıl boyunca emzirmenin meme kanseri riskini azalttığı da bildirilmiştir (Cokkinides vd., 2005). Ayrıca çocuk sahibi olmamak, emzirmeme, doğum kontrol hapları, alkol-sigara kullanımı ve göğüs implantlarının da meme kanseri riskini artırabileceği bildirilmiştir (ACS, 2019).

#### **2.1.2.4. Meme kanserinde tedavi**

Meme kanserinde tedavi şekilleri; cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hormon tedavisi, hedeflendirilmiş terapi ve immünoterapi olarak alt başlıklara ayrılır.

##### **Cerrahi**

Cerrahi tedavi, genellikle tümör özelliklerine ve hasta tercihine bağılı olarak değışiklik gösteren, doktorların kanser dokusunu kesip aldığı bir ameliyattır. Cerrahi tedavide iki ameliyat türü vardır. Bunlardan ilki olan lumpektomi, tümörün ve çevresinde az miktarda sağlıklı dokunun çıkarılması işlemidir. İkinci tür olan mastektomi ise lobüller, kanallar, yağ dokusu, meme başı gibi yapıların çıkarılmasını içerir. Bazı hastalarda göğüs duvarındaki lenf düğümleri ve kaslar da çıkarılabilmektedir (Cokkinides vd;

2005). Mastektomi uygulanan hastaların çoğunda radyasyona ihtiyaç duyulmasada, bazen tümör büyük olduğunda veya lenf düğümleri söz konusu olduğunda radyasyon tedavisi önerilmektedir.

### **Radyasyon tedavisi**

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini öldürmek veya büyümelerini önlemek için yüksek enerjili X-ışınları veya diğer radyasyon türlerinin kullanıldığı bir tedavi çeşididir. İki çeşit radyasyon terapisi bulunmaktadır. Bunlardan dış radyasyon tedavisinde, kanserli bölgeye radyasyon göndermek için vücudun dışında bir makine kullanılmaktadır. Dahili radyasyon tedavisinde ise doğrudan kanserin içine veya yakınına yerleştirilen iğneler, tohumlar, teller veya kateterlerle kapatılmış radyoaktif bir madde kullanılır. Radyasyon tedavisinin verilmesi, tedavi edilen kanserin tipine ve evresine bağlıdır (Cokkinides vd., 2005).

### **Kemoterapi**

Kemoterapi, kanser hücrelerinin büyümesini durdurmak için ilaçların kullanıldığı bir kanser tedavisidir. Kemoterapi ağızdan alındığında ya da damar veya kas içine enjekte edildiğinde ilaçlar kan dolaşımına girerek kanser hücrelerine ulaşabilirler (sistemik kemoterapi). Kemoterapi doğrudan beyin omurilik sıvısına, bir organa veya karın gibi bir vücut boşluğuna uygulandığında ise ilaçlar bu bölgelerdeki kanser hücrelerine etki etmektedirler (bölgesel kemoterapi). Kemoterapinin nasıl verileceği tedavi edilen kanserin tipine ve evresine bağlıdır. Meme kanserinin tedavisinde sistemik kemoterapi kullanılır (Cokkinides vd., 2005).

### **Hormon tedavisi**

Hormon tedavisi, hormonları ortadan kaldırarak veya eylemlerini engelleyerek kanser hücrelerinin büyümesini durduran bir kanser tedavisidir. Hormonlar, vücuttaki bezler tarafından üretilen ve kan dolaşımında bulunan maddelerdir. Kanser hücreleri hormonların bağlanabileceği yerlere sahiplerse (reseptörler), hormon üretimini azaltmak veya çalışmalarını engellemek için ilaçlar, cerrahi veya radyasyon tedavisi kullanılır. Hormon reseptörü pozitif meme kanseri olan kadınlarda, en az 5 yıllık adjuvan hormon tedavisi kanserin tekrarlama (geri gelme) riskini azaltır. Hormon

reseptörü pozitif meme kanseri teşhisi konmuş bazı premenopozal kadınlara luteinize edici bir hormon salgılatıcı hormon (LHRH) agonisti ile hormon tedavisi verilir. LHRH agonistleri vücudun östrojen ve progesteronunu azaltır. Hormon reseptörü pozitif meme kanseri olan bazı postmenopozal kadınlara ise aromataz inhibitörü ile hormon tedavisi uygulanır. Aromataz inhibitörleri, aromataz adı verilen bir enzimi androjenin östrojene dönüştürmesini engelleyerek vücudun östrojenini azaltır (Cokkinides vd., 2005).

### **Hedeflendirilmiş terapi**

HER2 yolunu hedefleyen antikör tedavisi 1990'lerden beri kullanılmakta olup HER2-pozitif metastatik meme kanseri tedavisinde devrim yaratmıştır. Birkaç HER2 hedefli ajan (Trastuzumab, pertuzumab, ado-trastuzumab emtansin, lapatinib) bu hastalığın tedavisi için onaylanmıştır (Cokkinides vd., 2005).

**Monoklonal antikör tedavisi:** Trastuzumab, HER2/neu reseptörüne bağlanan bir monoklonal antikördür (Pegram vd., 1998). Daha önce tümörleri HER2/neu eksprese eden sitotoksik kemoterapi ile tedavi edilen hastalarda, trastuzumabın tek bir ajan olarak uygulanması %21'lik bir yanıt oranı ile sonuçlanmıştır.

Pertuzumab, HER2 hücre dışı alanında trastuzumabdan farklı bir epitopa bağlanan bir monoklonal antikördür. Pertuzumabın HER2'ye bağlanması, diğer ligandla aktive edilmiş HER reseptörleri, özellikle HER3 ile dimerizasyonu önler. Ado-trastuzumab emtansin (T-DM1), trastuzumabın HER2 hedefli antitümör özelliklerini mikrotübül engelleyici ajan DM1'in sitotoksik aktivitesi ile birleştiren bir antikör-ilaç konjugatıdır (Cokkinides vd., 2005).

**Tirosin kinaz inhibitörü tedavisi:** Lapatinib, HER2/neu ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün oral yoldan verilen bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Lapatinib artı kapesitabin, trastuzumab tedavisinden sonra ilerleyen HER2-pozitif metastatik meme kanseri olan hastalarda aktivite göstermiştir (Cokkinides vd., 2005).

**Germline BRCA mutasyon tedavisi:** Olaparib ve talazoparib PARP inhibitörleri olarak bilinen ilaçlardır. PARP proteinleri normalde hücrelerin içindeki hasarlı DNA'nın onarımına yardımcı olur. Mutasyona uğramış bir BRCA genine sahip tümör hücreleri

zaten hasarlı DNA'yı onarmakta zorlandığından, PARP proteinlerini bloke etmek genellikle bu hücrelerin ölümüne yol açar (Cokkinides vd., 2005).

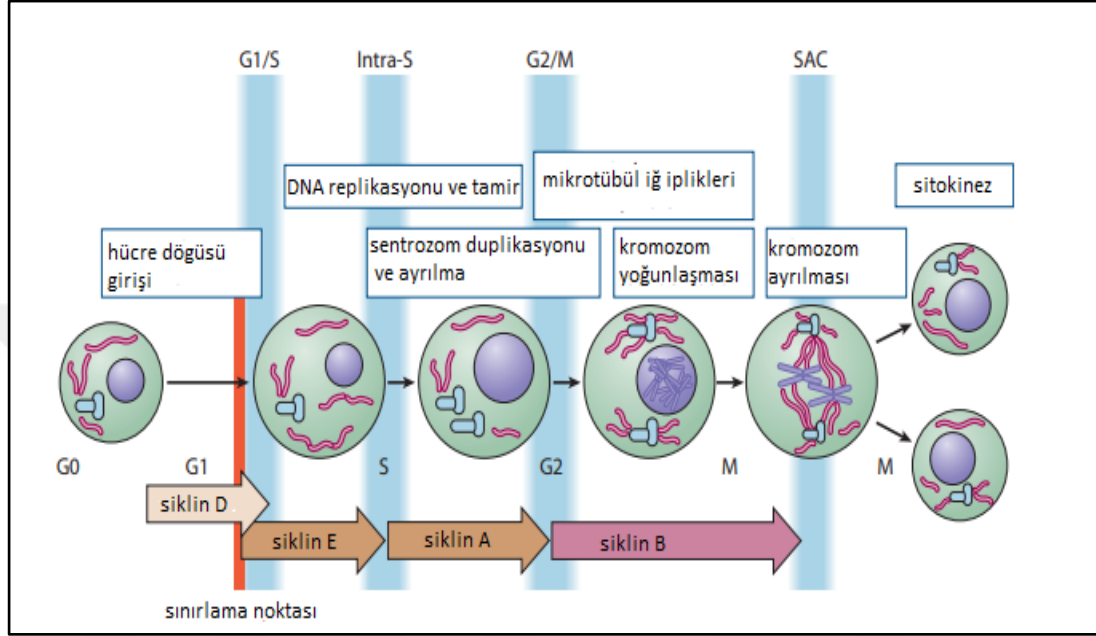
### **İmmünoterapi**

İmmünoterapi, bir kişinin kendi bağışıklık sistemini, kanser hücrelerini daha etkili bir şekilde tanıması ve yok etmesini uyarmak için ilaçların kullanılmasıdır. İmmün sistemi bağışıklık sistemi hücrelerinin vücuttaki normal hücrelere saldırmasını önlemektedir. Bu nedenle, bir immün yanıt başlatmak için bağışıklık hücrelerinde açılması veya kapatılması gereken proteinler olan “kontrol noktaları” kullanır. Meme kanseri hücreleri bazen immün sistem tarafından saldırıya uğramamak için bu kontrol noktalarını kullanır. İmmünoterapi ilaçları bu kontrol noktalarını hedefleyerek meme kanseri hücrelerine karşı immün yanıtı geri kazanmaya yardımcı olur (Cokkinides vd., 2005).

### **2.2. Hücre Döngüsü**

Malumbres (2020), hücre döngüsünü, hücresel canlılığın devam etmesi için en önemli olaylardan biri olan DNA replikasyonunun, replikasyon öncesi ve esnasına kadar hücresel bileşenlerin iki katına çıkarıldığı, bunun sonucunda da hücre bölünmesinin gerçekleştiği süreçler zinciri olarak tanımlamıştır (Bkz. Şekil 2.11). Hücreler temel olarak bölünme için iç ya da dış bir sinyal almadığı sürece G0 aşamasında sessiz (dinlenme fazı) olarak bekletilirler. Bu aşamada hücre biyokimyasal olarak aktiftir. Sinyal alımı gerçekleştiğinde hücre hacimce büyüdüğü ve genetik materyalin kopyalanması için gerekli materyallerin sentezlendiği G1 fazına geçer. DNA kopyalanmadan önce, hücrede RNA ve protein sentezi artmakta ve proteinlerin artması sonucu hücresel hacim iki katına çıkmaktadır. Bu evre G1 evresi olarak bilinmektedir. Burada DNA replikasyonundan önce hazırlık evresi söz konusudur. Gerçekleşen bu evrede S-siklinler devreye girerek, DNA sentezini başlatmak için yeterli maddelerin olduğu sinyali verir ve S evresine geçişi sağlar. S evresi; DNA replikasyonun gerçekleştiği evredir. Daha sonra hücre G2 evresine geçer ve bir sonraki aşama olan mitozun gerçekleşmesi için gerekli olan enerjiyi, tübülün ve histon olmayan proteinleri sentezler. Olgunlaşmayı başlatan faktör olarak bilinen MPF bileşiğinin iki alt birimi CDC-2 ve siklin B birleşip aktifleşerek hücrenin G2 evresinden mitoz (M) evresine geçmesini sağlar ve böylelikle M-siklinler mitozu başlatır (Barnum ve O'Connell, 2014;

Junqueira vd., 1993). Bu evre; kromozomun yoğunlaştığı, çekirdek zarının parçalandığı ve iğ ipliklerinin olduğu profaz, kromozomların sentromerlerinden iğ ipliklerine bağlandığı metafaz, bu sentromerlerden iki kromatidin birbirinden ayrıldığı anafaz ve sitokinezin tamamlandığı telofaz evrelerinden oluşmaktadır.



Şekil 2.11. Hücre döngüsü modeli

### 2.2.1. Hücre döngüsünün kontrolü

Canlı organizmada proliferasyon kararı sıkı bir şekilde düzenlenmekte olup, besleyici maddeler ve büyüme faktörleri, inhibe edici faktörler, çeşitli dış sinyaller, hücrenin komşularından ve dış matriksinden gelen etkileşimlerden etkilenmektedir. Her bir faktör proliferasyonu destekleyen veya baskılayan hücre içi sinyal yollarını uyarır. Hücre iç ve dış tüm sinyalleri birleştirerek şartlar uygun olduğunda hücre döngüsünü başlatmaktadır. Ökaryotik hücre döngüsü geçişlerini düzenlemede birçok gen, enzim ve hormon koordineli bir şekilde çalışmaktadır. Döngüde karşılaşılabilecek her türlü hasara karşı “dur ve geç” emirleri ile hücrenin kontrol altında tutulması sağlanır. Bu kontrol noktaları G1-S, S, G2-M ve metafaz–anafaz geçişinde bulunur (Malumbres, 2020). Bu fazlardaki kontrol siklin bağımlı kinazlar (CDK) tarafından gerçekleşir. Siklin bağımlı kinazlar normal şartlar altında inaktiftir ve aktifleşmek için siklinlere ihtiyaç duyarlar.

## **Siklinler**

Siklin bağımlı kinazlardan (CDK) farklı olarak siklinler; hücre döngüsünün belirli evrelerinde sentezlenirler ve CDK'ları aktifleştirirler. Döngü esnasında sırasıyla siklin D, E, A ve B bir veya birden fazla CDK'a bağlanırlar. Hücre döngüsünde düzeyi ilk artan Siklin D'dir ve G1'in ortasında ortaya çıkıp S evresinde kaybolur.

Hücre döngüsünün G1 evresinde Siklin D, CDK4'e bağlanarak siklin D-CDK4 kompleksini oluşturur. Bu kompleks hücre döngüsünde retinoblastoma proteinini (RB) fosforiller. RB'nin fosforillenmesi hücre döngüsü için moleküler bir anahtar gibi görev yapar. Çünkü RB'nin hipofosforile hali transkripsiyon faktörü E2F ile sıkı bir kompleks oluşturup hücrelerin replikasyonunu engeller. RB'nin fosforilasyonu ise kompleksin ayrılmasına ve E2F üzerindeki transkripsiyon aktivite engelinin ortadan kalkmasına neden olur.

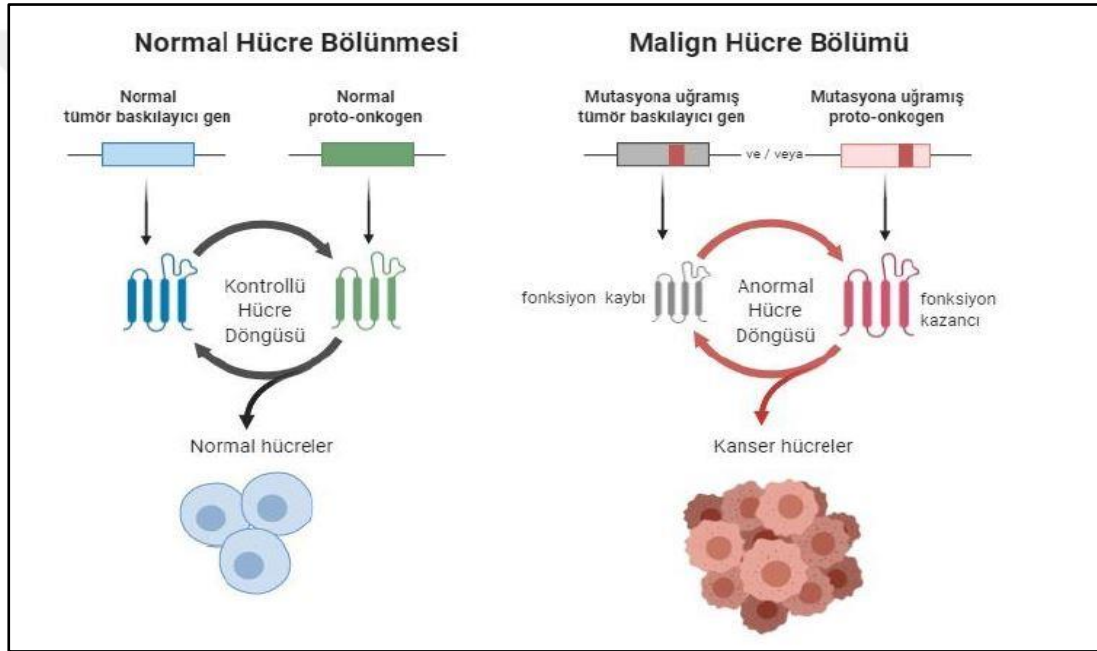
Hücre döngüsünün S evresine geçmesi ve DNA replikasyonunun başlaması için siklin E ve CDK2 arasında aktif bir kompleksin oluşması gerekir. Bu kompleksin oluşumu için de aktif E2F'ye ihtiyaç vardır. E1 ve E2 olarak iki izoformu bulunan siklin E, S-evresinde CDK2 ile aktif bir kompleks oluşturur. Aktif E2F, siklin E'nin ve DNA replikasyonu için gerekli polimerazın transkripsiyonunu arttırarak DNA replikasyonunu uyarır.

Hücre döngüsünde G2/M geçişi ise siklin A-CDK2 kompleksi tarafından sağlanır. Bu kompleks profaz evresindeki olayları düzenler. Profazdan sonraki evrelere geçişi sağlayan siklin B-CDK1 kompleksidir. Bir protein fosfataz tarafından aktive edilen bu kompleks erken profaz evresinde çekirdek içinde birikerek çekirdek zarının çözülmesine neden olur ve mitozu başlatır (Dulic vd., 1992; Senderowicz, 2000; Joyce vd., 2001; DiPaola, 2002; Gutierrez vd., 2002; Alberts vd., 2004; Golias vd., 2004; Kierszenbaum, 2006).

### **2.2.2. Hücre döngüsü ve kanser**

Polyak vd., (1994) kontrolsüz hücre çoğalmasını kanserin en temel ayırt edici özelliği olarak belirtmiştir (Bkz. Şekil 2.12) ve tümör hücrelerinde çoğunlukla hücre döngüsünü doğrudan düzenleyen genler hasarlıdır (Sherr, 1996). İnsanlarda görülen tüm kanser

tiplerinde, hücre döngüsüne girişi kontrol eden moleküler yollarda ve p53 yolu düzenleyicilerindeki mutasyonların temel rol aldığı bildirilmiştir. (Malumbres ve Barbacid, 2001; Kastan ve Bartek, 2004). pRB ve p53 molekülleri, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve stres tepkisinin oluşturulmasında kritik kapı koruyucularıdır ve temel işlevleri kromozomlarda hep yapısal hem de sayısal sapmalar düzeyinde genom bütünlüğünü korumaktır (Malumbres, 2011; Manning ve Dyson, 2012). Hücre döngüsünde en sık karşılaşılan değişiklikler pRB tümör baskılayıcısının kaybı veya mutasyonu, aşırı siklin ve/veya CDK ekspresyonu, CDK inhibitörlerinin ekspresyonunun kaybı olarak sıralanabilir.



**Şekil 2.12.** Hücre döngüsü ve kanser ilişkisi

Hücrede bir DNA hasarı tespit edilmesi durumunda tümör baskılayıcı bir protein olan p53, metilasyon ve asetilasyon gibi epigenetik regülasyonlar aracılığıyla hücre içinde daha fazla tutulmaktadır. p53, hücre döngüsünde fren görevi yapan proteinlerin ifadesini artırmakta ve hücrenin kontrollü bir şekilde intihara sürüklenmesini sağlamaktadır (Miyashita vd., 1994; Yu vd., 2001). Yapılan araştırmalarda çeşitli kanser türlerinin en az %50'sinde p53 proteininin mutasyona uğradığı ya da ikinci kopyasının yok olduğu gösterilmiştir (Whibley vd., 2009). Son yıllarda p53 genini kanserli dokulara geri

kazandırmak için gen tedavi yöntemleri üzerine kapsamlı çalışmalar yürütülmektedir (Chen vd., 2010).

### 2.3. Apoptozis

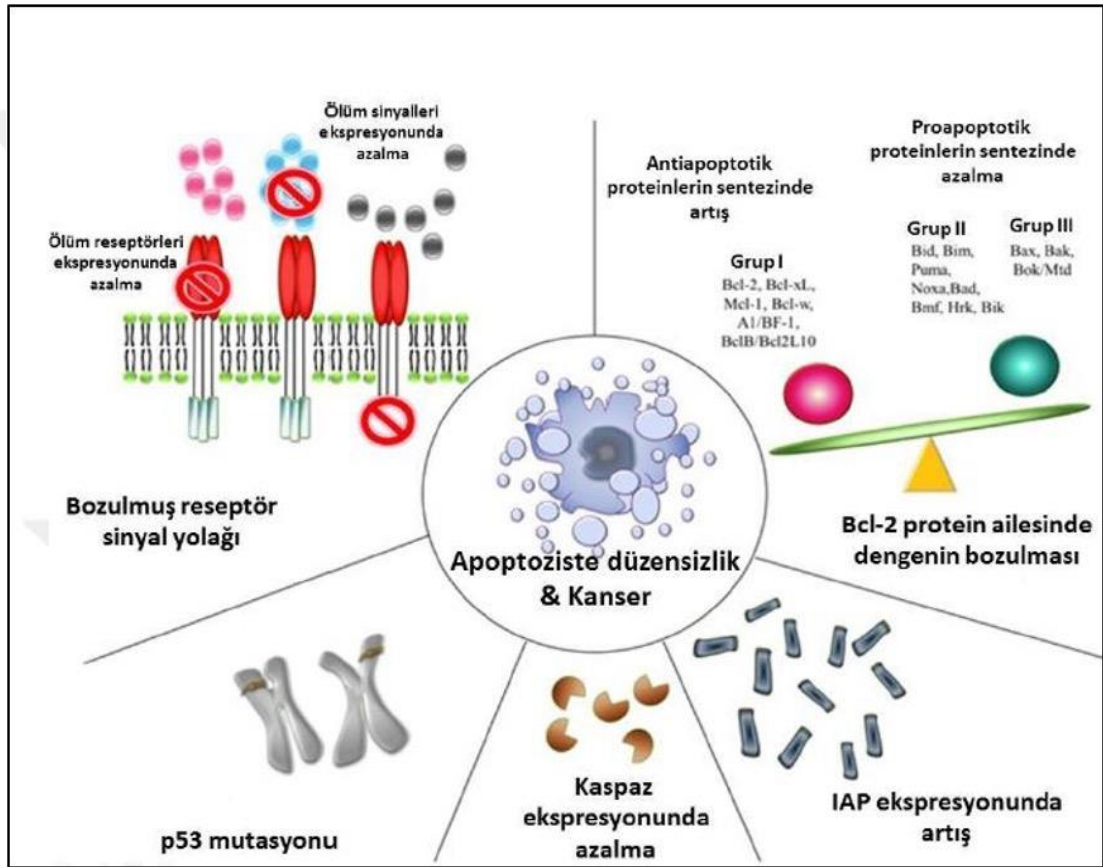
Bir organizmadaki canlı ve ölü hücre dengesini sağlamak için hücre çoğalması kadar hücre ölüm mekanizmaları da önem taşımaktadır. Hücreler programlanmış hücre ölümü olan apoptozis, nekroz ve otofaji gibi çeşitli hücre ölüm tipleriyle gerçekleşmektedir. Nekrozun aksine, apoptoz; komşu hücreler tarafından hücre kalıntılarının fagositozuna yol açan düzenlenmiş, enerjiye bağlı bir hücre ölüm şeklidir. Nekroz morfolojik olarak düzensizdir. Çünkü nekroz gerçekleşirken organeller şişerek hücreyi patlatır. Bazen hücre içeriğini dışarı verdiğinden dolayı komşu hücrelerin zarar görmesine bazen de immün sistem tarafından bir enflamasyona neden olabilir. Bu da organizmanın programı dışında gerçekleştiğinden dolayı istenen bir durum değildir. Ancak apoptoz da proteinleri parçalanmış hücreler büzüşür ve kendi çekirdek ve DNA'sını parçalayarak immün sistem tarafından yok edilir. Dolayısı ile enerji kullanarak hücrenin yapmış olduğu bu ölüm şekline programlı hücre ölümü (apoptozis) denir ve embriyolojik dönemden itibaren organizmada görülmektedir (Öktem vd., 2001; Ziegler ve Groscurth, 2004). Embriyonik dönemde insanlarda parmak aralarındaki perdenin ortadan kalkması, kurbağaların metamorfoz sırasında kuyruklarının kaybolması, postnatal dönemde kan hücrelerinin uzaklaştırılması, menstrasyon sırasında endometriyal hücrelerinin (uterusun iç katmanındaki epiteller) yıkımı, menstrual siklus sonunda genişleyen korpus luteumun tekrar eski haline dönmesi apoptozis ile gerçekleşir (Franz ve Kidson, 1997; Marti vd., 2000; Ford, 2001).

Apoptozis herhangi nedenle zarar görmüş hücrelere karşı bir savunma mekanizmasıdır. Bu şekilde olan hücrelerde apoptoz gerçekleşmediği takdirde kanser, bazı nörodejeneratif bozukluklar, otoimmün hastalıklar ve AIDS gibi hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (Ulukaya vd., 2011).

DNA kondensasyonu ve DNA'nın yaklaşık 200 baz çifti halinde fragmentlere kırılması; membran yüzeyinde membrane blebs adı verilen lipid keseciklerinin meydana gelmesi; hücrenin büzüşerek küçülmesi; fosfatidil serin moleküllerinin membranın dış yüzeyine göç etmesi; kaspaz- 3, 8 ve 9 gibi kaspazların aktivasyonu; mitokondrinin

permeabilitesinin bozulması (sitokrom c salınması) ve apoptotik hücrelerin komşu hücreler veya makrofajlar tarafından yutulması apoptotik hücre ölüm yollarının en temel morfolojik ve biyokimyasal belirteçleridir (Elmore, 2007).

Wong (2011)' e göre kanser, bir dizi genetik değişimin sonucu olarak normal bir hücrenin kötü huylu bir hücreye dönüşmesidir (Bkz. Şekil 2.13). Bu dönüşüme sebep olan temel faktörlerden biri de apoptozdan kaçmaktır (Hanahan ve Weinberg, 2000). Kanser oluşumunda azalmış apoptozis veya apoptozis direnci önemli bir rol oynar.



Şekil 2.13. Apoptozis ve kanser

Genomik analizin ortaya çıkışı, kanserlerin hücre ölümünü atlamaasına izin veren çeşitli mutasyonlara ilişkin önemli bilgiler sağlamıştır. Artık kanser hücrelerinin, belirli bir tümör tipine özgü olan apoptozdan kaçmak için çeşitli mekanizmalarda meydana gelen düzensizlikleri kullandıkları bilinmektedir (Koff vd., 2015). Birçok kanser hücresi, bu sıkı düzenlenmiş hücre ölümü programını, anti-apoptotik moleküllerin seviyelerini değiştirerek veya pro-apoptotik hücre ölümü bileşenlerini etkisizleştirerek atlama için

mekanizmalar geliştirir. Kanslerle mücadelede hücre ölümü için hücrenin kendi mekanizmasını kullanmak oldukça etkili bir yöntemdir (Koff vd., 2015). Terapötik hedefleme için iki ortak strateji, pro-apoptotik moleküllerin uyarılması ve anti-apoptotik moleküllerin inhibisyonudur.

### **2.3.1. Apoptozisin indüklenmesi**

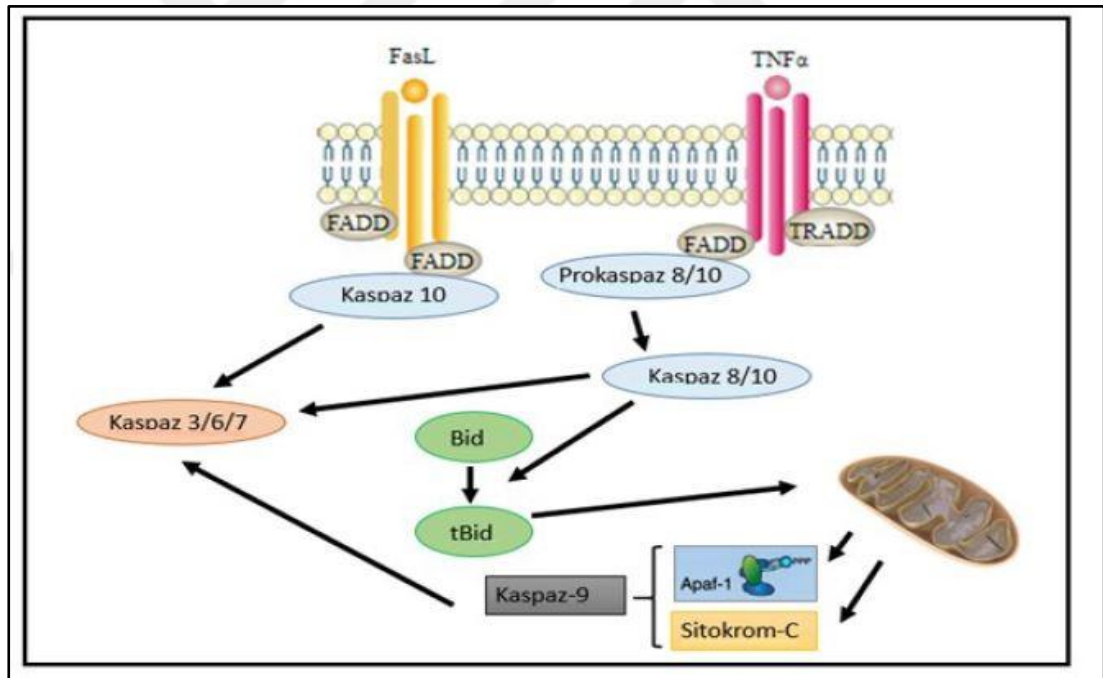
Hücrelerde apoptozisin başlayabilmesi için hücre içi ya da hücre dışı bir uyarıcı ile genetik mekanizmanın harekete geçmesi gerekmektedir (Erdoğan, 2003). BCL-2 ailesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, viral/bakteriyel enfeksiyonlar, p53 geninin aktivasyonu ve onkojenler hücre içi uyarıcılardır. Hücre dışı uyarıcılar ise IL-2, Fas/FasL, glukokortikoidler, koloni uyarıcı faktörler (CSF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), tümör nekrozis faktör (TNF), nöron büyüme faktörü (NGF), ilaçlar ve radyasyondur (Kaya, 2007). Apoptozisin düzenlenmesinde mitokondri önemli bir rol oynamaktadır. Apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom-c gibi birçok apoptotik faktör, sitoplazmaya mitokondriden salınır (Kumar vd., 2005). Sitoplazmaya salınan proteinlerden BCL-2 ailesi birbirine zıt etkili iki grup olan anti-apoptotik (BCL-1, BCL-2 ve BCL-Xl) ve proapoptotik (Bcl-Xs, Bak, Bad, Bim, Bax ve Bid) protein üyelerinden oluşur (Chang ve Yang, 2000). Bu proteinlerin rölatif oranı hücrenin apoptozisle ölüm olmeyeceğini belirler. Anti-apoptotik üyeler apoptogenik faktörlerin mitokondriden salınımını engelleyerek ya da kaspazların öncü formlarını durdurarak hücrenin yaşamasını indüklerken; pro-apoptotik üyeler ise hücreyi apoptoze götürür (Kumar vd., 2005).

Apoptozisin indüklenmesinde; hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme/ekstrinsik (dışsal) yolak, mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozis oluşturulması/ intrinsik (içsel) yolak ve endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması olmak üzere üç sinyal yolağı bulunmaktadır.

#### **Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen dışsal yolak**

Dışsal yol Fan vd., (2005)' in belirttiğine göre apoptotik sinyalleri ileten hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin aktivasyonu aracılığı ile gerçekleşmektedir (Bkz. Şekil 2.14). En iyi bilinen ölüm sinyalleri Fas ligandı ve tümör nekroz faktörüdür

(TNF). Fas, tümör nekroz faktör ile ilişkili ölüm alanlarına (TRADD) veya Fas ile ilişkili ölüm alanlarına (FADD) bağlanabilmektedir. Bu bağlanma sonucu plazma zarının sitosolik tarafında bulunan prokaspaz-8'in etki alanındaki ölüm efektör alanı (DED) ile etkileşime girerek, DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi) meydana gelmekte ve prokaspaz-8'i aktive etmektedir (Wong vd., 2011). Prokaspaz-8'in aktivasyonundan sonra meydana gelen diğer kaspaz aktivasyonları hücre tiplerine göre farklılık göstermektedir. Kaspaz-8, hücre tipine göre iki farklı yol izleyebilir. Bunlardan birincisi, lenfoidlerde olduğu gibi, doğrudan prokaspaz 3'ü aktive etmesi, ikincisi ise sitosol içinde proapoptotik protein olan Bid'i keserek tBid aktif formuna dönüştürmesidir. Dışsal yolağın tetiklenmesi sonrasında kaspaz-8 aktivasyonu sonucu oluşan tBid, mitokondri yolunun önemli proapoptotik proteinleri olan sitokrom-c ve apoptoz indükleme faktörü (AIF)'nün mitokondriden salınması ile apoptozu tetiklemektedir (Fan vd., 2005; Wong vd., 2011).

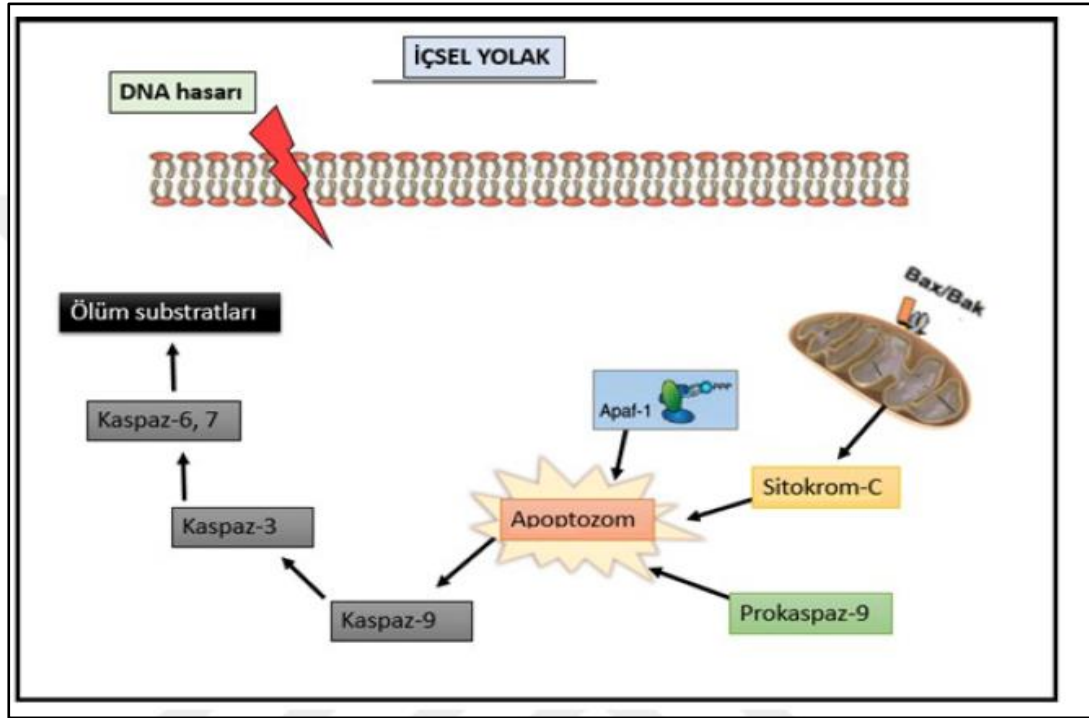


**Şekil 2.14.** Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile uyarılan ekstrinsik yol

### Mitokondri aracılı içsel yolak

Gewies (2003)' e göre apoptozun mitokondriyal yolunun aktifleşmesi hipoksi, genetik hasar, kalsiyum iyon konsantrasyonunun sitozolde artması ve yüksek oksidatif stres gibi

faktörlerle gerçekleşebilir (Bkz. Şekil 2.15). Apoptozun başlatılması tamamen BCL-2 ailesine ait olan proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki dengeye bağlıdır (Sankari vd., 2012). BCL-2 ailesi, mitokondri aktivasyonuna yol açan ve zıt etkileri olan iki alt gruba sahip en önemli faktördür. Bu aile anti-apoptotik ve pro-apoptotik genler olarak tabir edilen diğer bir deyişle hem apoptozu tetikleyen hem de apoptozu baskılayan genler bulundurur.



Şekil 2.15. Mitokondri aracılı içsel yol

Apoptotik uyarıcılar, mitokondri dış membranında gömülü halde bulunan proapoptotik protein Bax ve Bak'ın konformasyonunun değişmesine sebep olmaktadır. Sağlıklı hücrelerde Bak, mitokondriyal dış membranın içine yerleşmiş şekilde bulunurken Bax sitosoliktir ancak küçük bir kısmı, mitokondriyal dış membranına gevşek bir şekilde tutunmuş olarak bulunmaktadır. Apoptoz sırasında, Bax sitozolden mitokondriyal dış membran içine yerleşerek Bak'ın konformasyonel değişimine neden olmaktadır (Westphal vd., 2011). Normal şartlarda mitokondri içinde bulunan sitokrom-c gibi apoptotik faktörlerin sitosole salınımına izin vermeyecek şekilde kapalı olan bu yapı konformasyonel değişimle por şeklinde açılarak sitokrom-c salınımına izin vermektedir. Sitoplazmaya salınan apoptotik sitokrom-c, prokaspaz-9 ve proteaz aktive edici faktör-

1 ile birleşerek apoptozomu meydana getirmektedir. Apoptozom oluşumu ile aktifleşen kaspaz-9, cellat kaspaz olarak isimlendirilen kaspaz-3'ü aktif hale getirir. Meydana gelen bütün bu değişimler apoptotik hücrenin fagositik hücreler tarafından yutulmasını ve inflamasyon olmaksızın intihara sürüklenmesini sağlamaktadır (Süder vd., 2018).

### **Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis**

Endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol, mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı olarak Kaspaz-12'ye bağımlı bir yoldur. Kaspaz-12, ER membranında bir kaspazdır (Nakamura vd., 2000, Keane vd., 2001).  $Ca^{+2}$  seviyesinin yükselip kalpainin ER'yi etkilemesi ile prokaspaz-12 aktifleşerek kaspaz-12'dönüşür. Sitoplazmaya yönelen kaspaz-12 ise kaspaz-9 ile etkileşip sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Rao vd., 2001).

Yukarıda ifade edilen kaspaz-bağımlı apoptozis yolları dışında kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise sebep olduğu varsayılan bir mekanizma daha bulunmaktadır. Bu mekanizmada apoptozis indükleyici faktör (AIF) mitokondriden salınarak nükleusa geçmekte ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına sebep olmaktadır (Ulukaya, 2003; Dash vd., 2007).

### **2.3.2. Apoptozisin genetik kontrolü**

Apoptozisin kontrolünde görev alan gen ve proteinler apoptotik yollarındaki rollerine ve spesifik hastalıklarla olan ilişkilerine göre sınıflandırılırlar. BCL-2 ailesi, kaspaz aktivasyonunu negatif ya da pozitif yönde düzenler. Apoptozisi uyaran c-myc gibi onkogenler veya p53 gibi tümör baskılayıcı genler ise daha ileri aşamalarda rol alarak birtakım kaskadları aktifleştirirler.

İnsan c-myc proetini; 439 aminoasitten oluşan ve çekirdekte bulunan bir transkripsiyon faktörü olup tümör oluşumunda anormal şekilde düzenlenmekte ve apoptozisin kontrolünde önem taşımaktadır. C-myc; protein biyosentezi, metabolizma, apoptozis (BCL-2'yi aşağı yönde düzenleyerek), hücre siklus düzenlenmesi, hücre adezyonu ve sitoiskelet yapılanmasını sağlayan gen sınıflarıyla etkileşim halindedir. C-myc'nin hatalı düzenlenmesi, hücre proliferasyonunu (siklinleri yukarı ve p21'i aşağı yönde

düzenleyerek) indükler (Evan vd., 1992; Shi vd., 1992; Hermeking ve Eick, 1994; Kauffmann-Zeh vd., 1997).

Viral veya hücrel onkogenlerin sebep olduğu transformasyonu baskıladığından tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılıp hücre siklusunun ilerleyişi ve apoptoziste önemli rol oynayan insan p53 geni 17. kromozomun kısa kolunda yer almaktadır. İnsanlarda pek çok kanser gelişiminde p53 geninin mutasyona uğradığı bilinmektedir. DNA hasarı sonrasında p53 proteinin transkripsiyonu artarak bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CDKI) olan p21 proteinin sentezini uyarmak suretiyle hücre döngüsünü G1 evresinde durdurur ve hücre S fazına geçemez (El-Deiry vd., 1993; Cachot, 1998). Bu sebeple hücrede ya DNA hasarı onarılır ya da hücre apoptozise teşvik edilir. Hücrenin tamir mekanizmasının onarabileceği seviyesinin üzerinde bir DNA hasarı varsa apoptozis gerçekleşir.

Bir diğer tümör baskılayıcı gen olan Retinoblastom (RB), insanın 13. kromozomu üzerinde bulunur. RB proteininin fosforile formu inaktifken defosforile formu ise aktiftir. Yapısal fosforile olmuş RB mutantlar S fazı restriksiyon bölgesinde kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000; Kopnin, 2000).

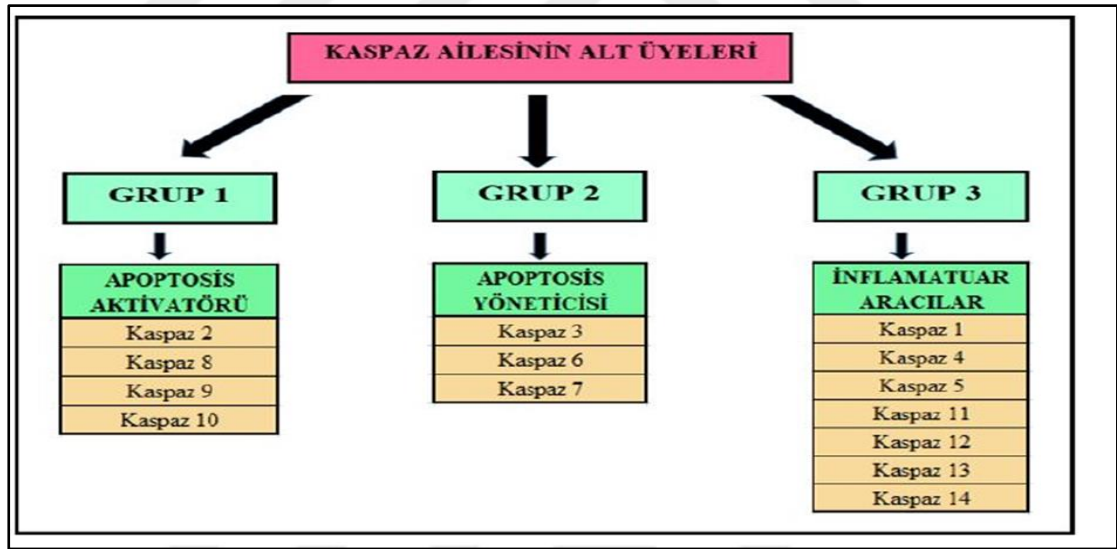
### 2.3.3. Kaspazlar

Hücrenin cellatları olarak kabul gören kaspazlar ilk kez *Caenorhabditis elegans*'ta hücre ölümünün düzenleyicileri olarak keşfedilmiştir (Hedgcock vd., 1983). Kaspazlar apoptozun hem başlangıcında hem de ilerlemesinde rol oynar (Mortezaee vd., 2019). Kaspaz aracılı apoptozis, çok hücreli organizmalarda, işlevsiz veya sağlıklı hücrelerin ortadan kaldırılması yoluyla organ büyüklüğünü, şeklini ve doku homeostazını kontrol etmeye yardımcı olan önemli bir süreçtir. Kaspazların çoğu, apoptozun uygulanmasında etkili olmasına rağmen, bağışıklık, hücrel onarım, öğrenme, hafıza ve farklılaşma dahil olmak üzere çeşitli işlemlerde apoptotik olmayan fonksiyonlara da sahiptir (Fuchs ve Steller, 2015).

Kaspaz aktivitesinin hatalı düzenlenmesi hücre için öldürücü olabilmektedir. Bu yüzden prokaspaz olarak sentezlenen kaspazların bazı kısımları kesilip uzaklaştırılarak aktif kaspaz haline getirilir (Fischer vd., 2003). Yapısal olarak, kaspazlar, katalitik olarak

aktif cep oluşturan iki alt birim içerir. Ek olarak, bazı üyeler, etkin aktivasyonları için gerekli olan büyük protein komplekslerinin (örn; apoptozom, inflammatuar), oluşumunu kolaylaştıran N-terminal protein alım alanları içerir (Xu vd., 2018). Olgunlaşma sürecinde, prokaspazların büyük ve küçük alt birimleri arasında proteolitik olarak kesilerek ayrılır. Daha sonra iki küçük ve iki büyük alt birimden oluşan heterotetramer aktif kaspaz meydana gelir (Gewies, 2003). Birbirlerini proteolitik olarak aktifleştirip bir kaskada neden olan başlatıcı kaspazlar (kaspaz- 2, 8, 9, 10), apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara (kaspaz- 3, 6, 7) taşırlar. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayıp apoptotik hücre morfolojisini oluştururlar (Spierings vd., 2004)

Bugüne kadar, bu ailenin en az 14 üyesi memelilerde tanımlanmış olmasına rağmen, hepsi apoptoz sırasında işlev görmemektedir (Zhang vd., 2004). Kaspazlar Fan vd., (2005) tarafından apoptozis (memelilerde kaspaz- 3, 6, 7, 8 ve 9) ve enflamasyonda (kaspaz- 1, 4, 5 ve 11) bilinen rolleriyle sınıflandırılmıştır (Bkz. Şekil 2.16).



**Şekil 2.16.** Kaspaz ailesinin alt üyeleri

Kaspazlar, apoptozis süreci sırasındaki geçici aktivasyonlarına bağlı olarak iki kategoriye ayrılabilir. Başlatıcı/apikal kaspazlar (kaspaz- 2, 8, 9, 10), apoptozun erken aşamalarında aktive edilir ve hemen sonra, efektör/yürütücü elemanların (kaspaz- 3, 6, 7) enzimatik aktivasyonunu tetikler. Apoptoz sırasında, yüksek seviyelerde kaspaz aktivasyonu, tüm alt hücre kompartmanları boyunca bir protein substratlarının tamamını

enzimatik olarak parçalayarak organellerin basit olarak parçalanmasına ve daha sonra tüm gerekli hücrel görevlerin kapatılmasına yol açabilir (Xu vd., 2018).

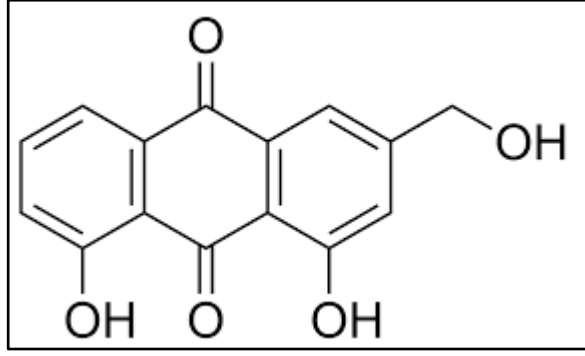
#### **2.4. Bitkisel Kökenli Anti-Kanser Ajanlar**

Bitkiler etkili anti-kanser ilaçların keşfinde önemli bir yer tutmakta olup kanser tedavisinde kullanımları uzun bir geçmişe sahiptir. Şu anda kullanılmakta olan antikanser ilaçların %60'ından fazlası bitkileri, deniz canlılarını ve mikroorganizmaları içeren doğal kaynaklardan türevlenmektedir (Newman vd., 2003; Cragg ve Newman, 2005). Bitkisel kaynaklar kullanılarak yapılan anti-kanser ilaç araştırmaları 1950'lerde vinka alkaloidleri, vinblastin ve vinkristinin keşfi ile başlamıştır. Amerika Bileşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI; "National Cancer Institute") 1960'larda ağırlıklı olarak ılıman bölgeleri kapsayan kapsamlı bir bitki toplama programı başlatmış ve bu çalışmalarla taksanları ve kamptotesinleri kapsayan sitotoksik aktivite gösteren türler keşfedilmiştir (Cassady ve Douros, 1980).

#### **2.5. Aloe-emodin**

Bitkilerde ikincil metabolitlerden olan antrakinonlar, büyük yapısal çeşitliliğe, belirgin biyolojik aktiviteye ve düşük toksisiteye sahip bileşiklerdir. Son yıllarda apoptoz ve otofajide rol oynamalarından dolayı kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılan antrakinonlar çoğunlukla Fabaceae, Liliaceae, Polygonaceae, Rubiaceae, Rhamnaceae ve Scrophulariaceae familyalarında bulunurlar (Özenver vd., 2018). Doğal bir antrakinon türevi olan emodin Aloe, Rheum ve Rhamnus cinsi bitkilerde bulunan fenolik bir bileşiktir.

Emodin özellikle kök ve kabuklarda olmak üzere çeşitli bitkilerde bulunan antioksidan, antifungal, antibakteriyel, antiviral, antienflamatuar, immünsupresif ve kemopreventif etkilere sahip olduğu bilinen bir bileşiktir (Wang vd., 2001; Srinivas vd., 2003; Yan vd., 2008; Ko vd., 2010; Su vd., 2010; Dey vd., 2014). Tez çalışmasında kullanılan emodin, Aloe cinsi bitkilerden elde edilmiş olup molekül formülü  $C_{15}H_{10}O_5$ , moleküler ağırlığı ise 270,24 g'dır (Şeker Karatoprak vd., 2022) (Bkz. Şekil 2.17). Kristal toz yapıda olan aloe-emodin sarı-turuncu renkte olup erime sıcaklığı 256-257 °C'dir. Suda çözünmeyen aloe-emodin alkol türevi organik çözücülerdeki çözünürlüğü yüksektir.



**Şekil 2.17.** Aloe emodin (1,8-dihidroksi-3-hidroksimetilantrakinon)

Antitümör etkisi bulunan aloe-emodininin pek çok farklı tümör hücre hattını etkilediği ve akciğer, yumurtalık, meme, karaciğer, serviks, prostat gibi birçok kanser türünde hücre canlılığını azalttığı ve hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Huang vd., 2009; Min vd., 2017; Tseng vd., 2017; Wang vd., 2017).

Emodin aynı zamanda bir fitoöstrojendir. Bu özelliği sayesinde doğrudan reseptörlerle etkileşerek veya başka yollarla östrojen seviyelerini değiştirebilmektedir. Bu nedenle sentetik östrojene göre daha az etkili olmalarına rağmen sentetik östrojen tüketimine bağlı oluşan meme kanserini azaltabilecekleri tahmin edilmektedir (Adlercreutz ve Mazur, 1997). Yapılan çalışmalarda emodin, test edilen diğer antrakinonlar arasında en yüksek östrojenik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Matsuda vd., 2001). Fitoöstrojenler zaman ve konsantrasyona bağlı olarak östrojene bağımlı tümör büyümesini inhibe edebilmekte ancak aynı zamanda tetikleyebilmektedirler (Allred vd., 2001; Bhat vd., 2001; Cotroneo vd., 2002). Fitoöstrojenler etkilerini birçok mekanizma ile gösterirler. Bunlar; hücre döngüsü regülasyonu, protein kinaz inhibisyonu, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez inhibisyonu gibi yollardır (Basly vd., 2000; Cappelletti vd., 2000)

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu özelliklerin yanı sıra, emodin protein tirozin kinazların tirozin fosforilasyonunu inhibe ettiği ve kanser hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir (Zhang ve Lau, 1999). Emodinin akciğer, meme, serviks, karaciğer, yumurtalık, kemik iliği, prostat, kan kanseri gibi birçok kanser türünde proliferasyonu azalttığı ve apoptozisi indüklediği bulunmuştur (Yu vd., 2013; Huang vd., 2009; Su vd., 2010).

## 2.6. Paklitaksel

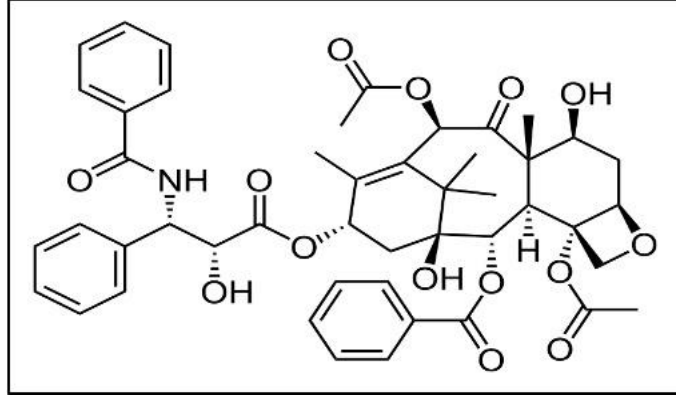
İlk olarak *Taxus brevifolia* isimli Pasifik porsuk ağacı (Bkz. Şekil 2.18) özütünden elde edilen paklitakselin birçok tümörlere karşı antitümör etkisi bulunmuş ve pek çok kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Singla vd., 2001).



Şekil 2.18. Pasifik porsuk ağacı

Moleküler ağırlığı ise 853,9 Da olan paklitakselin molekül formülü  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ 'tür (Singla vd., 2001) (Bkz. Şekil 2.19). Paklitaksel kristal toz yapıda ve beyaz renkte olup erime sıcaklığı  $216-217^{\circ}C$ 'dir (Panchagnula, 1998). Organik çözücülerdeki çözünürlüğü daha yüksek olan paklitakselin sudaki çözünürlüğü  $0,3 \mu g/mL$ 'dir (Adams vd., 1993).

Anti-mikrotübül bir ajan olan paklitaksel M fazına spesifiktir. Paklitaksel mikrotübülleri stabilize edip DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olarak hücre siklusunu G2/M fazında durdurup apoptozisi indükler. p53 mutasyonu bulunan tümörlerin paklitaksele karşı daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. (Vikhanskaya vd., 1998).



**Şekil 2.19.** Paklitakselin kimyasal yapısı

Paklitaksel en çok kullanılan kemoterapi ilaçlarından biridir. Meme kanseri dışında küçük hücreli dışı akciğer, baş-boyun, over, prostat, safra kesesi, özafagus ve mide kanserleriyle yumuşak doku sarkomlarında kullanılmaktadır (Harris vd., 2007). Apoptozisin, paklitaksel sitotoksitesinin mekanizmalarından biri olduğu ilk kez 1993 yılında insan lenfositik lösemi hücrelerinde gösterilmiştir (Bhalla vd., 1993). Bu araştırma lösemi hücreleri, gastrik karsinom hücreleri, over karsinom hücreleri, adrenokortikal karsinom hücreleri, baş boyun tümörleri, prostat tümörleri ve insan glioma hücre hatlarında yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir (Milross vd., 1996).

Bu tez çalışmasında aloe-emodin ve paklitaksel etkin maddelerinin insan meme kanseri hücre hatlarındaki sinerjik, apoptotik ve sitotoksik etki mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kullanılmış olup, aloe-emodin ile paklitakselin söz konusu hücrelerde hücre canlılığı ve hücre döngüsü üzerine etkileri araştırılmıştır. Aloe-emodin ve paklitakselin antiproliferatif etkinliğinin belirlenmesini takiben söz konusu maddelerin hücrelerdeki apoptotik etkinliği de çeşitli analiz yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

### 3. MATERİYAL ve YÖNTEM

Teze ait tüm deneysel çalışmalar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Doku Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

| Kimyasal adı                             | Marka                 | Kullanım amacı                                                       |
|------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Medium) | Sigma                 | Hücre besiyeri                                                       |
| FBS (Fetal Bovine Serum)                 | Biowest               | Hücre besiyeri serumu                                                |
| Penisilin-Streptomisin                   | Biological Industries | Hücre besiyerinde kontaminasyonun önlenmesi                          |
| L-Glutamine Solution                     | Sartorius             | Hücre besiyerine ek aminoasit kaynağı                                |
| Trypsin-EDTA Solution                    | Sartorius             | Hücre pasajlanması                                                   |
| PBS (Phosphate Buffered Saline)          | Sigma                 | Hücrelerin yıkanması                                                 |
| Trypan Blue                              | Sigma                 | Hücre sayımında                                                      |
| DMSO (Dimethyl Sulfoxide)                | Sigma                 | Hücre dondurulması                                                   |
| Aquaguard-1                              | Biological Industries | CO <sub>2</sub> inkübatörü kontaminasyonunun önlenmesi ve arıtılması |
| MTT                                      | Roche                 | Sitotoksosite ölçümü                                                 |
| MultiCaspase Kit                         | Luminex               | Apoptoz ölçümü                                                       |
| Annexin V & Dead Cell Kit                | Luminex               | Apoptoz ölçümü                                                       |
| Paklitaksel                              | Bioshop               | Sinerjik etki çalışmaları                                            |
| Aloe-emodin                              | TCI                   | Sinerjik etki çalışmaları                                            |
| Neutral Red                              | Bioshop               | Sitotoksosite ölçümü                                                 |
| ICF                                      | Luminex               | Muse Analyser temizliği                                              |

### 3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

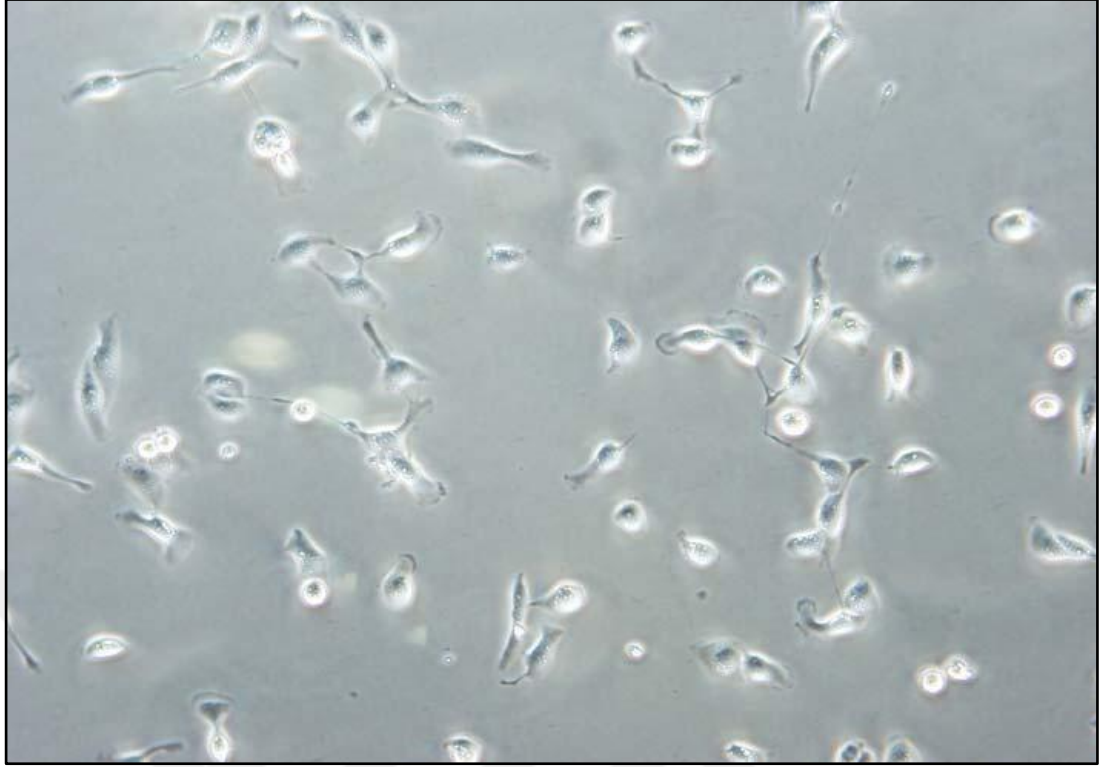
- Hücre kültür flaskları (25, 75), Thermo Scientific
- Kuyucuklu hücre kültür plateleri (96, 6), Sarstedt
- Steril tek kullanımlık pipetler (5, 10, 25), Sarstedt
- Mikro pipetler, Eppendorf
- Pipet uçları, Axygen
- Steril santrifüj tüpleri (15, 50) Sarstedt
- Thoma lamı, Isolab
- Kriyovial, Corning
- Hassas terazi, Shimadzu
- CO<sub>2</sub> inkübatörü, Nüve CO<sub>2</sub> inkübatör EC 160
- Laminar akışlı kabin, Bil-ser lab. Ltd. şti. class II
- Santrifüj, Hanil Smart R17
- Vorteks, Heidolph Reaxtop
- Su banyosu, Memmert
- Invert mikroskop, Nikon Eclipse Ti-2U
- ELISA cihazı, Epoch Biotek
- -80°C Buzdolabı, Haer Medical
- Buzdolabı (-20°C- +4°C), Arçelik

### 3.1.3. Kullanılan hücre hatları

Tez çalışmasında insan meme adenokarsinoma MCF-7 (ATCC-HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC-HTB-26) kanser hücre hatları Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) ticari olarak satın alınmıştır.

#### **MCF-7 hücre hattı ve özellikleri**

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation 7) hücre hattı 1970 yılında, Kafkas bölgesinde yaşayan 69 yaşında meme kanseri bir kadının meme dokusundan izole edilen farklılaşmış meme epitelinin özelliklerine sahip olup meme adenokarsinomundan türevlenmiş bir epitelyal kanser hücre hattıdır (Bkz. Şekil 3.1).



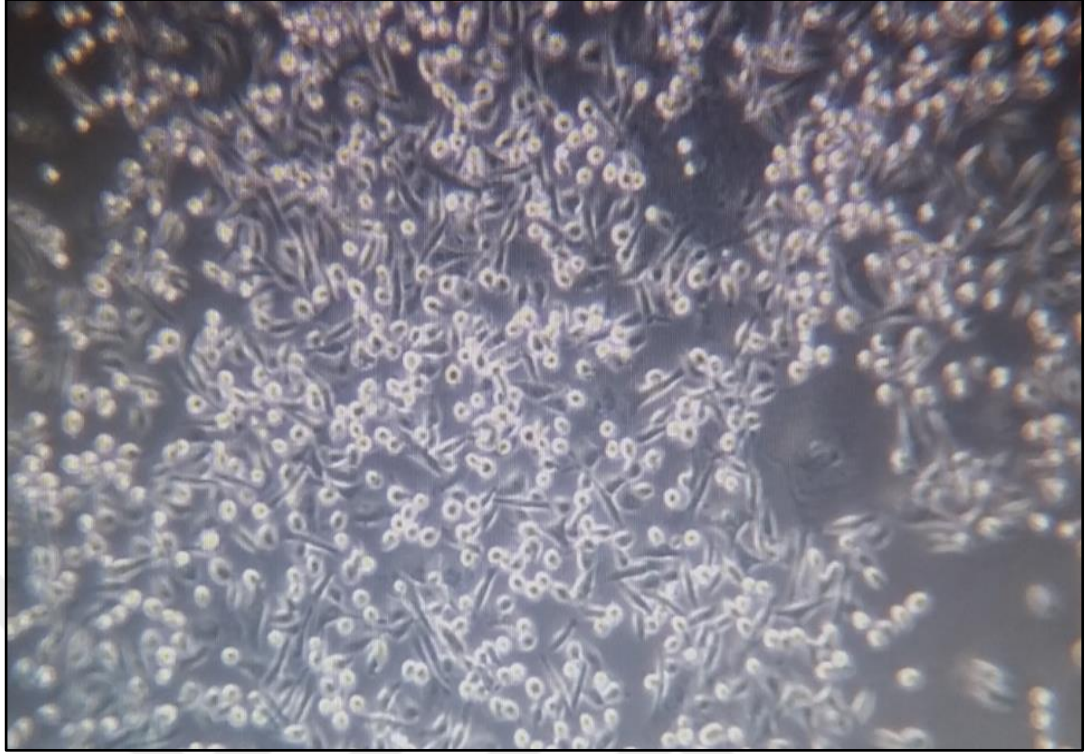
**Şekil 3.1.**MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü

MCF-7 hücreleri östrojen reseptörleri aracılığıyla östradiol yapıdaki östrojeni işleyebilirler. Bu özellikleri MCF-7 hücre hattını östrojen reseptörü (ER) pozitif hücre hattı yapmaktadır. MCF-7 progesteron reseptörü pozitif ve HER2 negatiftir. Diğer meme kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında MCF-7 daha düşük metastatik potansiyel ve invaziviteye sahip olması nedeniyle daha az agresiftir (Gest vd., 2013).

#### **MDA-MB-231 hücre hattı ve özellikleri**

MDA-MB-231 HER2 amplifikasyonu ile PR ve ER ekspresyonuna sahip olmadığı için invaziv, agresif ve zayıf diferansiye üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır (Bkz. Şekil 3.2). Üç boyutlu kültüründe, hücre dizisi endotelial morfolojiyi gösterir ve yıldız şeklindeki çıkıntılara sahip olan invaziv fenotipiyle ayırt edilebilir.

Üçlü negatif meme kanseri, sınırlı tedavi seçeneklerine sahip bir kanser formu olup bu özellik yeni ve etkili ilaçların geliştirilmesi için önem arz etmektedir (Chavez vd., 2010).



**Şekil 3.2.**MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü

### **3.2.Yöntem**

#### **3.2.1.Paklitaksel ve aloe-emodin stok çözeltilerinin hazırlanması**

Molekül ağırlığı 270,2 g/mol olan aloe-emodin 5 mg olarak tartılıp 50  $\mu$ L DMSO içerisinde çözünmesi sağlanmış olup daha sonra çözelti RPMI 1640 besiyeri ile 1 mL' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti seyreltilerek 100; 80; 60; 40 ve 20  $\mu$ M'lık dozlar hazırlanmıştır.

Molekül ağırlığı 853,906 g/mol olan paklitaksel ise 2 mg olarak tartılıp 50  $\mu$ L DMSO içerisinde çözünmesi sağlanmış olup daha sonra çözelti RPMI 1640 besiyeri ile 1 mL' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti seyreltilerek 2; 1,6; 1,2; 0,8 ve 0,4  $\mu$ M'lık dozlar hazırlanmıştır.

#### **3.2.2. Hücre kültürü**

Hücre kültürü, canlı dokulardan alınan hücrelerin kontrol edilebilen yapay ve sıvı bir ortamda büyümesini ifade eder. Hücreler dokulardan doğrudan veya enzimatik ve

mekanik yollarla elde edilebileceği gibi daha önceden elde edilmiş hücre hatları ve hücre suşlarından alınarak da kültürlenebilmektedir. Hücre kültürü çalışmaları; ortamın sürekli kontrol edilebilmesi, model oluşturabilme, etik izine gerek olmaması, ekonomi ve homojenite sağlayabilme gibi birçok avantaj sağlayan tekniklerdir. Bu teknik, virüslerin incelenmesi, aşı geliştirme, organ-doku yenilenmesi, gen tedavilerinin geliştirilmesi, kansere karşı ilaç geliştirme ve biyokimyasal moleküllerin incelenmesi için başarılı bir şekilde uzun yıllardır kullanılmaktadır.

#### **3.2.2.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için besiyeri hazırlanması**

Öncelikle ticari olarak satın alınan 500 mL RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) besiyerinin üzerine, %10 oranında steril FBS (fetal bovine serum) den 50 mL eklenmiştir. Kullanım açısından kolaylık sağlamak için besiyeri 50 mL'lik falkonlara paylaştırılıp kullanım esnasında her falkona 500 µL penisilin-streptomisin ve 500 µL L-glutamin eklenmiştir. Besiyerleri +4 derecede muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.2.2. Hücrelerin çözündürülmesi**

-80°C'de saklanan kriyovialler çalışma öncesinde sıcak su banyosunda çözülmüştür. Çözünen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları 5 mL RPMI 1640 besiyeri içeren 15 mL'lik falkon tüplere alınıp 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti üzerine 1 mL besiyeri ilave edilerek hücrelerin tekrar süspanse olması sağlanmıştır. Süspanse hale gelen hücreler içerisinde 5 mL besiyeri bulunan alınıp 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

#### **3.2.2.3. Hücrelerin pasajlanması**

25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınan hücre hatları flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak 3 mL PBS ile hücreler yıkanmıştır. Daha sonra PBS ortamdan uzaklaştırılıp yüzeye yapışan hücrelerin kalkmaları için 0,5 mL Tripsin-EDTA eklenmiştir. Etüvde 5 dk'lık inkübasyon sonunda yüzeyden ayrıldıklarından emin olmak için kontrol edilen hücrelere eklenen tripsinin 10 katı kadar besiyeri ilave edilmiştir. Hücre çözeltisi 15 mL'lik falkon tüplere alınıp 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre peletinin 1 mL besiyerinde

çözünmesi sağlandıktan sonra 9 mL daha besiyeri ilave edilip 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmış ve 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

#### 3.2.2.4. Hücrelerin dondurulması

Flask yüzeyinde hücreler tamamen konfluent olduklarında besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp 3 mL PBS ile hücreler yıkanmıştır. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyinden hücrelerin kalkması için Tripsin-EDTA solüsyonundan 2-3 mL eklenerek yine etüvde 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Yüzeyden ayrılan hücreler üzerine besiyeri eklenip 15 mL’lik falkon tüplerine alınmıştır. 800 rpm’de 5 dk santrifüj sonrası süpernatant atılıp kalan pelet üzerine her bir kriyovial için hücre hatlarının saklanma koşullarına uygun olarak DMSO ve besiyeri eklenmiş ve -80°C’ye kaldırılmıştır.

### 3.2.3. Sitotoksosite analizleri

### 3.2.3.1. Hücrelerin sayılması

İnkübatörden alınan hücreler steril kabine alınarak otomatik pipet ile flask içerisindeki besiyeri çekilip atılmış ve 5 mL PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra hücreleri flask yüzeyinden sökmek için 4 mL Tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek 5 dk inkübe edilmiştir. Hücrelerin sökülmesi işleminin akabinde hücre solüsyonu 16 mL besiyeri içeren 50 mL'lik falkon tüpe eklenerek 20 mL'ye seyreltilmiştir. 800 rpm'de falkon tüp 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir.

Santrifüjden çıkartılan falkon tüp steril kabine alınarak süpernatant atılmış ve içerisine 1 mL RPMI 1640 besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. 1 mL'lik hücre homojenatından 50 µL alınarak endorf tüpe konulmuştur. Tüpe Tripan Blue boyası eklenip pipetaj yapılmıştır. Daha sonra bu karışımdan 10 µL alınarak Thoma lamininin her iki yanına eklenmiş ve mikroskop altında hücre sayımı işlemi gerçekleştirilmiştir. Sayma işlemi Thoma lamininin her iki tarafında da yapılarak ortalama alınmıştır. Hücre sayısını bulmak için şu formül kullanılmıştır:

$$\text{Hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre sayısı} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

### 3.2.3.2. MTT testi

1983 yılında ilk kez Mosmann ve arkadaşları tarafından bulunan MTT yöntemi, hücrelerdeki mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçümüne dayanmaktadır (Mossmann, 1983). Yaşayan hücrelerde enzim aktivitesi bulunurken ölü hücrelerde ise bulunmamaktadır. Mitokondriyel dehidrogenaz enziminin varlığı MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) maddesini değişime uğratar. Sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzu olan MTT, canlı hücreler tarafından alınarak mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimleri sayesinde koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. MTT sonucunda canlı hücreler mavi-mor renkte boyanırken ölü hücreler ise boyanmamaktadır.

MTT testi için, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak her bir kuyuya 100 µL besiyeri içerisinde  $7,5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelere aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100 µM) ve paklitaksel (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2 µM) uygulaması ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde yapılmıştır. Deneylerde negatif kontrol (maksimum canlılık) için ayrılan kuyulara sadece besiyeri ortamına ekilen hücreler kullanılırken kör için ise sadece 200 µL besiyeri eklenmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar için hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. MTT uygulaması MTT Roche deney kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiş olup canlılık oranı şu şekilde hesaplanmıştır:

$$\% \text{Canlılık} = [100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbensisi ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbensisi ortalaması} - \text{kör ortalama})]$$

### 3.2.3.3. Neutral red testi

MTT analiz sonuçlarını desteklemesi açısından yapılan Neutral Red uygulaması için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak her bir kuyuya 100 µL besiyeri içerisinde  $7,5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelere aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100 µM) ve paklitaksel (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2 µM) uygulaması yapılmıştır.

Deneylerde negatif kontrol (maksimum canlılık) için ayrılan kuyulara sadece besiyeri ortamına ekilen hücreler kullanılırken kör için ise sadece 200 µL besiyeri eklenmiştir.

Ardından hücreler 48 ve 72 saat için 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda kuyucuklara çözünmüş Neutral Red boyası eklenip üç saat bekletilmiştir. Üç saatin sonunda PBS ile yıkanan kuyucuklara çözücü solüsyon eklenerek 540 nm dalga boyunda Elisa okuması yapılmıştır.

$$\% \text{Canlılık} = [100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$$

#### 3.2.3.4. Kombinasyon indeksinin hesaplanması

Kombinasyon indeksi (CI), maddelerin sinerjik, antagonistik ya da aditif etkilerden hangisini gösterdiğini hatta etkinin derecesini anlaşılmasını sağlayan, bazı yazılım programlarıyla hesaplanan bir değerdir (Bkz. Tablo 3.2).

**Tablo 3.2.** Kombinasyon indeksi sonuçlarına göre, uygulanan kimyasalların hücre hattı üzerine sinerjik, aditif ya da antagonistik etkisi

| Kombinasyon İndeksi (CI) | Hücreye etkisi              |
|--------------------------|-----------------------------|
| CI: 1,1 – 1,2            | Hafif antagonistik etki     |
| CI: 1,2 – 1,45           | Orta antagonistik etki      |
| CI: 1,45 – 3,3           | Antagonistik etki           |
| CI: 3,3 – 10             | Güçlü antagonistik etki     |
| CI> 10                   | Çok güçlü antagonistik etki |
| CI: 0,9 – 1,1            | Aditif etki                 |
| CI: 0,85 – 0,9           | Hafif sinerjik etki         |
| CI: 0,7 – 0,85           | Orta sinerjik etki          |
| CI: 0,3 – 0,7            | Sinerjik etki               |
| CI: 0,1 – 0,3            | Güçlü sinerjik etki         |
| CI< 0,1                  | Çok güçlü sinerjik etki     |

Çalışmamızda kombinasyon indeksi değerleri Compusyn programı ile hesaplanmıştır. Elde edilen CI değerlerine bakılarak sinerjik etkinin en fazla olduğu dozlar belirlenerek (MDA-MB-231 hücre hattı için 72 saatlik uygulamada aloe-emodin 80 µM, paklitaksel

1,6 µM, MCF-7 hücre hattı için 48 saatlik uygulamada aloe-emodin 60 µM, paklitaksel 1,2 µM) bu dozlarda emodin ve paklitakselin apoptotik etkileri çalışılmıştır.

### **3.2.5. Apoptotik analizler**

#### **3.2.5.1. Hücre döngüsü analizi**

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında değişik dozlardaki aloe-emodin ve paklitakselin hücre döngüsünü hangi aşamada etkilediğinin araştırılması amacı ile hücre döngüsü analizi uygulanmıştır. 6 kuyucuklu plaklara  $125 \times 10^4$  /mL hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra kuyucuklara MCF-7 için aloe-emodin 60 µM, paklitaksel için 1,2 µM dozları, MDA-MB-231 için aloe-emodin 80 µM, paklitaksel için 1,6 µM dozları ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde uygulanmıştır. MCF-7 hücre hattı için 48 saat, MDA-MB-231 hücre hattı için 72 saatlik inkübasyondan sonra etüvden çıkarılan plaklardan besiyeri aspire edildikten sonra hücreler 15 mL’ lik eppendorf tüplere alınıp 5 dk 800 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak tripsin uzaklaştırılıp üzerlerine 500 µL %70’lik soğuk etanol eklenmiştir. -20 °C’ de 3 saat inkübe edildikten sonra tekrar santrifüj edilen hücrelere 200 µL cell cycle ajanı eklenip vortekslenmiştir. Ardından 30 dk boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilip Muse cihazında ölçümler yapılmıştır.

#### **3.2.5.1. Anneksin V Analizi**

İnsan vasküler antikoagülan anneksin V, anyonik fosfolipid fosfatidilserin için Ca<sup>+2</sup> varlığında yüksek afiniteye sahip olan, ~35 kDa uzunluğunda, fosfolipid bağlayıcı bir proteindir. Anneksin V’in floresan konjugatları, apoptotik hücrelerin dış zarındaki fosfatidilserini (PS) tanıyabildikleri için apoptoza uğrayan hücreleri saptamakta sıklıkla kullanılmaktadır. PS, sağlıklı hücrelerde zarın sitoplazmik yüzeyinde yer almakta olup apoptozis esnasında zarın yapısal değişikliğe uğramasıyla iç yüzeyden dış yüzeye hareket eder.

Annexin- V çalışmaları için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 1 mL’de 500.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve tutunup çoğalmaları için 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara MCF-7 için aloe-

emodin 60  $\mu$ M, paklitaksel için 1,2  $\mu$ M dozları, MDA-MB-231 için aloe-emodin 80  $\mu$ M, paklitaksel için 1,6  $\mu$ M dozları ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde uygulanmıştır. MCF-7 hücre hattı için 48 saat, MDA-MB-231 hücre hattı için 72 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılıp yapışan hücrelerin kalkması için de 100  $\mu$ L tripsin eklenip ardından 1 dk etüve konulmuştur. Daha sonra plakların üzerine 1 mL taze besiyeri eklenip hücre karışımı 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. Tüpler 800 rpm 'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası çöken hücre pelleti üzerine 500  $\mu$ L taze besiyeri eklenerek hücreler resuspense edilmiştir. Daha sonra bu hücre süspansiyonundan 100  $\mu$ L alınıp yeni bir eppendorfa aktarılmıştır. Üzerine 100  $\mu$ L Muse™ Annexin V Luminex kit prosedürüne uygun olarak eklenip 20 dk 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamında inkübasyonu sonucunda Muse cihazında ölçümler yapılmıştır.

#### **3.2.5.2. Multicaspase aktivasyon analizi**

Multicaspase apoptoz ölçümleri için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyucuklu plakalara 1 mL içerisinde 200×10<sup>3</sup> olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonu takiben kuyucuklara MCF-7 için aloe-emodin 60  $\mu$ M, paklitaksel için 1,2  $\mu$ M dozları, MDA-MB-231 için aloe-emodin 80  $\mu$ M, paklitaksel için 1,6  $\mu$ M dozları ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde uygulanmıştır.

MCF-7 hücre hattı için 48 saat, MDA-MB-231 hücre hattı için 72 saatlik inkübasyondan sonra öncelik olarak Muse Multicaspase kit (Luminex) bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri uzaklaştırılıp, 2 mL PBS eklenerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlanmıştır. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 mL Tripsin-EDTA eklenip hücreler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler, tripsinin inhibe olması için on katı besiyeri ile muamele edilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 mL'lik falkon tüplere alınıp 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edilip hücre peleti sulandırılmıştır. Daha sonra etiketli eppendorflara hücre süspansiyonundan 50  $\mu$ L eklenmiştir. Muse Multicaspase kiti deney prosedürüne göre ilgili işlemler yapıp Muse cihazı kullanılarak multicaspase aktivitesi değerlendirilmiştir.

### 3.2.5. İstatistiksel yöntemler

Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics software (SPSS v22) hazır paket programı kullanılarak yapılmıştır. Aloe-emodin ve paklitaksel tekli ve kombine tüm dozlarının sitotoksite ve canlı hücre yüzdeleri ortalama $\pm$ standart hata tablosu ile değerlendirilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına aloe-emodin ve paklitaksel tekli ve kombine dozları uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucu MTT sitotoksiste testi sonuçlarının istatistiksel analizi normal dağılıma uygunluğuna göre, tek yönlü ANOVA (One-Way ANOVA) kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmeler yapılırken p değeri (güven aralığı) 0,001 ve 0,05 olarak alınmıştır.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Sitotoksite Bulguları

#### 4.1.1. Kombinasyon çalışmaları

Kombinasyon çalışmalarında aloe-emodin ve paklitaksel için hem klinik öncesi faz çalışmalarında etkinliği gösterilmiş olan literatür verileri hem de kombinasyon için doz belirleme çalışmalarındaki tekli ilaç uygulamasından elde edilen % canlılık ve % büyüme oranı verileri değerlendirildiğinde, aloe-emodin için 100  $\mu$ M ve paklitaksel için 2  $\mu$ M başlangıç dozları birbiri ile kombine edilmek suretiyle 4 alt doz kombinasyonuna daha inilerek toplamda 5 farklı kombinasyon dozunun çalışılmasına karar verildi. Kombinasyon çalışmaları 24, 48 ve 72 saat sürelerinde 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

Kombinasyon tedavisinin sinerjistik etki gösterip göstermediğinin tespit edilmesi amacıyla doz-etki eğrileri CompuSyn Version 1.0 (Biosoft, UK) yazılımı Chou-Talalay metodu kullanılarak gösterildi ve kombinasyon indeks (CI) değerleri hesaplandı. CI değerleri ilaç kombinasyonlarının etkinliğini göstermek için kullanılmaktadır. CI değeri 0,1'den az hesaplanırsa ( $CI < 0,1$ ) çok güçlü sinerjistik, 0,1-0,3 aralığında hesaplanırsa güçlü sinerjistik, 0,3-0,7 aralığında hesaplanırsa sinerjistik, 0,7-0,85 aralığında hesaplanırsa orta derecede sinerjistik, 0,85-0,90 aralığında hesaplanırsa hafif sinerjistik, 0,90-1,10 aralığında hesaplanırsa yaklaşık aditif ve 1,10-1,20 aralığında hesaplanırsa hafif antagonistik, 1,20-1,45 aralığında hesaplanırsa orta derecede antagonistik, 1,45-3,3 aralığında hesaplanırsa antagonistik, 3,3-10 aralığında hesaplanırsa güçlü antagonistik, 10'dan büyük hesaplanırsa ( $CI > 10$ ) çok güçlü antagonistik etkiyi göstermektedir. Tedaviler için konsantrasyon-yanıt analizleri iki ilacın tekli ve kombinasyon uygulamalarının konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde hareket ettiğini gösterdi ve gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak hesaplandı.

Compusyn analizlerine göre MCF-7 hücre hattı için 24 saatlik A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonucunda sinerjik etki gösteren doz bulunamamıştır (Bkz. Tablo 4.1). 48 saatlik A-EMO+PTX kombinasyonu sonucunda ise 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX

ile 100  $\mu$ M A-EMO+2,0  $\mu$ M PTX dozlarının güçlü sinerjik etki oluşturduğu görülmüştür (Bkz. Tablo 4.2). Aynı şekilde 72 saatlik A-EMO+PTX uygulamasında ise 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX ve 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX dozlarının güçlü sinerjik etki oluşturduğu gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.3).

**Tablo 4.1.** MCF-7 hücrelerinde A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi 24 saat uygulamasının doz-etki verileri

| Kombinasyon                       | CI değeri | Tanımlanan etki                  |
|-----------------------------------|-----------|----------------------------------|
| 20 $\mu$ M A-EMO+0,4 $\mu$ M PTX  | 4,58896   | Güçlü antagonistik (CI: 3,3-10)  |
| 40 $\mu$ M A-EMO+0,8 $\mu$ M PTX  | 2,98354   | Antagonistik (CI: 1,45-3,3)      |
| 60 $\mu$ M A-EMO+1,2 $\mu$ M PTX  | 5,24589   | Güçlü antagonistik (CI: 3,3-10)  |
| 80 $\mu$ M A-EMO+1,6 $\mu$ M PTX  | 1,98562   | Antagonistik (CI: 1,45-3,3)      |
| 100 $\mu$ M A-EMO+2,0 $\mu$ M PTX | 1,15689   | Hafif antagonistik (CI: 1,1-1,2) |

**Tablo. 4.2.** MCF-7 hücrelerinde A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi 48 saat uygulamasının doz-etki verileri

| Kombinasyon                       | CI değeri | Tanımlanan etki               |
|-----------------------------------|-----------|-------------------------------|
| 20 $\mu$ M A-EMO+0,4 $\mu$ M PTX  | 0,78865   | Orta sinerjik (CI: 0,7-0,85)  |
| 40 $\mu$ M A-EMO+0,8 $\mu$ M PTX  | 0,85987   | Hafif sinerjik (CI: 0,85-0,9) |
| 60 $\mu$ M A-EMO+1,2 $\mu$ M PTX  | 0,12541   | Güçlü sinerjik (CI: 0,1-0,3)  |
| 80 $\mu$ M A-EMO+1,6 $\mu$ M PTX  | 0,89568   | Hafif sinerjik (CI: 0,85-0,9) |
| 100 $\mu$ M A-EMO+2,0 $\mu$ M PTX | 0,28976   | Güçlü sinerjik (CI: 0,1-0,3)  |

**Tablo 4.3.** MCF-7 hücrelerinde A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi 72 saat uygulamasının doz-etki verileri

| Kombinasyon                       | CI değeri | Tanımlanan etki               |
|-----------------------------------|-----------|-------------------------------|
| 20 $\mu$ M A-EMO+0,4 $\mu$ M PTX  | 0,88568   | Hafif sinerjik (CI: 0,85-0,9) |
| 40 $\mu$ M A-EMO+0,8 $\mu$ M PTX  | 0,87562   | Hafif sinerjik (CI: 0,85-0,9) |
| 60 $\mu$ M A-EMO+1,2 $\mu$ M PTX  | 0,24534   | Güçlü sinerjik (CI: 0,1-0,3)  |
| 80 $\mu$ M A-EMO+1,6 $\mu$ M PTX  | 0,11544   | Güçlü sinerjik (CI: 0,1-0,3)  |
| 100 $\mu$ M A-EMO+2,0 $\mu$ M PTX | 0,88654   | Hafif sinerjik (CI: 0,85-0,9) |

MDA-MB-231 hücre hattı için gerçekleştirilen Compusyn analizlerine göre 24 saatlik A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonucunda 20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX

konsantrasyonunun sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.4). 48 saatlik A-EMO+PTX kombinasyonu sonucunda ise yine 20 µM A-EMO+0,4 µM PTX dozunun hafif sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.5). Aynı şekilde 72 saatlik A-EMO+PTX uygulamasında ise 40µM A-EMO+0,8µM PTX, 80 µM A-EMO+1,6 µM PTX ve 100 µM A-EMO+2,0 µM PTX dozlarının güçlü sinerjik etki oluşturduğu gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.6).

**Tablo 4.4.** MDA-MB-231 hücrelerinde A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi 24 saat uygulamasının doz-etki verileri

| Kombinasyon           | CI değeri | Tanımlanan etki             |
|-----------------------|-----------|-----------------------------|
| 20µM A-EMO+0,4µM PTX  | 0,78589   | Sinerjik (CI: 0,3-0,7)      |
| 40µM A-EMO+0,8µM PTX  | 2,56586   | Antagonistik (CI: 1,45-3,3) |
| 60µM A-EMO+1,2 µM PTX | 2,55310   | Antagonistik (CI: 1,45-3,3) |
| 80µM A-EMO+1,6µM PTX  | 1,45673   | Antagonistik (CI: 1,45-3,3) |
| 100µM A-EMO+2,0µM PTX | 1,99235   | Antagonistik (CI: 1,45-3,3) |

**Tablo 4.5.** MDA-MB-231 hücrelerinde A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi 48 saat uygulamasının doz-etki verileri

| Kombinasyon           | CI değeri | Tanımlanan etki                 |
|-----------------------|-----------|---------------------------------|
| 20µM A-EMO+0,4µM PTX  | 0,85695   | Hafif sinerjik (CI: 0,85-0,9)   |
| 40µM A-EMO+0,8µM PTX  | 0,96315   | Aditif (CI: 0,9-1,1)            |
| 60µM A-EMO+1,2 µM PTX | 2,65983   | Antagonistik (CI: 1,45-3,3)     |
| 80µM A-EMO+1,6µM PTX  | 4,65698   | Güçlü antagonistik (CI: 3,3-10) |
| 100µM A-EMO+2,0µM PTX | 1,46569   | Antagonistik (CI: 1,45-3,3)     |

**Tablo 4.6.** MDA-MB-231 hücrelerinde A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi 72 saat uygulamasının doz-etki verileri

| Kombinasyon           | CI değeri | Tanımlanan etki              |
|-----------------------|-----------|------------------------------|
| 20µM A-EMO+0,4µM PTX  | 0,45682   | Sinerjik (CI: 0,3-0,7)       |
| 40µM A-EMO+0,8µM PTX  | 0,23568   | Güçlü sinerjik (CI: 0,1-0,3) |
| 60µM A-EMO+1,2 µM PTX | 0,78953   | Orta sinerjik (CI: 0,7-0,85) |
| 80µM A-EMO+1,6µM PTX  | 0,12356   | Güçlü sinerjik (CI: 0,1-0,3) |
| 100µM A-EMO+2,0µM PTX | 0,23659   | Güçlü sinerjik (CI: 0,1-0,3) |

#### 4.1.2. MTT Testi ile Sitotoksosite Tayini Bulguları

MTT testi için, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 100  $\mu$ L besiyeri içerisinde  $7,5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde her bir kuyuya ekilmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelere aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ M) ve paklitaksel (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu$ M) uygulaması yapılmıştır. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanılmıştır. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200  $\mu$ L besiyeri ilave edilmiştir. Ardından hücreler, 24, 48 ve 72 saat için 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda MTT analizi uygulanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan aloe-emodin ve paklitakselin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde ayrı ayrı ve kombine bir şekilde sitotoksik etkisini belirlemek için yapılan MTT test bulguları sonucunda belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

**Tablo 4.7.** MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına A-EMO ve PTX tedavisi uygulaması sonunda 24, 48 ve 72 saatleri için IC<sub>50</sub> değerleri

| Doz ( $\mu$ M) |            | IC <sub>50</sub>      |                        |
|----------------|------------|-----------------------|------------------------|
| Tedaviler      |            | A-EMO                 | PTX                    |
| Süre           | Hücre      |                       |                        |
| 24h            | MCF-7      | >100 $\mu$ M          | >2 $\mu$ M             |
|                | MDA-MB-231 | >100 $\mu$ M          | >2 $\mu$ M             |
| 48h            | MCF-7      | 78 $\pm$ 1,21 $\mu$ M | 1,3 $\pm$ 0,45 $\mu$ M |
|                | MDA-MB-231 | >100 $\mu$ M          | 1,7 $\pm$ 1,33 $\mu$ M |
| 72h            | MCF-7      | 57 $\pm$ 1,04 $\mu$ M | 0,8 $\pm$ 1,23 $\mu$ M |
|                | MDA-MB-231 | 59 $\pm$ 0,18 $\mu$ M | 0,5 $\pm$ 1,09 $\mu$ M |

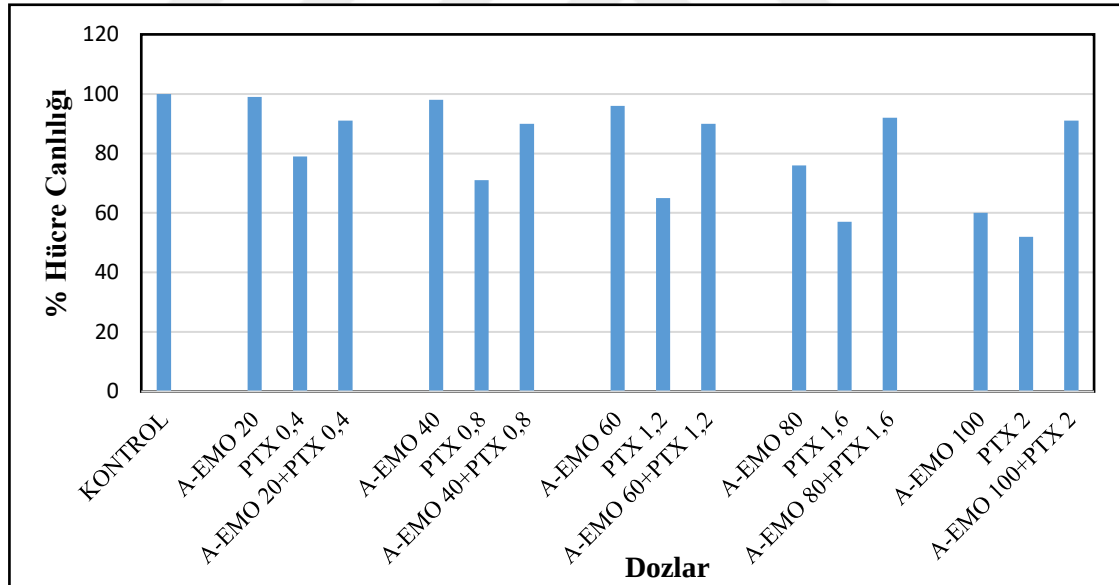
##### 4.1.2.1. MCF-7 hücre hattı için MTT test bulguları

MCF-7 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ M) bileşiğinin 24 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda düşük dozlarda (20, 40 ve 60  $\mu$ M) hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ( $p > 0,05$ ). 80 ve 100  $\mu$ M'lık uygulamalarda ise canlılık oranları sırasıyla

%76,98±0,24 ve %60,57±0,54 çıkmıştır. Bu sonuçlar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,001).

Paklitakselin MCF-7 hücre hattında 24 saat boyunca artan dozlarda (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2 µM) tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları ise sırasıyla %79,85±0,12; %71,62±0,31; %65,15±1,01; %57,36±0,25 ve %52,23±0,65 olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlıdır (p<0,001) (Bkz. Şekil 4.1).

MCF-7 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları (20 µM A-EMO+0,4 µM PTX, 40 µM A-EMO+0,8 µM PTX, 60 µM A-EMO+1,2 µM PTX, 80 µM A-EMO+1,6 µM PTX ve 100 µM A-EMO+2 µM PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır (p> 0,05). Compusyn analizlerine göre MCF-7 hücre hattı için 24 saatlik A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonucunda sinerjik etki gösteren doz bulunamamıştır.



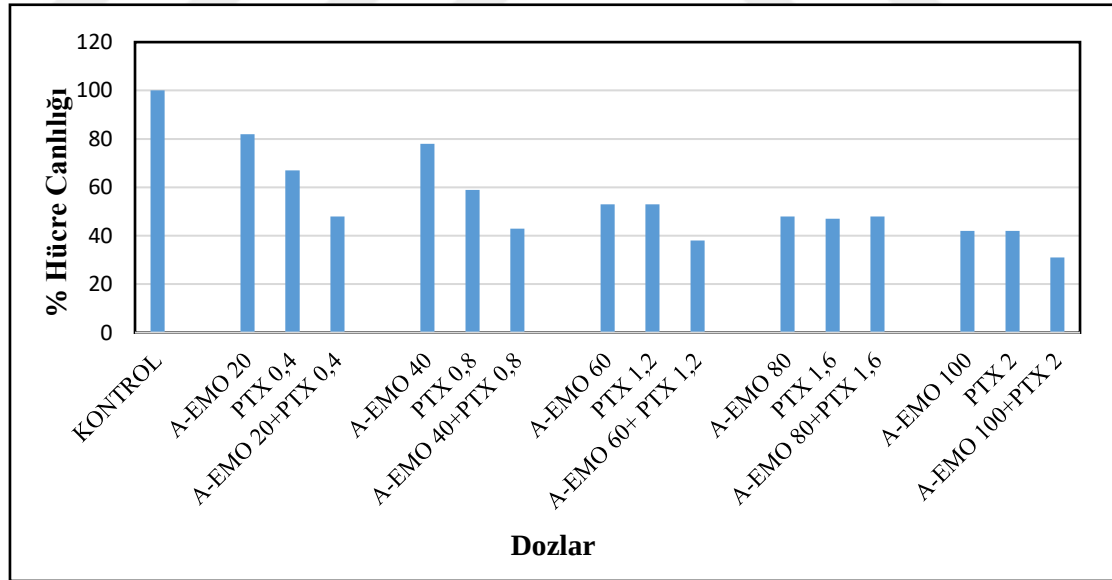
**Şekil 4.1.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 24 saatlik yüzde canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100 µM) bileşiğinin 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla %82,63±0,11; %78,85±0,65; %53,21±0,75; %48,78±0,94 ve %42,54±0,22'dir.

Tüm dozlarda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ).

MCF-7 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu\text{M}$ ) 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla %67,15 $\pm$ 0,36; %59,22 $\pm$ 0,99; %53,78 $\pm$ 0,41; %47,13 $\pm$ 0,78 ve %42,33 $\pm$ 0,68 olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ) (Bkz. Şekil 4.2).

MCF-7 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları (20  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,4  $\mu\text{M}$  PTX, 40  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,8  $\mu\text{M}$  PTX, 60  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,2  $\mu\text{M}$  PTX, 80  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,6  $\mu\text{M}$  PTX ve 100  $\mu\text{M}$  A-EMO+2  $\mu\text{M}$  PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları ise sırasıyla %48,23 $\pm$ 0,35; %43,68 $\pm$ 0,1; %41,75 $\pm$ 0,25; %48,52 $\pm$ 0,46 ve %31,23 $\pm$ 0,23 olarak belirlenmiş olup bu oranlar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p<0,001$ ). Compusyn analizlerine göre 48 saatlik A-EMO+PTX kombinasyonu sonucunda 60  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,2  $\mu\text{M}$  PTX ile 100  $\mu\text{M}$  A-EMO+ 2  $\mu\text{M}$  PTX dozlar güçlü sinerjik etki oluşturduğu görülmüştür.



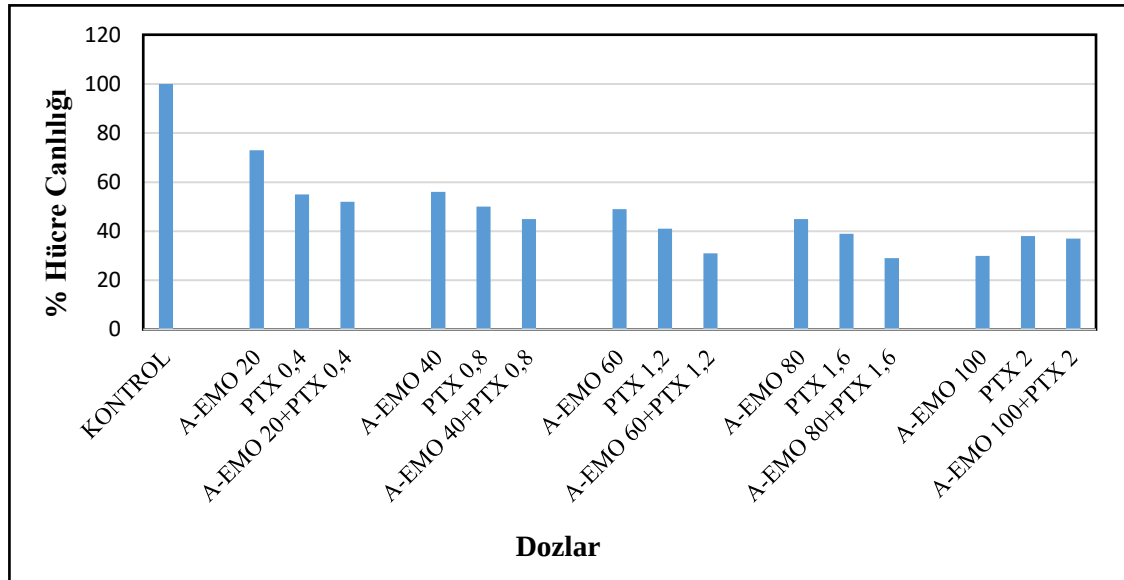
**Şekil 4 2.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 48 saatlik yüzde canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu\text{M}$ ) bileşiğinin 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları

sırasıyla  $73,65 \pm 0,1$ ;  $56,22 \pm 0,26$ ;  $49,14 \pm 0,78$ ;  $45,82 \pm 0,69$  ve  $30,71 \pm 0,45$ 'tir. Tüm dozlarda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ).

MCF-7 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu\text{M}$ ) 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları ise sırasıyla  $55,28 \pm 0,12$ ;  $50,78 \pm 0,63$ ;  $41,26 \pm 0,23$ ;  $39,68 \pm 0,14$  ve  $38,74 \pm 0,63$  olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ) (Bkz. Şekil 4.3).

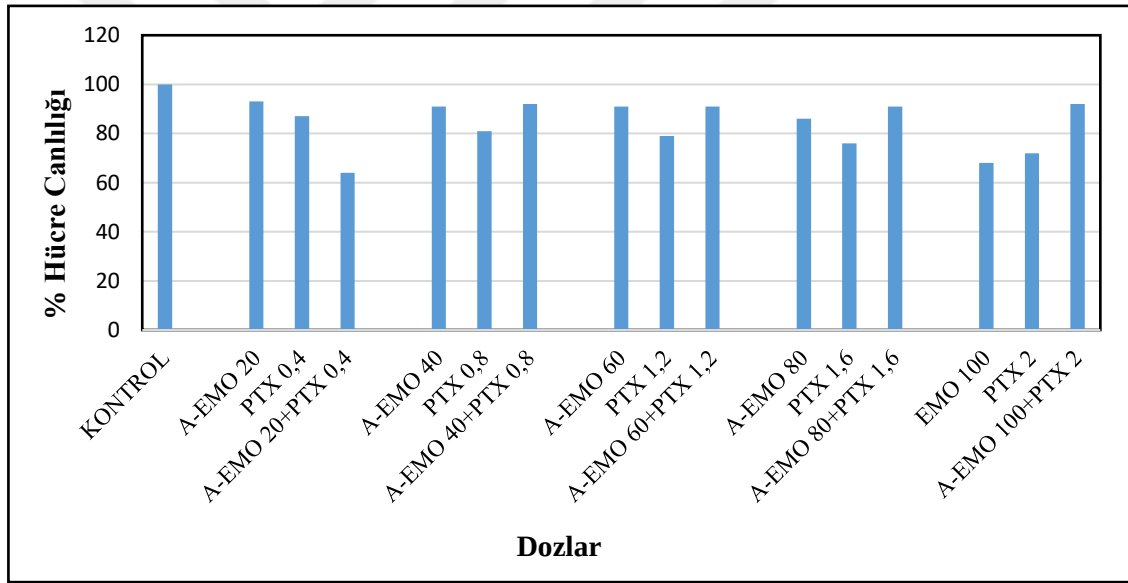
MCF-7 hücre hattında 72 saatlik aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları (20  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,4  $\mu\text{M}$  PTX, 40  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,8  $\mu\text{M}$  PTX, 60  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,2  $\mu\text{M}$  PTX, 80  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,6  $\mu\text{M}$  PTX ve 100  $\mu\text{M}$  A-EMO+2  $\mu\text{M}$  PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları ise sırasıyla  $52,45 \pm 0,13$ ;  $45,23 \pm 0,23$ ;  $31,37 \pm 0,52$ ;  $29,74 \pm 0,48$  ve  $37,56 \pm 0,52$  olarak belirlenmiş olup bu oranlar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p < 0,001$ ). Compusyn analizlerine göre 72 saatlik EMO+PTX uygulamasında 60  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,2  $\mu\text{M}$  PTX ve 80  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,6  $\mu\text{M}$  PTX dozlarının güçlü sinerjik etki oluşturduğu gözlenmiştir.



**Şekil 4.3.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 72 saatlik yüzde canlılık grafiği

#### 4.1.2.2. MDA-MB-231 hücre hattı için MTT test bulguları

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu\text{M}$ ) bileşiğinin 24 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda 20, 40 ve 60  $\mu\text{M}$  dozlarda hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). 80 ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık uygulamalarda ise canlılık oranları sırasıyla  $\%86,21\pm0,52$  ve  $\%68,75\pm0,89$  çıkmıştır. Bu sonuçlar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ). MDA-MB-231 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu\text{M}$ ) 24 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla  $\%87,35\pm0,56$ ;  $\%81,57\pm0,12$ ;  $\%79,17\pm0,15$ ;  $\%76,06\pm0,41$  ve  $\%72,58\pm0,14$  olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ) (Bkz. Şekil 4.4).

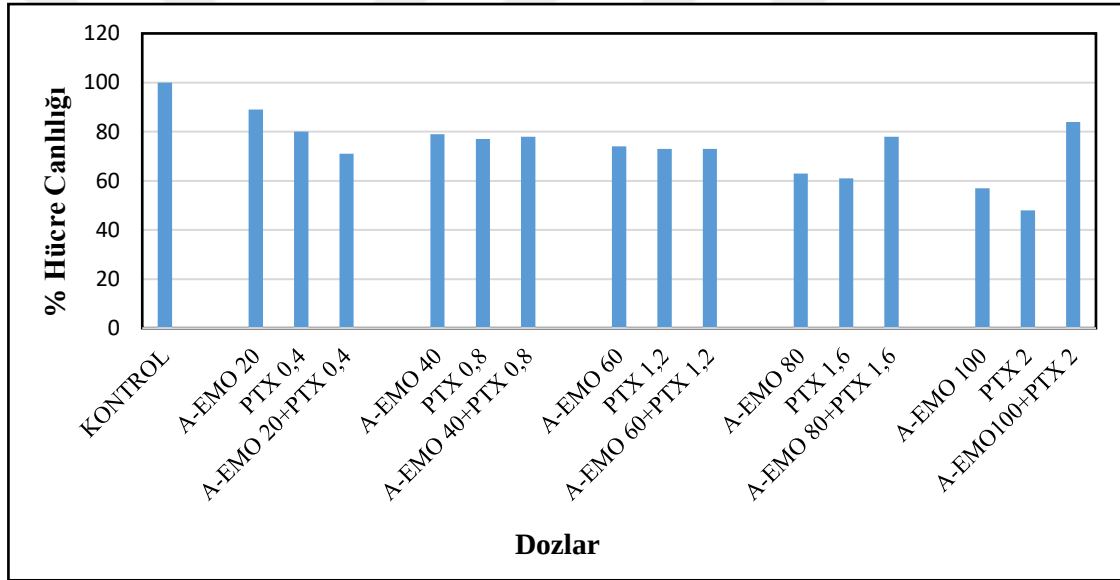


**Şekil 4.4.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 24 saatlik yüzde canlılık grafiği

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamalarından sadece 20  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,4  $\mu\text{M}$  PTX kombinasyonu sonucu oluşan canlılık oranı ( $\%64,28\pm0,82$ ) kontrole göre anlamlı bir farklılık oluşturmuştur ( $p<0,001$ ). Diğer konsantrasyonlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır ( $p>0,05$ ). MDA-MB-231 hücre hattı için gerçekleştirilen Compusyn analizlerine göre 24 saatlik A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonucunda 20  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,4  $\mu\text{M}$  PTX dozunun sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur.

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu\text{M}$ ) bileşiğinin 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla  $\%89,78 \pm 0,32$ ;  $\%79,24 \pm 0,42$ ;  $\%74,56 \pm 0,1$ ;  $\%63,26 \pm 0,56$  ve  $\%57,43 \pm 0,52$ 'tür. Tüm dozlarda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ).

MDA-MB-231 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu\text{M}$ ) 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla  $\%80,47 \pm 0,23$ ;  $\%77,57 \pm 0,12$ ;  $\%73,18 \pm 0,23$ ;  $\%61,36 \pm 0,31$  ve  $\%48,63 \pm 0,25$  olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ) (Bkz. Şekil 4.5).

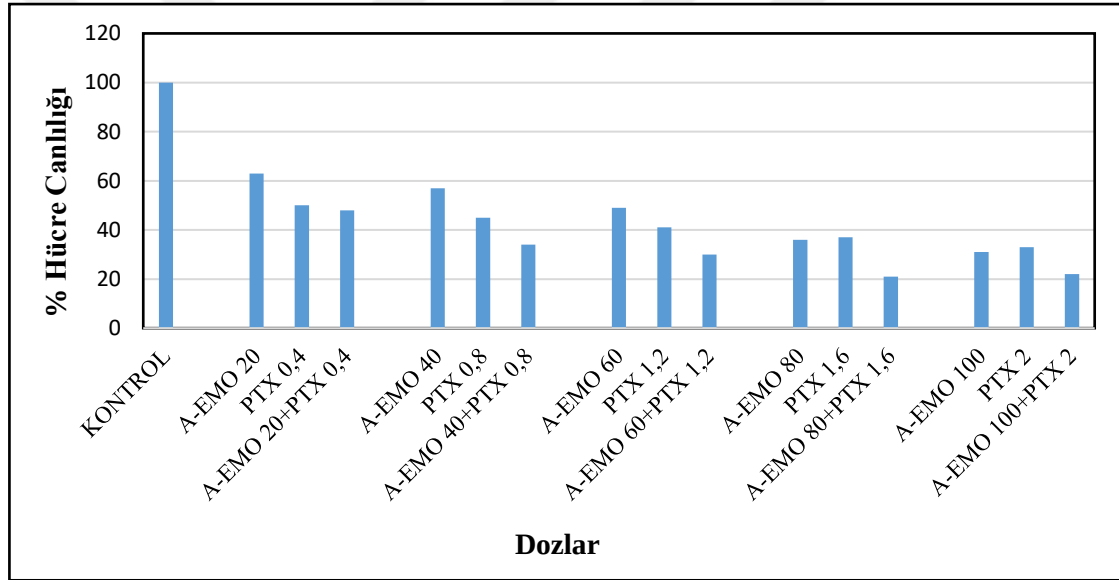


**Şekil 4.5.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 48 saatlik yüzde canlılık grafiği

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları sonucunda 20  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,4  $\mu\text{M}$  PTX, 40  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,8  $\mu\text{M}$  PTX ve 60  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,2  $\mu\text{M}$  PTX dozlarında ortaya çıkan canlılık oranları sırasıyla  $\%71,24 \pm 0,23$ ;  $\%78,14 \pm 0,18$  ve  $\%73,21 \pm 0,28$  olup kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Diğer dozlarda oluşan canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ( $p > 0,05$ ). MDA-MB-231 hücre hattı için gerçekleştirilen Compusyn analizlerine göre 48 saatlik A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonucunda 20  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,4  $\mu\text{M}$  PTX dozunun sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur.

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu\text{M}$ ) bileşiğinin 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla  $\%63,25\pm0,45$ ;  $\%57,98\pm0,48$ ;  $\%49,45\pm0,13$ ;  $\%36,72\pm0,43$  ve  $\%31,34\pm25$ 'tir. Tüm dozlarda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ).

MDA-MB-231 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu\text{M}$ ) 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları ise sırasıyla  $\%50,21\pm0,34$ ;  $\%45,34\pm0,45$ ;  $\%41,52\pm0,12$ ;  $\%37,24\pm0,14$  ve  $\%33,12\pm0,31$  olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ) (Bkz. Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonu uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi ile belirlenen 72 saatlik yüzde canlılık grafiği

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları (20  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,4  $\mu\text{M}$  PTX, 40  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,8  $\mu\text{M}$  PTX, 60  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,2  $\mu\text{M}$  PTX, 80  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,6  $\mu\text{M}$  PTX ve 100  $\mu\text{M}$  A-EMO+2  $\mu\text{M}$  PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları ise sırasıyla  $\%48,41\pm0,14$ ;  $\%34,56\pm0,42$ ;  $\%30,23\pm0,15$ ;  $\%21,85\pm0,17$  ve  $\%22,42\pm0,23$  olarak belirlenmiş olup bu oranlar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p<0,001$ ). Compusyn analizlerine göre 72 saatlik A-EMO+PTX uygulamasında 40  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,8  $\mu\text{M}$  PTX, 80  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,6  $\mu\text{M}$  PTX ve 100  $\mu\text{M}$  A-EMO+2,0  $\mu\text{M}$  PTX dozlarının güçlü sinerjik etki oluşturdıkları gözlenmiştir.

#### 4.1.3. Neutral Red ile sitotoksosite tayini bulguları

MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerine 48 ve 72 saat süresince farklı dozlarda aloe-emodin ve paklitaksel bileşikleri ayrı ayrı ve birlikte uygulanarak hücre canlılığı Neutral Red testi ile belirlenmiştir. Neutral Red uygulaması sonucunda elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 4.8’ de gösterilmiştir.

**Tablo 4.8.** MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına A-EMO ve PTX tedavisi uygulaması sonunda 48 ve 72 saatleri için IC<sub>50</sub> değerleri

| Doz (µM)  |            | IC <sub>50</sub> |             |
|-----------|------------|------------------|-------------|
| Tedaviler |            | A-EMO            | PTX         |
| Süre      | Hücre      |                  |             |
| 48h       | MCF-7      | 89±1,65 µM       | 1,1±1,49 µM |
|           | MDA-MB-231 | 92± 0,4µM        | 1,5±0,85 µM |
| 72h       | MCF-7      | 58±1,41 µM       | 0,9±1,06 µM |
|           | MDA-MB-231 | 71±0,81 µM       | 0,7±0,52 µM |

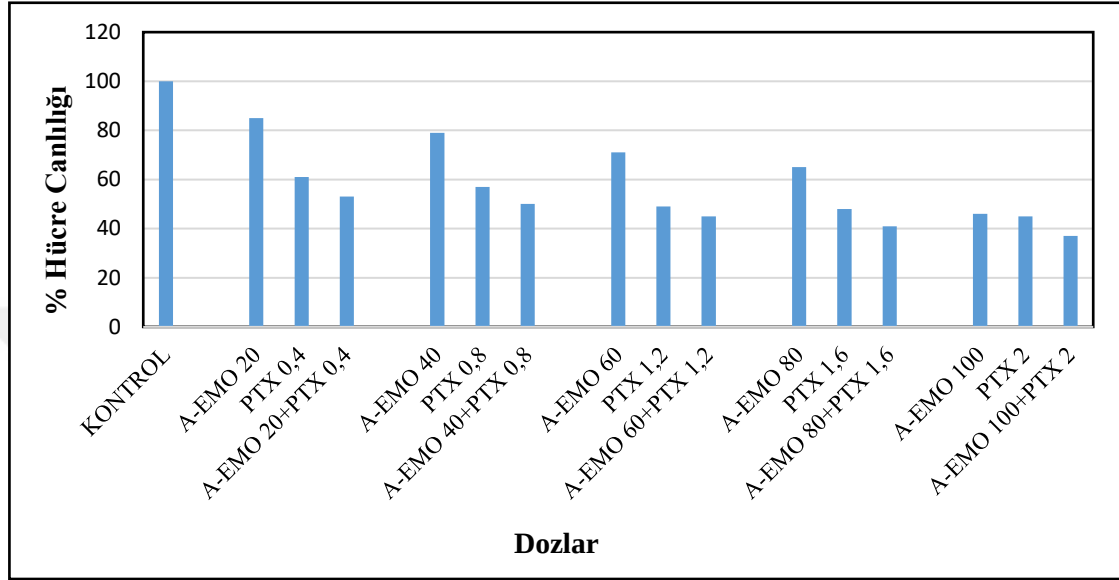
##### 4.1.3.1. MCF-7 hücre hattı için Neutral Red test bulguları

MCF-7 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100 µM) bileşiğinin 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda Neutral Red testi ile elde edilen canlılık oranları sırasıyla %85,13±0,11; %79,27±0,18; %71,38±0,23, %65,95±0,53 ve %46,11±0,34’dür. Tüm dozlarda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,001).

MCF-7 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2 µM) 48 saat boyunca artan konsantrasyonlarda tek başına uygulanması sonucunda Neutral Red testi ile elde edilen canlılık oranları ise sırasıyla %61,98±0,10; %57,8±0,25; %49,21±0,38; %48,65±0,86 ve %45,24±0,13 olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,001) (Bkz. Şekil 4.7).

MCF-7 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları (20 µM A-EMO+0,4 µM PTX, 40 µM A-EMO+0,8 µM PTX, 60 µM A-EMO+1,2 µM PTX, 80 µM

A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX ve 100  $\mu$ M A-EMO+2  $\mu$ M PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları ise sırasıyla %53,21 $\pm$ 0,54; %50,74 $\pm$ 0,26; %45,63 $\pm$ 0,46; %41,35 $\pm$ 0,12 ve %37,57 $\pm$ 0,19 olarak belirlenmiş olup bu oranlar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p<0,001$ ).



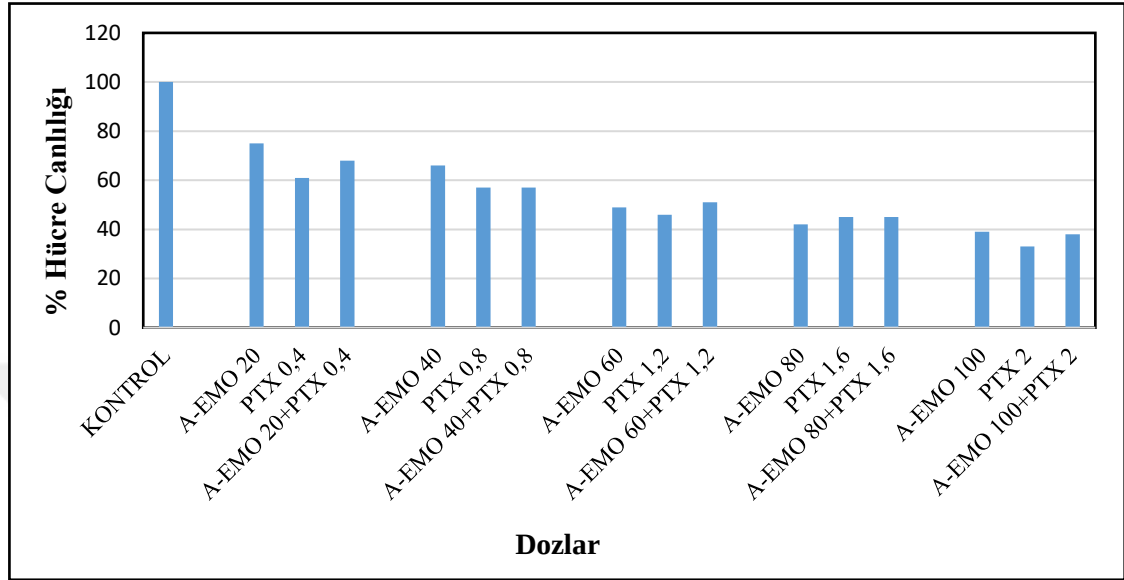
**Şekil 4.7.** MCF-7 hücrelerine uygulanan A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonrası hücre canlılığının 48 saat sürede doza bağlı değişimi

MCF-7 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ M) bileşiğinin 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda Neutral Red testi ile elde edilen canlılık oranları sırasıyla %75,25 $\pm$ 0,45; %66,14 $\pm$ 0,12; %49,37 $\pm$ 0,17; %42,34 $\pm$ 0,13 ve %39,49 $\pm$ 0,19'dur. Tüm dozlarda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ).

MCF-7 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu$ M) 72 saat boyunca artan dozlardaki tek başına uygulanması sonucunda Neutral Red testi ile elde edilen canlılık oranları ise sırasıyla %61,49 $\pm$ 0,42; %57,68 $\pm$ 0,23; %46,53 $\pm$ 0,14; %45,79 $\pm$ 0,45 ve %33,34 $\pm$ 0,17 olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ) (Bkz. Şekil 4.8).

MCF-7 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları (20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX, 40  $\mu$ M A-EMO+0,8  $\mu$ M PTX, 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX ve 100  $\mu$ M A-EMO+2  $\mu$ M PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık

oranları ise sırasıyla  $68,46 \pm 0,14$ ;  $57,34 \pm 0,45$ ;  $51,21 \pm 0,14$ ;  $45,15 \pm 0,78$  ve  $38,21 \pm 0,63$  olarak belirlenmiş olup bu oranlar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p < 0,001$ ).



**Şekil 4.8.** MCF-7 hücrelerine uygulanan A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonrası hücre canlılığının 72 saat sürede doza bağlı değişimi

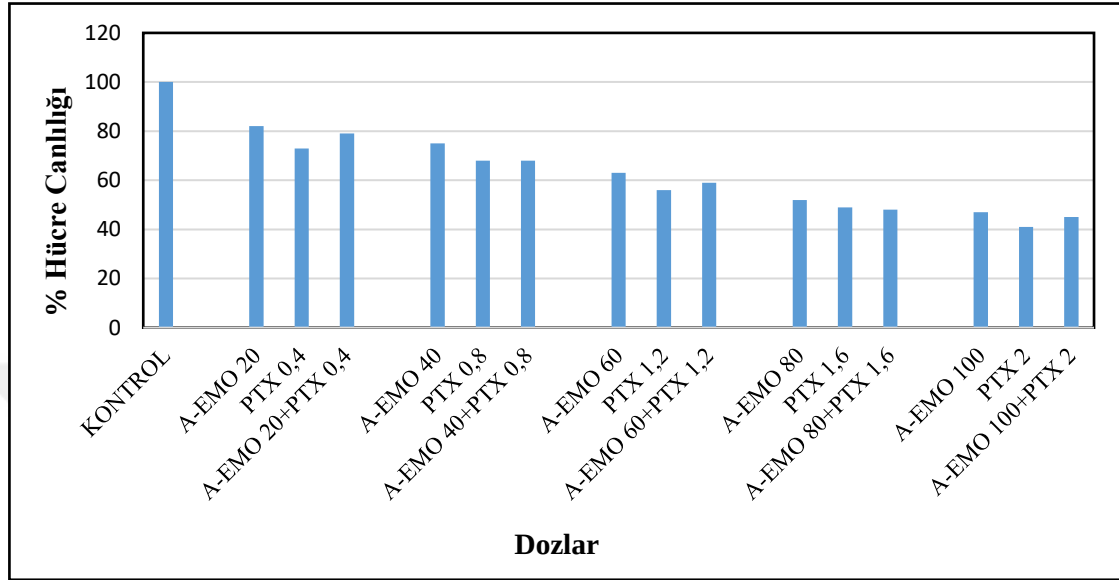
#### 4.1.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı için Neutral Red test bulguları

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu\text{M}$ ) bileşiğinin 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda Neutral Red testi ile elde edilen canlılık oranları sırasıyla  $82,42 \pm 0,23$ ;  $75,21 \pm 0,45$ ;  $63,45 \pm 0,47$ ;  $52,34 \pm 0,17$  ve  $47,83 \pm 23$ 'tür. Tüm dozlarda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ).

MDA-MB-231 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu\text{M}$ ) 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla  $73,24 \pm 0,78$ ,  $68,78 \pm 0,14$ ,  $56,13 \pm 0,53$ ,  $49,24 \pm 0,18$  ve  $41,52 \pm 0,23$  olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ) (Bkz. Şekil 4.9).

MDA-MB-231 hücre hattında paklitaksel ve emodin kombinasyon uygulamaları (20  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,4  $\mu\text{M}$  PTX, 40  $\mu\text{M}$  A-EMO+0,8  $\mu\text{M}$  PTX, 60  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,2  $\mu\text{M}$  PTX, 80  $\mu\text{M}$  A-EMO+1,6  $\mu\text{M}$  PTX ve 100  $\mu\text{M}$  A-EMO+2  $\mu\text{M}$  PTX) sonucunda ortaya çıkan

canlılık oranları ise sırasıyla %79,11±0,11; %68,23±0,26; %59,25±0,45; %48,52±0,18 ve %45,23±0,17 olarak belirlenmiş olup bu oranlar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p<0,001$ ).



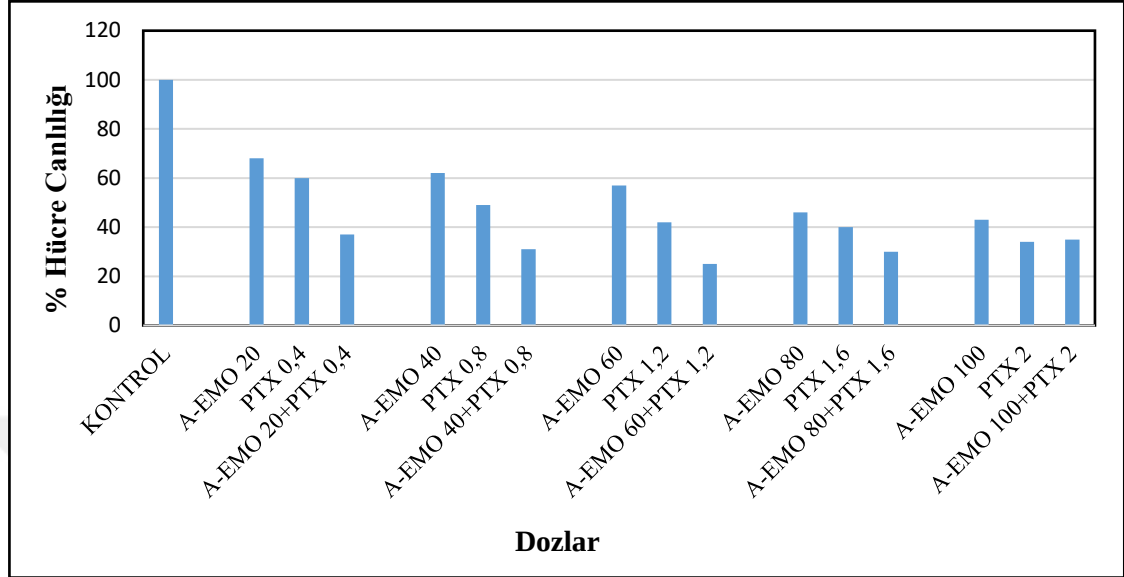
**Şekil 4.9.**MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonrası hücre canlılığının 48 saat sürede doza bağlı değişimi

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ M) bileşiğinin 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda Neutral Red testi ile elde edilen canlılık oranları sırasıyla %68,24±0,14; %62,45±0,52; %57,36±0,42; %46,23±0,14 ve %43,15±0,15'tir. Tüm dozlarda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ).

MDA-MB-231 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu$ M) 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla %60,23±0,58; %49,86±0,42; %42,35±0,63; %40,51±0,74 ve %34,11±0,16 olup tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ) (Bkz. Şekil 4.10).

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyonu (20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX, 40  $\mu$ M A-EMO+0,8  $\mu$ M PTX, 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX ve 100  $\mu$ M A-EMO+2  $\mu$ M PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları ise sırasıyla %37,71±0,14; %31,52±0,53; %25,12±0,12; %30,42±0,18 ve

%35,41±0,42 olarak belirlenmiş olup bu oranlar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p<0,001$ ).



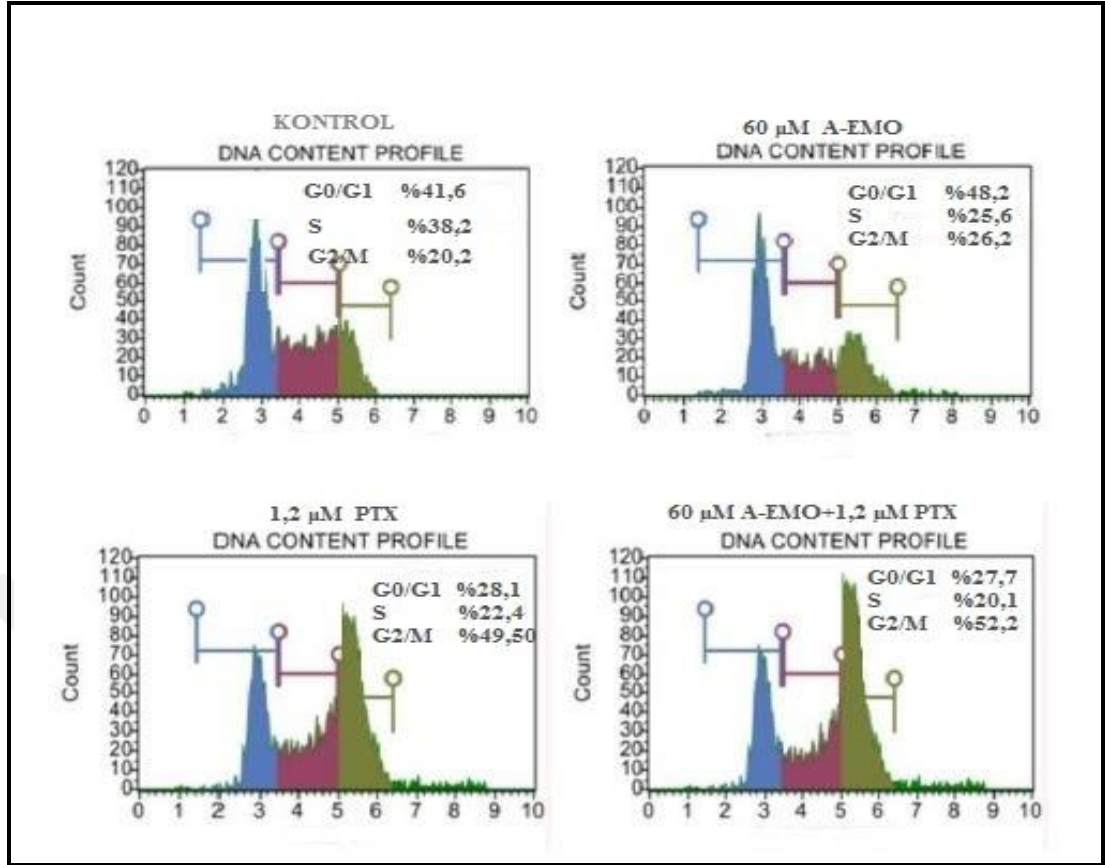
**Şekil 4.10.**MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonrası hücre canlılığının 72 saat sürede doza bağlı değişimi

## 4.2. Apoptotik Bulgular

### 4.2.1. Hücre döngüsü analizi bulguları

MCF- 7 hücre hattında 60 µM aloe-emodin ve 1,2 µM paklitaksel dozlarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının hücre döngüsü üzerine etkilerini araştırmak için Muse® Cell Cycle Kit protokolü uygulanmıştır.

Elde edilen hücre döngüsü evrelerinin yüzde dağılım sonuçları Tablo 4.9’da gösterilmiştir. Veri dağılımına bakıldığında aloe-emodin uygulamasının MCF-7 hücre hattında hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurduğu, paklitaksel uygulamasının ise hücre döngüsüne G2/M evresinde etki ettiği görülmektedir. Kombinasyon uygulamasının da çoğunlukla G2/M evrsinde etkili olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.11).



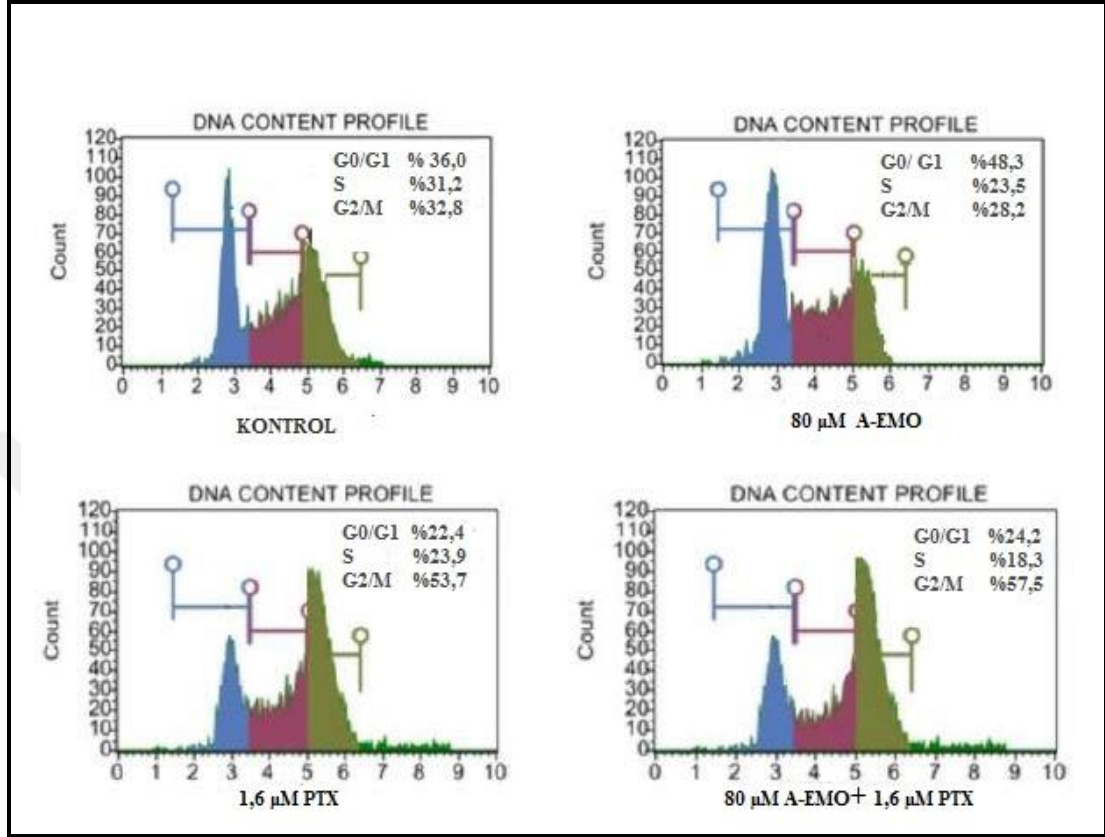
**Şekil 4.11.** 60 µM A-EMO ve 1,2 µM PTX uygulamasının MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonuçları

**Tablo 4.9.** MCF-7 hücre hattı hücre döngüsü (%) değerleri

| Hücre döngüsü (%) | Kontrol   | 60 µM A-EMO | 1,2 µM PTX | 60 µM A-EMO+ 1,2 µM PTX |
|-------------------|-----------|-------------|------------|-------------------------|
| <b>G0/G1</b>      | 41,6 ±2,8 | 48,2 ±3,3   | 28,1 ±1,4  | 27,7 ±1,7               |
| <b>S</b>          | 38,2 ±0,1 | 25,6 ±2,9   | 22,4 ±2,1  | 20,1 ±2,1               |
| <b>G2/M</b>       | 20,2 ±1,6 | 26,2 ±3,2   | 49,50±1,2  | 52,2 ±3,1               |

MDA-MB-231 hücre hattında 80 µM aloe-emodin ve 1,6 µM paklitaksel dozlarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının hücre döngüsü üzerine etkilerini araştırmak için Muse® Cell Cycle Kit protokolü uygulanmıştır. Bunun için 72 saatlik deney grubu hazırlanmış ve sonuçlar Muse® Cell Analyzer'da ölçülmüştür. Elde edilen hücre döngüsü evrelerinin yüzde dağılım sonuçları Tablo 4.10'da gösterilmiştir. Veri dağılımına bakıldığında aloe-emodin uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurduğu, paklitaksel uygulamasının ise hücre döngüsüne G2/M evresinde etki ettiği

görülmektedir. Kombinasyon uygulamasının da çoğunlukla G2/M evresinde etkili olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** 80 µM A-EMO ve 1,6 µM PTX uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonuçları

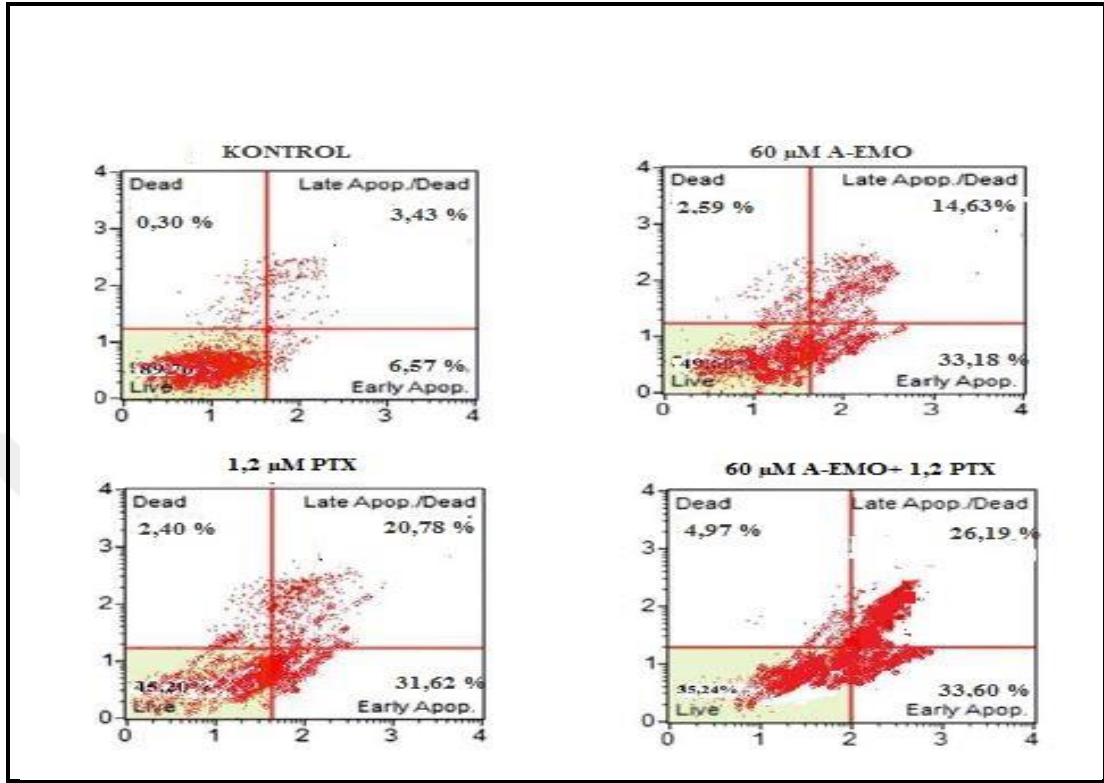
**Tablo 4.10.** MDA-MB-231 hücre hattı hücre döngüsü (%) değerleri

| Hücre döngüsü (%) | Kontrol   | 80 µM A-EMO | 1,6 µM PTX | 80 µM A-EMO+ 1,6 µM PTX |
|-------------------|-----------|-------------|------------|-------------------------|
| G0/G1             | 36,0 ±1,2 | 48,3 ±1,1   | 22,4±2,4   | 24,2 ±1,6               |
| S                 | 31,2 ±2,1 | 23,5 ±2,7   | 23,9±1,5   | 18,3 ±2,6               |
| G2/M              | 32,8 ±1,1 | 28,2 ±3,1   | 53,7±1,7   | 57,5 ±1,3               |

#### 4.2.2. Anneksin V testi bulguları

Akış sitometrisinde Anneksin V testi ile apoptotik hücre ölüm mekanizmasının değerlendirilmesi sonucunda; en yüksek sinerjik etki gösteren 60 µM A-EMO ve 1,2 PTX dozları ile MCF-7 hücre hattında 48 saatlik uygulamaların ardından kontrol grubunda canlı hücrelerin yüzdesi %89,70, erken apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi %6,57 ve

geç apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi ise %3,43, apoptotik olmayan ölü hücrelerin oranı ise %0,30 olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** 60 µM A-EMO ve 1,2 µM PTX uygulamasının MCF-7 hücrelerinde Anneksin V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Dead): Nekroz, (Late Apoptotic/Dead): Geç apoptoz, (Live): % canlılık, (Early Apoptotic): Erken apoptoz

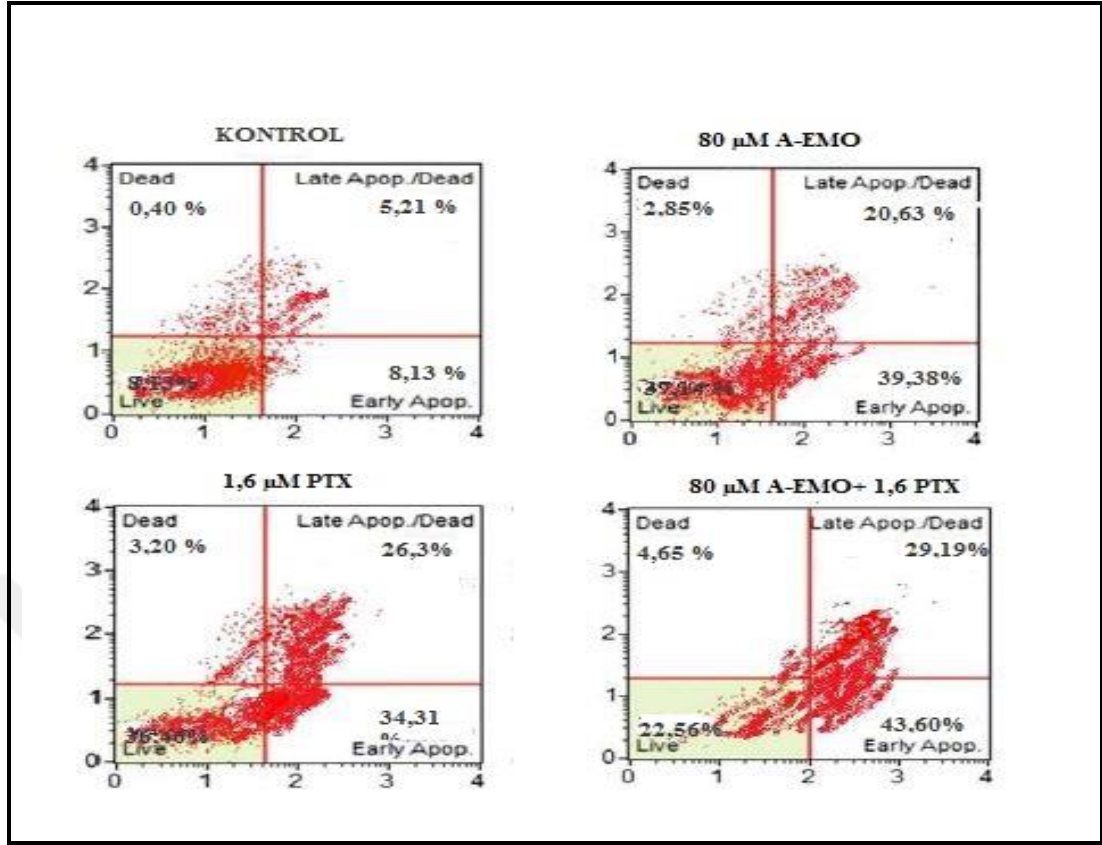
Sadece 1,2 µM PTX uygulanan grupta kontrol grubunda canlı hücrelerin yüzdesi %45,20, erken apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi %31,62 ve geç apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi ise %20,78, apoptotik olmayan ölü hücrelerin oranı ise %2,40 olarak bulunmuştur. Sadece 60 µM A-EMO uygulanan grupta apoptotik kontrol grubunda canlı hücrelerin yüzdesi %49,60, erken apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi %33,18 ve geç apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi ise %14,63, apoptotik olmayan ölü hücrelerin oranı ise %2,59 olarak bulunmuştur. 60 µM A-EMO+1,2 PTX uygulanan grupta ise canlı hücrelerin yüzdesi %35,24, erken apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi %33,60 ve geç apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi ise %26,19, apoptotik olmayan ölü hücrelerin oranı ise %4,97 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.11). Apoptotik (erken ve geç) yanıtlar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.001$ ).

**Tablo 4.11.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonlarının 48 saatlik tedavisi sonucu MCF-7 hücre hattında anneksin V testi değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerleri

| Uygulama Grubu              | Canlı hücre (%) | Apoptotik olmayan ölü hücre (%) | Erken apoptoz (%) | Geç apoptoz (%) |
|-----------------------------|-----------------|---------------------------------|-------------------|-----------------|
| <b>Kontrol</b>              | 89,70±0,11      | 0,30±0,15                       | 6,57±0,47         | 3,43±0,19       |
| <b>1,2 µM PTX</b>           | 45,20±0,45      | 2,40±0,11                       | 31,62±0,63        | 20,78±0,56      |
| <b>60 µM A-EMO</b>          | 49,60±0,41      | 2,59±0,21                       | 33,18±0,84        | 14,63±0,34      |
| <b>60 µM A-EMO+ 1,2 PTX</b> | 35,24±0,32      | 4,97±0,31                       | 33,60±0,46        | 26,19±0,78      |

Akış sitometrisinde Anneksin V testi ile apoptotik hücre ölüm mekanizmasının değerlendirilmesi sonucunda; en yüksek sinerjik etki gösteren 80 µM A-EMO ve 1,6 PTX dozları ile MDA-MB-231 hücre hattında 72 saatlik uygulamaların ardından kontrol grubunda canlı hücrelerin yüzdesi %86,26, erken apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi %8,13 ve geç apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi ise %5,21, apoptotik olmayan ölü hücrelerin oranı ise %0,40 olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.14).

Sadece 1,6 µM PTX uygulanan grupta canlı hücrelerin yüzdesi %36,46, erken apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi %34,31 ve geç apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi ise %26,03, apoptotik olmayan ölü hücrelerin oranı ise %3,20 olarak bulunmuştur. Sadece 80 µM A-EMO uygulanan grupta apoptotik kontrol grubunda canlı hücrelerin yüzdesi %37,14, erken apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi %39,38 ve geç apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi ise %20,63, apoptotik olmayan ölü hücrelerin oranı ise %2,85 olarak bulunmuştur. 80 µM A-EMO+1,6 PTX uygulanan grupta ise canlı hücrelerin yüzdesi %22,56, erken apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi %43,60 ve geç apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi ise %29,19, apoptotik olmayan ölü hücrelerin oranı ise %4,65 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.12). Apoptotik (erken ve geç) yanıtlar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ).



**Şekil 4.14.** 80 µM A-EMO ve 1,6 µM PTX uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde Anneksin V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Dead): Nekroz, (Late Apoptotic/Dead): Geç apoptoz, (Live): % canlılık, (Early Apoptotic): Erken apoptoz

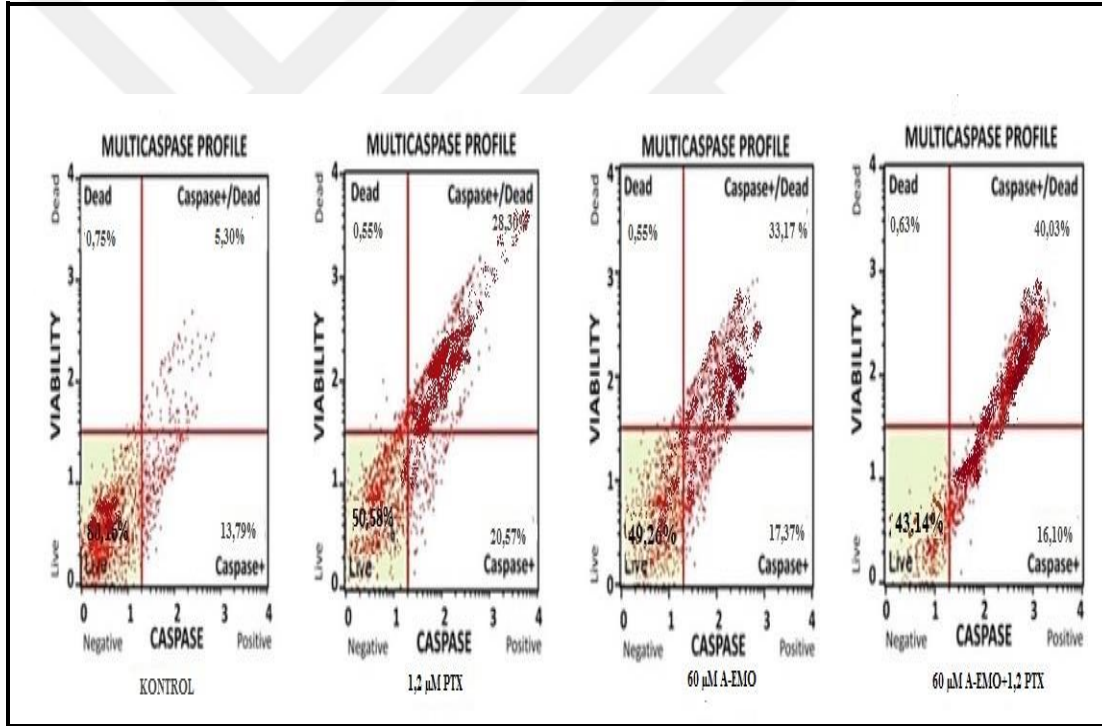
**Tablo 4.12.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonlarının 72 saatlik tedavisi sonucu MDA-MB-231 hücre hattında anneksin V testi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerleri

| Uygulama Grubu              | Canlı hücre (%) | Apoptotik olmayan ölü hücre (%) | Erken apoptoz (%) | Geç apoptoz (%) |
|-----------------------------|-----------------|---------------------------------|-------------------|-----------------|
| <b>Kontrol</b>              | 86,26±0,41      | 0,40±0,42                       | 8,13±0,38         | 5,21±0,28       |
| <b>1,6 µM PTX</b>           | 36,46±0,34      | 3,20±0,39                       | 34,31±0,10        | 26,03±0,14      |
| <b>80 µM A-EMO</b>          | 37,14±0,13      | 2,85±0,15                       | 39,38±0,54        | 20,63±0,28      |
| <b>80 µM A-EMO+ 1,6 PTX</b> | 22,56±0,48      | 4,65±0,28                       | 43,60±0,34        | 29,19±0,41      |

#### 4.2.3. Multicaspase aktivasyon analizi bulguları

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde aloe-emodin ve paklitakselin ayrı ayrı ve sinerjik olarak apoptotik etkilerinin incelenmesi amacıyla multicaspase düzeyleri ölçülmüştür.

Buna göre; 48 saat süreyle aloe-emodin (60  $\mu$ M) ve paklitaksele (1,2  $\mu$ M) maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde elde edilen verilere göre, kontrol grubunda total kaspaz %19,09 $\pm$ 3,43 olarak saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.15). 60  $\mu$ M aloe-emodin uygulanmasında total kaspaz %50,54 $\pm$ 1,77 ( $p<0,001$ ) iken 1,2  $\mu$ M paklitaksel uygulanmasında %48,87 $\pm$ 0,60, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6 PTX kombinasyonunda ise %56,13 $\pm$ 3,33 ( $p<0,001$ ) değerleri gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.13).

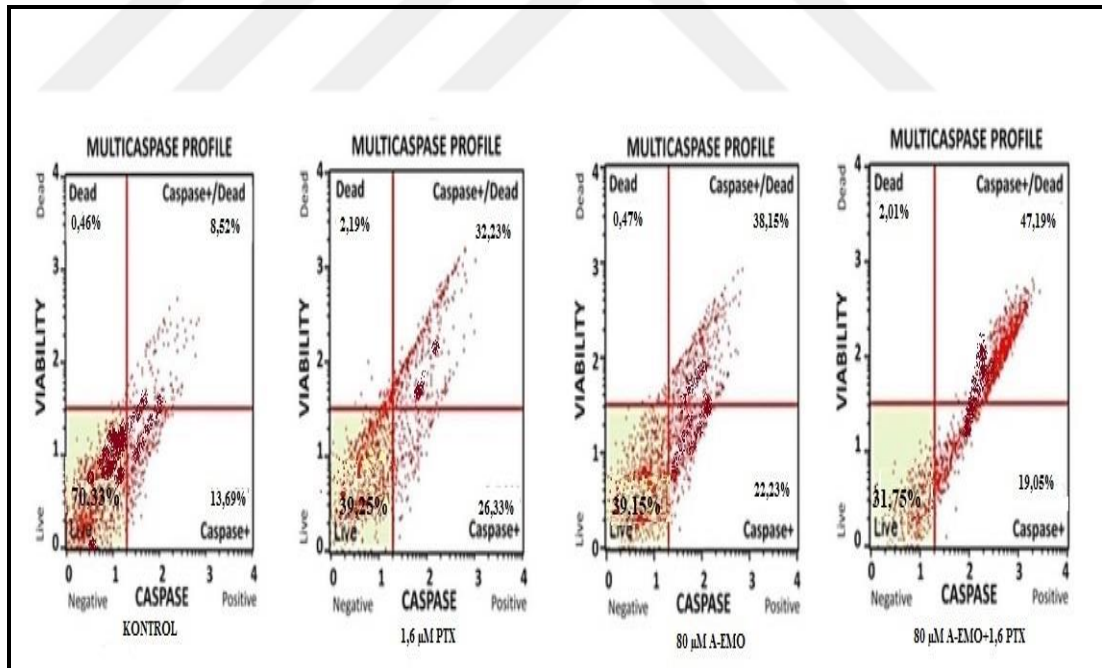


**Şekil 4.15.** 60  $\mu$ M A-EMO ve 1,2  $\mu$ M PTX uygulamasının MCF-7 hücrelerinde Multicaspase değerlendirmesi ile elde edilen yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Sol alt bölge apoptotik olmayan kaspaz negatif canlı hücre popülasyonunu, sol üst bölge apoptotik olmayan kaspaz negatif ölü hücre popülasyonunu, sağ alt bölge apoptotik kaspaz pozitif canlı hücre popülasyonunu, sağ üst bölge apoptotik kaspaz pozitif ölü hücre popülasyonunu göstermektedir.)

**Tablo 4.13.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonlarının 48 saatlik uygulaması sonucunda MCF-7 hücre hattında total kaspaz aktivitesi testi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerleri

| Uygulama Grubu             | Canlı hücre (%) | Total kaspaz | Ölü hücre (%) |
|----------------------------|-----------------|--------------|---------------|
| <b>Kontrol</b>             | 80,16±0,11      | 19,09±3,43   | 0,75±0,10     |
| <b>1,2 µM PTX</b>          | 50,58±0,23      | 48,87±0,60   | 0,55±0,32     |
| <b>60 µM A-EMO</b>         | 49,26 ±0,41     | 50,54±1,77   | 0,20±0,38     |
| <b>60 µM A-EMO+1,2 PTX</b> | 43,14±0,32      | 56,13±3,33   | 0,63±0,85     |

Aynı şekilde 72 saat süreyle aloe-emodin (80 µM) ve paklitaksele (1,6 µM) maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde elde edilen verilere göre, kontrol grubunda total kaspaz %22,21±2,37 iken; 80 µM aloe-emodin uygulanmasında total kaspaz %60,38±0,89 ( $p<0,001$ ), 1,6 µM paklitaksel uygulanmasında %58,56±0,10, 80 µM A-EMO+1,6 µM PTX kombinasyonunda ise %66,24±3,42 ( $p<0,001$ ) değerleri gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.16 ve Tablo 4.14).



**Şekil 4.16.** 80 µM A-EMO ve 1,6 µM PTX uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde Multicaspase değerlendirmesi ile elde edilen yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Sol alt bölge apoptotik olmayan kaspaz negatif canlı hücre popülasyonunu, sol üst bölge apoptotik olmayan kaspaz negatif ölü hücre popülasyonunu, sağ alt bölge apoptotik kaspaz pozitif canlı hücre popülasyonunu, sağ üst bölge apoptotik kaspaz pozitif ölü hücre popülasyonunu göstermektedir.)

**Tablo 4.14.** A-EMO, PTX ve A-EMO+PTX kombinasyonlarının 72 saatlik uygulaması sonucunda MDA-MB-231 hücre hattında total kaspaz aktivitesi testi değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerleri

| Uygulama Grubu             | Canlı hücre (%) | Total kaspaz | Ölü hücre (%) |
|----------------------------|-----------------|--------------|---------------|
| <b>Kontrol</b>             | 77,33±0,11      | 22,21±2,37   | 0,46±0,52     |
| <b>1,6 µM PTX</b>          | 39,25±0,48      | 58,56±0,10   | 2,19±0,87     |
| <b>80 µM A-EMO</b>         | 39,15 ±0,41     | 60,38±0,89   | 0,47±0,26     |
| <b>80 µM A-EMO+1,6 PTX</b> | 31,75±0,19      | 66,24±3,42   | 2,01±0,85     |

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Dünyada ve özellikle gelişmiş ülkelerde yaşanan tüm ölümler içerisinde kanserin payı oldukça büyüktür ve bu pay giderek artmaktadır. Kanser vakalarının sayısı arttıkça yeni teşhis ve tedavi yöntemlerine duyulan ihtiyaç başta bitkisel tıp, akupunktur gibi alternatif tedavi yöntemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Geliştirilen yeni tedavilerin klasik tedaviler ile uyumlarının test edilmesi, yan etkilerinin belirlenmesi ve oluşturabilecekleri istenmeyen etkilerden kaçınılması son derece önemlidir. Son yıllarda bu konulara yoğunlaşan çalışmalar ile bitkisel tedavi yöntemleri araştırılmakta ve tedaviye faydalı olabilecek etkin madde içerikleri değerlendirilmektedir (Pecere vd., 2000; Kuo vd., 2002; Pecere vd., 2003). Bu çerçevede, bitkisel kaynaklı maddelerden olan aloe-emodin de birçok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere pek çok araştırmada kullanılması söz konusudur.

Meme kanseri, tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olup tüm kanser ölümleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanseri tedavisinde cerrahi girişim ve radyoterapinin yanı sıra kemoterapi de önemli yer tutmaktadır. Son yıllarda modern kemoterapi şemaları geliştirilmesine rağmen tatmin edici bir başarı elde edilememiştir. Bu doğrultuda hazırlanan tez çalışmasında aloe-emodin ve paklitaksel bileşiklerinin sinerjik, sitotoksik ve apoptotik etkileri insan meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7, MDA-MB-231) araştırılmıştır. Aloe-emodin ve paklitaksel bileşiklerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine olası sinerjik ve sitotoksik etkilerini belirleyebilmek için MTT ve Neutral Red canlılık testi yöntemleri kullanılmıştır.

MTT canlılık testinin sonuçlarına göre, MCF-7 hücre hattı için  $IC_{50}$  değerleri 48 saatlik uygulamada A-EMO için  $78 \pm 1,21 \mu M$ , PTX için  $1,3 \pm 0,45 \mu M$  bulunurken, 72 saatlik uygulamada  $IC_{50}$  değerleri A-EMO için  $57 \pm 1,04 \mu M$ , PTX için  $0,8 \pm 1,23 \mu M$  bulunmuştur. MCF-7 hücre hattında 24 saatlik A-EMO (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu M$ ) uygulamasında sadece 80 ve 100  $\mu M$ 'lık dozlarda canlılık oranında kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş yaşanmıştır ( $p < 0,001$ ). Paklitakselin MCF-7 hücre hattında 24 saat boyunca artan dozlarda (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu M$ ) tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). MCF-7 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon

uygulamaları (20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX, 40  $\mu$ M A-EMO+0,8  $\mu$ M PTX, 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX ve 100  $\mu$ M A-EMO+2  $\mu$ M PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır ( $p > 0,05$ ). Compusyn analizlerine göre, MCF-7 hücre hattı için 24 saatlik A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonucunda sinerjik etki gösteren doz bulunamamıştır.

MCF-7 hücre hattında A-EMO (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ M) bileşiğinin 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). MCF-7 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu$ M) 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları da kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). MCF-7 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları (20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX, 40  $\mu$ M A-EMO+0,8  $\mu$ M PTX, 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX ve 100  $\mu$ M A-EMO+2  $\mu$ M PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p < 0,001$ ). Compusyn analizlerine göre 48 saatlik A-EMO+PTX kombinasyonu sonucunda 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX ile 100  $\mu$ M A-EMO+2  $\mu$ M PTX dozlarının güçlü sinerjik etki oluşturduğu görülmektedir.

MCF-7 hücre hattında A-EMO (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ M) bileşiğinin 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). MCF-7 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu$ M) 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). MCF-7 hücre hattında 72 saatlik aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları (20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX, 40  $\mu$ M A-EMO+0,8  $\mu$ M PTX, 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX ve 100  $\mu$ M A-EMO+2  $\mu$ M PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p < 0,001$ ). Compusyn analizlerine göre 72 saatlik EMO+PTX uygulamasında 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX ve 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX dozlarının güçlü sinerjik etki oluşturduğu gözlenmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattında A-EMO (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ M) bileşiğinin 24 saat boyunca artan konsantrasyonlarda tek başına uygulanması sonucunda sadece 80 ve 100  $\mu$ M'lık uygulamalarda canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ). MDA-MB-231 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu$ M) 24 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda tüm dozlarda gözlenen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ( $p<0,001$ ). MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamalarından sadece 20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX kombinasyonu sonucu oluşan canlılık oranı kontrole göre anlamlı bir farklılık oluşturmuştur ( $p<0,001$ ). MDA-MB-231 hücre hattı için gerçekleştirilen Compusyn analizlerine göre 24 saatlik A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonucunda 20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX dozunun sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur.

MDA-MB-231 hücre hattında A-EMO (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ M) bileşiğinin 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ). MDA-MB-231 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu$ M) 48 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları da kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ). MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları sonucunda 20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX, 40  $\mu$ M A-EMO+0,8  $\mu$ M PTX ve 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX dozlarında ortaya çıkan canlılık oranları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ). Diğer dozlarda oluşan canlılık oranları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ( $p>0,05$ ). MDA-MB-231 hücre hattı için gerçekleştirilen Compusyn analizlerine göre 48 saatlik A-EMO+PTX kombinasyon tedavisi sonucunda 20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX dozunun sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur.

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin (20, 40, 60, 80 ve 100  $\mu$ M) bileşiğinin 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık oranları tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ).

MDA-MB-231 hücre hattında paklitakselin (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 ve 2  $\mu$ M) 72 saat boyunca artan dozlarda tek başına uygulanması sonucunda elde edilen canlılık tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,001$ ).

MDA-MB-231 hücre hattında aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyon uygulamaları (20  $\mu$ M A-EMO+0,4  $\mu$ M PTX, 40  $\mu$ M A-EMO+0,8  $\mu$ M PTX, 60  $\mu$ M A-EMO+1,2  $\mu$ M PTX, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX ve 100  $\mu$ M A-EMO+2  $\mu$ M PTX) sonucunda ortaya çıkan canlılık oranları da kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır ( $p<0,001$ ). Compusyn analizlerine göre 72 saatlik A-EMO+PTX uygulamasında 40  $\mu$ M A-EMO+0,8  $\mu$ M PTX, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX ve 100  $\mu$ M A-EMO+2,0  $\mu$ M PTX dozlarının güçlü sinerjik etki oluşturdıkları gözlenmiştir.

MTT testini doğrulamak için MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına 48 ve 72 saat süresince farklı dozlarda aloe-emodin ve paklitaksel bileşikleri ayrı ayrı ve birlikte uygulanarak hücre canlılığı Neutral Red testi ile belirlenmiştir. Neutral Red uygulaması sonucunda elde edilen bulgular MTT testi bulguları ile örtüşmektedir. Hem MTT testi hem de Neutral Red testi ile elde edilen bulgular literatürle desteklenmiştir.

Literatüre bakıldığında emodin ve aloe-emodin bileşiklerinin pek çok kanser çeşidinde proliferasyonu azalttığı görülmektedir. MDA-MB-453 ve MCF-7 hücre hatlarında aloe-emodin (6-100  $\mu$ M) uygulaması sonucunda MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunun önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. MDA-MB-453 hücrelerinde ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Huang vd., 2013).

MDA-MB-453, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin 48 saat boyunca aloe-emodine (10, 30 ve 50  $\mu$ M dozlarda) maruz kalmasının, telomerlerin kısalmasına ve telomerazın inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır. hTERT'nin transkripsiyonu, E2F1'in aktivasyonu ve c-myc proteinlerinin inaktivasyonu ile baskılanmıştır. CpG adalarının hTERT gen promotöründe önemli demetilasyon sayısı gözlenmiştir (Wang vd., 2020).

Prostat kanseri hücrelerinde (PC3) 2,5-15  $\mu$ M aloe-emodin tedavisi sonrası hücrelerin proliferasyonunun inhibe olduğu saptanmıştır (Liu vd., 2012). Yapılan başka bir çalışmada aloe-emodin toksik olmayan dozlarında kolon tümör hücrelerinin invazyonunu ve migrasyonunu indükleyen PMA'yı (phorbol-12-myristyl-13-acetate) baskıladığı ve aloe-emodin anjiogenezisi, invazyonu, endotelial hücre migrasyonunu, promotor aktiviteyi güçlü bir inhibe edici etkisi olduğu gözlenmiştir (Suboj vd., 2012).

Lu vd., (2008) emodinin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) reseptör sinyalini engelleyerek kanser hücre büyümesini inhibe ettiğini ve emodinin kolon kanseri anjiyogenezisinde potansiyel bir inhibitör olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Han vd., (2012), emodinin kolon kanser hücre hattı DLD-1’de PRL-3’ün fosfotaz aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini, PRL-3 ile indüklenen tümör hücrelerini ve metastazını konsantrasyona bağlı olacak şekilde bloke ettiğini bulmuştur.

Guo vd., (2013) yapmış olduğu bir başka çalışmada, antikanser etki gösteren curcumin ile emodin ikilisinin, meme kanser hücrelerinde proliferasyonu, apoptozu ve invazyonu benzer olarak inhibe ettiğini saptamıştır. Ayrıca, miR-34a’nın bu ikili tarafından ifadesinin arttığı görülmüştür.

Pek çok kanser hücre hattında sitotoksik etki gösteren emodin bileşiği, normal hücre hatlarına uygulandığında (1-100  $\mu$ M arasında değişen değerlerde) herhangi bir toksik etkiye yol açmamıştır (Özenver vd., 2018).

Kanser tedavisi için potansiyellerinin daha kapsamlı değerlendirilebilmesi için aloe-emodin ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulandığı tedavide hücreleri apoptozis yoluyla ölüme götürdüğünün belirlenmesi önemlidir. Hem maddelerin tekli uygulamalarının hem de kombinasyon tedavisinin hücreleri apoptozis yoluyla ölüme götürdüğü, akış sitometrisinde anneksin V, total kaspaz ve hücre döngüsü aktivitesi testleriyle tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre istatistiksel olarak anlamlı apoptozis oranları bulunmuştur.

Hücre döngüsü sonuçlarına bakıldığında, aloe-emodin uygulamasının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurduğu, paklitaksel uygulamasının ise hücre döngüsüne G2/M evresinde etki ettiği görülmektedir. Kombinasyon uygulamasının ise çoğunlukla G2/M evresinde etkili olduğu saptanmıştır.

Akış sitometrisinde Anneksin V testi ile apoptotik hücre ölüm mekanizmasının değerlendirilmesi sonucunda MCF-7 hücre hattında 48 saatlik, MDA-MB-231 hücre hattında 72 saatlik uygulamaların ardından elde edilen apoptotik (erken ve geç) yanıtlar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ).

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde aloe-emodin ve paklitakselin ayrı ayrı ve sinerjik olarak apoptotik etkilerinin incelenmesi amacıyla multicaspase düzeyleri ölçülmüştür. Buna göre, 48 saat süreyle aloe-emodin (60  $\mu$ M) ve paklitaksele (1,2  $\mu$ M) maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde elde edilen verilere göre, kontrol grubunda total kaspaz %19,09 $\pm$ 3,43 iken; 60  $\mu$ M aloe-emodin uygulanmasında total kaspaz %50,54 $\pm$ 1,77 ( $p<0,001$ ); 1,2  $\mu$ M paklitaksel uygulanmasında %48,87 $\pm$ 0,60, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6 PTX kombinasyonunda ise %56,13 $\pm$ 3,33 ( $p<0,001$ ) değerleri gözlenmiştir.

Benzer şekilde 72 saat süreyle aloe-emodin (80  $\mu$ M) ve paklitaksele (1,6  $\mu$ M) maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde elde edilen verilere göre, kontrol grubunda total kaspaz %22,21 $\pm$ 2,37 iken; 80  $\mu$ M aloe-emodin uygulanmasında total kaspaz %60,38 $\pm$ 0,89 ( $p<0,001$ ); 1,6  $\mu$ M paklitaksel uygulanmasında %58,56 $\pm$ 0,10, 80  $\mu$ M A-EMO+1,6  $\mu$ M PTX kombinasyonunda ise %66,24 $\pm$ 3,42 ( $p<0,001$ ) değerleri gözlenmiştir. Apoptoz çalışmalarında elde edilen verilerde literatür araştırmalarıyla uyumludur. Literatürde emodin ve aloe-emodin bileşiklerinin çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozu teşvik ettiği görülmektedir.

Aloe-emodin, insan hepatoma hücre hatlarında apoptozisi p53 ve p21 yoluyla indüklediği gösterilmiştir (Kuo vd., 2002). İnsan promiyelositik lösemi hücrelerinde aloe-emodin uygulaması G2/M duraklamasına yol açmıştır (Chen vd., 2004). İnsan H460 akciğer küçük hücreli olmayan kanser hücrelerinde aloe-emodin indüklediği apoptoziste p38'in rolü bulunmaktadır (Yeh vd., 2003). Karaciğer satellit T-HSC/C16 hücrelerinde aloe-emodin mitokondriyon aracılığı ile apoptozisi uyardığı iddia edilmektedir (Lian vd., 2005). Aloe-emodin nöroektodermal tümörler üzerine etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda ilacın hücre içerisine girerek çekirdekte DNA'ya bağlandığı gösterilmiştir (Pecere vd., 2000; Pecere vd., 2003).

LS1034 kolon kanseri hücrelerinde emodin ROS ve  $Ca^{+2}$  salınımını indüklediği, anti ve pro-apoptotik protein düzeylerini değiştirdiği, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu ve kaspaz- 9 ile kaspaz- 3'ü aktive ederek apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Ma vd., 2012). Lin vd., (2012) yapmış olduğu çalışmada, emodin pankreas kanser hücrelerinin büyümesini ve anjiyogenezisini olası bir NF- $\kappa$ B (nükleer faktör kappa B) tutulum mekanizması ile inhibe edip etmediği araştırılmıştır. Emodin

uygulamasý sonucunda pankreas kanser hücrelerinin bir pirimidin analođu olan gemitabinle indüklenen büyümesini engellediđi ve apoptozisi arttırdıđı bulunmuştur.

Emodin in insan karaciğer kanser hücre hattı HepG2’de apoptozu indüklediği ve G1 fazında hücreleri tuttuğu gözlenmiştir. Emodin uygulamasý sonucunda HepG2 hücrelerinde Bax protein seviyesinde herhangi bir değişiklik görülmezken apoptoz üzerindeki Bcl-2 etkileri azalmış, p53 ifadesi artmıştır (Yu vd., 2013).

Emodin in insan rahim ağzı kanseri HeLa hücre hattının apoptoz üzerindeki etkisini araştırmak ve ilgili mekanizmaları tanımlamak için Yaoxian vd., (2013) tarafından bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda emodin in dahili mitokondriyal ve harici ölüm reseptörü yoluyla apoptozu indükleyerek HeLa hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği görölmüştür.

2013 yılında yapılan çalışmada, survivin hedefli shRNA (small hairpinRNA) ve emodin ikilisinin etkisi yumurtalık kanserine karşı araştırılmış ve bu ikili kombinasyon uygulamasının hücre proliferasyonunu ve invazyonunu azaltarak apoptozu indüklediği, *in vitro* şekilde yüksek oranda antitümör etkiye yol açtığı bulunmuştur (Xue vd., 2013).

Emodin in, akciğer hastalıkları tedavisi ile ilgili olarak, farelerde bleomisine bağlı fibrozis gelişimine karşı koruyucu bir etkisi olduğu ve akciğer kanserine karşı potansiyel bir ilaç olabileceği saptanmıştır (Chen vd., 2009; Shrimali vd., 2013).

Emodin, baş ve omuz skuamoz hücreli karsinoma hücrelerinde TWIST1 ifadesini direkt olarak baskılamış, E-cadherin mRNA ve protein ifadesini düşürmüş, vimentin mRNA ve protein ifadesini arttırmıştır. Ayrıca emodin in, E-cadherin promotoruna TWIST1 bağlanmasını inhibe ederek, E-cadherin transkripsiyon aktivitesini bastırdığı görölmüştür (Way vd., 2014).

Bir başka çalışmada, HCT116 kolon kanseri hücrelerinde emodin ile indüklenen apoptozda reaktif oksijen türlerinin rolü ve sinyal yolağı üzerine etkileri araştırılmıştır. HCT116 hücrelerinde emodin in mitokondriyal apoptozisi başlattığı görölmüştür. Emodin in oksidatif strese yanıt olarak ROS’u arttırdığı ve p53’ün aşırı ifadesini tetiklediği görölmüştür (Xie vd., 2014).

Aloe-emodin (1-15  $\mu\text{M}$ ) uygulanan HeLa hücrelerinde emodine bağlı olarak lizozomal membranların geçirgenliğinin arttığı ve dolayısıyla lizozomal yola bağımlı apoptozun tetiklendiği bildirilmiştir (Trybus vd., 2017). Gao vd., (2019) tarafından yapılan bir çalışmada aloe-emodin (10- 200  $\mu\text{M}$  dozlarda) HeLa ve SiHa hücrelerinin apoptozunu teşvik ettiği ve HPV ile ilişkili E6 ve E7 proteinlerinin ifadelerini azalttığı görülmüştür. Kolon kanseri hücre hattı WiDr üzerinde yapılan bir çalışmada 30  $\mu\text{mol/L}$  48 saatlik aloe-emodin uygulamasının hücre döngüsünü G2/M evresinde (%64,2) duraklattığı, siklin B1 promotorunu inhibe ettiği bulunmuştur (Suboj vd., 2012). HeLa hücrelerinde 2,5- 40  $\mu\text{mol/L}$  72 saatlik aloe-emodin uygulamasının siklin A düşüşüne ve siklin B1 ve CDK1 artışına sebep olarak hücre döngüsünü G2/M evresinde hapsedtiği bulunmuştur (Guo vd., 2007). MCF-7 hücre hattında 5, 10, 15, and 20  $\mu\text{M}$ 'lık aloe-emodin uygulamalarının mitokondriyal ve ER bağımlı apoptozu indüklediği saptanmıştır (Chen vd., 2016).

Kanser tedavisinde kombine ilaç kullanımında amaç, tedavinin başarısını artırmak ve olası ilaç yan etkilerini azaltmaktır. Bu çerçevede; aloe-emodin çeşitli antikanser ilaçlarla kombinasyon durumunda etkinliğinin değişip değişmeyeceği araştırılmıştır. Bu araştırmalardan birinde aloe-emodin sisplatin ile birlikte kullanıldığında C6 glioma hücrelerinde sisplatinin toksik etkisini azalttığı ifade edilmiştir (Mijatovic vd., 2005). Bir başka *in vitro* çalışmada ise aloe-emodin 0,5- 10  $\mu\text{M}$ 'lık dozları cis-platinol, doxorubicin, 5-flourourasil ile kombine olarak beş gün süreyle Merkel hücrelerine uygulanmıştır. Kombine uygulanan ilaçların antiproliferatif etkisinin her bir ilacın tek başına kullanımlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin ilaçların özellikle düşük konsantrasyonlarda daha belirgin olduğu da bildirilmiştir (Fenig vd., 2004).

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise 4, 8, 12 ve 16  $\mu\text{g/mL}$  aloe- emodin uygulamasının tamoksifen etkinliğini arttırdığı saptanmıştır (Tseng vd., 2017).

Paklitaksel bir mitoz inhibitörü olarak sınıflandırılır. Mitoz inhibitörleri hücre bölünmesi sürecinde olan hücreleri hedefleyen kemoterapötik ilaçlardır (Matson ve Stukenberg, 2011). Bunlardan vinka alkaloitleri ve kolşisin, mikrotübül depolimerizasyonuna yol açarken, paklitaksel (taksol grubu) mikrotübüllerin depolarizasyonunu engeller. Bu şekilde mitotik iğ ipliklerinin işlevlerini yerine getirememesi kromozomların orta bölgede

konumlanmasını ve ayrılmasını engeller ve hücre döngüsü G2/M fazında baskılanır. Bu durumda iğ kontrol noktası (spindle assembly checkpoint-SAC) adı verilen proteinlerin hücre döngüsünü durdurduğu ve hücrelerin birçoğunun apoptoz sürecine girdikleri varsayılmaktadır. Paklitakselin p53 yolağından bağımsız olarak hücreleri ölüme götürdüğü, Bcl-XL ekspresyonunu baskıladığı, Bak ekspresyonunu arttırdığı, p34, CDK2 ve diğer siklin bağımlı kinazlar vasıtasıyla apoptoz yolağını indüklediği gösterilmiştir (Wang vd., 2000).

Pushkarev vd., (2009) paklitakselin farklı konsantrasyonlarda hücre döngüsünü farklı fazlarda ketlediğini, düşük paklitaksel konsantrasyonlarında hücre döngüsünün G1 fazında yüksek konsantrasyonlarda G2/M fazında baskılandığını göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanser potansiyellerinin belirlenmesi için hücre hatlarına aloe-emodin, paklitaksel ve kombinasyonları tek başına ve ilk kez kombine bir şekilde uygulanmıştır. Literatürde aloe-emodin ve paklitakselin birlikte kullanımına ilişkin başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu açıdan bu tez çalışması söz konusu bileşiklerin meme kanseri hücre hatları üzerinde sitotoksik aktiviteye yol açtığını gösteren ilk çalışma olması sebebiyle özgün bir değer taşımaktadır. Bu çalışmada, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına A-EMO, PTX ve kombinasyonlarının ayrı ayrı uygulanmasıyla sitotoksik ve apoptotik etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Bu kombinasyonun sinyal yolları ve gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için daha kapsamlı araştırmaların yapılması önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- ACS (American Cancer Society) “Breast Cancer Risk and Prevention” <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention.html>, Son erişim tarihi: 15.06.2022.
- Adams, J. D., Flora, K. P., Goldspiel, B. R., Wilson, J. W., Arbuck, S. G. and Finley, R. (1993) “Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns”, *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 15, 141- 147.
- Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., De Azambuja, E., Viale, G. and Piccart, M. (2014) “Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives”, *Journal of Clinical Oncology*, 32 (25), 2794- 2803.
- Adlercreutz, H. and Mazur, W. (1997) “Phyto-oestrogens and Western diseases”, *Annals of Medicine*, 29 (2), 95- 120.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. and Khan, A. U. (2017) “Awareness and current knowledge of breast cancer”, *Biological Research*, 50 (1), 33.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of The Cell*, 4<sup>th</sup> ed., New York, 1314.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K. and Watson, J. (2004), “Biologia Molecolare Della Cellula”, *Libro Multimediale*, Bologna: Zanichelli, 1172- 1177.
- Allred, C. D., Allred, K. F., Ju, Y. H., Virant, S. M. and Helferich, W. G. (2001) “Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner”, *Cancer Research*, 61 (13), 5045- 5050.
- Atıcı, E. (2007) “Tıp tarihinde kanser ve lösemi”, *Türk Onkoloji Dergisi*, 22 (4), 197- 204.
- Balachandran, P. and Govindarajan, R. (2005) “Cancer: An ayurvedic perspective”, *Pharmacol Research*, 51, 19- 30.
- Barnum, K. J. and O’Connell, M. J. (2014) “Cell cycle regulation by checkpoints”. In *Cell Cycle Control*, *Humana Press*, New York, 29- 40.
- Basly, J. P., Marre-Fournier, F., Le Bail, J. C., Habrioux, G. and Chulia, A. J. (2000) “Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)-and (Z)-resveratrol”, *Life Sciences*, 66 (9), 769- 777.
- Bhalla, K., Ibrado, A. M., Tourkina, E., Tang, C., Mahoney, M. E. and Huang, Y. (1993) “Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with

- programmed cell death in human myeloid leukemia cells”, *Leukemia*, 7 (4), 563- 568.
- Bhat, K. P., Kosmeder, J. W. and Pezzuto, J. M. (2001) “Biological effects of resveratrol”, *Antioxidants and Redox Signaling*, 3 (6), 1041- 1064.
- Bulut, G. (2012) “İnsan her2/neu pozitif, invaziv meme karsinomu hücre hattı olan Mda-Mb-453’de trastuzumab ve gossipol (At-101) kombinasyonunun sitotoksikite ve apoptozis üzerine etkisi”, Uzmanlık Tezi, *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı*, İzmir, 55-62.
- Cachot, J. (1998) “Caractérisation et analyse de la mutagenèse du gène suppresseur de tumeur p53 chez le flet, *Platichthys flesus* (L.)”, Doctoral dissertation, *Aix-Marseille 2*.
- Cai, Y., Ma, W., Huang, X., Cao, L., Li, H., Jiang, Y., Lu, N. and Yin, Y. (2015) “Effect of survivin on tumor growth of colorectal cancer *in vivo*”, *International Journal of Clinica and Experimental Pathology*, 8 (10), 13267-13272.
- Cappelletti, V., Fioravanti, L., Miodini, P. and Di Fronzo, G. (2000) “Genistein blocks breast cancer cells in the G2/M phase of the cell cycle”, *Journal of Cellular Biochemistry*, 79 (4), 594- 600.
- Cassady, J.M. and Douros, J.D. (1980) “Anticancer agents based on natural product models”, *Academic Press*, New York.
- Chang, H.Y. and Yang, X. (2000) “Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), 821- 846.
- Chavez, K. J., Garimella, S. V. and Lipkowitz, S. (2010) “Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer”, *Breast Disease*, 32 (1- 2), 35.
- Chen, H. C., Hsieh, W. T., Chang, W. C. and Chung, J. G. (2004) “Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells”, *Food and Chemical Toxicology*, 42 (8), 1251- 1257.
- Chen, X. H., Sun, R. S., Hu, J. M., Mo, Z. Y., Yang, Z. F., Jin, G. Y., Guan, W. D. and Zhong, N. S. (2009) “Inhibitory effect of emodin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice”, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 36, 146- 153.
- Chen, F., Wang, W. and El-Deiry, W. S. (2010) “Current strategies to target p53 in cancer”, *Biochemical Pharmacology*, 80 (5), 724- 730.
- Chen, Q., Tian, S., Zhu, J., Li, K. T., Yu, T. H., Yu, L. H. and Bai, D. Q. (2016) “Exploring a novel target treatment on breast cancer: aloe-emodin mediated photodynamic therapy induced cell apoptosis and inhibited cell metastasis,” *Anti-cancer Agent Medicinal Chemistry*, 16 (6), 763- 770.

- Clark, W. H. (1991) "Tumour progression and the nature of cancer", ***British Journal of Cancer***, 64 (4), 631- 644.
- Clavel, J. (2007) "Progress in the epidemiological understanding of gene-environment interactions in major diseases: cancer", ***Comptes Rendus Biologies***, 330 (4), 306- 317.
- Claus, E. B., Stowe, M. and Carter, D. (2003) "Family history of breast and ovarian cancer and the risk of breast carcinoma in situ", ***Breast Cancer Research and Treatment***, 78 (1), 7- 15.
- Cokkinides, V., Albano, J., Samuels, A., Ward, M. and Thum, J. (2005) "American cancer society: Cancer facts and figures." ***Atlanta: American Cancer Society***.
- Cooper, G. M. and Hausman, R. E. (2004) "The cell: a molecular approach", ***ASM Press***.
- Cragg, G.M. and Newman, D. J. (2005) "Plants as a source of anti-cancer agents", ***Journal of Ethnopharmacology***, 100 (1), 72-79.
- Cos, S., González, A., Martínez-Campa, C., Mediavilla, M. D., Alonso-González, C. and Sánchez-Barceló, E. J. (2006) "Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions", ***Cancer Detection and Prevention***, 30 (2), 118- 128.
- Cotroneo, M. S., Wang, J., Fritz, W. A., Eltoum, I. E. and Lamartiniere, C. A. (2002) "Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model", ***Carcinogenesis***, 23 (9), 1467- 1474.
- Cragg, G. M., and Newman, D. J. (2005) "Plants as a source of anti-cancer agents", ***Journal of Ethnopharmacology***, 100 (1-2), 72- 79.
- Cui, J. and Hopper, J. L. (2000) "Why are the majority of hereditary cases of earlyonsetbreast cancer sporadic? A simulation study", ***Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention***, 9 (8), 805- 812.
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z. and Li, J. (2017), "Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping", ***Journal of Cancer***, 8 (16), 3131- 3141.
- Dash, P. R., McCormick, J., Thomson, M. J., Johnstone, A. P., Cartwright, J. E. and Whitley, G. S. (2007) "Fas ligand-induced apoptosis is regulated by nitric oxide through the inhibition of fas receptor clustering and the nitrosylation of protein kinase C $\epsilon$ ", ***Experimental Cell Research***, 313 (16), 3421- 3431.
- Dey, D., Ray, R. and Hazra, B. (2014) "Antitubercular and antibacterial activity of quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates", ***Phytotherapy Research***, 28, 1014- 1021.

- DiPaola, R. S. (2002) "Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis", **Clinical Cancer Research**, 8 (11), 3311- 3314.
- Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F., and Wicha, M. S. (2003) "Stem cells in normal breast development and breast cancer", **Cell Proliferation**, 36, 59- 72.
- Dulić, V., Lees, E., and Reed, S. 1. (1992) "Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase", **Science**, 257 (5078), 1958- 1961.
- Dumitrescu, R. and Cotarla, I. (2005) "Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005", **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 9 (1), 208- 221.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M. and Vogelstein, B. (1993) "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression", **Cell**, 75 (4), 817- 825.
- Eliyatkın, N., Yalcın, E., Zengel, B., Aktaş, S. ve Vardar, E. (2015) "Meme kansinomunda moleküler sınıflama: gelenekselden yeni döneme yolculuk", **Meme Sağlığı Dergisi**, 11 (2), 59- 66.
- Elmore S. (2007) "Apoptosis: a review of programmed cell death", **Toxicologic Pathology**, 35 (4), 495- 516.
- Erdoğan, B. B. (2003) "Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis", **Akciğer Arşivi**, 4 (3), 165- 174.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M. and Hancock, D. C. (1992) "Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein", **Cell**, 69 (1), 119- 128.
- Eyong, K.O., Kuete, V. and Efferth, T. (2013) "10- quinones and benzophenones from the medicinal plants of Africa, medicinal plant research in Africa", **Oxford, Elsevier**, 351- 391.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. and Liang, J. (2005) "Caspase family proteases and apoptosis", **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 37 (11), 719- 727.
- 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.
- Fischer, O. M., Hart, S., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2003) "EGFR signal transactivation in cancer cells", **Biochemical Society Transactions**, 31 (6), 1203- 1208.
- Franz, T. A. and Kidson, S. H. (1997) "Mapping of interdigital apoptosis in the chick and duck hindlimb", **Embryology**, 93 (2), 85- 94.

- Ford, W. C. L. (2001) "Biological mechanisms of male infertility", *The Lancet*, 357 (9264), 1223- 1224.
- Fuchs, Y. and Steller, H. (2015) "Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16 (6), 329.
- Gao, R., Wu, X., Huang, Z., Wang, B., Li, F., Xu, H. and Ran, L. (2019) "Anti-tumor effect of aloe-emodin on cervical cancer cells was associated with human papillomavirus E6/E7 and glucose metabolism", *OncoTargets and Therapy*, 12, 3713- 3721.
- Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L. L., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, C- Q., Mirshahi, P., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, J-P., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R. and Soria, C. (2013) "Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines", *BMC Cancer*, 13 (1), 1- 14.
- Gewies, A. (2003) "Introduction to apoptosis", *ApoReview*, 3, 1- 26.
- GLOBOCAN." Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020" <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>, Son erişim tarihi: 19.07.2021
- Golias, C. H., Charalabopoulos, A. and Charalabopoulos, K. (2004) "Cell proliferation and cell cycle control: a mini review", *International Journal of Clinical Practice*, 58 (12), 1134- 1141.
- Gullett, N. P., Ruhul Amin, A. R., Bayraktar, S., Pezzuto, J. M., Shin, D. M., Khuri, F. R., Aggarwal, B. B., Surh, Y. J. and Kucuk, O. (2010) "Cancer prevention with natural compounds", *Seminars Oncology*, 37, 258- 281.
- Guo, J. M., Xiao, B. X., Liu, Q., Zhang, S., Liu, D. H. and Gong, Z. H. (2007) "Anticancer effect of aloe-emodin on cervical cancer cells involves G2/M arrest and induction of differentiation," *Acta Pharmacologica Sinica*, 28 (12), 1991- 1995.
- Guo, J., Li, W., Shi, H., Xie, X., Li, L., Tang, H., Wu, M., Kong, Y., Yang, L., Gao, J., Liu, P., Wei, W. and Xie, X. (2013) "Synergistic effects of curcumin with emodin against the proliferation and invasion of breast cancer cells through upregulation of miR- 34a", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 382, 103.
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F. and Fernandez-Luna, J. L. (2002) "Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor- $\kappa$ B activation", *Journal of Biological Chemistry*, 277 (44), 41701- 41705.
- Han, Y. M., Lee, S. K., Jeong, D. G., Ryu, S. E., Han, D. C., Kim, D. K. and Kwon, B. M. (2012) "Emodin inhibits migration and invasion of DLD-1 (PRL-3) cells via

- inhibition of PRL-3 phosphatase activity”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22, 323- 326.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) “The hallmarks of cancer”, *Cell*, 100 (1), 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) “Hallmarks of cancer: the next generation”, *Cell*, 144 (5), 646- 674.
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M. R., Hayes, D. f. and Bast Jr, R. C. (2007) “American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer”, *Journal of Clinical Oncology*, 25 (33), 5287- 5312.
- Hedgecock, E. M., Sulston, J. E. and Thomson, J. N. (1983) “Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*”, *Science*, 220 (4603), 1277- 1279.
- Hermeking, H. and Eick, D. (1994) “Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53”, *Science*, 265 (5181), 2091- 2093.
- HSGM (Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü). “Türkiye Kanser İstatistikleri 2017”, [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_Istatistikleri\\_2017.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf) Son erişim tarihi: 15.06.2022.
- Huang, Z., Chen, G. and Shi, P. (2009) “Effects of emodin on the gene expression profiling of human breast carcinoma cells”, *Cancer Detection and Prevention*, 32 (4), 286- 291.
- Huang, P. H., Huang, C. Y., Chen, M. C., Lee, Y. T., Yue, C. H., Wang, H. Y., and Lin, H. (2013) “Emodin and aloe-emodin suppress breast cancer cell proliferation through ER $\alpha$  inhibition,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Hulka, B. S. and Moorman, P. G. (2001) “Breast cancer: hormones and other risk factors-Discussion”, *Elsevier*, 38, 103- 116.
- İşlen, N. (2018) “EGFR inhibitorunun (Ag 1478) triple negatif ve luminal A meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif ve antimetastatik etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.
- Joyce, D., Albanese, C., Steer, J., Fu, M., Bouzahzah, B. and Pestell, R. G. (2001) “NF- $\kappa$ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection”, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 12 (1), 73- 90.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., Aytakin, Y. and Solakoğlu, S. (1993) “Temel Histoloji”, *Barış Kitabevi*.
- Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004) “Cell-cycle checkpoints and cancer”, *Nature*, 432 (7015), 316- 323.

- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. and Evan, G. (1997) "Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI (3) K and PKB", *Nature*, 385 (6616), 544- 548.
- Kaya, M. (2007) "Bazı monoterpen ve uçucu yağların, hücre çoğalması ve apoptozis üzerine etkilerinin memeli hücre kültürleriyle araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.
- Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C. and Dietrich, W. D. (2001) "Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60, 422- 429.
- Kierszenbaum, A. L. (2006) "Cell-cycle regulation and mammalian gametogenesis: A lesson from the unexpected", *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 73 (8), 939- 942.
- Ko, J. C., Su, Y. J., Lin, S. T., Jhan, J. Y., Ciou, S. C., Cheng, C. M., Chiu, y. F., Kuo, Y. H., Tsai, M. S. and Lin, Y. W. (2010) "Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of ERCC1 and inactivation of ERK1/2", *Lung Cancer*, 69 (2), 155- 164.
- Koff, J., Ramachandiran, S. and Bernal-Mizrachi, L. (2015) "A time to kill: targeting apoptosis in cancer", *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (2), 2942- 2955.
- Kopnin, B. P. (2000) "Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis", *Biochemistry C/C of Biokimii*, 65 (1), 2- 27.
- Kumar, A., Kumar, A., Michael, P., Brabant, D., Parissenti, A. M., Ramana, C. V. and Parrillo, J. E. (2005) "Human serum from patients with septic shock activates transcription factors STAT1, IRF1, and NF- $\kappa$ B and induces apoptosis in human cardiac myocytes", *Journal of Biological Chemistry*, 280 (52), 42619- 42626.
- Kuo, P. L., Lin, T. C. and Lin, C. C. (2002) "The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines", *Life Science*, 71(16), 1879-92.
- Lian L. H., Park, E. J., Piao, H. S., Zhao, Y. Z. and Sonh, D. H. (2005) "Aloe emodin-induced apoptosis in t-HSC/Cl 6 cells involves a mitochondria-mediated pathway", *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96, 495- 502
- Lin, S. Z., Wei, W. T., Chen, H., Chen, K. J., Tong, H. F., Wang, Z. H., Ni, Z. L., Liu, H. B., Guo, H. C. and Liu, D. L. (2012) "Antitumor activity of emodin against pancreatic cancer depends on its dual role: promotion of apoptosis and suppression of angiogenesis", *PLoS ONE*, 7 (8), e42146.

- Liu, K., Park, C., Li, S., Lee, K. W., Liu, H., He, L., Soung, N. K., Ahn, J. S., Bode, A. M., Dong, Z., Kim, B. Y. and Dong, Z. (2012) "Aloe-emodin suppresses prostate cancer by targeting the mTOR complex 2," **Carcinogenesis**, 33 (7), 1406- 1411.
- Liu, L., Ahn, K. S., Shanmugam, M. K., Wang, H., Shen, H., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Alharbi, S. A., Chang, Y., Sethi, G. and Tang F. R. (2019) "Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF- $\kappa$ B activation cascade in estrogen receptor-negative breast cancer cells", **Journal of Cellular Biochemistry**, 120 (3), 4504-4513.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. l., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2000) **Molecular Cell Biology** 4<sup>th</sup> ed., Whfreemanandco, Newyork.
- Loo, W. T. Y., Fong, J. H. M. and Chow, L. W. C. (2005) "The efficacy of Paclitaxel on solid tumour analysed by ATP bioluminescence assay and VEGF expression: atranslational research study", **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 59, 337-339.
- Lowe, S. W. and Lin, A. W. (2000) "Apoptosis in cancer", **Carcinogenesis**, 21 (3), 485-495.
- Lu, Y., Zhang, J. and Qian, J. (2008) "The effect of emodin on VEGF receptors in human colon cancer cells", **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, 23, 222- 228.
- Ma, Y. S., Weng, S. W., Lin, M. W., Lu, C. C., Chiang, J. H. and Yang, J. S. (2012) "Antitumor effects of emodin on LS1034 human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*: roles of apoptotic cell death and LS1034 tumor xeno grafts model", **Food and Chemical Toxicology**, 50 (5), 1271 1278.
- Madigan, M. P., Ziegler, R. G., Benichou, J., Byrne, C. and Hoover, R. N. (1995) "Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors", **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 87 (22), 1681- 1685.
- Majdalawieh, A. F., Fayyad, M. W. and Nasrallah, G. K. (2017) "Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*", **Critical Review Food Science Nutrition**, 57 (18), 3911- 3928.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2001) "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer", **Nature Reviews Cancer**, 1 (3), 222- 231.
- Malumbres, M. (2011) "Oncogene-induced mitotic stress: p53 and pRb get mad too", **Cancer Cell**, 19 (6), 691- 692.
- Malumbres, M. (2020) "Control of the Cell Cycle", **In Abeloff's Clinical Oncology**, 56-73.
- Manning, A. L. and Dyson, N. J. (2012) "RB: mitotic implications of a tumour suppressor", **Nature Reviews Cancer**, 12 (3), 220- 226.

- Marti, A., Ritter, P.M. and Jager, R. (2001) "Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome-c release and caspase activation", ***Mechanisms of Development***, 104 (1-2), 89- 98.
- Martínez-Jiménez, F., Muiños, F., Sentís, I., Deu-Pons, J., Reyes-Salazar, I., Arnedo-Pac, C., Mularoni, L., Pich, O., Bonet, J., Kranas, H., Gonzalez-Perez, A. and Lopez-Bigas, N. (2020) "A compendium of mutational cancer driver genes", ***Nature Reviews Cancer***, 20 (10), 555- 572.
- Matson, D. R. and Stukenberg, P. T. (2011) "Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways", ***Molecular Interventions***, 11, 141- 150.
- Matsuda, H., Shimoda, H., Morikawa, T., and Yoshikawa, M. (2001) "Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity", ***Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters***, 11 (14), 1839- 1842.
- McPhee, S. J. and Papadakis, M. A. (2010) "Güncel Tıbbi Tanı ve Tedavi", ed. Müftüoğlu, E., ***Nobel Tıp Kitapevleri***, Adana, 1465- 1485.
- Meisel, J. L., Zhao, J., Suo, A., Zhang, C., Wei, Z., Taylor, C., Aneja, R., Krishnamurti, A., Li, Z., Nahta, R., O'Regan, R. and Li, X. (2020) "Clinicopathologic factors associated with response to neoadjuvant anti-HER2-directed chemotherapy in HER2-positive breast cancer", ***Clinical Breast Cancer***, 20 (1), 19- 24.
- Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Radovic J., Miljkovic Dj., Kaludjerovic, Sabo, T. J. and Trajkovic V. (2005) "Aloe emodin decreases the ERK- dependent anticancer activity of cisplatin", ***Cell Mol Life Sci, Cellular and Molecular Life Sciences CMLS***, 62 (11), 1275- 1282.
- Milross, C. G., Mason, K. A., Hunter, N. R., Chung, W. K., Peters, L. J. and Milas, L. (1996) "Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel", ***JNCI: Journal of the National Cancer Institute***, 88 (18), 1308- 1314.
- Min, H., Niu, M., Zhang, W., Yan, J., Li, J., Tan, X., Li, B., Su, M., Di, B. and Yan, F. (2017) "Emodin reverses leukemia multidrug resistance by competitive inhibition and downregulation of P-glycoprotein", ***PLoS One***, 12 (11), e0187971.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. and Reed, J. C. (1994) "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*", ***Oncogene***, 9 (6), 1799- 1805.
- Mortezaee, K., Salehi, E., Mirtavoos-mahyari, H., Motevaseli, E., Najafi, M., Farhood, B., Sahebkar, A. (2019) "Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy", ***Journal Of Cellular Physiology***, 234 (8), 12537- 12550.

- Mossman, T. (1983) "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", ***Journal of Immunological Methods***, 65 (1-2), 55- 63.
- Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E., Burns, K., Fadel, M. P., Lozyk, M., Goping, S., Opas, M., Bleackly, R.C., Green, D.R. and Michalak, M. (2000) "Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis", ***The Journal of Cell Biology***, 150 (4), 731- 740.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. and Snader, K.M. (2003) "Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002", ***Journal of Natural Products***, 66, 1022- 1037.
- Nicolai, S., Rossi, A., Di Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M. and Raschella, G. (2015) "DNA repair and aging: the impact of the p53 family", ***Aging***, 7 (12), 1050- 1065.
- Oesterreich, S. and Fuqua, S. A. W. (1999) "Tumor suppressor genes in breast cancer", ***Endocrine-Related Cancer***, 6, 405- 419.
- Öktem, S., Özhan, M. H. ve Özol, D. (2001) "Apoptozisin önemi", ***Toraks Dergisi***, 2 (1), 91- 95.
- Özdoğan, M. "Türkiye kanser istatistikleri", <https://www.drozdogan.com/turkiye-kanser-istatistikleri-2020/> Son erişim tarihi: 22.07.2022
- Özdoğan, M. "Karsinogenez nedir, normal bir hücre nasıl kansere dönüşür", <https://www.drozdogan.com/karsinogenez-nedir-normal-bir-hucre-nasil-kansere-donusur/>, Son erişim tarihi: 22.07.2022
- Özenver, N., Saeed, M., Demirezer, L. Ö. and Efferth, T. (2018) "Aloe-emodin as drug candidate for cancer therapy", ***Oncotarget Advance Publications***, 9 (25), 17770- 17796.
- Panchagnula, R. (1998) "Pharmaceutical Aspects of Paclitaxel", ***International Journal of Pharmaceutics***, 172, 1- 15.
- Pecere, T., Gazzola, M.V., Mucignat, C., Parolin, C., Vecchia, F. D., Cavaggioni, A., Basso, G., Diaspro, A., Salvato, B., Carli, M. and Palu, G. (2000) "Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors", ***Cancer Research***, 60 (11), 2800- 2804.
- Pecere, T., Sarinella, F., Salata, C., Gatto, B., Bet, A., Dalla Vecchia, F., Diaspro, A., Carli, M., Palumbo, M. and Palu, G. (2003) "Involvement of p53 in spesific anti-neuroectodermal tumor activity of aloe-emodin", ***International Journal of Cancer***, 106 (6), 836- 847
- Pegram, M. D., Pauletti, G. and Slamon, D. J. (1998) "HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy", ***Breast Cancer Research and Treatment***, 52, 1-3, 65-77.

- Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument, B. H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P. and Massague, J. (1994) "Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals", *Cell*, 78, 59.
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X. and Perou, C. M. (2010) "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer", *Breast Cancer Research*, 12 (5), 1- 18.
- Provenzano, E., Ulaner, G. and Chin, S. F. (2018) "Molecular classification of breast cancer", *PET Clinics*, 13 (3), 325- 338.
- Pushkarev, V. M., Starenki, D. V., Saenko, V. A., Yamashita, S., Kovzun, O. I., Popadiuk, I. D., Pushkarev, V. V. and Tronko, M. D. (2009) "Effects of low and high concentrations of antitumour drug taxol in anaplastic thyroid cancer cells", *Experimental Oncology*, 31 (1), 16- 21.
- Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M. and Bredesen, D. E. (2001) "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation", *Journal of Biological Chemistry*, 276 (36) 33869- 33874.
- Reis-Filho, J. S. and Pusztai, L. (2011) "Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction", *The Lancet*, 378 (9805), 1812- 1823.
- Rodriguez Bigas, M. A., Stoler, D. L., Bertario, L., Anderson, R. G. and Baba, S. (2000) "Colorectal cancer: How does it start? How does it metastasize?", *Surgical Oncology Clinics of North America*, 9 (4), 643- 652.
- Sankari, S. L., Masthan, K. M. K., Babu, N. A., Bhattacharjee, T. and Elumalai, M. (2012) "Apoptosis in cancer-an update", *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention*, 13(10), 4873-4878.
- Schneider, B. P., Winer, E. P., Foulkes, W. D., Garber, J., Perou, C. M., Richardson, A., Sledge, G. W. and Carey, L. A. (2008) "Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets", *Clinical Cancer Research*, 14 (24), 8010- 8018.
- Seigler, D.S. (2012) "Plant secondary metabolism", *New York: Springer*.
- Senderowicz, A. M. (2000) "Small molecule modulators of cyclin-dependent kinases for cancer therapy", *Oncogene*, 19 (56), 6600- 6606.
- Sherr, C. J. (1996) "Cancer cell cycles", *Science*, 274 (5293), 1672- 1677.
- Shi, Y., Glynn, J. M., Guilbert, L. J., Cotter, T. G., Bissonnette, R. P. and Green, D. R. (1992) "Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas", *Science*, 257 (5067), 212- 214.

- Shrimali, D., Shanmugam, M. K., Kumar, A. P., Zhang, J., Tan, B. K., Ahn, K. S. and Sethi, G. (2013) "Targeted abrogation of diverse signal transduction cascades by emodin for the treatment of inflammatory disorders and cancer", **Cancer Letters**, 341, 139- 149.
- Siegel, R. L., Jakubowski, C. D., Fedewa, S. A., Davis, A., and Azad, N. S. (2020) "Colorectal cancer in the young: epidemiology, prevention, management", **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, 40, 75- 88.
- Singla, A. K., Garg, A. and Aggarwal, D. (2001) "Paclitaxel and its formulations", **International Journal of Pharmaceutics**, 235, 179- 192.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. and Norton, L. (2001) "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2", **New England Journal of Medicine**, 344 (11), 783- 792.
- Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H. and de Jong, S. (2004) "Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors", **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 52 (6), 821- 831.
- Srinivas, G., Anto R. J., Srinivas P., Vidhyalakshmi S., Senan V. P. and Karunakaran D. (2003) "Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly (ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9", **European Journal of Pharmacology**, 473, 117- 125.
- Su, Y. J., Tsai, M. S., Kuo, Y. H., Chiu, Y. F., Cheng, C. M., Lin, S. T. and Lin, Y. W. (2010) "Role of Rad51 down-regulation and extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 inactivation in emodin and mitomycin C-induced synergistic cytotoxicity in human non-small-cell lung cancer cells", **Molecular Pharmacology**, 77 (4), 633- 643.
- Suboj P., Babykutty S., Gopi D. R. V., Nair R. S., Srinivas P. and Gopala S. (2012) "Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF- $\kappa$ B", **European Journal of Pharmaceutical Science**, 45 (5), 581- 591.
- Sudhakar, A. (2009) "History of cancer, ancient and modern treatment methods", **Journal of Cancer Science and Therapy**, 1 (2), 1- 4.
- Sung, B., Prasad, S., Yadav, V. R. and Aggarwal, B. B. (2012) "Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals", **Nutrition and Cancer**, 64, 173- 197.

- Süder, İ., Kuzucu, H. O., Garipcan, A. ve Özören, N. (2018) “Kanserde apoptoza direnç mekanizmaları” Baran, Y., Kiraz, Y., ve Ulu, G.T. (Eds.), “Kanser Moleküler Biyolojisi”, 1. baskı, *Kısayol Yayıncılık*, Ankara, 45-61.
- Şeker Karatoprak, G., Küpeli Akkol, E., Yücel, Ç., Bahadır Acıkara, Ö., and Sobarzo-Sánchez, E. (2022) “Advances in understanding the role of aloe-emodin and targeted drug delivery systems in cancer”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
- Tekin, A., Kaya, E. ve Yazıcı, S. (2012) “Kanserle ilgili alternatif tıp içerikli web sitelerinin içerik analizi”, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 4 (6), 14- 34.
- Tripathy, A. and Pradhan, R. K. (2020) “The Cancer Principle-I: Introducing cancer as a fundamental principle of nature”, *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 11 (6), 1- 5.
- Trybus, W., Król, G., Trybus, E., Stachurska, A., Kopacz- Bednarska, A. and Król, T. (2017) “Aloe-Emodin influence on the lysosomal compartment of Hela cells”, *Asian Pacific Journal of Cancer Preview*, 18 (12), 3273- 3279.
- Tseng, H. S., Wang, Y. F., Tzeng, Y. M., Chen, D. R., Liao, Y. F., Chiu, H. Y. and Hsieh, W. T. (2017) “Aloe-emodin enhances tamoxifen cytotoxicity by suppressing ras/ERK and PI3K/mTOR in breast cancer cells”, *American Journal of Chinese Medicine*, 45, 337- 350.
- Tuncer, S. (2014) “Çoklu ilaca dirençli kanser hücre hattına nanopartiküllerle ilaç aktarımı”, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Ulukaya, E. (2003) “Apoptozis ders notları”. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı*, 15- 26.
- Ulukaya, E., Acilan, C. and Yılmaz, Y. (2011), “Apoptosis: why and how does it occur in biology?”, *Cell Biochemistry and Function*, 29 (6), 468- 480.
- Venkitaraman, A. R. (2002) “Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2”, *Cell*, 108 (2), 171- 182.
- Vikhanskaya, F., Vignati, S., Beccaglia, P., Ottoboni, C., Russo, P., D’Incalci, M. and Brogini, M. (1998) “Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis”, *Experimental Cell Research*, 241 (1), 96- 101.
- Wang, T. H., Wang, H. S. and Soong, Y. K. (2000) “Paclitaxel-induced cell death: Where the cell cycle and apoptosis come together”, *Cancer*, 88(11):2619- 2628.
- Wang, H. W., Chen, T. L., Yang, P. C. and Ueng, T. H. (2001) “Induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by emodin in human lung adenocarcinoma cell line CL5”, *Drug Metabolism and Disposition*, 29 (9), 1229- 1235.

- Wang, X., Li, L., Guan, R., Zhu, D., Song, N. and Shen, L. (2017), “Emodin inhibits ATP-induced proliferation and migration by suppressing P2Y receptors in human lung adenocarcinoma cells”, *Cellular Physiology Biochemistry*, 44, 1337- 1351.
- Wang, S., Yan, W. W., He, M., Wei, D., Long, Z. J. and Tao, Y. M. (2020) “Aloe-emodin inhibits telomerase activity in breast cancer cells: transcriptional and enzymological mechanism”, *Pharmacology Reports*, 72 (5),1383- 1396.
- Way, T., Huang, J., Chou, C., Huang, C., Yang, M. and Ho, C. (2014) “Emodin represses TWIST1-induced epithelial–mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the b-catenin and Akt pathways”, *European Journal of Cancer*, 50, 366- 378.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E. and Kluck, R. M. (2011) “Molecular biology of Bax and Bak activation and action”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4), 521-531.
- Whibley, C., Pharoah, P. D. and Hollstein, M. (2009) “p53 polymorphisms: cancer implications”, *Nature Reviews Cancer*, 9 (2), 95- 107.
- WHO (World Health Organization). “Cancer” <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Son erişim tarihi: 15.06.2022.
- Wong, R. S. (2011) “Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment”, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30 (1), 1- 14.
- Xie, M., Ma, Y., Miao, L., Wang, Y., Wang, H., Xing, Y., Xi, T. and Lu, Y. (2014) “Emodin-provoked oxidative stress induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through a p53-mitochondrial apoptotic pathway”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (13), 5201- 5205.
- Xu, D. C., Arthurton, L. and Baena-Lopez, L. A. (2018) “Learning on the fly: the interplay between caspases and cancer”, *Biomed Research International*, 2018.
- Xue, H., Chen, Y., Cai, X., Zhao, L., He, A., Guo, K. and Zheng, X. (2013) “The combined effect of survivin-targeted shRNA and emodin on the proliferation and invasion of ovarian cancer cells”, *Wolters Kluwer Health Anti-Cancer Drugs*, 24, 937- 944.
- Yager, J. D. and Davidson, N. E. (2006). “Estrogen carcinogenesis in breast cancer”, *New England Journal of Medicine*, 354 (3), 270- 282.
- Yaoxian, W., Hui, Y., Yunyan, Z., Yanqin, L., Xin, G. and Xiaoke, W. (2013) “Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway”, *Cancer Cell International*, 16 (13), 1- 8.
- Yan, Y., Su, X., Liang, Y., Zhang, J., Shi, C., Lu, Y., Gu, L. and Fu, L. (2008) “Emodin azide methyl anthraquinone derivative triggers mitochondrial-dependent cell

- apoptosis involving in caspase-8-mediated Bid cleavage”, *Molecular Cancer Therapeutics*, 7 (6), 1688- 1697.
- Yeh, F. T., Wu, C. H. and Lee, H. Z. (2003) “Signaling pathway for aloe-emodin-induced apoptosis in human H460 lung nonsmall carcinoma cell”, *International Journal of Cancer*, 106 (1), 26-33
- Yılmaz, E. ve Altunok, V. (2011) “Kanser ve p53 geni”, *Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1, 19- 23.
- Yokota, J. and Kohno, T. (2004) “Molecular footprints of human lung cancer progression”, *Cancer Science*, 95 (3), 197- 204.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2001) “PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells”, *Molecular Cell*, 7 (3), 673- 682.
- Yu, J., Bao, W. and Lei, J. (2013) “Emodin regulates apoptotic pathway in human liver cancer cells”, *Phytotherapy Research*, 27, 251- 257.
- Zhang, L., Lau, Y. K., Xia, W., Hortobagyi, G. N. and Hung, M. C. (1999) “Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel”, *Clinical Cancer Research*, 5(2), 343-353.
- Zhang, X. D., Gillespie, S. K., Hersey, P. (2004) “Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and-independent apoptotic pathways”, *Molecular Cancer Therapeutics*, 3 (2), 187- 197.
- Zhang, H., Dutta, P., Liu, J., Sabri, N., Song, Y., Li, W. X., and Li, J. (2019) “Tumour cell-intrinsic CTLA4 regulates PD-L1 expression in non-small cell lung cancer”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(1), 535- 542.
- Ziegler, U. and Groscurth, P. (2004) “Morphological features of cell death”, *Physiology*, 19 (3), 124- 128.

## EKLER

### Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

- Atıcı, T.**, Altun Çolak, D., Ersöz, Ç. (2018). “Protective effects of *Berberis crataegina* DC. (Ranunculales: Berberidaceae) extract on Bleomycin-induced toxicity in fruit flies (Diptera: Drosophilidae)” *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 77 (4), 1- 8.
- Atıcı, T.**, Altun Çolak, D. (2019). “Investigation Healing Effects of Isgın and Dandelion against of Doxorubicin-Induced Toxicity in *D. melanogaster*.” *Journal of Applied Biological Sciences*, 13 (2), 39- 42.
- Atıcı, T.**, Altun Çolak, D., Çolak, S., Ersöz, Ç., Geyikoğlu, F., Altay, A., Koç, K., Çeriğ, S. (2020). “İnsan glioblastoma hücre hattında Cimin üzümünün antioksidan ve anti-proliferatif etkilerinin incelenmesi.”, *XI. MAS European International Congress On Mathematics-Engineering-Natural & Medical Sciences*, Tokat-TURKEY, pp. 254- 266.