



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

**SİKLOTRİFOSFAZEN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN KOLON KANSERİ
HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HANİFE ÇAKAL

HAZİRAN

HANİFE ÇAKAL

BİYOTEKNOLOJİ

HAZİRAN 2025

**SİKLOTRİFOSFAZEN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN KOLON KANSERİ
HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hanife ÇAKAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2025

Yüksek Lisans Tezi Kabul ve Onay Sayfası

Hanife ÇAKAL tarafından hazırlanan “Siklotrifosfazen Türevi Bileşiklerin Kolon Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotik Aktivitelerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan: Doç. Dr. Elif ŞENKUYTU

Kimya Anabilim Dalı, Atatürk Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Burak YAZGAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 13/06/2025

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hanife ÇAKAL

13.06.2025

SİKLOTRİFOSFAZEN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hanife ÇAKAL

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2025

ÖZET

Dünya genelinde insidans ve mortalite açısından kanser türleri arasında üçüncü sırada yer almakta olan Kolorektal Kanser (KRK) önemli bir sağlık sorunu olarak görülmektedir. Bu kanser türünün özellikle geç evrede tanı alması nedeniyle tedavi süreci zorlaşmaktadır. Günümüzde kozmetik ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan parabenlerin, kanser gelişimi üzerindeki etkileri daha fazla araştırılmaktadır. Fosfazenler, P-N iskeletine sahip, çeşitli organik gruplarla kolaylıkla fonksiyonelleştirilebilen ve yüksek biyouyumluluk ile antikanser potansiyel sergileyen bileşikler olarak, son yıllarda özellikle ilaç taşıyıcı sistemler ve hedefe yönelik tedavilerde dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalar bu yapıların kolorektal ve meme kanseri hücre hatlarında anlamlı sitotoksik ve apoptotik etkiler gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, anilin türevi siklotrifosfazen ve anilin-paraben türevi siklotrifosfazen bileşiklerinin Caco-2 (insan kolon adenokarsinoma) ve CCD-18Co (normal kolon fibroblast) hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri, MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür) analizi ile, apoptotik mekanizmaların moleküler belirteçleri olan BAX, BCL-2 ve KASPAZ-3 genlerinin mRNA düzeyleri ise qRT-PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile belirlenmiştir. Caco-2 hücre hattında doza bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı ve sitotoksik etkinin görüldüğü tespit edilmiştir. Bileşik-3 için 11.67 µM ve bileşik-5 için 16.62 µM aralığında IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. BAX ve KASPAZ-3 gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir artış, BCL-2 geninde ise anlamlı bir azalış olduğu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar, bileşiklerin kolon (Caco2) kanser hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik aktivite gösterdiği, hücre ölüm mekanizmaları üzerinde etkilerinin olabileceği ve potansiyel antikanser ajanlar olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Sayfa Adedi : 95

Anahtar Kelimeler : Paraben, Fosfazen, Kolon kanseri, Sitotoksikite, Apoptoz

Danışman : Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC ACTIVITIES OF
CYCLOTRIPHOSHAZENE DERIVATIVE COMPOUNDS ON COLON CANCER
CELLS

(M. Sc. Thesis)

Hanife ÇAKAL

AMASYA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2025

ABSTRACT

Colorectal Cancer (CRC), which ranks third among cancer types in terms of incidence and mortality worldwide, is seen as an important health problem. The treatment process of this cancer type becomes difficult due to its diagnosis, especially at a late stage. The effects of parabens, which are widely used in the cosmetics and food industry, on cancer development are being investigated more. Phosphazenes, which have a P–N skeleton, can be easily functionalized with various organic groups, and exhibit high biocompatibility and anticancer potential, have attracted attention in recent years, especially in drug delivery systems and targeted therapies. Studies have shown that these structures can exhibit significant cytotoxic and apoptotic effects in colorectal and breast cancer cell lines. In this study, it was aimed to investigate the cytotoxic and apoptotic effects of aniline-derived cyclotriphosphazene and aniline-paraben-derived cyclotriphosphazene compounds in Caco-2 (human colon adenocarcinoma) and CCD-18Co (normal colon fibroblast) cell lines. The effects of these compounds on cell viability were determined by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) analysis, and the mRNA levels of BAX, BCL-2 and KASPAZ-3 genes, which are molecular markers of apoptotic mechanisms, were determined by qRT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction). It was determined that cell viability decreased and cytotoxic effect was observed in the Caco-2 cell line depending on the dose. IC₅₀ values were calculated in the range of 11.67 µM for compound-3 and 16.62 µM for compound-5. It was observed that there was a significant increase in BAX and KASPAZ-3 gene expression levels and a significant decrease in BCL-2 gene. The results obtained suggest that the compounds exhibit cytotoxic and apoptotic activity in colon (Caco2) cancer cells, may have effects on cellular death mechanisms, and may be evaluated as potential anticancer agents.

Number of pages : 95

Keywords : Paraben, Phosphazene, Colon cancer, Cytotoxicity, Apoptosis

Supervisor : Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince her zaman bana destek olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak çalışmamı özenli bir şekilde yönlendiren tez danışman hocam Prof. Dr. Tuba YILDIRIM'a çok teşekkür ederim. Lisansüstü eğitimim süresince çalışmalarımın her aşamasında laboratuvar bilgilerini paylaşan Öğr. Gör. Dr. Seda MESCI'ye, tez çalışmasında kullandığım bileşikleri sentezleyen Doç. Dr. Elif ŞENKUYTU hocalarıma teşekkür ederim. Yüksek lisans ders dönemimde eğitime katkı sunan değerli hocalarım Prof. Dr. Arif AYAR'a, Doç. Dr. Burak YAZGAN'a, Doç. Dr. Ebru BATI AY'a ve Dr. Öğr. Üyesi Fadime SEYREKOĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması FMB-BAP 23-0589 Proje Numarası ile Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kanser.....	3
2.2. Kolon Kanseri	3
2.2.1.Kolon yapısı.....	3
2.2.2. Kolorektal kanser epidemiyolojisi.....	5
2.2.3.Kolon kanseri belirtileri ve risk faktörleri	9
2.2.4.Patofizyolojisi.....	9
2.2.4.1.Genetik ve epigenetik değişiklikler	9
2.2.4.2.Metabolik değişiklikler	12
2.2.5.Kolon kanseri biyobelirteçleri	13
2.2.6.Evreleme	14
2.2.7.Kolon kanseri tanı koyma yöntemleri	15
2.3.Kanser ve Apoptoz İlişkisi	16

2.3.1. Apoptoz sürecindeki morfolojik değişiklikler	17
2.3.2. Apoptozdaki biyokimyasal değişiklikler	17
2.3.3. Apoptoz mekanizmaları.....	18
2.3.4. Apoptoz gen regölasyonu	21
2.4. Parabenler ve Özellikler	23
2.5. Fosfazenler ve Özellikleri	25
3. MATERYAL VE METOT.....	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Deneyisel çalışmalarda kullanılan cihazlar	28
3.1.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler	30
3.1.3. Moleküler analizlerde kullanılan malzemeler	31
3.1.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan çözeltiler.....	31
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Sentezlenen bileşikler	32
3.2.2. Hücre kültürü	34
3.2.2.1. Hücrelerin açılması	35
3.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması.....	36
3.2.2.3. Hücrelerin dondurulması	37
3.2.3. MTT analizi	38
3.2.3.1. MTT yöntemi	38
3.2.3.2. Hücrelerin sayımı.....	39
3.2.3.3. Hücrelerin ekimi	40
3.2.3.4. Test bileşiklerinin hazırlanması	40
3.2.3.5. Bileşiklerin uygulanması	40

3.2.3.6. MTT boyasının hazırlanması ve pleytlere ekimi	41
3.2.4. MTT verilerinin istatistiksel analizi.....	42
3.2.5. Total RNA izolasyonu.....	43
3.2.6. cDNA (Komplementer DNA) sentezi.....	45
3.2.7. Gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR).....	46
4. BULGULAR.....	49
4.1. Bileşiklerin Analizleri	49
4.2. Sitotoksik Aktivite (MTT analizi)	55
4.4.1. MTT analizi istatistik sonuçları	60
4.3. qRT-PCR ANALİZİ	60
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	65
KAYNAKLAR.....	80
ÖZGEÇMİŞ	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Apoptoz nekroz karşılaştırma	16
Çizelge 3.1. Deneysel çalışmada kullanılan cihazlar	28
Çizelge 3.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar ve kullanım alanları.....	30
Çizelge 3.3. Moleküler analizlerde kullanılan malzemeler	31
Çizelge 3.4. Hücre kültüründe kullanılan besiyerleri ve serumlar.....	35
Çizelge 3.5. cDNA sentez programı	45
Çizelge 3.6. qRT-PCR protokolü.....	46
Çizelge 3.7. Primer dizileri, aksesyon numaraları ve primer uzunlukları	47
Çizelge 3.8. qRT-PCR amplifikasyon programı.....	47
Çizelge 4.1. Bileşik-3'ün CaCo-2 hücre hattında MTT sonuçları	56
Çizelge 4.2. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında MTT sonuçları	57
Çizelge 4.3. Bileşik-5'in CaCo-2 hücre hattında MTT sonuçları	58
Çizelge 4.4. Bileşik-5'in CCD-18Co hücre hattında MTT sonuçları	59
Çizelge 4.5. RNA miktarları (ng/μL) ve 260/280 oranları (nm)	61
Çizelge 4.6. BAX/BCL-2 oranı	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kolon ve rektum anatomisi (Tıp Akademi, 2018).....	4
Şekil 2.2. Cinsiyete göre küresel kolorektal kanser sıklığı (GLOBOCAN, 2022).	6
Şekil 2.3. Türkiye kanser istatistiği (GLOBOCAN,2022).....	7
Şekil 2.4. Türkiye kanser mortalite oranları (GLOBOCAN,2022)	8
Şekil 2.5.Kolon kanseri evreleri (Özdoğan, 2024).	15
Şekil 2.6. Apoptoz içsel yol	19
Şekil 2.7. Apoptoz dışsal yol	20
Şekil 3.1.Hücrelerin pasajlanması (Biorender).....	37
Şekil 4.1. Bileşik-3'ün kütle spektrumu	49
Şekil 4.2.Bileşik-3'ün proton ile eşleşmemiş 31P NMR spektrumu	50
Şekil 4.3. Bileşik-3'ün proton ile eşleşmiş 31P NMR spektrumu	51
Şekil 4.4.Bileşik-3'ün fosfor ile eşleşmiş 1H NMR spektrumu	52
Şekil 4.5. Bileşik-5'in kütle spektrumu	53
Şekil 4.6.Bileşik-5'in proton ile eşleşmemiş 31P NMR spektrumu	53
Şekil 4.7. Bileşik-5'in proton ile eşleşmiş 31P NMR spektrumu.....	54
Şekil 4.8.Bileşik-5'ün fosfor ile eşleşmiş 1H NMR spektrumu	55
Şekil 4.9.Bileşik-3'ün CaCo-2 hücre hattında % canlılık aktiviteleri	56
Şekil 4.10. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında % canlılık aktiviteleri.....	57
Şekil 4.11. Bileşik-5'in CaCo-2 hücre hattında % canlılık aktiviteleri	59
Şekil 4.12. Bileşik-5'in CCD-18Co hücre hattında % canlılık aktiviteleri.....	60
Şekil 4.13.Bileşik-3 ve bileşik 5'in CaCo-2 hücre hattında BAX gen ifadesi.....	61
Şekil 4.14. Bileşik-3 ve bileşik-5'in CaCo-2 hücre hattında BCL-2 gen ifadesi.....	62

Şekil 4.15.Bileşik-3 ve bileşik-5'in CaCo-2 hücre hattında KASPAZ-3 gen ifadesi.....	62
Şekil 4.16. Bileşik-3 ve bileşik-5'in CaCo-2 hücrelerinde BAX/BCL-2 gen ifadesi.....	63
Şekil 4.17. CaCo-2 hücresinde BAX, BCL-2, KASPAZ-3 ve B-Aktin erime eğrileri....	64



RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Bileşik-3'ün sentez şeması	32
Resim 3.2. Bileşik-5'in sentez şeması	33
Resim 3.3. Çalışmada kullanılan hücre hatları görüntüsü	35
Resim 3.4.Thoma lamında sayım işlemi.....	39
Resim 3.5 MTT yöntemi için hücre ekimi.....	40
Resim 3.6.Bileşikler uygulandıktan sonra pleytlerin kontrolü	41
Resim 3.7.MTT boyası eklenmiş pleytler.....	42
Resim 3.8.DMSO eklenmiş pleytler	42
Resim 3.9.RNA izolasyonu için hücre ekimi ve sonrası hücrelerin izolasyonu.....	43
Resim 3.10. İzolasyon sonrası RNA stokları	44
Resim 3.11. cDNA sentezi sonucunda elde edilen cDNA stokları.....	45
Resim 3.12.qRT-PCR çalışması	46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, yanda açıklamaları verilmek üzere aşağıda listelenmiştir.

Simgeler

Açıklama

°C	Santigrat derece
%	Yüzde
g	Gram
IU	İnternational unit
mg	Miligram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
rpm	Dakikadaki devir sayısı
mm	Milimetre

Kısaltmalar

Açıklama

DLD-1	İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
CaCo-2	İnsan kolorektal adenokarsinom hücre hattı
IC ₅₀	%50 İnhibitör konsantrasyonu
CCD-18Co	Kolon fibrablast epitel hücre hattı

PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su
C6	Sıçan beyin glioma
pH	Hidrojen iyon konsantrasyonu
KRK	Kolorektal kanser
MCF-7	Meme adenokarsinomu
Hep2	Epidermoid larenks kanseri
CEA	Karsinoembriyonik antigen
FADD	Fas ile ilişkili ölüm alanı
APC	Adematöz polipoz koli
KRAS	Kirsten rat sarkoma viral onkogen
	Homologu
MSI	Mikrosatelit karasızlığı
TME	Tümör mikroçevresi
TNF- α	Tümör nekroz faktörü-alfa
IL-6	İnterlökin-6
HDM	Hücre dışı matriks
PD-1	Programlı hücre ölüm proteini 1
CA19-9	Karbohidrat antijen 19-9
TNM	Tümör-nodu-metastazı
GLOBOCAN	Küresel kanser özlemevi
HT-29	İnsan kolon adenokarsinomu
HeLa	Rahim ağzı kanseri
FBS	Fetal sığır serumu
qRT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

1.GİRİŞ

Kanser, vücutta hücrelerin anormal şekilde çoğalıp kontrolsüz bir biçimde yayılmasıyla karakterize edilen karmaşık ve çok yönlü bir hastalık grubudur. Son yıllarda dünya genelinde kanser vakalarında gözlemlenen hızlı artış, bu hastalığın daha iyi anlaşılmasını ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. 2020 yılında dünya çapında yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyonun üzerinde kanser kaynaklı ölüm rapor edilmiştir. Bu sayıların 2040 yılı itibarıyla sırasıyla 28 milyon ve 16,4 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Bu çarpıcı artış, kansere yönelik küresel çabaların daha sistematik ve yenilikçi olması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Kolon kanseri, özellikle sanayileşmiş ülkelerde görülme sıklığı artan ve genetik yatkınlık, yaşam tarzı faktörleri, beslenme alışkanlıkları ve çevresel etkenler nedeniyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Dünya genelinde en sık karşılaşılan üçüncü kanser türüdür. Kolorektal kanser (KRK) hem insidans hem de mortalite açısından önemli bir sağlık sorunu olup, erkeklerde üçüncü, kadınlarda ise ikinci en sık görülen kanser türü olduğu görülmektedir. Erken evrede genellikle asemptomatik seyreden bu kanser türü, ilerledikçe tedavi süreci daha karmaşık hâle gelmektedir.

Kolon kanserinin tedavisinde cerrahi müdahaleler birincil seçenek olmakla birlikte, ileri evrelerde kemoterapi ve radyoterapi gibi adjuvan tedavi yaklaşımları devreye girmektedir. Ancak günümüzde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlar çoğu zaman ciddi sistemik toksisiteye, yüksek maliyetlere ve tedaviye karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. Bu durum, mevcut tedavi protokollerinin yetersiz kaldığını ve daha seçici, hedefe yönelik, toksik etkileri azaltılmış yeni ajanlara olan ihtiyacı göstermektedir. Bu bağlamda programlanmış hücre ölümü (apoptoz) mekanizmalarının, özellikle de hücre yaşamı ile ölümü arasındaki dengeyi sağlayan moleküler yolların anlaşılması büyük önem arz etmektedir.

Parabenler, mikrobiyal kontaminasyonu önleme yetenekleri nedeniyle gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde yaygın biçimde kullanılan koruyucu maddelerdir. Metilparaben, propilparaben ve bütilparaben en yaygın formlarıdır. Ancak bu bileşiklerin çevrede birikmesi ve biyolojik sistemlerde potansiyel toksik etkilere yol açması, sağlık açısından kaygıları artırmaktadır.

Fosfazen bileşikleri ise fosfor ve azot atomları içeren hibrit yapıları sayesinde dikkat çeken, fiziksel ve kimyasal olarak kolayca modifiye edilebilen organofosfor bileşikleridir. Bu moleküller, ilaç taşıma sistemlerinden antitümör ajanlara kadar geniş bir biyolojik uygulama yelpazesi sunmaktadır. Literatürde, özellikle amino asit, antibiyotik veya paraben türevlerinin fosfazen omurgasına bağlanmasıyla biyolojik etkilerin arttığına yönelik bulgular yer almakla birlikte, bu etkilerin moleküler mekanizmaları hâlâ yeterince aydınlatılamamıştır.

Mevcut kolon kanseri tedavi yöntemleri, ciddi sistemik yan etkiler ve sınırlı hedeflenebilirlik gibi nedenlerle yeterince etkili olamamaktadır. Literatürde fosfazen bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili bazı çalışmalar bulunsa da özellikle siklotrifosfazen türevi bileşiklerinin kolon kanseri üzerindeki etkileri kapsamlı biçimde araştırılmamıştır. Bu bağlamda, sitotoksik ve apoptotik özelliklere sahip yeni ilaç adayı bileşiklerin sentezlenmesi, karakterize edilmesi ve sinyal yolları ile ilişkili moleküler mekanizmaların aydınlatılması ile ilgili çalışmalar önemli bir alan oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, siklotrifosfazen türevi bileşiklerinin kolon kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Özellikle insan kolon adenokarsinom (CaCO-2) ve normal insan kolon fibroblast (CCD-18Co) hücre hatları kullanılarak, sitotoksik ve apoptotik aktivite ile ilgili analizler gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Apoptozla ilişkili (BAX, BCL-2 ve KASPAZ-3) genlerin ekspresyon düzeyleri ise gerçek zamanlı PZR tekniğiyle belirlenmiştir.

KRK ile ilişkili hücresel ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması, yalnızca hastalığın tanı ve prognozu açısından değil, aynı zamanda hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi bakımından da önemlidir. Son yıllarda paraben gibi yaygın çevresel kimyasalların kanser üzerindeki olası etkileri tartışma konusu olmuş ve bu maddelerin endokrin bozucu özelliklerinin olduğu görülmüştür. Fosfazenlerin ise ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmasıyla birlikte, biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri taşıması nedeniyle araştırmalara konu olmaktadır. Bu çalışmanın söz konusu bileşiklerin hücresel apoptoz üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde incelenerek literatürdeki önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Kolon, gastrointestinal sistemin son kısmında yer alan, su ve elektrolit emilimi gibi temel işlevleri olan bir organdır. Kolorektal kanser; kolon dokusunda hücrel mutasyonlar, inflamasyon, genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle gelişen, yayılım ve ölüm oranı yüksek ciddi bir malignitedir.

2.1.Kanser

Kanser, vücuttaki hücrelerin normal büyüme ve bölünme döngülerinden saparak kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla karakterize edilen, karmaşık ve heterojen bir hastalık grubudur. Vücudun herhangi bir bölümünü veya organını etkileyebilen büyük bir hastalık olan kanser hücrelerinin büyümesi, yayılması, doku bozulması ve vücudun normal hücrelerini etkileyip vücut fonksiyonlarını bozarak sonuçta ağrıya, organ yetmezliklerine ve kaşeksi gibi kanserle ilişkili sendromlara neden olmaktadır (Brown ve diğerleri,2023).

Kanser, 21. yüzyılda büyük bir sağlık ve ekonomik problem haline gelmiştir. GLOBOCAN 2022 verilerine göre dünyada her altı ölümden biri (%16,8) kanserden kaynaklanırken, bulaşıcı olmayan hastalıklar nedeniyle gerçekleşen her dört ölümden biri (%22,8) de kanserle ilgilidir (GLOBACAN,2022).

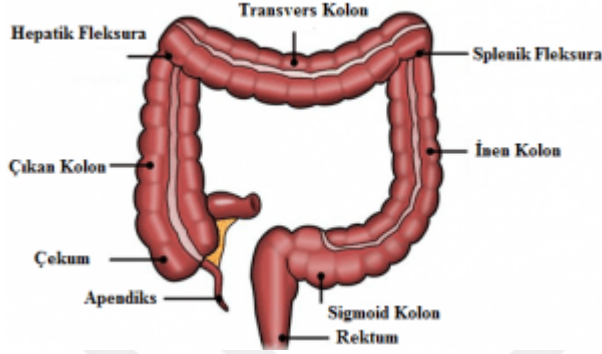
2.2. Kolon Kanseri

Kolon kanseri, genellikle kolon mukozasında başlayan ve zamanla çevre dokulara yayılan malign bir hastalıktır. Erken evrede belirti vermemesi nedeniyle sıklıkla geç teşhis edilir ve dünya genelinde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir.

2.2.1.Kolon yapısı

Gastrointestinal sistemin son bölümü olan kalın bağırsak kolon olarak da isimlendirilir. İnce bağırsaktan daha kalın, 150 cm uzunluğunda bir tüp şeklindedir. Kalın bağırsak, kolon, rektum ve anal kanal olmak üzere üç bölümden oluşur. Kolon ise inen kolon, çıkan kolon, transvers kolon, sigmoid kolon ve çekum olmak üzere beş bölümdür. Çekum kalın

bağırsağın ilk ve en geniş bölümü olup anüse doğru gittikçe çapı küçülür (Tıp Akademisi, 2018) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Kolon ve rektum anatomisi (Tıp Akademisi, 2018).

Kalın bağırsağın görevi, ince bağırsaktan kalın bağırsağa geçen besin maddelerinden su, sodyum, vitamin ve minerallerin emilimini sağlar. Sonuç olarak sıvı olarak giren kimus, yarı-katı feçes şeklinde yoğunlaşır. En önemli salgısı mukustur, yüzeyi kayganlaştırarak intestinal içeriğin ilerlemesini sağlar ve vücuttan uzaklaştırır. Ayrıca bazı hormonlar da kalın bağırsaktan salgılanır (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kalın bağırsak mukozal katman, submukozal katman, kas tabakası ve seröz katman olmak üzere dört ana katmandan oluşur. Mukozal katman yapısında villus bulunmaz, yüzey düz bir şekildedir. Tek katlı prizmatik çizgili kenarlı epitel absorptif hücreler bulunur. Yüzey epitel hücreleri su ve elektrolit emiliminde görev alır. Kolonik epitel mukus salgılayan goblet hücreleri bakımından zengindir. Goblet hücreleri, bağırsak iç yüzeyini koruyan ve dışının hareketini kolaylaştıran mukus üretir. Yapısında bulunan enterositler besin maddelerinin emilmesini sağlar. Mukozal katmandaki lamina propria, epitelin altında bulunan bağ dokusu, kan damarları, lenfatikler ve bağışıklık hücrelerini içerir. Aynı zamanda plazma hücreleri ve lenfosit gibi savunma hücreleri bulunur. Mukozal katmanın diğer bir yapısı bağırsak yüzeyindeki kıvrımların oluşumuna katkı sağlayarak mukozanın hareketini sağlayan muskularis mukozadır. Submukozal katman, mukozayı dış kaslardan ayıran bağ dokusudur. Yapısında kan damarları, lenfatikler ve meissner sinir pleksus bulunur. Kas tabakası, sindirim hareketlerini gerçekleştirir. Seröz tabaka, kalın bağırsağın dış kısmını örter ve seröz bir zar şeklinde bulunur (Taysı ve Köprücü, 2022).

Rektum, sigmoid kolondan anal kanala kadar uzanır ve kalın bir kas tabakasına sahiptir. Rektumun mukozası uzunlamasına anal sütunlar oluşturmak için kıvrılmıştır. Sindirim sisteminin son bölümü olup, dışkının depolandığı ve dışarı atılmadan önce son bir biçim aldığı alandır. Kalın bağırsağın sigmoid kolondan başlayarak, anüsle birleşen bu bölüm, sindirim sürecinin tamamlanmasının ardından atık maddelerin dışarı atılmasını sağlayan temel bir işlevi yerine getirir (Taysı ve köprücü,2022).

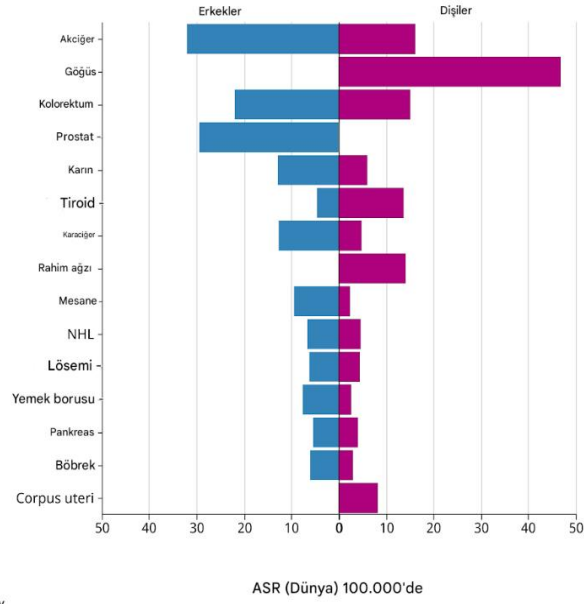
2.2.2. Kolorektal kanser epidemiyolojisi

Dünya genelinde kanser insidansı son verilere göre KRK tüm kanserler arasında görülme sıklığı bakımından üçüncü sırada yer almaktadır. Cinsiyete göre veriler incelendiğinde kadın ve erkekte görülme sıklığı ile üçüncü sıradadır (Şekil 2.2.). KRK, dünya çapında kanser mortalitesine büyük oranda etki eden bir hastalıktır. 2022 verilerine göre, KRK dünya genelindeki kanser ölümlerinin %9,3'ünü oluşturmaktadır. KRK yüksek ölüm oranları, genellikle geç evrelerde teşhis edilmesi ve bu kanser türünün insidansının giderek artması ile ilişkilidir (GLOBOCAN,2022).

KRK insidansı, coğrafi bölgelere göre büyük farklılıklar göstermektedir. Asya, en büyük vaka yükünü taşıırken, Avrupa ve Kuzey Amerika'daki yüksek insidans, gelişmiş sağlık hizmetlerinin, erken teşhis ve tarama programlarının yaygınlığından kaynaklanmaktadır. Afrika ve Okyanusya'da ise insidans daha düşük olup, bu bölgelerde kanser tarama programlarının sınırlı olması, erken teşhis oranlarını etkilemektedir (GLOBOCAN, 2022).

KRK insidansındaki bu bölgesel farklılıklar, bölgesel sağlık politikalarının, yaşam tarzı alışkanlıklarının ve genetik faktörlerin bir birleşimi olarak değerlendirilebilir. Erken teşhis ve yaşam tarzı değişikliklerinin yaygınlaştırılması, KRK insidansını ve mortalitesini azaltmada önemli rol oynamaktadır.

Yaş'a Göre Standardize Oran (Dünya) 100.000'de, İnsidans, Erkekler ve Kadınlar, 2022
Dünya
(En iyi 15 kanser bölgesi)



Kanser BUGÜN | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Veri sürümü: Globocan 2022 (sürüm 1.1)
© Tüm Hakları Saklıdır 2025

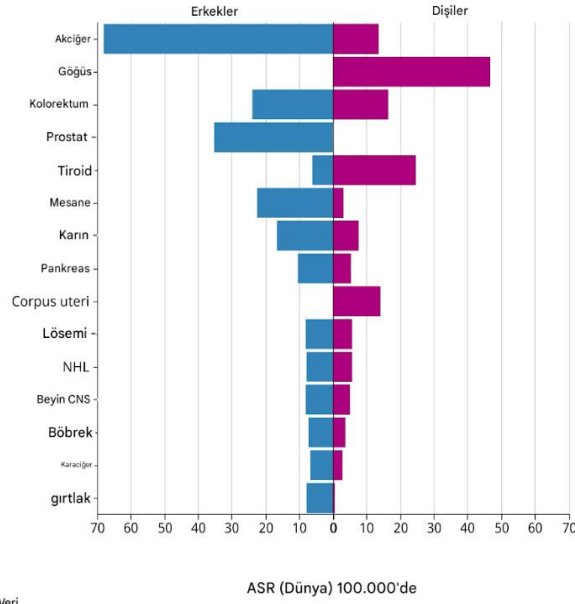
ASR (Dünya) 100.000'de

Uluslararası Kanser
Araştırma Ajansı
Dünya Sağlık Örgütü

Şekil 2.2. Cinsiyete göre küresel kolorektal kanser sıklığı (GLOBOCAN, 2022).

Türkiye’de KKK vakaları GLOBOCAN 2022 verilerine göre tüm kanser türleri arasında %9 oranla üçüncü sırada yer almaktadır. Erkeklerde kanser türleri arasında akciğer %24,9 ile ilk sırada yer alırken; KKK %8,8 oranla üçüncü sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise meme kanser %23,5 ilk sırada yer alırken KKK %9,3 oranla üçüncü sırada yer aldığı görülmektedir (GLOBOCAN,2022) (Şekil 2.3).

Yaş'a Göre Standardize Oran (Dünya) 100.000'de, İnsidans, Erkekler ve Kadınlar, 2022
Türkiye
(En iyi 15 kanser bölgesi)



Kanser BUGÜN | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today> Veri
sürümü: Globocan 2022 (sürüm 1.1)
© Tüm Hakları Saklıdır 2025

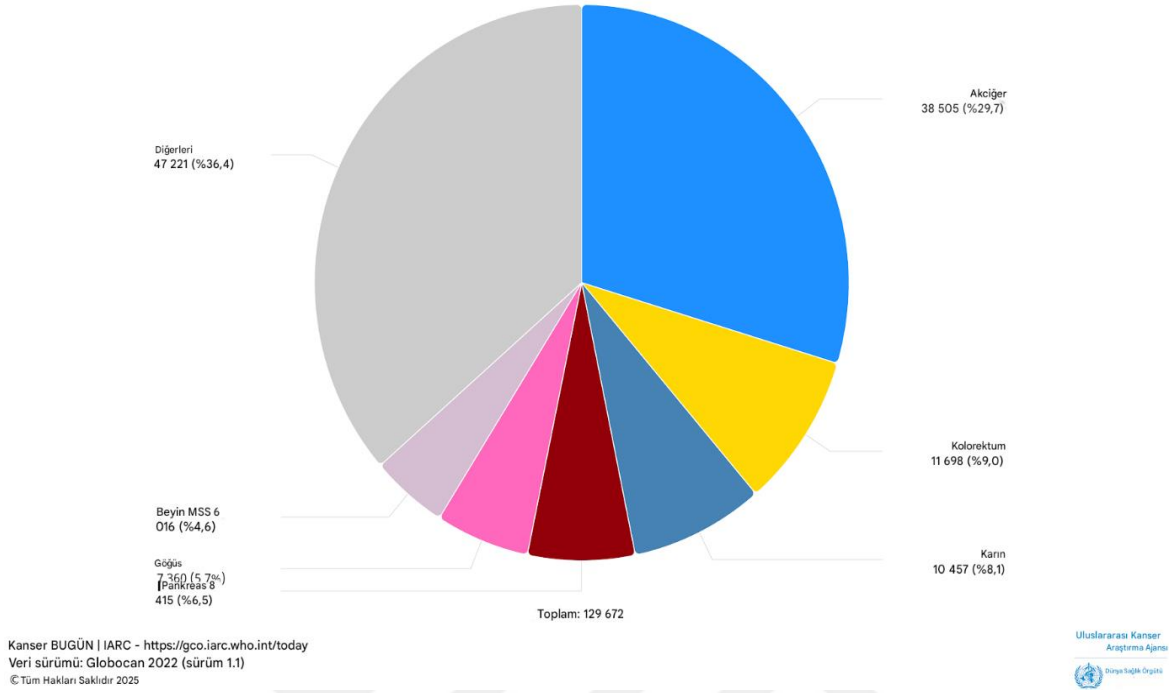
ASR (Dünya) 100.000'de

Uluslararası Kanser
Araştırma Ajansı
Dünya Sağlık Örgütü

Şekil 2.3. Türkiye kanser istatistiği (GLOBOCAN,2022)

Ülkemizde görülen kanser vakalarının mortalite oranları incelendiğinde %29,7 ile akciğer kanseri en çok mortalite oranı ile göze çarpmaktadır. KRK %9 mortalite oranı ile ikinci sırada yer almakta olduğu görülmektedir (GLOBOCAN,2022) (Şekil 2.4.).

Mutlak sayılar, Ölüm oranı, Her iki cinsiyet, 2022'de
Türkiye



Şekil 2.4. Türkiye kanser mortalite oranları (GLOBOCAN,2022)

Geçmiş yılların verileri incelendiğinde nüfus artış hızı da hesaba katılarak 2050 yılında dünyada kolon kanser vakalarının 2022 verilerine göre %90 oranında artış olacağı tahmin edilmektedir. Dünya genelindeki kolon kanseri hastası sayısındaki önemli artış, sağlık hizmetlerinin erişilebilirliğini, erken teşhis ve tedavi yöntemlerinin önemini artırmaktadır. Toplumda sağlıklı yaşam alışkanlıklarının yaygınlaştırılması ve kanser tarama programlarının etkinliğinin artırılması büyük bir gereklilik haline gelmektedir (GLOBOCAN,2022).

2022 yılında Türkiye’de 13 723 kolon kanseri hastası olduğu görülmekte ve nüfus oranı %0,016 olarak hesaplanmaktadır. 2050 yılı kanser vaka tahminleri yapıldığında nüfus artışında azalma olduğu fakat kolon kanser vakalarında ise yaklaşık iki katı artış olacağı tahmin edilmektedir. Yaşlı nüfusun artması, tarama testlerinin artmasıyla hastalığın daha fazla teşhis edilmesi ile beslenme ve hareketsiz yaşam tarzı gibi faktörler vaka sayılarının artışına neden olabilir (GLOBOCAN,2022).

2.2.3.Kolon kanseri belirtileri ve risk faktörleri

Belirtiler uzun süreli kabızlık, ishal, dışkıda kan veya mukus bulunması, karın ağrısı, kilo kaybı, yorgunluk ve halsizlik yer almaktadır. Kolon kanserinin kesin nedenleri tam olarak belirlenmiş değildir fakat bir bireyin hastalığa yakalanma olasılığını artırabilecek çok sayıda risk faktörü araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır (Rodrigo, Rafael ve Alejandro, 2022; Adelstein, Macaskill, Chan, Katelaris ve Irwig, 2011). Yaş faktörü; kanser 50 yaşından sonra büyük ölçüde artar, teşhislerin çoğunluğu yaş itibari ile büyük kişilerde görülür. Genetik faktör; yakın akrabalarda kanser varlığı riski artırmaktadır. Beslenme ve yaşam tarzı; kırmızı veya işlenmiş et ürünlerinin aşırı tüketimi, düşük lifli beslenme, yağ oranı yüksek besin tüketimi kolon kanser riskini artırmaktadır. Kolonda kronik inflamasyona neden olan Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıkları da risk faktörleri arasındadır. Obezite ve metabolik sendrom kanser gelişimini destekleyen hormonal ve inflamatuvar değişiklikler, hareketsiz yaşam, sigara ve alkol tüketimi de kolon kanser riskinin artmasına sebep olmaktadır (Yılmaz ve Emre, 2021; Ergül, Sarıkaya, Doğan ve Filik, 2013; Aydın ve diğerleri, 2015).

2.2.4.Patofizyolojisi

Kolon kanseri, genellikle kolon veya rektumda gelişen malignite olan adenomatöz poliplerden gelişir. Adenoma-karsinoma sırasındaki gelişim genetik mutasyonlar ve hücresel değişikliklerle başlar ve zamanla malign tümöre dönüşür. Polip dokusunun kansere dönüşme süreci yavaş bir şekilde ilerleyerek birkaç yıl sürebilir (Wolf ve diğerleri, 2018; Ateş, Sivri ve Kilickap, 2017).

Kolon kanseri gelişimi genellikle "adenoma-karsinoma sekansı" olarak bilinen bir süreçle açıklanır. Bu süreç, normal kolon epitel hücrelerinden başlayan bir dizi genetik ve moleküler değişiklik sonucu, kolonun iç yüzeyinde kanserli hücrelerin oluşmasına yol açar (Corley ve diğerleri, 2014; Gerçeker ve Baykan, 2022).

2.2.4.1.Genetik ve epigenetik değişiklikler

Kolon kanseri gelişimi genellikle anahtar onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik mutasyonlar tarafından başlatılır.

- Adenomatous Polypoz Coli (APC) Yol: APC geni, hücre yapışma ve sinyalizasyonda yer alan bir protein olan β -katenin'i düzenleyen kritik bir tümör baskılayıcısıdır. APC geninde mutasyonlar, çekirdekte β -katenin birikimine yol açarak, hücre çoğalma ve hayatta kalmayı yönlendiren genlerin transkripsiyonu teşvik etmektedir (Cariello ve diğerleri, 2022).
- Kirsten Rat Sarkoma Viral Oncogene Homolog (KRAS) Mutasyonları: KRAS mutasyonları kolon kanserlerinin yaklaşık %40'ında yaygındır. Bu mutasyonlar, RAS sinyal yolunun aktivasyonuna yol açarak hücre büyümesini ve bölünmesini teşvik eder (Yue ve diğerleri, 2015).
- TP53 Mutasyonlar: TP53 geni, hücre döngüsü düzenlemesi ve apoptozunda çok önemli bir rol oynayan p53 proteinini kodlar. TP53'teki mutasyonlar, kolon kanserinin ileri evreleri ve zayıf prognozla ilişkilidir (He ve diğerleri, 2019).
- Microsatellite Instability (MSI): MSI, DNA uyumsuzluk onarım sistemindeki kusurlardan kaynaklanan bir genomik dengesizlik biçimidir. Yüksek MSI seviyeleri gösteren tümörler genellikle kolon kanseri riskini arttıran bir durum olan Lynch sendromuyla ilişkilidir (Jiang ve diğerleri., 2021)
- Genetik mutasyonlara ek olarak, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik değişiklikler kolon kanseri patogenezinde önemli roller oynar. Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu, bunların susturulmasına yol açarak tümör oluşumuna katkıda bulunabilir (Zhou ve diğerleri, 2020).

Tümör mikroçevresi (TME), fibroblastlar, bağışıklık hücreleri ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden oluşur, bunlar kanser hücreleriyle etkileşime girer ve tümör davranışını etkiler. Kolon kanserinde TME'nin temel bileşenleri şunlardır:

İnflamatuvar Sitokinler: Kronik inflamasyon, kolon kanseri için iyi bilinen bir risk faktörüdür. Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinler, anjiyogenezi ve

bağışıklık sisteminden kaçışını artırarak tümör büyümesini ve metastazı teşvik eder (Nagarsheth ve diğerleri, 2016).

Tümör İlişkili Makrofajlar: Büyüme faktörleri ve immünoşüpresif sitokinlerin salgılanması yoluyla tümör ilerlemesini teşvik ederek pro-tümörijenik özellikler sergileyebilir. Makrofajların M2 fenotipine doğru polarizasyonu, özellikle kolon kanserinde kötü prognozla ilişkilidir (Xiu ve diğerleri, 2019).

Hücre Dışı Matriks (HDM): Tümörlere yapısal destek sağlar ve hücre davranışını etkiler. HDM bileşimindeki değişiklikler tümör hücresi göçünü ve invazyonunu artırabilir (Wang ve diğerleri, 2023).

Kolon kanseri hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçma: Kanser hücrelerinin bağışıklık yanıtlarından korunmak ve sağlıklı büyümelerini sürdürmek için major histokompatibilite kompleksi, bağışıklık kontrol noktası molekülleri ve düzenleyici T hücreleri mekanizmalarını kullanmaktadır.

Major Histokompatibilite Kompleksi: Kolon kanseri hücreleri, majör histokompatibilite kompleksi sınıf I moleküllerinin ekspresyonunu azaltabilir ve sitotoksik T lenfositleri tarafından tümör hücrelerinin tanınmasını zorlaştırır.

Bağışıklık kontrol noktası molekülleri: Programlanmış hücre ölüm proteini ve ligandı gibi bağışıklık kontrol noktası proteinleri tümörlerin bağışıklık sisteminden kaçmalarına yardımcı olabilir. Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) ve onun ligandı olan PD-L1, bu moleküllere örnek teşkil eder. PD-1, T hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir protein olup, bağışıklık yanıtını düzenleyen önemli bir rol oynar. Kanser hücreleri, PD-L1'i ifade ederek PD-1 ile etkileşime girebilir ve bu etkileşim sonucunda T hücrelerinin aktivasyonu engellenir. Bu da kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve yok edilmesini zorlaştırır. Son yıllarda, PD-1 ve PD-L1'in engellenmesi, kanser tedavisinde yeni bir strateji olarak öne çıkmıştır. Bu tedavi, kanser hücrelerinin PD-1/PD-L1 etkileşimini inhibe ederek bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini daha etkili bir şekilde hedeflemesine olanak tanır.

Düzenleyici T hücreleri: Bu hücreler bağışıklık sisteminin aşırı tepki vermesini engelleyerek vücutta dengeyi sağlarlar. Ancak, tümör mikroçevresinde T hücrelerinin yoğunluğu arttığında bu hücreler bağışıklık yanıtlarını baskılar ve kanser hücrelerinin büyümesine olanak sağlar. T hücreleri tümör karşıtı bağışıklık yanıtlarını zayıflatarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar.

2.2.4.2. Metabolik değişiklikler

Kolon kanseri hücreleri, hızlı büyüme ve hayatta kalma süreçlerini desteklemek için metabolik yollarında önemli değişiklikler gösterir. Bu metabolik değişiklikler (aerobik glikoz, glutamin ve değişen lipid metabolizması); kanser hücrelerinin çevresel streslere, oksijen eksikliğine (hipoksi) ve besin kısıtlamalarına rağmen hayatta kalmalarını sağlar. Kolon kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türü, bu metabolik adaptasyonları kullanarak tümör büyümesini hızlandırır ve bağışıklık sisteminden kurtulabilir.

Warburg etkisi (aerobik glikoz): Kanser hücreleri, oksijen varlığında bile aerobik glikoliz kullanarak enerji üretirler. Normalde hücreler oksijen varlığında oksidatif fosforilasyonu tercih ederken, kanser hücreleri glikozu laktata dönüştürerek enerji elde ederler. Bu süreç hem enerji üretimi sağlar hem de biyosentez için gerekli olan ara maddeleri (örneğin, yağ asitleri, amino asitler ve nükleotitler) üretir. Kolon kanseri hücrelerinde bu süreç, tümörlerin hızlı büyümesini destekler.

Glutamin metabolizması: Kolon kanseri hücreleri de dahil olmak üzere birçok kanser hücresinin enerji üretimi ve biyosentez süreçleri için kritik bir rol oynar. Glutamin, kanser hücreleri için önemli bir karbon ve azot kaynağıdır ve özellikle hızla çoğalan hücreler için hayati önemi vardır.

Değişen lipid metabolizması: Yüksek yağlı diyetler, lipid metabolizmasında tümörün ilerlemesine katkıda bulunan değişikliklerle birlikte, kolon kanseri riskinin artmasına sebep olmaktadır.

2.2.5.Kolon kanseri biyobelirteçleri

Kolon kanseri, erken teşhis, tanı, prognoz ve tedavi için güvenilir biyobelirteçler ile tanımlanması gerektiğinden dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir.

Karsinoembryonic Antijen (CEA): Kolon kanseri için en yaygın kullanılan serum biyobelirteçlerinden biridir. Hücre yapışmasında yer alan bir glikoproteindir ve tipik olarak kolorektal kanserli hastalarda yükselir. Özgünlüğü ve duyarlılıkları sınırlıdır, diğer malignitelerde ve yeni başlayan bening tümörlerde yüksek seviyede bulunabilir (Chen ve diğerleri, 2018). CEA tanı koyma için değil hastalığın tedavi yanıtı ve tekrarlamasını izlemede kullanılır.

Karbohidrat Antijen 19-9 (CA19-9): Genellikle pankreas ve bazı KRK vakalarıyla ilgili glikoprotein yapısında biyobelirteçtir. Kolon kanseri hastalarında CA19-9 seviyesi yüksektir. Tanı koymada kullanımı sınırlı ve spesifik değildir. Kanser tedavisini izlemek ve hastalığın ilerleyip ilerlemediğini tespit etmede kullanılır. CA19-9'un yüksek seviyeleri ilerlemiş hastalığın göstergesi olabilir ve sıklıkla kötü prognozla ilişkilendirilir (Chen ve diğerleri, 2018).

Gelsolin (GSN): Son çalışmalar, gelsolin'i kolon kanseri için potansiyel bir biyobelirteç olarak tanımlamıştır. Gelsolin, sitoskeletal dinamiklerde rol oynayan bir aktin bağlayıcı proteindir. Araştırmalar, gelsolin serum düzeylerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında kolon kanseri hastalarında önemli ölçüde daha düşük olduğunu gösterdiği için bir tanı belirteci olarak potansiyel faydasını düşündürmektedir (Chen ve diğerleri, 2019).

TRIM72: Üçlü motif içeren protein ailesinin bir üyesi olan TRIM72, kolon kanseri için bir biyobelirteç olarak da araştırılmıştır. Çalışmalar, TRIM72 düzeylerinin kolon kanseri hastalarında azaldığını ve yeni bir tanı belirteci olarak hizmet edebileceğini göstermektedir (Chen ve diğerleri, 2019).

DNA metilasyonu: Kolon kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser için karakteristiktir. Vimentin (VIM) gibi belirli genler, metilasyon durumuna göre potansiyel belirteçler olarak tanımlanmıştır. Dışkı örneklerinde %46 duyarlılık ve %90 özgünlük oranları yapılan

çalışmalarda bildirilerek noninvaziv bir tarama aracı olarak umut verici sonuçlar göstermiştir (Solé ve diğeri, 2014).

Microsatellite Instability (MSI): MSI, DNA uyumsuzluk onarım sistemindeki kusurlar nedeniyle oluşan genetik hipermutabilite durumudur. Özellikle Lynch sendromuyla ilişkili olmak üzere kolon kanserlerinin bir alt kümesinde önemlidir. MSI durumu için test yapmak, immünoterapi kullanımıyla ilgili olarak önemli prognostik bilgiler sağlayabilir ve tedavi kararlarına rehberlik edebilir (Yan, 2023).

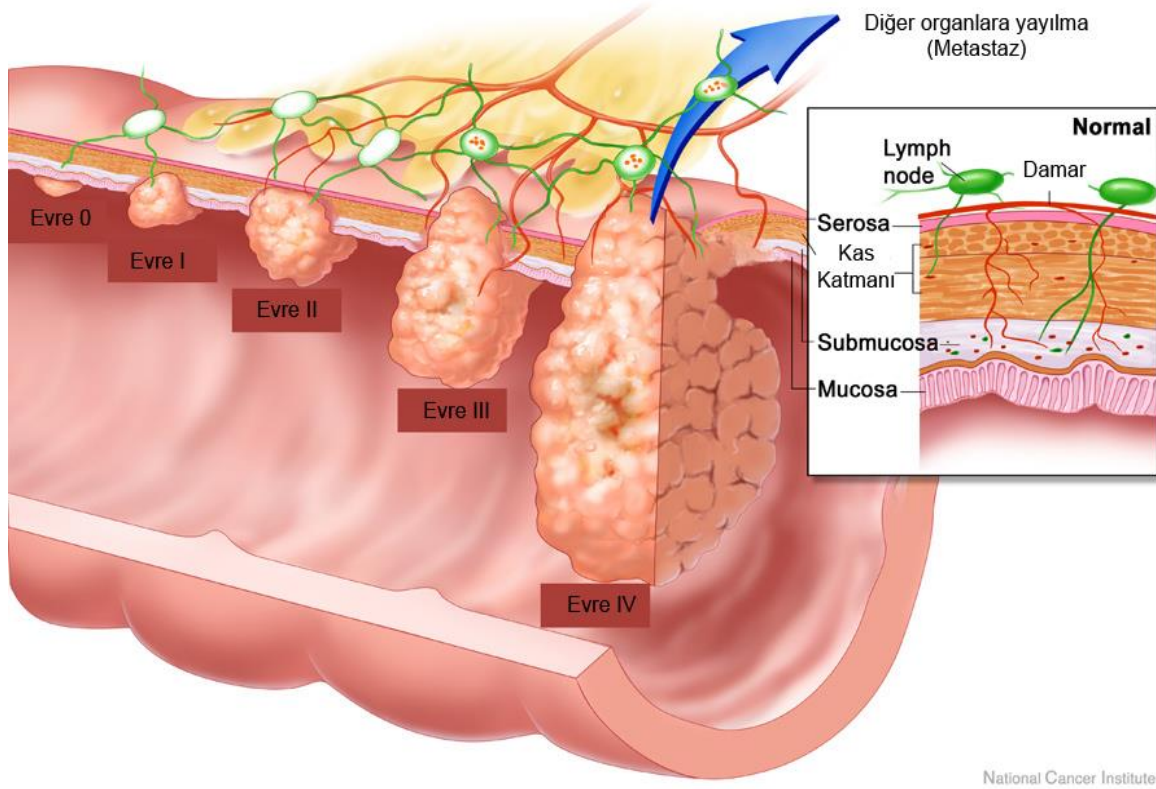
2.2.6.Evreleme

Kolon kanseri evrelemesi hastalığın durumun değerlendirilmesi ve uygun tedavi için alınacak kararları etkilediğı için önemlidir. Kolon kanseri evrelemesinde Tümör-Nod-Metastaz (TNM) ve DUKES evreleme yöntemleri kullanılır.

TNM yöntemi kanseri üç temel kritere ayırır: Birincil tümörün boyutu ve yayılımı (T), bölgesel lenf düğümlerinin tutulumu (N) ve uzak metastazın varlığı (M) şeklinde belirlenen parametrelerin her birine kanserin genel evresini belirleyen Evre 0 ile Evre IV arasında sayısal değer verilerek ifade edilir (Tian ve Zhou, 2022; Delattre vd., 2020) (Şekil 2.5.). TNM tanımlarını kullanarak tümör ilerlemesini nasıl kontrol edileceğı belirlenir; radyasyon, kemoterapi veya immünoterapi dahil olmak üzere hastalığın tedavisi planlanır ve prognozu belirlenir.

Duke'un sınıflandırması 20. Yüzyılın başlarında KKK için özel olarak geliştirilmiştir. Sınıflandırma hastalığın tümör invazyonu ve lenf nodu tutulumunun derecesine göre prognozu belirlenir ve tedavi kararı verilir. Bu sistem kriterleri genişleten Astler-Coller sistemi aracılığıyla yıllar içinde değişikliğe uğramıştır (Banas, Jung, Chiciudean ve Gurzu, 2022; Tsabit, 2023). Kolorektal kanseri dört evreye ayırır; A: Tümör mukoza ve submukoza ile sınırlıdır ve lenf nodu tutulumu yoktur, kanserin nispeten erken evresini gösterir ve hastalar genellikle olumlu bir prognoza sahiptir. B: Kanser muskularis propriayı delmiştir ancak bölgesel lenf düğümlerine yayılmamıştır. Bu evre, B1 (tümör muskularis propriayı istila eder) ve B2 (tümör muskularis propriadan perikolik dokuya istila eder) olmak üzere daha da alt bölümlere ayrılır (Tamgadge ve diğeri, 2016). C: kanserin bölgesel lenf

düğümlerine (N1 veya N2) yayıldığını gösterir. D: kanserin uzak organlara yayıldığı metastatik hastalığı ifade eder. Duke's D hastalarının prognozu kötüdür.



Şekil 2.5.Kolon kanseri evreleri (Özdoğan, 2024).

2.2.7.Kolon kanseri tanı koyma yöntemleri

Kolon kanserinin teşhisi, çeşitli tarama yöntemlerini, tanı testlerini ve klinik değerlendirmeleri birleştiren çok yönlü bir yaklaşımdır. Teşhis etmek için kullanılan birincil yöntemler dışkıda gizli kan taraması, kolonoskopi, sigmoidoskopi ve moleküler belirteçlerdir.

Dışkıda gizli kan testi: Genellikle ilk tarama aracıdır. Bu test ile dışkıda gizli kan tespit edilmesi kolon kanseri için erken bir göstergedir. Toplumsal tarama programları içerisinde yer alır.

Kolonoskopi: kanser teşhis etmek için, kolon mukozasının görüntülenmesi ve muayene sırasında biyopsi yapma ve polipler çıkarılmasına olanak sağlayan duyarlılığı yüksek bir testtir.

Sigmoidoskopi: Kolonun alt kısmını inceler, kolonoskopiden daha az kapsamlı olmasına rağmen rektum ve sigmoid kolondaki anormal değişiklikleri tespit edilmesinde etkilidir.

2.3.Kanser ve Apoptoz İlişkisi

Apoptoz, bir diğer ismi ile programlanmış hücre ölümü hücrel homeostazın düzenlenmesinde ve kanser ilerlemesinin önlenmesinde önemlidir. Hücre ölümünün iki ana fizyolojik biçiminden biri ve hücre biyolojisi alanında ve patolojik olmayan hücre ölümünü, "nekroz" olarak bilinen hücrel hasar sırasında meydana gelen hücre ölümünden ayırmada büyük öneme sahiptir. Kanser biyolojisinde, apoptozisin önlenmesi, kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilir ve kötü huylu hücrelerin hayatta kalmasına ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına olanak tanır (Kim ve diğerleri, 2021). Apoptozis kansere karşı temel bir savunma mekanizmasıdır. Apoptozis ve kanser arasındaki karmaşık ilişki, kanser hücrelerinde apoptozisin indüklenebileceği veya engellenebileceği çeşitli yollar ve mekanizmaları ortaya koyan kapsamlı araştırmaların odak noktasındadır (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Apoptoz nekroz karşılaştırma

Özellik	Nekroz	Apoptoz
Hücre büyüklüğü	Genişlemiş, şişmiş	Azalmış, büzülmüş
Nükleus	Piknoz=karyoreksis=kartolizis	Nükleozom boyutunda parçalara ayrılma
Plazma membranı	Parçalanmış	Sağlam, lipit oryantasyonu değişmiş
Hücrel içerikler	Enzimatik sindirim, hücre dışına sızabilir	Sağlam, apoptotik cisimler+
Çevrede inflamasyon	Sık	Yok
Fizyolojik veya patolojik yol	Her zaman patolojik (geri dönüşsüz)	Sıklıkla fizyolojik (istenmeyen hücre eliminasyon yolu) DNA zedelenmesinde patolojik yol

f2.3.1.Apoptoz sürecindeki morfolojik değişiklikler

Apoptozis sürecinin ayırt edici özellikleri olarak belirgin morfolojik değişiklikleri belirlemek, kanser araştırmaları da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik bağlamlarda apoptozu tanımlamak ve incelemek için çok önemlidir. Apoptozis sırasında meydana gelen morfolojik değişiklikler genel olarak birkaç temel özelliğe göre kategorize edilebilir.

Apoptozis sırasında gözlemlenebilen ilk değişikliklerden biri, genellikle zar kabarmasıyla birlikte görülen hücre büzülmesidir. Bu olay, plazma zarından çıkıntıların oluşumunu içerir ve apoptotik hücrelerin karakteristik görünümüne yol açar (Almosa ve diğerleri, 2020). Almosa ve diğerleri, bu morfolojik özelliklerin apoptotik fenotipi yansıttığını ve apoptozu nitel olarak değerlendirilebileceğini belirtmiştir (Almosa ve diğerleri, 2020). Moodley ve diğerleri kaspazların aktivasyonunun, membran kabarcıklanması ve hücre büzülmesi de dahil olmak üzere apoptozisle ilişkili morfolojik değişiklikleri katalize ettiğini vurguladı (Moodley ve diğerleri, 2004). Genellikle nükleer parçalanmayla birlikte gözlemlenen kromatin yoğunlaşması, mikroskop altında görüntülenebilen kromatinin yoğun kütleler halinde sıkıştırılmasını içerir (Bonanno ve diğerleri, 2009) ve apoptozu tespit etmek için gerekli bir özellik olduğunu vurgulanmıştır. Bir diğer ayırt edici özellik apoptotik cisimlerin oluşumudur. Mankiewicz vd., apoptozisin tipik morfolojik belirtilerinin hücre zarının yeniden düzenlenmesi, hücrenin büzülmesi, tomurcuklanma, apoptotik cisim oluşumu, nükleer yoğunlaşma ve parçalanma olduğunu belirtmiştir; bu da apoptotik cisimlerin apoptozis göstergeleri olarak tanımlanmasını desteklemektedir (Mankiewicz vd., 2001). Su ve diğerleri sitoplazmik membran kabarcıklandmasının, miyozin hafif zincir fosforilasyonunu teşvik eden ve apoptozla ilişkili karakteristik kabarcıklanmaya yol açan Rho efektörü ROCK I'nin aktivasyonu ile aracılık edildiğini bildirilmiştir (Su ve diğerleri, 2019). Sitoskeletal değişiklik, erken apoptoz sırasında tek hücrelerin mekanik dinamiklerini inceleyen Pelling ve diğerleri tarafından vurgulandığı gibi, apoptotik süreç sırasında hücrenin mekanik dinamikleri için esastır (Pelling ve diğerleri, 2009).

2.3.2.Apoptozdaki biyokimyasal değişiklikler

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümünde, hücresel bileşenlerin düzenli bir şekilde parçalanmasını kolaylaştıran bir dizi biyokimyasal değişiklik görülmektedir.

Kaspazların aktivasyonu: Kaspazlar, başlatıcı ve efektör kaspazlar olarak sınıflandırılır. Başlatıcı kaspaz efektör kaspazı aktive ederek çeşitli hücrel substratları keser ve apoptozisin karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerine yol açar (Schmidt ve diğerleri,2000; Riedl ve Shi, 2004).

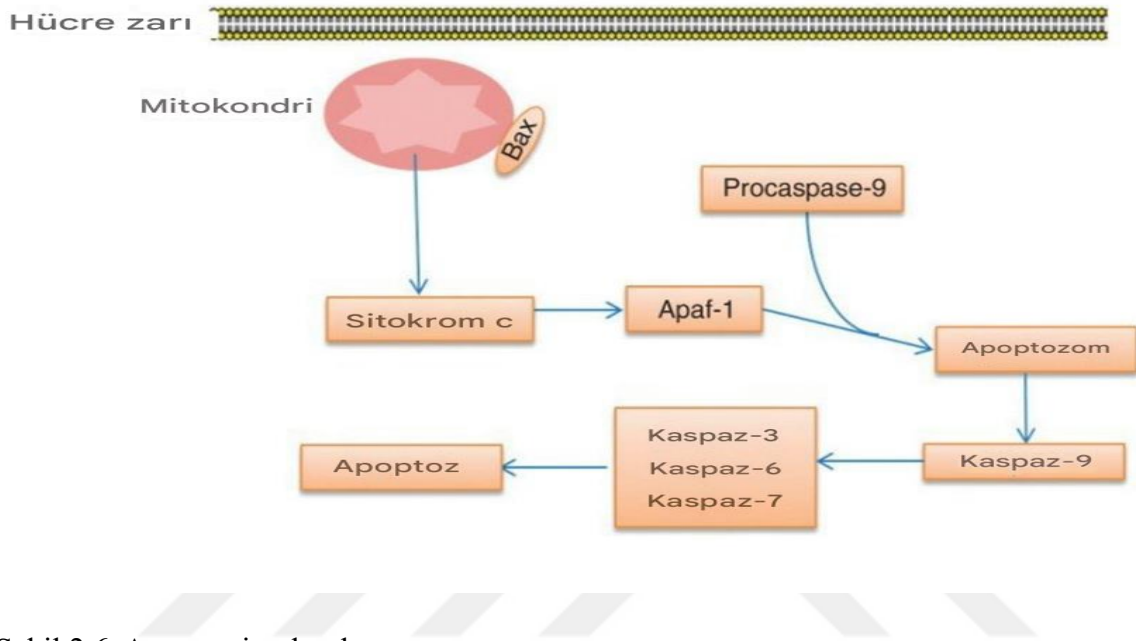
Mitokondriyal değişiklikler: Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınması, başlatıcı kaspazları aktive eden bir kompleks olan apoptozomun aktivasyonunu tetikleyen önemli bir olaydır (Yoshida, 2003). Bu süreç, mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol ederek apoptozu teşvik eden veya engelleyen BCL-2 protein ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir (Danial, 2007). Apoptoz hücrel sinyal yollarındaki değişiklikler; plazma membranının dış yüzeyindeki fosfatidilserinin açığa çıkması, erken apoptozisin biyokimyasal bir göstergesi ve fagositik hücrelerin ölmekte olan hücreyi yutması için bir sinyal görevi görür (Kolb ve diğerleri, 2002). Hücrenin genetik materyalinin parçalanması için kritik öneme sahip olan DNA parçalanması ve kromatin yoğunlaşması biyokimyasal değişikliklerdendir.

2.3.3.Apoptoz mekanizmaları

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, hücrel homeostazisi korumada ve hasarlı veya istenmeyen hücreleri ortadan kaldırmada önemli rol oynayan karmaşık bir biyolojik süreçtir. Apoptozis mekanizmaları genel olarak İçsel (mitokondriyal) ve dışsal (ölüm reseptörü) yol olmak üzere iki ana yola ayrılır. Her yol, apoptozisin infazcı proteini olan kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanan bir dizi biyokimyasal olayı içerir. Bu mekanizmaları anlamak, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve otoimmün bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik bağlamlarda apoptozisin rolünü açıklamak ve apoptozu manipüle etmeyi amaçlayan terapötik stratejiler geliştirmek için önemlidir.

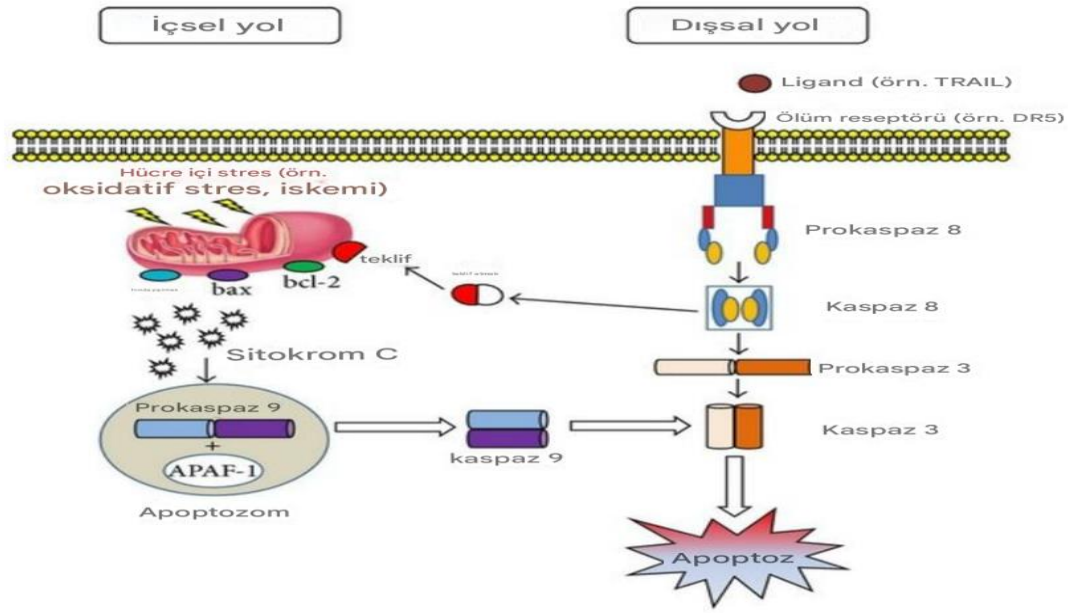
İçsel veya mitokondriyal yol: Pro-apoptotik faktörlerin salınımında merkezi bir rol oynayan mitokondriyle bağlantılı olan bu yol DNA hasarı, oksidatif stres veya metabolik bozukluklar gibi hücrel stres sinyalleri tarafından başlatılır. Bu yoldaki önemli olaylardan biri, sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasıdır; bu da daha sonra apoptozom kompleksini aktive ederek başlatıcı kaspazların, özellikle kaspaz-9'un aktivasyonuna yol açar (Meng ve diğerleri, 2017). Hem pro-apoptotik üyeleri (örn. BAX, BAK) hem de anti-apoptotik üyeleri (örn. BCL-2, BCL-XL) içeren BCL-2 protein ailesi, mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol ederek bu süreci düzenler (Ji ve diğerleri, 2017). BAX'ın aktivasyonu mitokondriyal

dış membran geçirgenliğine yol açarak sitokrom c ve diğer apoptojenik faktörlerin salınımını kolaylaştırır (Meng ve diğerleri, 2017). Sitozole girdikten sonra, sitokrom c, başlatıcı kaspaz-9'u aktive eden bir kompleks olan apoptozomun oluşumuna yol açan Apaf-1'e bağlanır (Li ve diğerleri, 2013) (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Apoptoz içsel yol

Dışsal veya ölüm reseptörü yolu: İçsel yolun tersine, dışsal yol, Fas ligandı (FasL) veya TNF- α gibi hücre dışı ölüm ligandlarının hücre yüzeyindeki ilgili ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılır. Bu etkileşim, başlatıcı kaspazları, özellikle kaspaz-8'i aktive eden FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) gibi adaptör proteinleri işe alır (Reyes-Zurita ve diğerleri, 2016). Kaspaz-8'in aktivasyonu iki sonuca yol açabilir: Etketör kaspazların doğrudan aktivasyonu veya pro-apoptotik bir BCL-2 ailesi üyesi olan ve daha sonra sitokrom c salınımını teşvik etmek ve apoptotik sinyali içsel yol aracılığıyla yükseltmek için mitokondriye taşıyan Bid'in kesilmesi (Kong ve diğerleri, 2013). Dışsal yol, bağışıklık tepkilerinde ve enfekte olmuş veya dönüştürülmüş hücrelerin ortadan kaldırılmasında özellikle önemlidir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Apoptoz dışsal yol

Ayrıca, PI3K/Akt ve NF- κ B yolları da dahil olmak üzere çeşitli sinyal yolları apoptozu düzenlemede kritik roller oynar. PI3K/Akt yolu pro-apoptik etkileriyle bilinir ve aktivasyonu pro-apoptotik faktörleri fosforile ederek ve inaktive ederek apoptozu inhibe edebilir (Huang vd., 2020; Lu vd., 2021). Tersine, birincil olarak inflamasyon ve hücre sağkalımı ile ilişkili olsa da NF- κ B yolu, pro-apoptotik genleri yukarı düzenleyerek ve anti-apoptotik genleri aşağı düzenleyerek belirli koşullar altında apoptozu da teşvik edebilir (Ji vd., 2017; Ming vd., 2022).

Ekstrinsik yolda kaspaz-8'in aktivasyonu, Bid bölünmesi yoluyla mitokondriden sitokrom c'nin salınımını teşvik ederek içsel yolu güçlendirebilir (Han ve diğerleri, 2009). Bu etkileşim, apoptotik sinyallemenin karmaşıklığını ve bu yolların birden fazla bileşenini hedef alan terapötik müdahalelerin potansiyelini vurgular.

Endoplazmik retikulum (ER), özellikle ER stresine yanıt olarak apoptozda rol oynayan bir diğer kritik organdır. Hücreler besin eksikliği veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi gibi durumlar yaşadığında, katlanmamış protein yanıtı (UPR) aktive olur. Uzun süreli ER stres, CHOP (C/EBP homolog proteini) gibi pro-apoptotik faktörlerin aktivasyonuna yol açabilir ve bu da içsel yol aracılığıyla apoptozu teşvik eder (Lan ve diğerleri, 2022; Brodie,

Crotty ve Gaffney, 2004). UPR, hafif stres altında koruyucu bir mekanizma görevi görür ancak stres şiddetli veya uzun süreli olduğunda hücre ölümünü tetikleyebilir.

Kanserde, apoptozisin önlenmesi tümör ilerlemesinin bir özelliğidir ve kanser hücrelerinin genomik instabiliteye ve terapötik müdahalelere rağmen hayatta kalmasını sağlar (Yang vd., 2014).

2.3.4.Apoptoz gen regülasyonu

Apoptoz, hücrelerin hayatta kalmak ya da ölmek arasında seçim yapmalarını sağlayan karmaşık bir mekanizmadır ve bu süreç, çeşitli genler ve proteinler tarafından düzenlenir. Apoptozun düzenlenmesi öncelikle çeşitli dış ve iç uyaranlardan etkilenen pro-apoptotik ve anti-apoptotik faktörler arasındaki bir denge ile yönetilir.

BCL-2 Ailesi Genleri

Bu gen ailesi, apoptozun başlatılmasını veya engellenmesini düzenler. BCL-2 ve BCL-XL, hücre ölümünü engelleyen (anti-apoptotik), BAX, BAK ve Bid gibi genler ise hücre ölümünü teşvik eden (pro-apoptotik) proteinleri üretir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin oranı, hücrenin apoptotik sinyallere nasıl yanıt vereceğini belirler (Hsu ve Hsueh, 2000). Örneğin, BAX ifadesinde BCL-2'ye göre bir artış, mitokondriyal dış zar geçirgenleşmesini tetikleyerek sitokrom c'nin salınmasına ve ardından apoptotik programı yürüten kaspazların aktivasyonuna yol açabilir (Zheng, 2011). BAX/BCL-2 oranındaki artış, tipik olarak apoptoza yatkınlığı gösterir, çünkü BAX hücre ölümünü teşvik ederken BCL-2 apoptozu inhibe eder (Ye ve diğerleri, 2018; Chen ve diğerleri, 2013). Kanser hücrelerinde BCL-2'nin aşırı ekspresyonu, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve apoptozdan kaçmalarına neden olabilir. BAX ve BAK, apoptozu başlatan proteinlerdir. Mitokondrilere yer alan bu proteinler, hücrenin ölüm sinyallerine yanıt olarak aktivite gösterir ve mitokondri zarını geçirgen hale getirir. Bid proteini, hücre dışı sinyallerle apoptozun tetiklenmesinde rol oynar. Özellikle Fas ve TNF gibi ölüm reseptörlerinin uyarılmasıyla aktive olur. BCL-2 ailesi proteinlerinin düzensizliği, BCL-2 gibi anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç yol açabileceği çeşitli kanserlerde sıklıkla gözlemlenmektedir (Wang ve diğerleri, 2015; Yang ve diğerleri, 2015). Örneğin, prostat kanserinde, yüksek BCL-2 seviyeleri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir ve terapötik

sonuçları iyileştirmek için bu yolu hedeflemenin önemini vurgulamaktadır (Yang ve diğerleri, 2015; Habib ve diğerleri, 2015). Örneğin, çalışmalar BAX'ın yukarı düzenlenmesinin ve BCL-2'nin aşağı düzenlenmesinin kanser hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde gelişmiş apoptoza yol açabileceğini göstermiştir (Chipuk ve diğerleri, 2012; Zhou ve diğerleri, 2022). Bu mekanizma, BAX/BCL-2 oranının modülasyonunun kötü huylu hücrelerde apoptozu indüklemeyi amaçlayan kanser tedavilerinin başarısını etkilemesi bakımından önem taşımaktadır (Jian ve diğerleri, 2016; Ji ve Xu, 2016).

Kaspazlar

Kaspazlar (Cysteine-aspartic proteases), apoptozun ilerleyişinde merkezi bir rol oynayan enzimlerdir. Bu enzimler, hücre ölümünü tetikleyen ve düzenleyen proteinleri parçalayan proteazlardır. Genellikle üç gruba ayrılır: İnhibitör kaspazlar (kaspaz 8 ve kaspaz 9), apoptozun başlatılmasında rol oynar ve diğer kaspazları aktive ederler. Efektör kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7), apoptozun ilerleyişinde etkinleşen ve hücre ölümünü gerçekleştiren enzimlerdir ve inhibitör kaspazlar tarafından aktive edilirler. İnaktif kaspazlar, apoptoz yolunda henüz aktifleşmemiş ve çoğunlukla proteolitik aktifleşme aşamasına geçmeyen formda bulunurlar. Dışsal yolda Fas (FasL) ligandları, ilgili ölüm reseptörlerine bağlanarak kaspaz-8'i aktive eder ve bu da efektör kaspazlardan özellikle KASPAZ-3'ü aktive eder. İçsel yol, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile bir kompleks oluşturan mitokondriden sitokrom c'nin salınmasıyla karakterize edilir ve bu da kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanır (Guo ve diğerleri, 2002; Loureiro ve diğerleri, 2007).

KASPAZ-3, apoptoz sırasında hücreyi parçalamadaki rolü nedeniyle genellikle "infazcı" kaspaz olarak adlandırılır. Hem kaspaz-8 hem de kaspaz-9 tarafından aktive edilir ve böylece dışsal ve içsel yolları birbirine bağlar (Stępczyńska ve diğerleri, 2001; Baskin ve diğerleri, 2005). Bu enzim inaktif bir öncü (pro-kaspaz-3) olarak sentezlenir, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gibi başlatıcı kaspazlar tarafından proteolitik bölünme yoluyla aktive edilir (Tao ve diğerleri, 2008; Soung ve diğerleri, 2004). KASPAZ-3, DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve membran kabarcıklanması gibi apoptoz ile ilişkili morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açan çeşitli hücresel substratların parçalanmasından sorumludur (Liu ve diğerleri, 2015; Soung ve diğerleri, 2004). Kaspaz-3'ün apoptozdaki önemi, inhibisyonunun kanser hücrelerinde apoptoza karşı direnç yolu açabileceğini, böylece tümör oluşumuna ve kemoterapiye karşı direnç katkıda bulunabileceğini gösteren çalışmalarla vurgulanmaktadır.

(Devarajan ve diğeri, 2002; Soung ve diğeri, 2004). KASP AZ-3, apoptozdaki rolüne ek olarak, hücre farklılaşması ve doku homeostazisi de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Örneğin, ekspresyonu gelişim sırasında sıkı bir şekilde düzenlenir ve ekspresyonundaki sapmalar kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik durumlara yol açabilir (Yakovlev ve diğeri, 2010; Soung ve diğeri, 2004). Kanser bağlamında, kaspaz-3 ekspresyonu genellikle aşağı düzenlenir ve bu da kötü huylu hücrelerin hayatta kalmasına ve kemoterapiye karşı dirençlerine katkıda bulunabilir (Devarajan ve diğeri, 2002; Soung ve diğeri, 2004). Bunun tersine, KASP AZ-3'ün yukarı düzenlenmesi, bağışıklık tepkileri sırasında T lenfositleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde apoptoza karşı artan duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir (Zhu ve diğeri, 2023; Soung ve diğeri, 2004). Ayrıca, KASP AZ-3'ün hücre döngüsünün G2/M geçişinde rol oynayabileceği ve bunun sadece apoptozun ötesinde bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Hsu ve diğeri, 2006; Soung ve diğeri, 2004). KASP AZ-3'ün hem apoptoz hem de hücre döngüsü düzenlemesindeki bu ikili rolü, hücrel homeostazı koruma ve stres sinyallerine yanıt vermedeki önemini vurgulamaktadır.

2.4. Parabenler ve Özellikler

Parabenler, anti-mikrobiyal ve anti-fungal özelliklerinden dolayı için yaklaşık 100 yıldır kullanılan bir bileşik sınıfıdır. İlk olarak 1920'lerin ortalarında farmasötik ürünler için koruyucu olarak kullanılan parabenler gıda ve kozmetik ürünlerde hızla yaygınlaştı. (Soni ve diğeri, 2005; Guo ve Kannan, 2013). Parabenler, para-hidroksibenzoik asidin alkil (metil, etil, propil, büt il veya hept il) ya da benzil grubu içeren esterleridir. Bu alkil zinciri, parabenlerin mikrobiyal koruyucu aktivitesi için çok önemlidir. Hem doğal hem de sentetik paraben bileşikleri 1930'lardan sonra ağırlıklı olarak gıda maddelerinde, kozmetiklerde ve farmasötik ilaçlarda koruyucu olarak kullanılmaktadır (Nemes ve diğeri, 2018; Haman ve diğeri, 2015). Kimyasal yapıları, geniş spektrumlu antimikrobiyal özellikler göstermelerine olanak tanıyarak bu maddelerin bakteriler, mantarlar ve mayalar gibi zararlı mikroorganizma türlerine karşı etkili ve ürünlerin daha uzun raf ömrüne sahip olmasını sağlamaktadır (Peng ve diğeri, 2006; Liao ve diğeri, 2013; Majewska ve diğeri, 2017). En yaygın kullanılan parabenler arasında metilparaben (MP), etilparaben (EP), propilparaben (PP) ve butilparaben (BP) bulunur; bunların her biri, etkinliklerini ve emilim özelliklerini etkileyen alkil zincir uzunluklarında farklılık gösterir (Smith ve diğeri, 2012; Ye ve diğeri, 2006; Oishi, 2001; Hajizadeh ve diğeri, 2020). Parabenlerin birincil

uygulaması, şampuanlar, losyonlar ve kozmetikler gibi kişisel bakım ürünlerinde koruyucu madde olarak kullanılmasıdır ve burada mikrobiyal büyümeyi ve bozulmayı önlemeye yardımcı olurlar (Engeli ve diğerleri, 2017; Oishi, 2002; Hu ve diğerleri, 2017). Gıda ürünlerinde kullanımı da önemlidir, çünkü tazeliği ve güvenliği korumak için fırınlanmış ürünler, içecekler ve çeşniler dahil olmak üzere çeşitli ürünlere eklenirler (Darbre ve diğerleri, 2003; Liang ve diğerleri, 2021; Lee ve diğerleri, 2018). İlaçlarda parabenler benzer bir amaca hizmet eder, mikrobiyal kontaminasyonu engelleyerek ilaçların stabilitesini, uzun ömürlülüğünü sağlar, metilparaben (MeP) ayrıca ilaçlar için bir plastikleştirici olarak kullanılır ve ilaçların üretiminde belirli aşamaları kolaylaştırır (Zgoła-Grzeskowiak ve diğerleri, 2016; Braun ve diğerleri, 2013).

Paraben türevi bileşikler, son yıllarda kozmetik ve farmasötiklerde koruyucu rollerinin yanı sıra potansiyel antikanser faaliyetleri nedeniyle önemli ölçüde dikkat çekmiştir. Çeşitli türevler arasında, etil parabenden sentezlenen hidrazid-hidrazonlar umut verici antikanser etkileri göstermiştir (Han ve diğerleri, 2020). Parabenlerin genotoksik etkileri belgelenmiştir ve yapılan araştırmada, insan lenfositlerinde DNA hasarına neden olabileceklerini göstermektedir (Bayülken ve diğerleri, 2017). Çalışmalar, parabenlerin meme dokusu da dahil olmak üzere insan dokularında birikebileceğini, östrojenik aktiviteleri ve kanser gelişimindeki potansiyel rolleri hakkında endişeleri artırdığını göstermiştir (Haman ve diğerleri, 2015; Harvey ve Everett, 2012). Pan ve diğerleri butilparabenin (BP) insan epidermal büyüme faktörü reseptör ligandlarının varlığında meme kanseri hücre çoğalmasını uyurabileceğini ve tümör hücresi büyümesini artırabilecek potansiyel bir sinerji olduğunu göstermiştir (Oishi, 2001).

Bazı çalışmalar, paraben maruziyeti ile meme kanseri arasında bir korelasyon göstermiş olsa da bu konuda elde edilen kanıtlar yetersiz kalmaktadır (Kanna ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, meme dokusunda parabenlerin tespit edilmesi, biyolojik etkileri ve kanser riski oluşturma mekanizmaları hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmalar, parabenlerin, hormona duyarlı kanserlerin, özellikle de meme kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinen östrojen hormonunu taklit edebileceğini göstermiştir. Örneğin, Lillo ve diğerleri metilparaben'in östrojen reseptörü-pozitif (ER+) meme kanseri modellerinde tümör başlatan hücreleri uyardığını ve parabenlerin bu kanser hücrelerinin östrojenik aktivite yoluyla çoğalmasını artırabileceğini

öne sürmektedir (Lillo ve diğerleri, 2016). Khadem ve Marles, paraben türevlerini kapsayan hidroksibenzoik asitler de dahil olmak üzere fenolik bileşiklerin biyoaktifliğini gözden geçirmiştir. Bu bileşiklerin antikanser etkileri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik faaliyetler sergilediğini, ancak spesifik mekanizmaların tamamen açıklığa kavuşturulması gerektiğini belirtmiştir (Khadem ve Marles, 2010). Yıldırım ve ark, sentezledikleri farklı siklotrifosfazen türevlerinin meme, yumurtalık ve prostat kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik etkiler gösterdiğini antikanser ajanlar olma potansiyeli taşıdığını ortaya koymuştur (Yıldırım ve diğerleri, 2012).

Siklotrifosfazen türevli bileşiklerin kolon kanseri (Caco-2) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesinin kanser araştırmalarına ilgi uyandıracakı düşünülmektedir. Caco-2 hücre hattı, bağırsak emilimi ve ilaç metabolizmasını incelemek için uygundur, çeşitli bileşiklerin antikanser etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.5. Fosfazenler ve Özellikleri

İnorganik kimyanın önemli bir sınıfını oluşturan fosfazenler, $- [N=PR_2] -$, düz zincir yapılı, halkalı yapılı ya da yüksek molekül ağırlıklı polimerik yapıda bulunabilmektedirler. Bu grubun üyelerinden birisi olan altı üyeli siklotrifosfazen (heksaklorosiklotrifosfazen, trimer, $N_3P_3Cl_6$), azot ve fosfor atomlarının birbirine ardışık olarak bağlandığı altı üyeli düzlemsel halka şeklinde bir yapıya sahiptir. Fosfazenlerdeki fosfor atomuna bağlı klorların, mono-, di-, tri-, tetra- fonksiyonlu organik veya inorganik nükleofiller ile kolaylıkla yer değiştirme reaksiyonları verebilmeleri sonucu farklı özellikler gösteren fosfazen bileşiklerinin elde edilebilmesi; araştırmacıların özellikle bu bileşiği ana iskelet olarak seçmelerine imkân sağlamaktadır. Fosfazen bileşiklerinde substitüe edilen reaktifin/reaktiflerin özelliklerine ve reaksiyon şartlarına bağlı olarak farklı özelliklere sahip ürünler ortaya çıkabilmektedir. Fosfazen bileşiklerinin sahip olduğu spesifik fiziksel ve kimyasal özellikler, fosfazen türevlerinin uygulama alanlarında da farklılıklara yol açmaktadır. Bu özelliklerin kontrollü şekilde düzenlenebilmesi, fosfazenleri biyomedikal mühendislik, malzeme bilimi ve çevre teknolojileri gibi alanlarda son derece umut verici adaylar hâline getirmiştir. Fosfazenler, çevre dostu özellikleri ile, biyolojik açıdan parçalanabilir olmaları ve çeşitli endüstriyel uygulamalara açık yapıları sayesinde ilgi görmektedir. Fosfor–azot bağları, fosfor–oksijen bağlarına kıyasla daha az polardır ve daha hacimli yapılar oluşturur. Bu durum, fosfazenleri

daha rijit ve oksidasyona karşı dirençli kılar. Polifosfazenler ayrıca tedavi için ilaç taşıyıcı olarak da kullanılabilir. Polifosfazenleri ilaç taşıyıcı olarak kullanmanın temel özelliklerinden biri biyouyumluluk ve biyobozunurluktur (Teasdale ve Brüggemann, 2013; Baillargeon ve Mequanint, 2014). Fosfazenlerin yüksek termal stabilitesi ve alev geciktirici, gibi benzersiz özellikleri, onları çeşitli tıbbi cihazlarda ve implantlarda kullanım için uygun hale getirir (Zhou ve diğerleri, 2009; Sun ve diğerleri, 2012). Örneğin, fosfazen bazlı malzemeler, biyobozunabilirliklerinin ve mekanik özelliklerinin doğal kemikle eşleşecek şekilde optimize edilebileceği kemik dokusu mühendisliğinde kullanımları için araştırılmıştır (Nair ve diğerleri, 2005; Ren ve diğerleri, 2017). Fosfazenler, iyonik iletkenliklerinin ve termal stabilitelerinin kritik olduğu yakıt hücreleri ve piller için polimer elektrolit membranlarına dahil edilmiştir (Hailanga ve diğerleri, 2019; Karadağ ve Aksan, 2018; Fei ve Allcock, 2010).

Fosfazenlerin en dikkat çekici uygulamalarından biri, özellikle ilaç dağıtım sistemleri ve doku mühendisliği olmak üzere biyomedikal mühendisliği alanlarındadır. Polifosfazenler, poli(organo)fosfazenler gibi, terapötik ajanlar için biyolojik olarak parçalanabilir taşıyıcılar içermeye potansiyelleri açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu polimerler, toksik olmayan ürünlere parçalanacak şekilde tasarlanabildiği için biyouyumluluğu nedeniyle çok önemli uygulamalar için kullanılabilir. (Teasdale ve Brüggemann, 2013; Baillargeon ve Mequanint, 2014). Örneğin, polifosfazenler, doku rejenerasyonu için gerekli olan hücre büyümesini ve çoğalmasını destekleyen hidrojel ve iskeletler oluşturmak için kullanılmıştır (Carampin ve diğerleri., 2007; Rothmund vd., 2014; Casella vd., 2022). Polifosfazenlere spesifik amino asit eklenmesinin biyolojik performanslarını arttırdığı ve biyolojik sistemlerle özel etkileşimlere olanak sağladığı gösterilmiştir (Carampin ve diğerleri, 2007; Rothmund ve diğerleri, 2014).

Poli(bis(karboksifenoksi)fosfazenin) kamptotesin (CPT) ve paklitaksel gibi antikanser ilaçları etkili bir şekilde kapsüllediği ve kanser hücrelerine iletilmesini artırdığı gösterilmiştir. Örneğin, Mehnath ve diğerleri CPT yüklü fosfazen stabilize altın nanopartiküllerinin, serbest CPT'ye oranla insan meme kanseri hücreleri tarafından daha iyi içselleştirildiğini gösterdi (Kanwar ve diğerleri, 2019). Benzer şekilde, poli(bis(karboksifenoksi)fosfazen) miselleri, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyümesini aktif olarak engelleyen uyarıya duyarlı ilaç dağıtım sistemleri oluşturmak için nanofiberlerle birleştirildi (Tozar ve diğerleri, 2022). Bu bulgular, fosfazenlerin hedefli kanser tedavileri

için etkili taşıyıcılar olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Fosfazenler çeşitli kanser hücre hatlarına karşı içsel sitotoksik özellikleri açısından araştırılmıştır. Örneğin, çalışmalar siklik fosfazenlerin insan meme adenokarsinomu (MCF-7) ve kolorektal adenokarsinom (DLD-1) hücre hatlarına karşı önemli sitotoksik aktivite gösterdiğini bildirmiştir (Cemaloğlu vd., 2023).

Fosfazenlerin sitotoksik etkileri, hücresel bileşenlerle etkileşim kurmaları ve bu etkileşimler sonucunda kanser hücrelerinde apoptoz ya da nekroz gibi hücre ölümü mekanizmalarını tetiklemeleriyle ilişkilendirilmektedir. Spiro-ansa-spiro-siklotrifosfazenlerin A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmış ve antikanser ajanlar olarak potansiyellerini ortaya koymuştur (Başterzi vd., 2015). Aziridin-taç-ikameli fosfazenlerin DNA'yı parçaladığı ve kanser hücresi büyümesini engellediği gösterilmiştir (Bilge vd., 2006; Ilter vd., 2007). Fosfazenlerin kanser tedavisindeki etki mekanizması çok yönlüdür. Bazı çalışmalar, fosfazenlerin belirli sinyal yollarının aktivasyonu ile apoptozu indükleyebileceğini öne sürmektedir. Örneğin, antrakınon türevli siklotrifosfazenlerin MCF-7 ve DLD-1 hücre hatlarında apoptozu ve ilaç direncini etkilediğini gösterilmektedir (Yazgan ve diğerleri, 2022). Fosfazenlerin polimerik sistemlere dahil edilmesi, siRNA ve diğer genetik materyallerin iletimini artırabilir ve böylece kanser hücrelerinde gen ekspresyonunu düzenleyebilir ve meme kanseri hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getiren survivin shRNA'yı iletmek için kullanılmıştır (Wang ve diğerleri, 2016). Fosfazen türevlerinin onkolojik hastalıkların tedavisindeki potansiyeli vurgulanırken, terapötik etkinliğin artırılmasında yapısal modifikasyonların önemine dikkat çekilmiştir. Ayrıca, fosfazen-peptit konjugatlarının sentezinin, bu bileşiklerin insan meme ve kolon kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik etkilerini artırdığı bildirilmiş; bu da kanser tedavisinde kombine yaklaşımların taşıdığı potansiyeli ortaya koymuştur (Gurbanov vd., 2019; Çalışkan ve diğerleri, 2024).

3. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde, çalışmada kullanılan cihazlar, hücre hatları ile hücre kültüründe ve moleküler analiz çalışmalarında kullanılan kimyasal malzemeler ve bu malzemelerin kullanım amaçları açıklanmıştır.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan hücre hatları, kimyasallar, cihazlar ve diğer laboratuvar malzemeleri bu bölümde sunulmuştur. Tüm materyaller deneysel yöntemlere uygun şekilde temin edilmiştir.

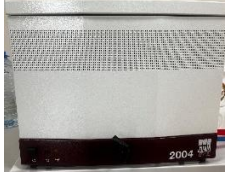
3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Tez çalışmalarında kullanılan cihazlar çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın adı	Markası	Resim
Karbondiyoksit inkübatör	Memmert (IPP30)	
Hassas terazi	Ohrus PR 4202	
Thermalcycler	Eppendorf AG 22331 (Nexus GSX1)	
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific, nano 100	

Çizelge 3.1. (devamı)

Saf su cihazı	GFL 2004	
Santrifüj	Hettich Eba 200	
Mikro santrifüj	Thermo Fisher Scientific (myspin 6)	
Mikroplaka okuyucu	Awareness technology chromate 4300	
Sterilizasyon cihazı	Nüve NC 40 M	
Vorteks	IKA (vortex 3)	
-80 °C buzdolabı	Thermo Fisher Scientific (ULT2586-9-V)	
(-20°C ve +4 °C) buzdolabı	Arçelik (2398 CYIY A++)	

Çizelge 3.1. (devamı)

Sınıf 2 kabin	Thermo Fisher Scientific, (1300)	
İnvert mikroskop	Zeiss (Axio observer 3)	
qRT-PCR cihazı	Roche (lightCycler 96)	
Mikro pipetler	Brad	

3.1.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler

Çizelge 3.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar ve kullanım alanları

Kimyasal malzemeler	Marka	Kullanım Amacı
DMEM	Gibco (2828781)	Hücre üretiminde
DMEM F-12	Biowest (Ms02CM1005)	Hücre üretiminde
Penisilin/streptomisin	Natriculture (PS1124)	Hücre üretiminde
FBS (Fetal Bovine Serum)	Cytiva	Hücre üretiminde
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Honeywell (M3210)	MTT çalışmalarında
Tipsin-EDTA	Cytiva	Hücre pasajlama
MTT Boyası	Serva (210078)	MTT çalışmasında

Çizelge 3.2. (devamı)

PBS (Phosphate Buffer Saline)	Capricorn (CP22-5305)	Hücrelerin yıkanması
Etanol	Tekkim (070222185001)	Sterilisasyon işlemlerinde
Trypan blue	Sigma (T815354)	Hücre sayımında

3.1.3. Moleküler analizlerde kullanılan malzemeler

Çizelge 3.3. Moleküler analizlerde kullanılan malzemeler

Moleküler malzemeler	Marka
RNA izolasyon kiti (NG20240603)	Nucleogene
cDNA sentez kiti (5x)	Nucleogene
qPCR SYBR Green Master Mix (2x)	Nucleogene
β -aktin	Biologo
BAX, BCL-2, KASPAS-3	Oligomer
96'lık mikroyet	Ultra flux PCR products

3.1.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan çözeltiler

CaCo-2 hücre hattında DMEM Medium (1X) besiyeri kullanıldı. Besiyerinin içerisinde 4,5g/L D-Glikoz, L-Glutamin ve pruvat bulunmaktadır. Hücre hatlarında kullanılmak üzere besiyeri içerisine DMEM (1X), %10 FBS ve %1 Penisilin/streptomisin koyularak hazırlandı ve +4⁰ C'de muhafaza edildi.

Ccd-18Co hücre hattında DMEM-F12 besiyeri kullanıldı. Besiyerinin içeriği stabil Glutamat ve 15mM Heps'ten oluşmaktadır. Hücre hatlarında kullanılmak üzere DMEM-F12, %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan besiyeri +4⁰ C' buzdolabında muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

Bu bölümde, sentezlenen bileşiklerin hazırlanışı, kullanılan hücre hatlarıyla gerçekleştirilen hücre kültürü işlemleri, sitotoksikite değerlendirmesi için uygulanan MTT analizi, total RNA

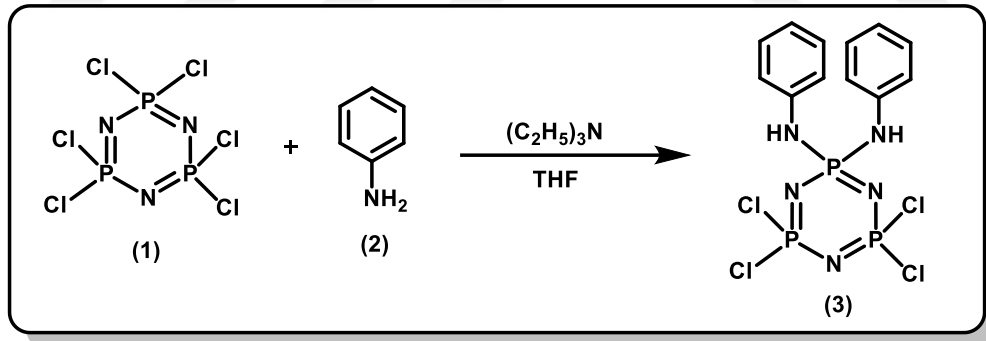
izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR yöntemine ilişkin uygulama basamakları detaylı olarak açıklanmıştır.

3.2.1. Sentezlenen bileşikler

Bu tez çalışması "Paraben türevi fosfazen bileşiğinin kolon kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik aktiviteleri" FMB-BAP 23-0589 numaralı Amasya Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan bileşikler; Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Elif ŞENKUYTU tarafından sentezlenmiştir.

Bileşiklerin Sentezlenmesi:

1. Başlangıç bileşiği olarak kullanılacak olan, siklotrifosfazenin anilin türevi bileşiği (3) literatüre uygun bir şekilde, heksaklorosiklotrifosfazen'in anilin ile 1:2 mol oranındaki reaksiyonu ile sentezlendi (Ganapathiappan ve Krishnamurthy, 1987).

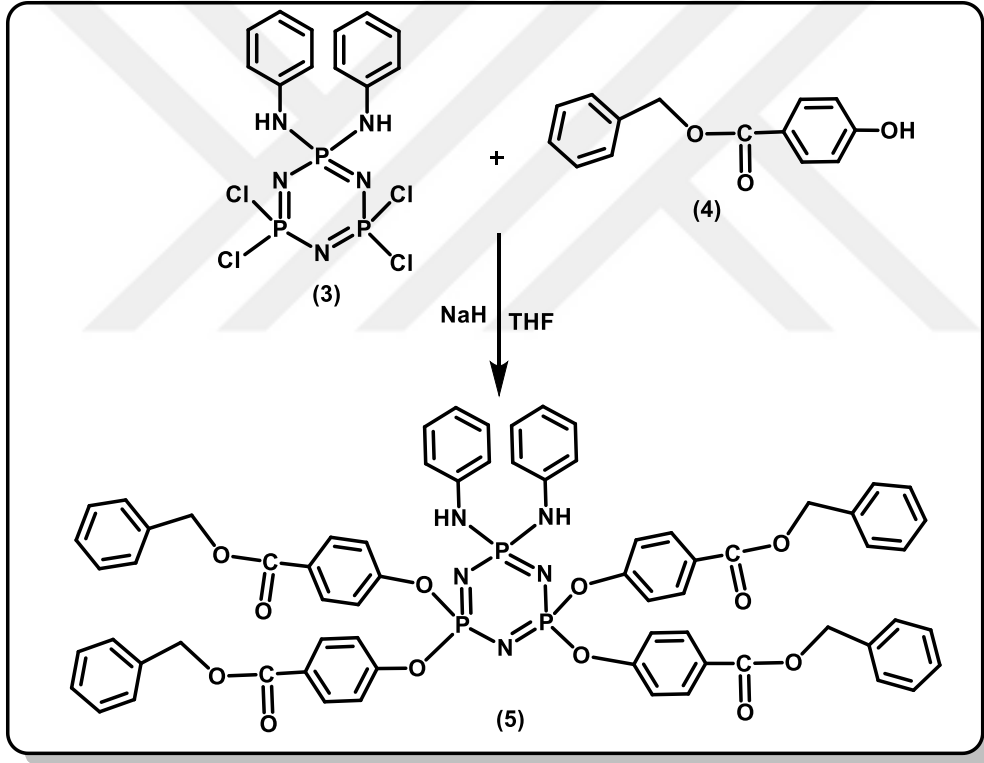


Resim 3.1. Bileşik-3'ün sentez şeması

Hekzaklorosiklotrifosfazen (5.25g, 15 mmol), 100 mL kuru tetrahidrofuranda argon atmosferinde 250 mL'lik yuvarlak dipli ve üç boyunlu bir balonda çözüldü. Reaksiyon karışımı tuz- buz banyosu ile -5°C'ye kadar soğutuldu. Soğutulan ortama trietilamin (4.33 ml, 30 mmol) ilave edildi. Anilin (2.75ml, 30mmol) 10 mL tetrahidrofurandaki çözeltisi damlatma hunisi yardımıyla 20 dakika boyunca reaksiyon ortamına damla damla ilave edildi. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek 4 gün oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Reaksiyon karışımı sinterli filtreden (G4) süzülerek trietilamin hidroklorür tuzları ayrıldı. Süzüntünün çözücüsü (THF) döner

buharlaştırıcıda kısmen vakum uygulanarak uzaklaştırıldı. Kalan reaksiyon karışımından, diklorometan:*n*-hekzan (3:1) çözücü sisteminin yürütücü faz olarak kullanılmasıyla, silikajel (70-230 mesh, 150 g.) dolgulu kolonda (3.5, 90 cm) ürün (3) (3.25g, 9.07 mmol), %61 verimle izole edildi. Beyaz renkli katı olarak izole edilen 2,2-dianilino-4,4,6,6-tetraklorosiklotrifosfazen (3) bileşiği diklorometan:*n*-hekzan (4:1) çözücü sisteminde kristallendirildi.

2. 2,2-dianilino-4,4,6,6-tetraklorosiklotrifosfazen (3) bileşiği ile benzil parabenin (4) NaH varlığında THF içerisindeki reaksiyonu sonucu yeni benzil paraben süstitüe anilino türevi siklotrifosfazen bileşiği (5) elde edildi.



Resim 3.2. Bileşik-5'in sentez şeması

Benzil paraben (4) (1.00 g, 4.44 mmol) ve NaH (0.18 g, 4.40 mmol) 10 mL kuru tetrahidrofuranda argon atmosferinde 100 mL'lik yuvarlak dipli ve üç boyunlu bir balonda çözüldü. Reaksiyon ortamına 2,2-dianilino-4,4,6,6-tetraklorosiklotrifosfazen (3) (0.5 g, 1.08 mmol) 10 mL tetrahidrofurandaki çözeltisi 10 dakika damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı TLC ile kontrol edilerek 2 gün geri soğutucu altında magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Reaksiyon karışımı sinterli filtreden (G4) süzüldü. Süzüntünün çözücüsü (THF)

döner buharlaştırıcıda kısmen vakum uygulanarak uzaklaştırıldı. Kalan reaksiyon karışımından, *n*-hekzan:THF (3:1) çözücü sisteminin yürütücü faz olarak kullanılmasıyla, silikajel (230- 400 mesh, 150 g.) dolgulu kolonda (3.5, 90 cm) iki ürün izole edildi. İzole edilen bileşiklerden ilk ürün reaksiyona girmeden ortamda kalan metil paraben bileşiğidir (4). İzole edilen ikinci ürün 5 bileşiği (0.73 g, 0.6 mmol), %55 verimle elde edildi.

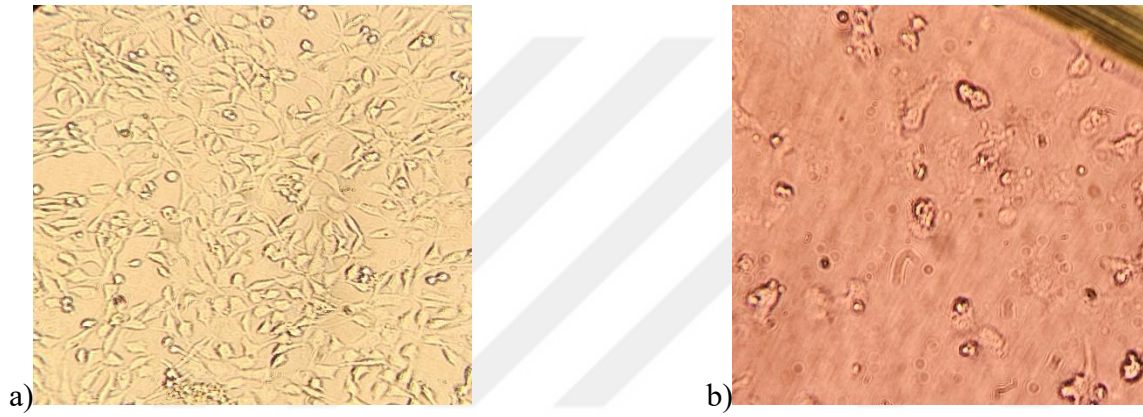
3. Reaksiyonlardan elde edilen bileşikler (3 ve 5) uygun ayırma yöntemleri ile ayrıştırılıp saflaştırıldı. Saflaştırılan bu bileşiklerin yapıları; kütle spektrometresi, ³¹P ve ¹H NMR spektroskopisi yöntemlerinden elde edilen veriler ile aydınlatıldı.

3.2.2. Hücre kültürü

Bu tez çalışmasında Ecotech Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme San. ve Tic. Ltd: Şti (Erzurum)'dan satın alınan CaCo-2 (insan kolon adenokarsinom hücre hattı, kolon kanseri) ve Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarından CCD-18Co (insan kolon fibroblast hücre hattı, normal kolon hücresi) temin edilen hücre hatları kullanılmıştır. Caco-2 hücre hattı, insan kolon adenokarsinomundan türetilmiş olup, *in vitro* sitotoksisite ve absorpsiyon çalışmalarında sıkça tercih edilen iyi karakterize edilmiş bir model sistemdir. Hücre kültüründen elde edilen sonuçların güvenilirliği, kültür koşullarının standartlara uygun şekilde yürütülmesine bağlıdır. Bu bağlamda, Caco-2 hücreleriyle yapılacak deneylerde morfolojik bütünlüğün korunması, doğru pasaj sayısı kullanımı ve uygun kültür süresi gibi iyi hücre kültürü uygulamaları büyük önem taşır (Natoli, Leoni, D'Agnano, Zucco ve Felsani, 2012). Hücre hatları %10'luk FBS ve %1'lik penisilin/streptomisin içeren CaCo-2 (ATTC: HTB-32) hücre hattında DMEM ve CCD-18Co (ATCC: CRL-1459) hücre hattında DMEM-F12 besiyeri kullanılarak (çizelge 3.4) 25 cm² ve 75 cm² 'lik flasklarda, %96 nem, %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıkta etüvde 24 saat inkübasyon bırakılarak çoğalması sağlandı. Hücreler %80 doygunluğa ulaşınca kadar üretildi. Çoğalan hücrelerden pasajlama işlemi yapıldıktan sonra bu hücreler yeni flasklara aktarıldı. Bu işlem sonrasında hücreler invert mikroskop kullanılarak kontrol edildi ve morfolojileri görüntülendi.

Çizelge 3.4. Hücre kültüründe kullanılan besiyerleri ve serumlar

Hücre hatları	Besiyerleri	Serumlar
CaCo-2	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	FBS (Fetal sığır serumu)
CCD-18Co	DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)	FBS (Fetal sığır serumu)



Resim 3.3. Çalışmada kullanılan hücre hatları görüntüsü. a) CCD-18Co, b) CaCo-2

3.2.2.1. Hücrelerin açılması

Hücre açılması, dondurulmuş hücrelerin uygun koşullarda çözülerek tekrar kültüre alınması işlemidir. Bu süreçte hücreler, canlılıklarını korumak için kontrollü sıcaklıkta ve steril ortamda çözündürülür. Hücre açılma aşmaları ile aşağıda anlatılmıştır.

- Hücreler, -80°C veya sıvı azot tankından (-196°C) alındıktan sonra, önce -20°C 'de
 - belirli bir süre bekletildi ve ardından oda sıcaklığında çözüldü.
- 25 cm²'lik bir flaska 6 mL besiyeri eklenip, flaskın üzerine kullanılan besiyeri türü, hücre adı, tarih ve pasaj numarası yazıldı.

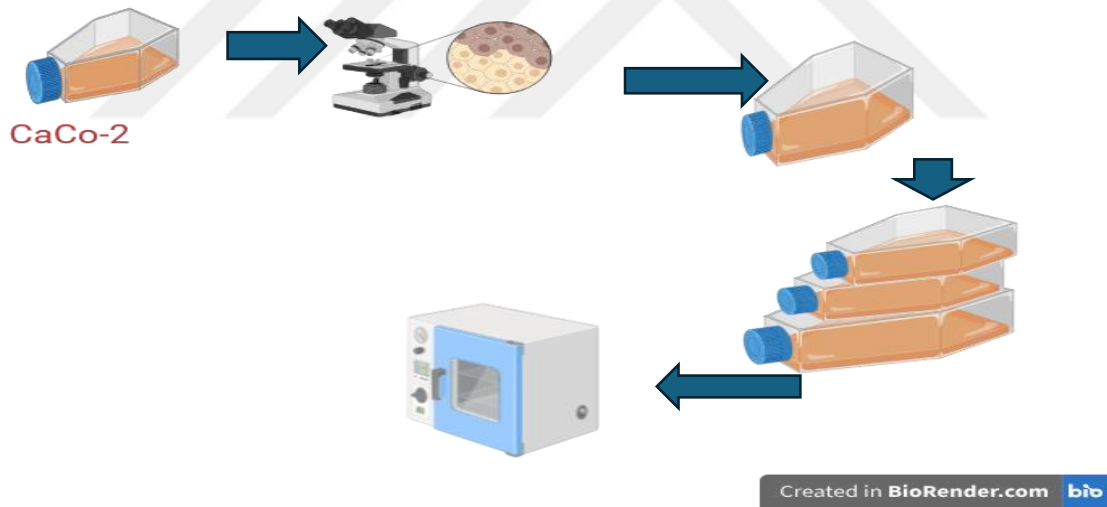
- Oda sıcaklığında çözölen hücreler, içinde 3 mL besiyeri bulunan 15 mL'lik bir falkon tüpüne alındı. Ardından, 6.000 rpm hızında 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürölüp toplandı.
- Santrifüj sonrası üst sıvı (supernatant) pipetle uzaklaştırıldı ve dipteki pelet üzerine 1 mL besiyeri eklenerek pipetle karıştırılıp çözölmesi sağlandı. Son olarak, hücreler daha önce hazırlanmış flaska ekim işlemi yapıldı.
- Hücreler, invert mikroskopla incelenerek kontrol edildi. Hücrelerin yüzeye yapışmasını sağlamak için 24 saat boyunca etüvde bekletildi.

3.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması

Pasajlama, hücrelerin aşırı çoğalmasını önlemek ve sağlıklı bir kültür sürdürebilmek için uygun yoğunluğa ulaştıklarında yeni kültür kaplarına aktarılması işlemidir.

- Hücrelerin doygunluğu %80 ve üzeri olduğunda hücrelerin pasajlanması yapıldı.
- Flaskın içerisindeki besiyeri dökölerek üzerine 1 mL PBS ile hücrelere yıkama işlemi yapılır.
- Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için 2 mL %0,05 (1X) tripsin- EDTA eklendi. Hücrelerin daha hızlı bir şekilde flask yüzeyinden ayrılması için 5-6 dakika CO₂ etüvde inkübe edildi.
- Etüvde inkübasyondan sonra flaskların içerisine tripsin-EDTA'nın iki katı miktarında besiyeri eklendi.
- Tripsin-EDTA, hücre ve besiyeri karışımı steril 15 mL falkon tüpe alınarak 6 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Tüpdeki süpernatant atılarak hücreler 1ml besiyeri kullanılarak ve pipetaj yapılarak çözöldü.

- Hücreleri aktaracağımız yeni flaskların üzerine hücre ismi, tarih, besiyeri adı, pasaj numarası, pasaj yapan kişi ismi yazılarak hazırlanmış olan flasklara hücre ekimi yapıldı.
- İnkübasyona bırakmadan önce hücre canlılığı invert mikroskopta kontrol edildi.
- Hazırlanan yeni flasklar 37 °C'de, %97 nemli ortamda ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.
- Hücre ekiminden 24 saat sonra hücreler mikroskopta kontrol edildi.
- İnkübasyon süresince ölü hücreler besiyeri değiştirme aşamasında uzaklaştırıldı. Deneyler için yeterli hücre sayısına ulaşıncaya kadar pasajlama işlemine devam edildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1.Hücrelerin pasajlanması (Biorender)

3.2.2.3. Hücrelerin dondurulması

Hücre dondurma, hücrelerin uzun süreli saklanması amacıyla özel koruyucu solüsyonlar (örneğin DMSO) kullanılarak düşük sıcaklıklarda (-80°C veya sıvı azotta) muhafaza edilmesidir.

- Dondurma işlemi yapılacak hücrelerin bulunduğu flastaki besiyeri döküldükten sonra flask içine (25'lik flastlara 1mL, 75'lik flastlara 2 mL PBS ekleyerek 2 defa yıkama yapılır) PBS eklenerek hücreler yıkandı.
- 75'lik flask içerisine 2 mL tripsin-EDTA eklenerek 5-6 dakika etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra tripsin-EDTA'nın iki katı kadar besiyeri eklenerek karışım 15 ml'lik falkon tüpe alındı. Falkon tüp 6 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
- Buz üzerinde çalışılarak her 1,5 ml cryotüpe 800 µL besiyeri-(%80) hücre karışımı koyuldu, 200 µL FBS (%20) ve 100 µL DMSO (%10) eklendi.
- Bir süre tüpler -20 °C'de bekletildikten daha sonra -80 °C'de muhafaza edildi. Uzun süre saklamak için -196 °C sıvı azot tankında depolandı.

3.2.3. MTT analizi

MTT analizi, hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla metabolik aktiviteye bağlı olarak formazan kristali oluşumuna dayanan kolorimetrik bir testtir. Çalışmada, CaCo-2 ve CCD-18Co hücrelerinde sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.3.1. MTT yöntemi

Çalışma prensibi; MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) testi, hücrelerin canlılığını değerlendirmek için kullanılan, hücrelerin metabolik aktivitesini ölçen renk değişim testidir (Mosman, 1983; Konsoula ve Barile, 2005). MTT, sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur. Canlı hücreler mitokondriyal redüktaz enzimleri sayesinde MTT'yi indirgeyerek mavi-mor renkte formazan kristalleri oluşturur. Bu kristaller hücrelerdeki canlılık ve metabolik aktivitenin varlığının ölçüldüğü renk yoğunluğu ile orantılıdır. Formazan kristalleri DMSO ile çözündürülerek, çözeltinin renk yoğunluğu 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda ölçülerek sitotoksik aktiviteleri belirlenmektedir. Bileşiklerin, CaCo-2 (kolon kanseri), CCD-18Co (normal kolon epiteli) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile firmanın kullanma talimatına göre uygulanarak,

incelenmiştir. MTT yöntemi için optimizasyon çalışmaları sonucu 1×10^4 /kuyu olacak şekilde hücre sayısı belirlenmiştir.

3.2.3.2. Hücrelerin sayısı

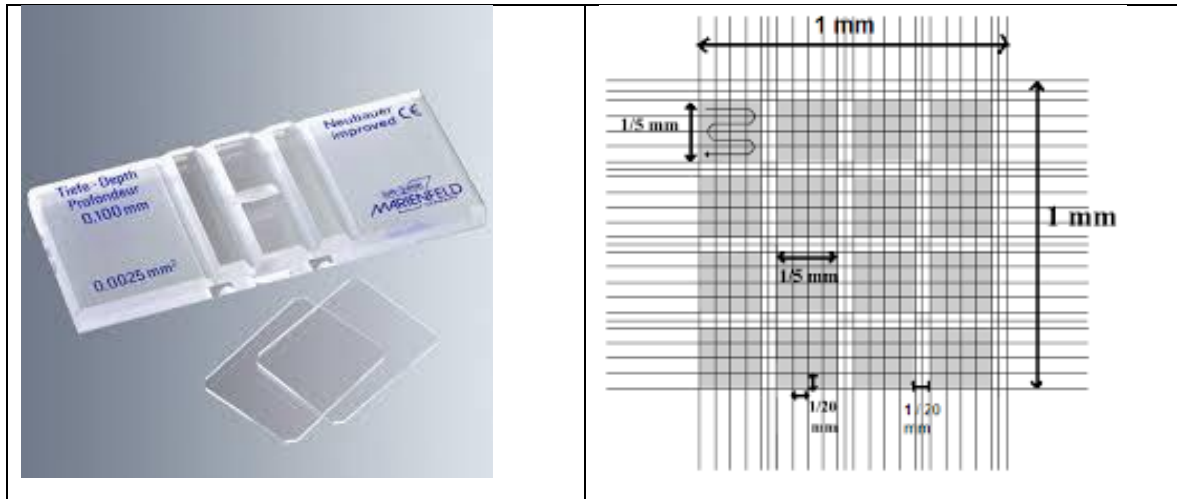
Pasajlama sırasında 15 mL falkon tüpe alınan hücreler 6 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldıktan sonra 1000 μ L besiyeri eklenerek pipet yardımıyla pelet çözüldü. Karışımdan 10 μ L alınarak 0.5 mL’lik tüpe eklendi ve üzerine 10 μ L trypane blue boyası ilave edildikten sonra thoma lamı üzerine koyularak lamel kapatıldı. Thoma lamı üzerinde bulunan 16 karedeki hücreler ışık mikroskobu yardımı ile sayıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak hücre sayısı hesaplandı:

A (sayım alanı içindeki hücre sayısı) x 2 (dilüsyon oranı) x 10^4 formülüne dayanarak hücre sayımı belirlendi.

Thoma lamı kare alanın kenarı 1 mm, yüksekliği 0,1 mm hacmi= $1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3$ etmektedir ($1 \text{ ml} = 1000 \text{ mm}^3$) (resim 3.4.).

$A = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ mL}$ ’dir. Yani bir mL’nin 10 000 de biridir.

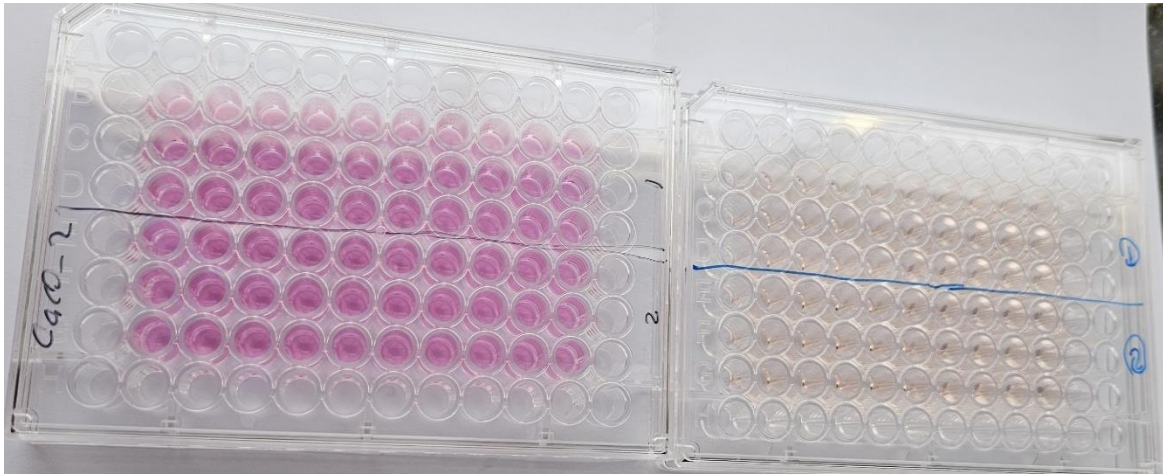
A alanı içinde sayılan hücre konsantrasyonu = (sayılan hücre sayısı / sayılan A numaralı alan sayısı) x 10 000’dir (Jain, Pento ve Greves, 1992).



Resim 3.4. Thoma lamında sayım işlemi

3.2.3.3. Hücrelerin ekimi

MTT yönteminin uygulanmasına hazırlık olarak 24 saat önceden 96 kuyucuklu pleytlere her kuyuya 1×10^4 hücre olacak şekilde, 100'er μL besiyeri + hücre karışımından ekim işlemi gerçekleştirildi. 24 saat 37°C %96 nemli ortamda ve %5 CO_2 etüvde inkübe edilerek hücrelerin yüzeye yapışması sağlandı (Resim 3.5.).



Resim 3.5 MTT yöntemi için hücre ekimi

3.2.3.4. Test bileşiklerinin hazırlanması

Bileşiklerin moleküler ağırlıkları göz önünde bulundurularak molarite hesaplamaları yapıldı ve her bir bileşik DMSO içinde final konsantrasyonu 1mM olacak şekilde hazırlandı.

3.2.3.5. Bileşiklerin uygulanması

DMSO ile çözdürülerek hazırlanmış olan 1 mM stok bileşiklerden 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM ve 1,56 μM olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlandı. Bileşik konsantrasyonlarına göre hesaplanan miktarda besiyeri kullanılarak 96'lık pleytlere üç tekrarlı her kuyuda 100 μL olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol olarak CaCo-2 hücre hattı için DMEM, CCD-18Co hücre hattı için DMEM-F12 kullanıldı. Pozitif kontrol olarak Doxorubicin (Adriamisin, 2mg/mL) kullanıldı. Çözücü kontrol olarak DMSO 1/1000 oranında hazırlandı. Pleytler 24 saat karbondioksit etüvde inkübasyona bırakıldı (Resim 3.6.).



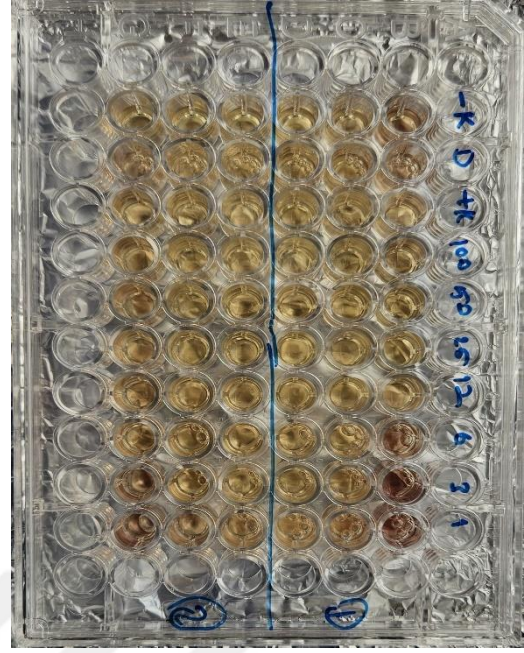
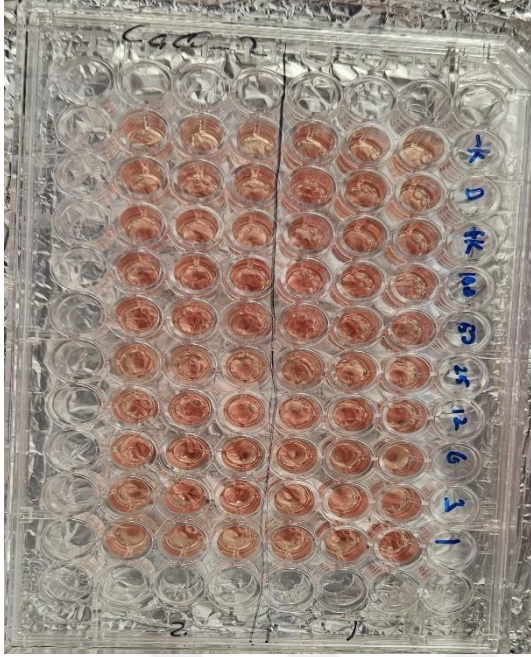
Resim 3.6.Bileşikler uygulandıktan sonra pleytlerin kontrolü

3.2.3.6. MTT boyasının hazırlanması ve pleytlere ekimi

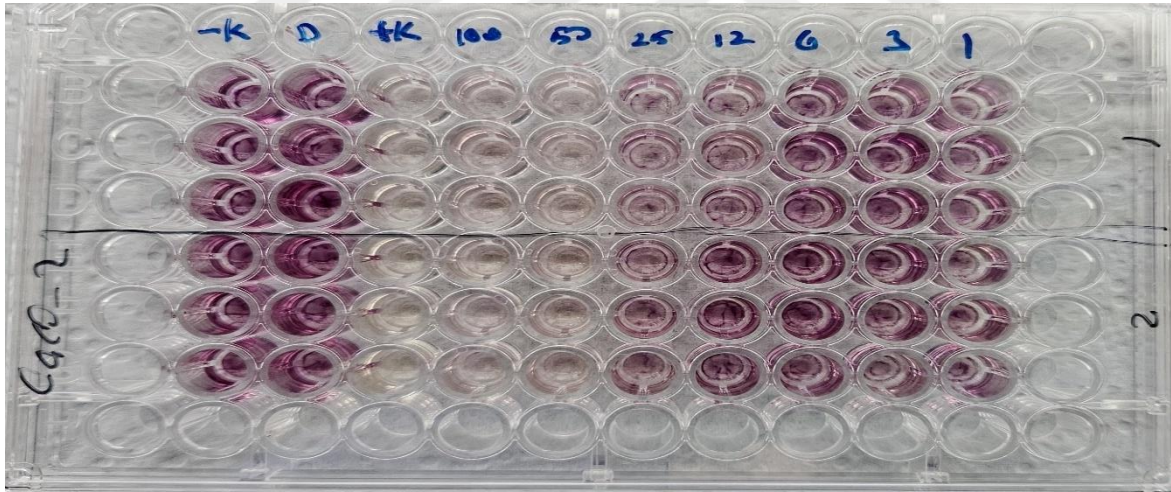
MTT boyası ışığa duyarlı olmasından dolayı karanlık ortam uygundu. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler boyanma işlemi için hazırlandı. 15 mL falkon tüp içerisinde 15 mg olarak tartılan MTT (5mg/mL), 3 mL PBS içinde pipetleme yapıldıktan sonra vortekslenerek çözdürüldü ve üzerine 12 mL besiyeri eklenerek MTT boyası hazırlandı. Hazırlanan MTT çözeltisi pleyteki her kuyu için 100 μ L olacak şekilde ekim yapıldı. Işıktan korumak için pleytler işlemiden sonra aliminyum folyoya sarılarak 3-4 saat arasında etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda pleyt içindeki karışım döküldü ve her kuyuya 100 μ L saf DMSO eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra spektrofotometrede 570 nm absorbans değerinde okutma işlemi yapıldı (Resim 3.7) (Resim 3.8.). Absorbans ölçüm sonuçlarına göre Microsoft excel programı yardımı ile uygulanan doz ve yüzdelik canlılık eğrisi aşağıdaki formüle göre belirlendi. %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Prism 9 programı kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Sitotoksosite} = \frac{\text{Test absorbans değeri}}{\text{kontrol absorbans değeri ortalaması}} \times 100$$

Hesaplanan değerlere göre iki bileşik için grafikler hazırlandı ve bileşiklerin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilerek, veriler negatif ve pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldı.



Resim 3.7.MTT boyası eklenmiş pleytler



Resim 3.8.DMSO eklenmiş pleytler

3.2.4. MTT verilerinin istatistiksel analizi

Bileşiklerin üç tekrarlı analiz sonuçları ile IC50 değerleri ve istatistik verileri one-way anova dunnett testi) ile Prism 9 programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.5. Total RNA izolasyonu

Öncelikle CaCo-2 hücre hattı 24 saat boyunca 37°C’de etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 6 kuyulu pleytlere her bir kuyuya 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi (Resim 3.9.).



Resim 3.9. RNA izolasyonu için hücre ekimi ve sonrası hücrelerin izolasyonu

MTT boyama sonucuna göre bileşiklerin sitotoksik dozları CaCo-2 hücre hattında Bileşik-3 için 12,5 μ M, Bileşik-5 için 25 μ M olarak belirlendi. Birinci kuyuya negatif kontrol için 3 mL besiyeri koyuldu. Bileşik-3’ten 37,5 μ L alınarak üzerine 3 mL besiyeri eklendi, Bileşik-5’ten 75 μ L alınarak üzerine 3 mL besiyeri eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 6 kuyulu pleyttteki besiyeri dökülerek üzerine her kuyuya 2 mL PBS olacak şekilde hücreler yıkandı. Hücreleri kaldırmak için her kuyuya 1 mL tripsin-EDTA eklendikten sonra 5-6 dk etüvde inkübe edildi ve hücreler kaldırıldı. İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerine tripsinin iki katı besiyeri eklenerek falkon tüplere aktarıldı. 6 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı. Total RNA izolasyonu için gerekli aşamalar kullanılan kitle önerilen protokole göre uygulandı;

- Bir örnek numune için eşit hacimde 400 μ L Lizis Buffer ve 400 μ L %100 etanol 15 mL’lik tüpe alındı. Her bir örnek için 800 μ L Lizis-etanol karışımı hazırlandı vorteks yapıldıktan sonra hücrelerin üzerine eklendi. Pipetaj yapılarak tüpün dibindeki hücrelerin homojen bir şekilde çözünmesi sağlandı. Etanol-lizis karışımı hücrelerin parçalanmasını sağlayarak RNA’nın ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

- Spin kolona hücreler aktarılıp 14 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonun dip kısmında kalan sıvı dökülerek uzaklaştırıldı.
- DNAs 1 hazırlanırken; her bir örnek için 5 μ L DNAs 1’den 2 mL’lik tüpe alındı, üzerine 45 μ L DNAs Buffer eklendi ve hafifçe ters çevirerek karıştırıldı. Sonra 50 μ L’lik karışım spin kolonun merkezine eklendi 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra spin kolonuna 400 μ L yıkama 1 tamponundan eklenerek 11 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri içinde biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- Yıkama tamponu 1’den 400 ‘er μ L alınarak spin kolona eklendi ve 11 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek toplama tüpünde kalan sıvı atıldı.
- Yıkama tamponu 2’den 700’er μ L alınarak spin kolona eklendi ve 14 000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpünde kalan sıvı atıldı.
- Spin kolonlara çözelti eklemeden ikinci kez 14 000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek etanolün tamamının uzaklaştırılması sağlandı.
- Santrifüjden sonra spin kolonlar yeni temiz toplama tüplerine aktararak üzerine 50 μ L elusyon buffer eklendi ve 14 000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüplerde toplanan RNA örnekleri cDNA çalışmalarında kullanılmak üzere -20 $^{\circ}$ C’de buzdolabında saklandı (Resim 3.10.).



Resim 3.10. İzolasyon sonrası RNA stokları

İzole edilen RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu nanodrop (Thermo Fisher Scientific /Multiskan) cihazı kullanılarak 260 ve 280 nanometrede ölçüldü.

3.2.6. cDNA (Komplementer DNA) sentezi

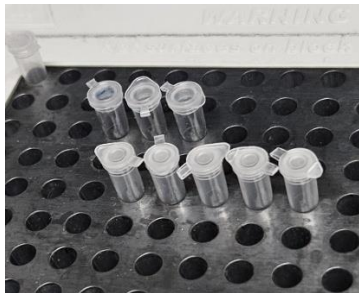
Total RNA'ların komplementer zincirleri hazırlandıktan sonra "Nucleogene ; cDNA sentez kiti (NG20240223) ve Mastercycler Nexus GSX1 kullanılarak cDNA sentezlendi. Kit protokolüne göre uygulanan sentez programı çizelge gösterildi (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. cDNA sentez programı

1.aşama	25°C'de 5 dakika
2. aşama	50°C'de 30 dakika
3. aşama	85°C'de 5 dakika

cDNA protokolüne göre;

- Her bir tüpe 6 µL nükleaz içermeyen su eklendi.
- Kontrol grubu, Bileşik-3 ve Bileşik-5'ten 10'ar µL RNA örnekleri tüplere koyuldu.
- cDNA sentez kitinden 4'er µL her bir tüpe eklendi, tüplerin toplam hacmi 20 µL oldu.
- Sentez döngüsü toplam 45 dakikada tamamlandı, elde edilen cDNA'lar -20°C buzdolabında muhafaza edildi (Resim 3.11.).



Resim 3.11. cDNA sentezi sonucunda elde edilen cDNA stokları

3.2.7. Gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR)

National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanından çalışmada kullanılacak genlerin dizileri belirlenerek bu genlerin Real Time (qRT-PCR) için gerekli olan primer dizileri NCBI primer blast programı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) ile belirlendi. PZR çalışmalarında ilk olarak β -Aktin, BAX, BCL-2 ve Kaspaz-3 genlerine ait bağlanma sıcaklıklarını belirlemek için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi (Çizelge 3.7.). Kit protokolüne göre çizelge 3.6.'da görüldüğü miktarlarda PZR tüpleri hazırlandı ve amplifikasyon programına göre Roche lightCycler 96 PZR cihazı kullanılarak mRNA ekspresyon düzeyleri ölçüldü qRT-PCR işlemi sonrası erime eğrisi (melt curve) analizi yapılarak primerlerin özgünlüğü belirlendi (Resim 3.12.) (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.6. qRT-PCR protokolü

Sybr Green Master Mix (2X)	10 μ L
Forward primer	2 μ L
Reverse primer	2 μ L
Nukleaz içermeyen su	4 μ L
cDNA	2 μ L
Toplam	20 μ L



Resim 3.12.qRT-PCR çalışması

Çizelge 3.7. Primer dizileri, aksesyon numaraları ve primer uzunlukları

Genler	Primer Dizileri (5'-3')	Aksesyon	Uzunluk	°C
β-Actin F	CTTCGCGGGGCGACGAT	NM_001101.5	103	59
β-Actin R	CACATAGGAATCCTTCTGACCCAT			
BAX F	TCATGGGCTGGACATTGGAC	NM_001291428.1	114	59
BAX R	GAGACAGGGACATCAGTCGC			
BCL-2 F	ATCTGGGCCACAAGTGAAGTC	NM_000633.2	209	59
BCL-2 R	TTCGACGTTTTGCCTGAAGAC			
CASP-3 F	GGCGCTCTGGTTTTTCGTTAAT	NM_001354777.1	239	59
CASP-3 R	CGACATCTGTACCAGACCGA			

Çizelge 3.8. qRT-PCR amplifikasyon programı

Başlangıç denatürasyonu	95°C	15 dakika
Denatürasyon	95°C	30 saniye
Bağlanma sıcaklığı	β-Aktin 59 °C BAX 59 °C BCL-2 59 °C Kaspaz-3 59 °C	60 saniye
Uzama	72 °C	30 saniye
Erime	90 °C	10 saniye

qRT-PCR analizi ile Ct (cycle threshold) değeri, floresan sinyal miktarının belirlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değeri) geçen döngü sayısının tespit edilmesi için önemlidir. Ct değeri ne kadar düşükse, gen ifadesi o kadar erken bir döngüde tespit edilmeye başlar. Gen ifadesinin tespiti için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin hesaplanması aşağıdaki işlem basamaklarına göre yapılmıştır.

Referans gen için ΔCT değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta CT = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$$

Her primer grubu için $\Delta\Delta CT$ değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct (\text{hedef gen}) - \Delta Ct (\text{referans gen})$$

Genlerin ifadelerinin yukarı (upregule) ya da aşağı (downregule) yönde regüle olup olmadığı, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemiyle hesaplanan değerler aracılığıyla belirlendi (Livak ve Schmittgen, 2001).



4. BULGULAR

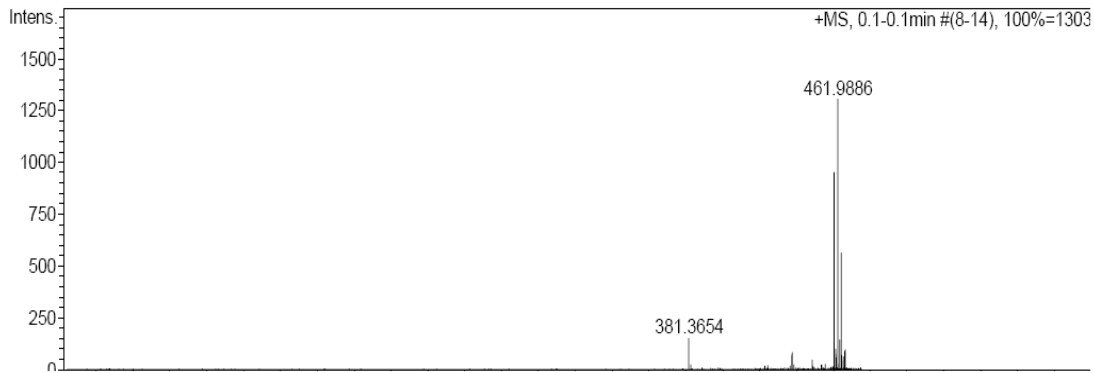
Bu bölümde, deneysel çalışmalarda elde edilen veriler ve analiz sonuçları sunulmuştur. Bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri, gen ekspresyon değişimleri ve diğer deneysel bulgular grafik, tablo ve şekillerle desteklenerek açıklanmıştır.

4.1. Bileşiklerin Analizleri

Bu çalışmada kolorektal CaCo-2 hücre hattında siklotrifosfazen türevi bileşiklerin sitotoksik ve apoptotik aktiviteleri araştırıldı. Çalışmanın ilk aşaması; potansiyel anti-kanser aktivite göstermesi beklenen siklotrifosfazen türevi bileşiklerinin (Bileşik 3-5) sentez, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarını içermektedir.

Sentezlenen Bileşiklerin (3 ve 5) Yapı Analizleri

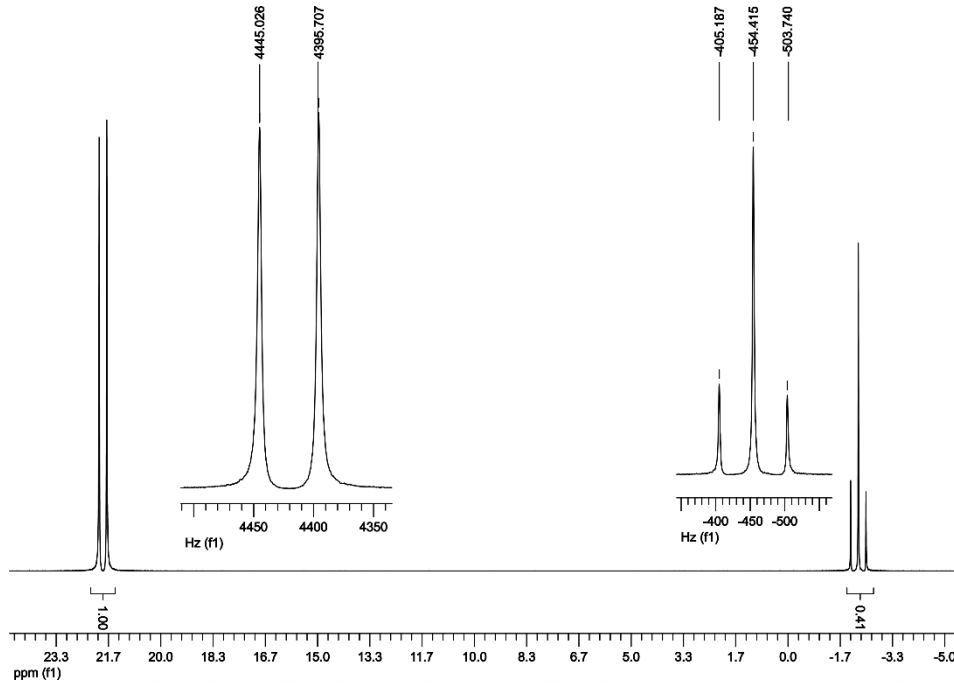
Bileşik-3'ün elektron sprey iyonlaşma (ESI) tekniği ile alınmış kütle spektrumunda moleküler iyon piki 461,98 m/z (%100) olarak görülmektedir ve beklenen değerle (461) uyum göstermektedir. Spektrumda klor izotop pikleri incelendiğinde yapıda dört klor atomu olduğu görülmektedir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Bileşik-3'ün kütle spektrumu

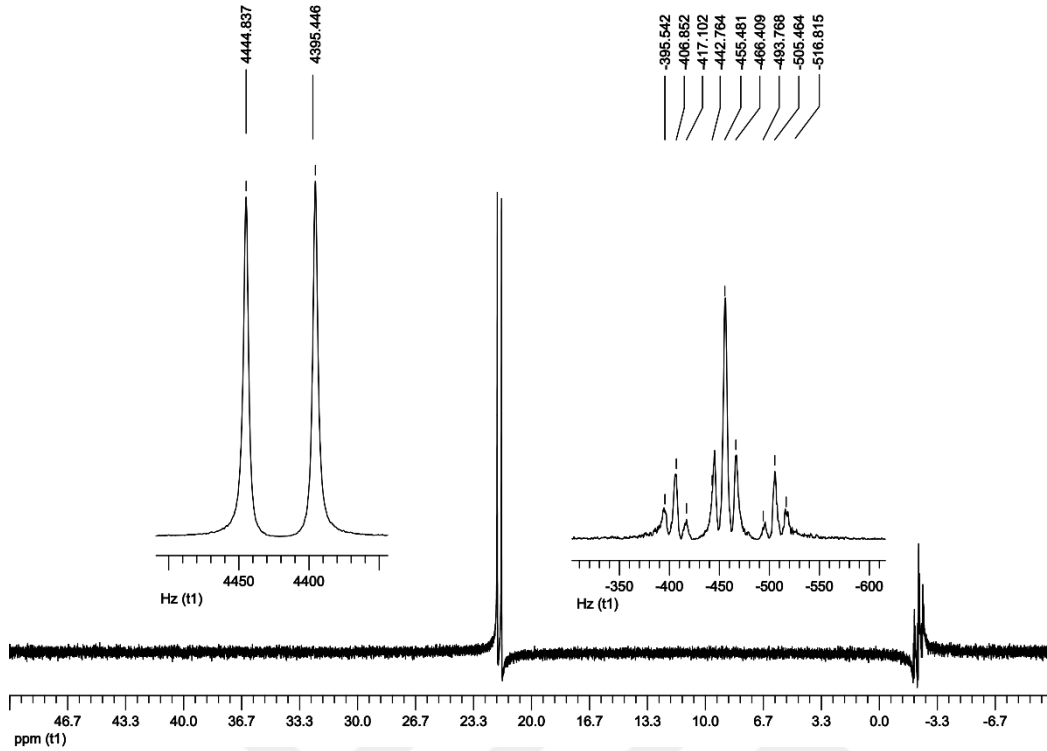
Bileşik-3'ün proton ile eşleşmemiş ^{31}P NMR spektrumunda, A_2X spin sistemi gözlenmektedir. $\delta=21.8$ ppm' de rezonansa gelmiş olan ikili pik PCl_2 gruplarındaki fosfor atomlarına aittir ve bu pik $\text{P}(\text{NHPh})_2$ grubundaki fosfor atomundan dolayı ikiye ($^2J_{\text{PNP}}=49.19$ Hz) yarılmıştır $\delta = -2.25$ ppm'de görülen üçlü pik iser $\text{P}(\text{NHPh})_2$ grubunda bulunan

fosfor atomuna aittir. Bu pik, komşu PCl_2 gruplarında bulunan fosfor atomlarından dolayı üçe ($^2J_{\text{PNP}}=49.19$ Hz) yarılmıştır. Bu spektruma ait integral değerleri 1:0.41 olup sırasıyla 2:1 fosfora karşılık gelmektedir (Şekil 4.2.).



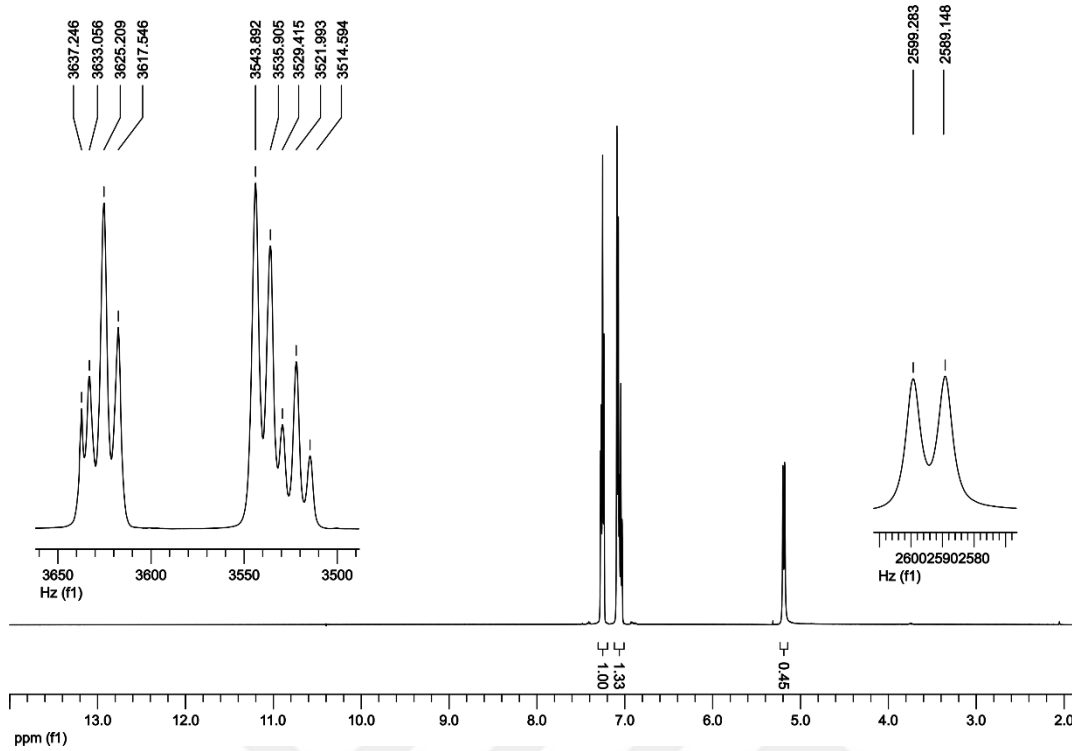
Şekil 4.2.Bileşik-3'ün proton ile eşleşmemiş ^{31}P NMR spektrumu

Bileşik-3'ün proton ile eşleşmiş ^{31}P NMR spektrumunda, $\delta=21.7$ ppm' de rezonansa gelmiş olan ikili pik PCl_2 gruplarındaki fosfor atomlarına aittir ve eşleşebileceği proton atomunun olmaması nedeniyle değişmeden kalmıştır. $\delta = -2.26$ ppm'de görülen üçlü pikler, $\text{P}(\text{NHPh})_2$ grubunda bulunan fosfor atomuna aittir. Bu pik, komşu PCl_2 gruplarındaki iki fosfor atomundan dolayı üçe; komşu azot atomu üzerinde bulunan protonlardan dolayı da tekrar üçe yarılarak üçe yarılmıştır (Şekil 4.3.).



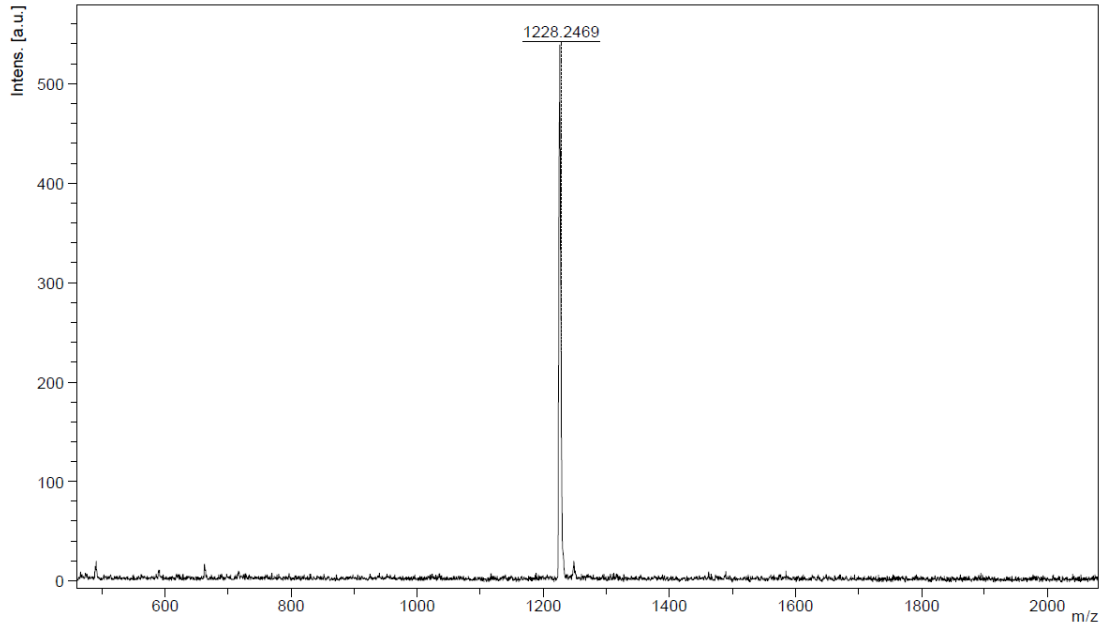
Şekil 4.3. Bileşik-3'ün proton ile eşleşmiş ^{31}P NMR spektrumu

Bileşik-3'ün fosfor ile eşleşmiş ^1H NMR spektrumunda, $\delta = 5.19$ ppm'de NH protonları rezonansa gelmiştir. Buradaki NH protonu, komşu fosfor atomundan dolayı ikiye yarılmıştır. $\delta = 7.02$ - 7.10 ppm arasında *m*- ve *p*-karbon atomlarına ait protonlar, $\delta = 7.22$ - 7.29 ppm'de *o*-karbon atomunun protonları rezonansa gelmiştir. İntegral değerleri de sırasıyla; 1:1.33:0.45 olup; sırasıyla 4:6:2 protona karşılık gelmektedir (Şekil 4.4.).



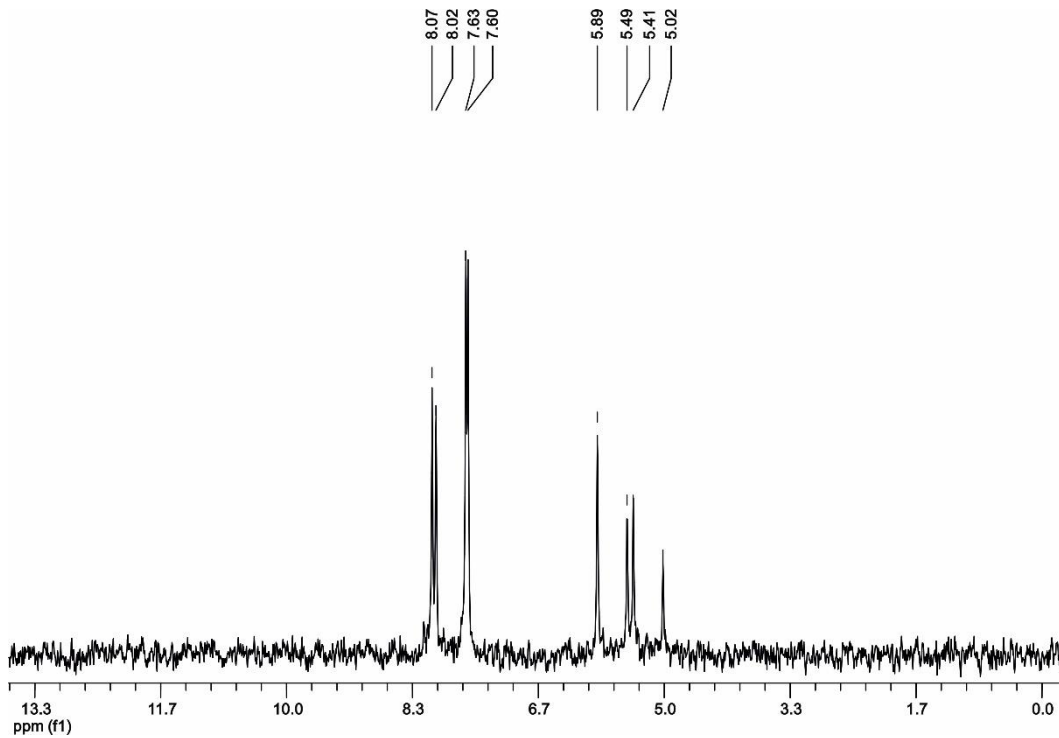
Şekil 4.4.Bileşik-3'ün fosfor ile eşleşmiş ^1H NMR spektrumu

Bileşik-5'in Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşma (MALDI) tekniği ile alınmış kütle spektrumunda moleküler iyon piki 122824 m/z (%100) olarak görülmektedir ve beklenen değerle (1228.14) uyum göstermektedir. Spektrumda klor izotop pikleri incelendiğinde yapıda dört klor atomu olduğu görülmektedir (Şekil 4.5.).



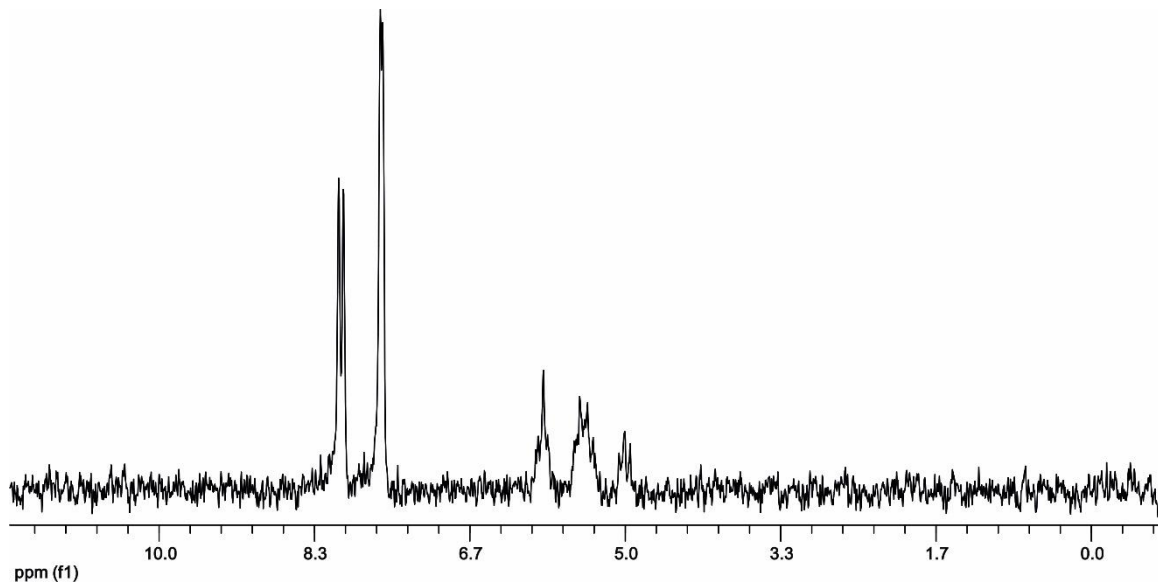
Şekil 4.5. Bileşik-5'in kütle spektrumu

Bileşik-5'in proton ile eşleşmemiş ^{31}P NMR spektrumunda, AB_2 spin sistemi gözlenmektedir. $\delta=5.49$ ppm' de rezonansa gelmiş olan sinyaller $\text{P}(\text{NHPh})_2$ grubundaki fosfor atomuna aittir. $\delta = 7.81$ ppm'de görülen üçlü pik iser $\text{P}(\text{O}_2)$ gruplarında bulunan fosfor atomlarına aittir ($^2J_{\text{PNP}}=71.20$ Hz) (Şekil 4.6.).



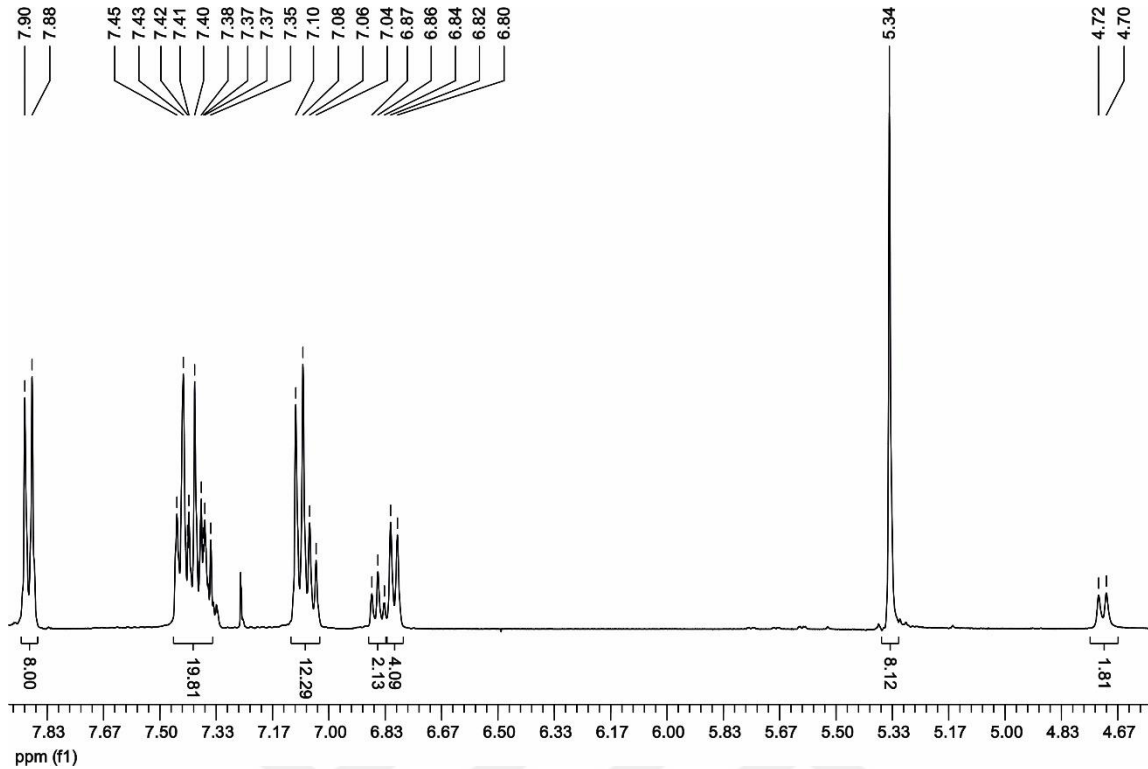
Şekil 4.6.Bileşik-5'in proton ile eşleşmemiş ^{31}P NMR spektrumu

Bileşik-5'in proton ile eşleşmiş ^{31}P NMR spektrumunda, $\delta=5.49$ ppm' de rezonansa gelmiş olan sinyaller $\text{P}(\text{NHPh})_2$ grubundaki fosfor atomuna aittir. Bu pik, komşu $\text{P}(\text{O})_2$ gruplarındaki fosfor atomundan yarıldıktan sonra komşu azot atomu üzerinde bulunan protonlardan dolayı da tekrar üçe yarılarak üçe yarılmış ve çoklu sinyaller şeklinde görülmüştür. $\delta = 7.81$ ppm'de görülen üçlü pik iser $\text{P}(\text{O})_2$ gruplarında bulunan fosfor atomlarına aittir ve eşleşebileceği proton atomunun olmaması nedeniyle değişmeden kalmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Bileşik-5'in proton ile eşleşmiş ^{31}P NMR spektrumu

Bileşik-5'in fosfor ile eşleşmiş ^1H NMR spektrumunda, $\delta= 4.71$ ppm'de NH protonları rezonansa gelmiştir. Buradaki NH protonu, komşu fosfor atomundan dolayı ikiye yarılmıştır. $\delta=6.80\text{-}7.90$ ppm arasında aromatik protonlar, $\delta=5.34$ ppm'de $-\text{O}-\text{CH}_3$ atomunun protonları rezonansa gelmiştir. Protonlara ait integral değerleri de yapıyı doğrulamaktadır (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8.Bileşik-5'ün fosfor ile eşleşmiş ^1H NMR spektrumu

4.2. Sitotoksik Aktivite (MTT analizi)

En etkili dozu belirlemek amacıyla, CaCo-2 ve CCD-18Co hücre hatlarında bileşik-3 ve bileşik-5, DMSO içinde çözülerek 1,56 μM -100 μM konsantrasyon aralığında çalışıldı. Her iki hücre hattında, her bileşiğin sitotoksik etkisi, spektrofotometrik MTT yöntemi ile ölçüldü. Microsoft Excel programı ile uygulanan doz miktarları ile % hücre canlılık eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon değeri (IC_{50}) sütun grafiği ile hesaplandı.

Bileşik-3 için etkin dozunun belirlenmesi

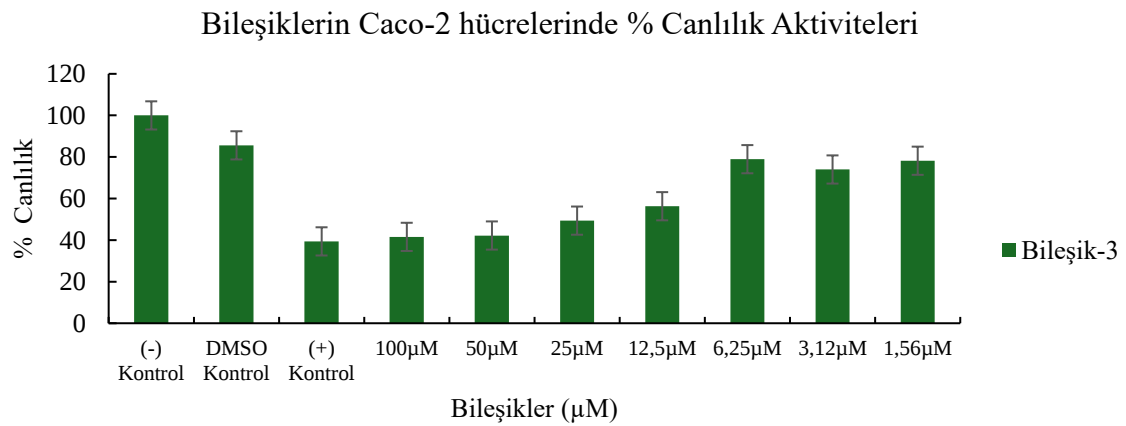
CaCo-2 hücre hattında: Bileşik-3'ün hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında en iyi etkiyi 100 μM , 50 μM ve 25 μM konsantrasyonlarda gösterdi.

CaCo-2 hücre hattında Bileşik-3 için absorbans aralığı 0,408 ile 0,767 arasında ve % canlılık 41,558 ile 78,185 aralığında hesaplandı (Çizelge 4.1.).

12,5-1,56 konsantrasyon aralığında düşük aktivite gösterdiği belirlendi. Bu bileşik (+) kontrol grubu olarak kullanılan doksorubisin bileşiği ile kıyaslandığında daha fazla sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.9.).

Çizelge 4.1. Bileşik-3'ün CaCo-2 hücre hattında MTT sonuçları

Grup	Absorbans	% canlılık
(-) Kontrol	0,981	100,000
DMSO Kontrol	0,840	85,596
(+) Kontrol	0,386	39,383
100 μ M	0,408	41,558
50 μ M	0,414	42,203
25 μ M	0,484	49,373
12,5 μ M	0,552	56,305
6,25 μ M	0,774	78,936
3,125 μ M	0,726	73,975
1,56 μ M	0,767	78,185



Şekil 4.9. Bileşik-3'ün CaCo-2 hücre hattında % canlılık aktiviteleri

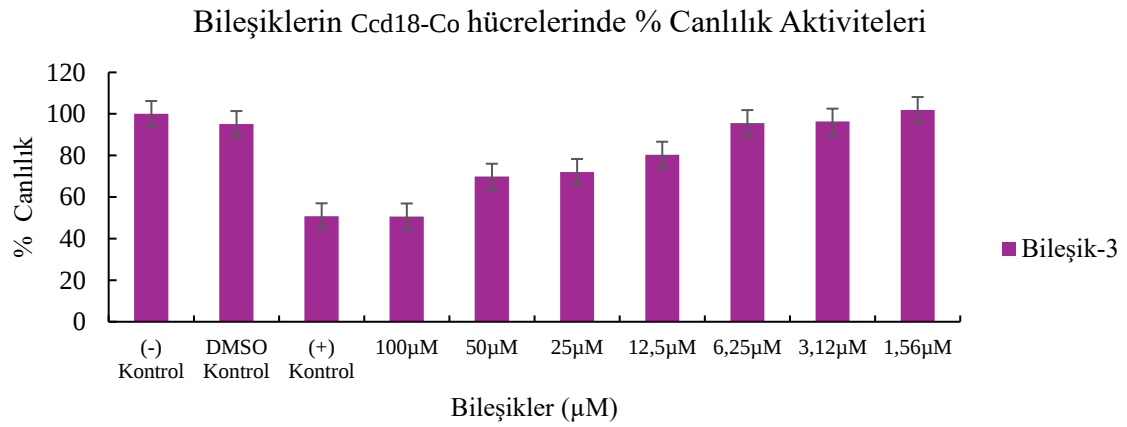
CCD-18Co hücre hattında: Bileşik-3'ün hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 μ M dozda sitotoksik aktivite gösterdiği, diğer dozlarda (50-1,56 μ M) ise kontrol grubu ile yaklaşık olarak benzer aktivite gösterdiği belirlendi.

CCD-18Co hücre hattında Bileşik-3 için absorbans aralığı 0,545 ile 1,096 arasında ve % canlılık 50,697 ile 101,921 aralığında hesaplandı (Çizelge 4.2.) (Şekil 4.10).

Sadece 100 μ M konsantrasyonda bu hücre hattı için sitotoksik etki gösterdiği belirlendi.

Çizelge 4.2. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında MTT sonuçları

Grup	Absorbans	% canlılık
(-) Kontrol	1,076	100,000
DMSO Kontrol	1,024	95,166
(+) Kontrol	0,546	50,790
100 μ M	0,545	50,697
50 μ M	0,751	69,817
25 μ M	0,776	72,110
12,5 μ M	0,865	80,415
6,25 μ M	1,029	95,631
3,125 μ M	1,036	96,328
1,56 μ M	1,096	101,921



Şekil 4.10. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında % canlılık aktiviteleri

Bileşik-5 için etkin dozunun belirlenmesi

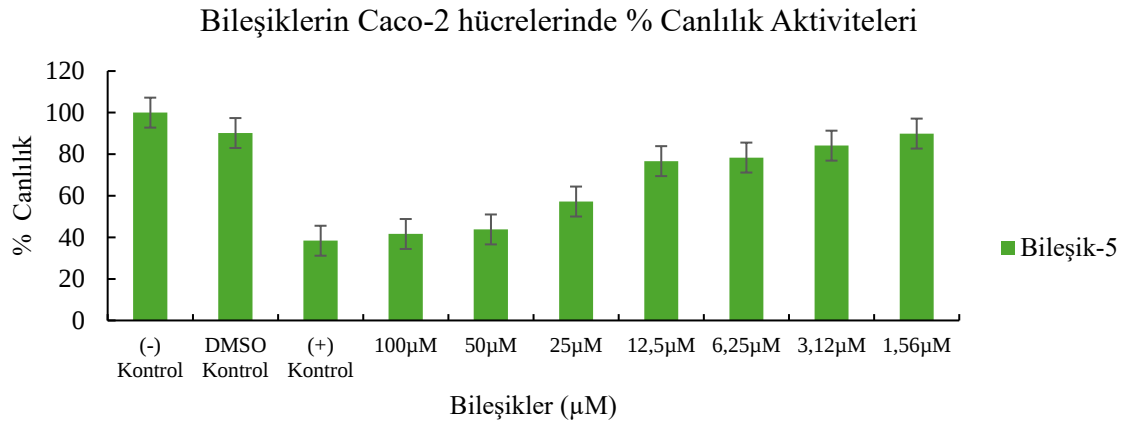
CaCo-2 hücre hattında: Bileşik-5'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında en iyi etkiyi 100 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarda gösterdi.

CaCo-2 hücre hattında Bileşik-5 için absorbans aralığı 0,406 ile 0,877 arasında ve % canlılık 41,607 ile 84,102 aralığında hesaplandı (Çizelge 4.3) (Şekil 4.11.).

25 – 1,56 μ M konsantrasyonlarda düşük aktivite gösterdiği belirlendi. Bu bileşik (+) kontrol olarak kullanılan Doksorubisin bileşiği ile karşılaştırıldığında daha fazla sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.3. Bileşik-5'in CaCo-2 hücre hattında MTT sonuçları

Grup	Absorbans	%canlılık
(-) Kontrol	0,976	100,000
DMSO Kontrol	0,880	90,182
(+) Kontrol	0,374	38,362
100 μ M	0,406	41,607
50 μ M	0,427	43,793
25 μ M	0,558	57,218
12,5 μ M	0,748	76,655
6,25 μ M	0,765	78,363
3,125 μ M	0,821	84,102
1,56 μ M	0,877	89,905



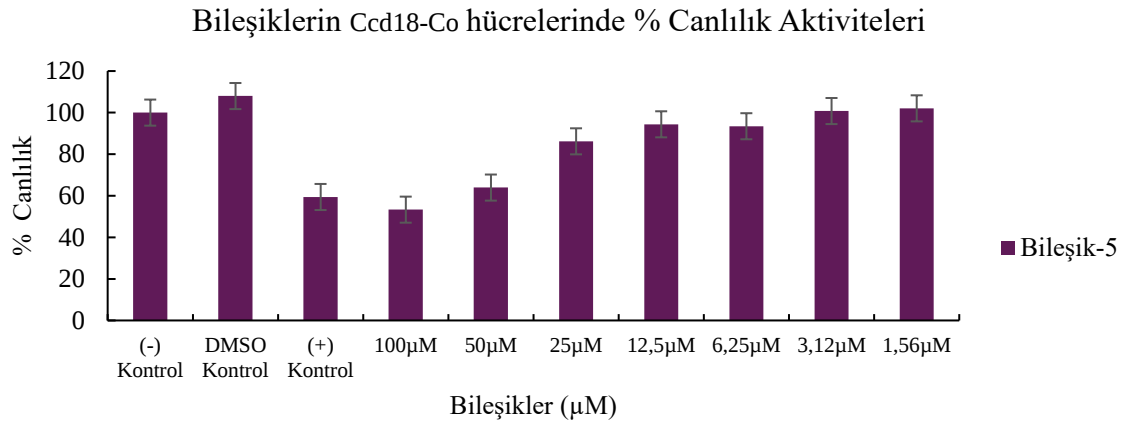
Şekil 4.11. Bileşik-5'in CaCo-2 hücre hattında % canlılık aktiviteleri

CCD-18Co hücre hattında: Bileşik-5'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında 100 µM ve 50µM dozda sitotoksik aktivite gösterdiği, diğer dozlarda kontrol grubu ile benzer aktivite gösterdiği belirlendi. Yüksek doz konsantrasyonlarında sitotoksik etki gösterebileceği düşünülmektedir. Doz miktarı azaldıkça % canlılık oranları üzerine etkisi azalmaktadır.

CCD-18Co hücre hattında Bileşik-5 için absorbans aralığı 0,537 ile 1,028 arasında ve % canlılık 53,309 ile 102,052 aralığında hesaplandı (Çizelge 4.4.) (Şekil 4.12.).

Çizelge 4.4. Bileşik-5'in CCD-18Co hücre hattında MTT sonuçları

Grup	Absorbans	%canlılık
(-) Kontrol	1,007	100,000
DMSO Kontrol	1,088	107,975
(+) Kontrol	0,598	59,398
100 µM	0,537	53,309
50 µM	0,644	63,931
25 µM	0,868	86,181
12,5 µM	0,951	94,375
6,25 µM	0,941	93,448
3,125 µM	1,015	100,761
1,56 µM	1,028	102,052



Şekil 4.12. Bileşik-5'in CCD-18Co hücre hattında % canlılık aktiviteleri

Bileşik-3 ve bileşik-5 uygulamaları sonucunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde bileşik-3 için IC_{50} 11,670 bileşik-5 için IC_{50} 16,620 olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre bileşik-3'ün daha iyi sitotoksik aktivite özelliği göstermiştir.

4.2.1. MTT analizi istatistik sonuçları

Üç tekrarlı teste sahip bileşiklerin sitotoksik verileri, tek yönlü ANOVA analizi ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi ile Prism 9 programı kullanılarak hesaplandı ve ortalamalar arasında anlamlı farklılıklar ($P > 0,05$) bulunamadı.

4.3. qRT-PCR ANALİZİ

MTT analiz sonuçlarına göre, CaCo-2 hücre hattında en etkili sitotoksik aktivite dozu bileşik-3 için 12,5 µM ve bileşik-5 için 25 µM olarak belirlenen konsantrasyonlar kullanılarak RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. RNA saflığı ve konsantrasyonu, Nanodrop cihazı ile ölçüldükten sonra qRT-PCR analizleri yapıldı.

Uygun konsantrasyonlarda (ng/µL) sulandırılan RNA örnekleri 260 ve 280 nm'de ölçüldü. RNA konsantrasyonu (µg/mL) = [OD (Optik yoğunluk) 260 x sulandırma oranı x 40 (µg/mL)] formülü ile hesaplandı.

İzole edilen tek zincirli total RNA'lar 100 ng olacak şekilde hesaplanarak oligo d(T) primeri ve revers transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak (Thermo Fisher; cDNA sentez kiti (K1622)) cDNA'ya dönüştürüldü (Çizelge 4.5.).

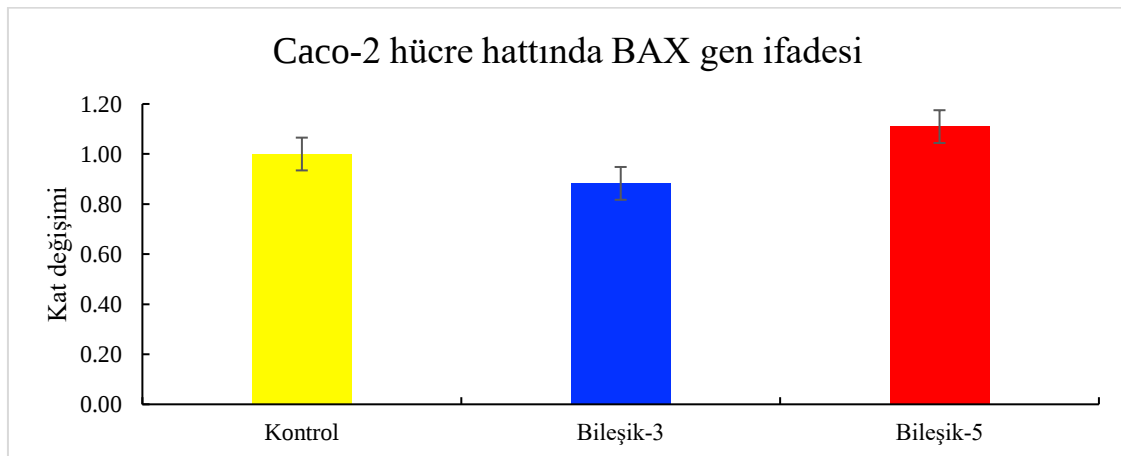
Çizelge 4.5. RNA miktarları (ng/μL) ve 260/280 oranları (nm)

Bileşikler	RNA miktarı (ng/μl)	260/280 oranı (nm)
(-) Kontrol	81.552	1.80
Bileşik-3	163.675	1.89
Bileşik-5	139.616	1.80

Siklotrifosfazen türevli bileşiklerin, CaCo-2 hücre hattı apoptotik sinyal yollarında önemli rol oynayan BAX, BCL-2 ve kaspaz-3 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle belirlendi. Bileşik-3 ve bileşik-5'e ait mRNA gen ifadesindeki kat (fold) artışı ve azalışı Microsoft Excel programı ile hesaplandı.

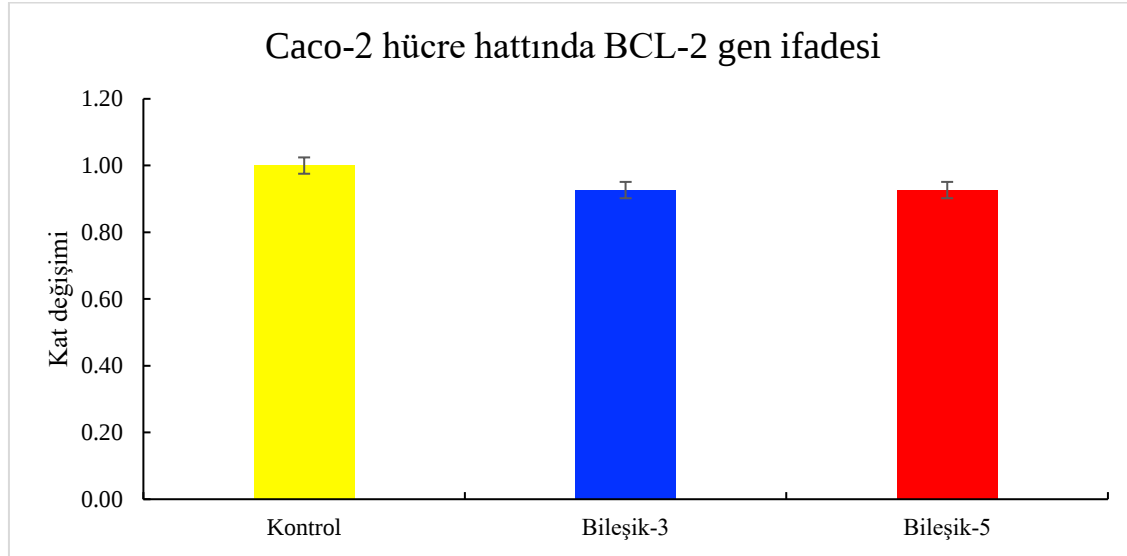
CaCo-2 hücre hattında apoptotik aktivite gen aktivite sonuçları şekillerde verilmektedir.

CaCo-2 hücre hattında bileşik-3'ün kontrol grubuna göre BAX gen ifadesinin 0,12 kat azaldığı; bileşik-5'in, kontrol grubuna göre BAX gen ifadesinin 0,11 kat arttığı tespit edildi (Şekil 4.13.).



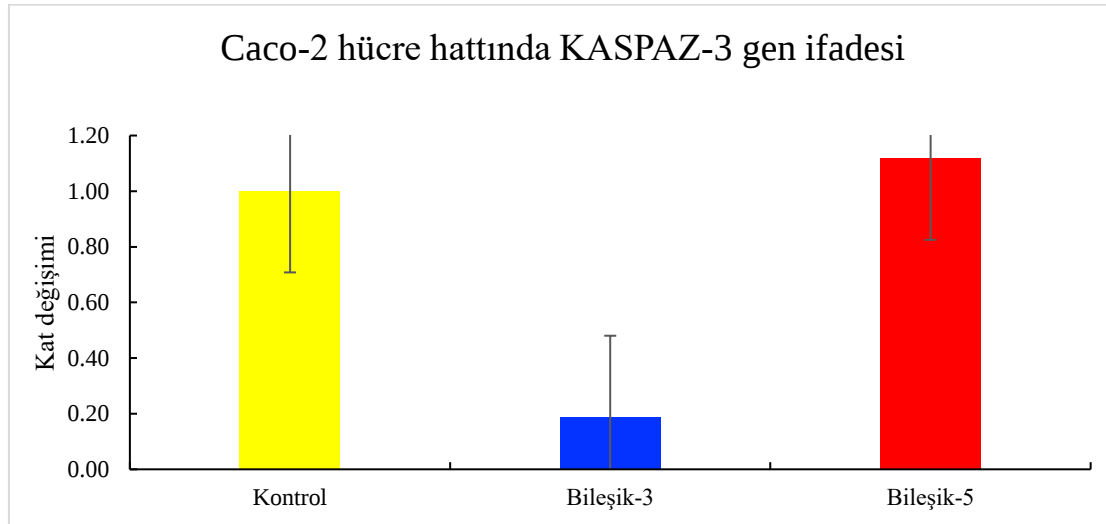
Şekil 4.13.Bileşik-3 ve bileşik 5'in CaCo-2 hücre hattında BAX gen ifadesi

CaCo-2 hücre hattında bileşik-3'ün kontrol grubuna göre BCL-2 gen ifadesinin 0,07 kat azaldığı, BCL-2 gen ifadesinin 0,07 kat azaldığı tespit edildi (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Bileşik-3 ve bileşik-5'in CaCo-2 hücre hattında BCL-2 gen ifadesi

CaCo-2 hücre hattında bileşik-3'ün kontrol grubuna göre KASPAZ-3 gen ifadesinin 0,81 kat azaldığı, KASPAZ-3 gen ifadesinin 0,12 kat arttığı tespit edildi (Şekil 4.15.).

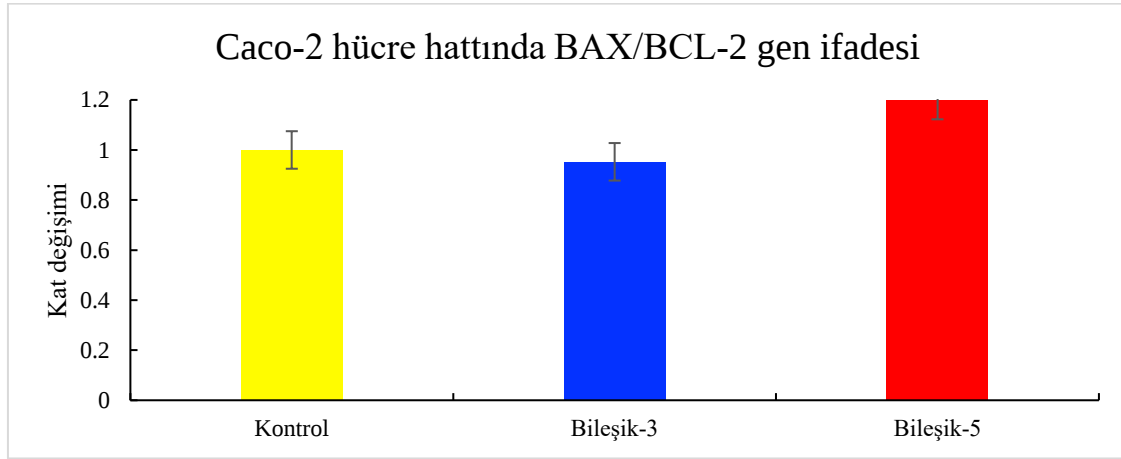


Şekil 4.15. Bileşik-3 ve bileşik-5'in CaCo-2 hücre hattında KASPAZ-3 gen ifadesi

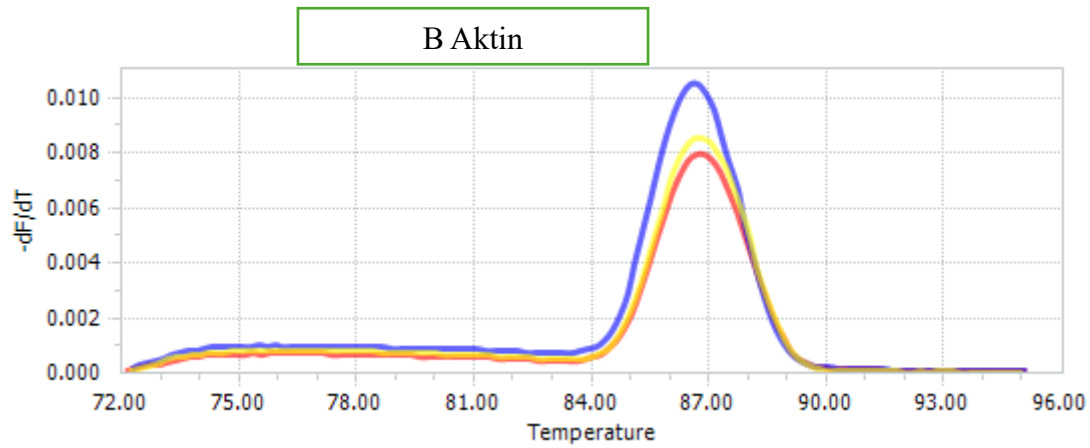
Bileşik-3'ün BAX/BCL-2 oranı yaklaşık kontrol grubu ile aynıdır, bileşik BAX/BCL-2 oranı ise kontrol grubuna göre 0,2 kat artış gösterdi. Bileşik-5'in bileşik-3'e göre daha etkili BAX/BCL-2 kat artışı gösterdiği tespit edildi (Çizelge 4.6.) (Şekil 4.16).

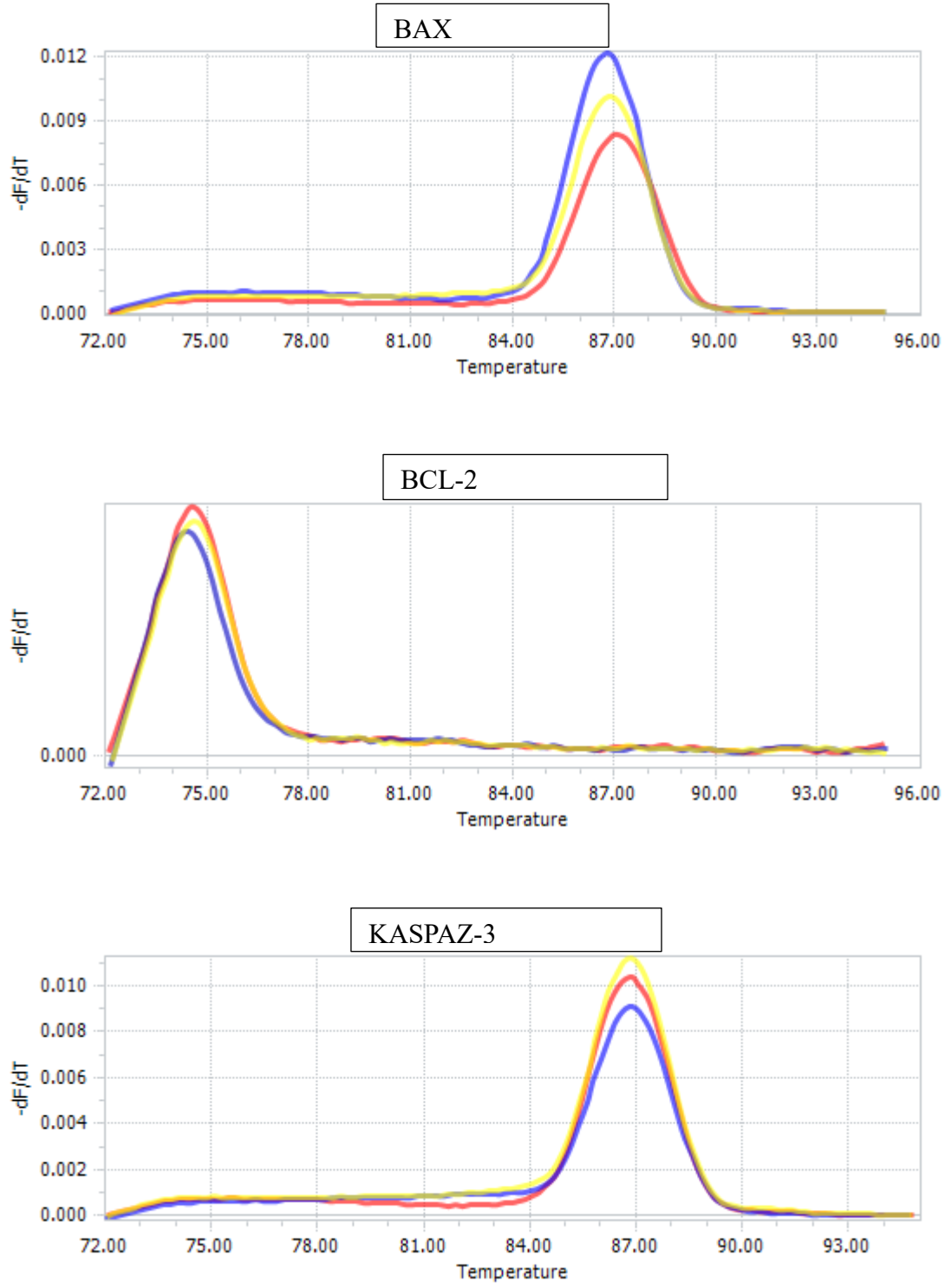
Çizelge 4.6. BAX/BCL-2 oranı

	BAX/BCL-2 Oranı
Kontrol	1
Bileşik 3	0,952638
Bileşik 5	1,1974787



Şekil 4.16. Bileşik-3 ve bileşik-5'in CaCo-2 hücrelerinde BAX/BCL-2 gen ifadesi





Şekil 4.17. CaCo-2 hücresinde BAX, BCL-2, KASPAZ-3 ve B-Aktin erime eğrileri

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Dünya genelinde görülen kanser vakaları içerisinde en sık karşılaşılan kanser tipleri arasında üçüncü sırada yer alan kolorektal kanserde siklotrifosfazen türevi bileşiklerinin kolon kanseri hücrelerinde sitotoksik aktivite ve apoptotik hücre ölümüyle ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan genlerin (BAX, BCL-2 ve KASPAZ-3) etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik aktivite, çalışılan bileşiklerin etkisinin kısa sürede ve direk olarak test edilmesine olanak sağladığı için dünya genelinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada CaCo-2 ve CCD-18Co hücre hatları üzerinde siklotrifosfazen türevi bileşiklerin MTT yöntemiyle sitotoksik etkileri ve qRT-PCR yöntemiyle apoptotik hücre ölümü ve ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan genlerin analizleri gerçekleştirildi.

Yapılan literatür araştırmalarında siklotrifosfazen türevi bileşikler ile çalışmaların mevcut olduğu görülmüştür. Bu bileşikler ile birçok kanser hücresinde antikanser aktivite (sitotoksikite, gen ekspresyonu ve apoptotik sinyal yolları) çalışmaları yapılmıştır. Siklotrifosfazen türevi bileşiklerin kanser hücreleri üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar, araştırmacılar tarafından oldukça ilgi görmektedir.

Yıldırım ve arkadaşları çalışmalarında, çeşitli fosfazen türevlerinin insan kolon adenokarsinomu (HT-29), epidermoid larenks kanseri (Hep2) ve kontrol amaçlı Vero hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmıştır. Bileşikler, farklı konsantrasyonlarda (0.2–50 µg/mL) 24 saat inkübe edilerek MTT testi ile değerlendirilmiş; ID₅₀ değerleri probit analizi ile hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, bazı bileşiklerin (1, 4, 5, 9, 12) HT-29 ve (4, 6, 14) Hep2 hücrelerinde güçlü sitotoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Akış sitometrisi ile yapılan analizlerde, Annexin V-FITC/PI boyaması kullanılarak erken ve geç dönem apoptoz tespit edilmiştir. Özellikle bileşik 6'nın Hep2 hücrelerinde %92 oranında apoptoz indüklemesi dikkat çekicidir. Ayrıca, birçok bileşik kanser hücrelerinde toksik etki gösterirken, Vero hücrelerinde düşük toksisite sergilemiştir. Bulgular, seçili siklotrifosfazen türevlerinin apoptoz yoluyla antikanser etki gösterebildiğini ve terapötik potansiyele sahip adaylar olabileceğini göstermektedir (Yıldırım ve diğerleri,2012).

Asmafiliz ve arkadaşları tarafından, fosfazen bileşikleri 2b, 1d, 2d ve 4d'nin HeLa kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak paklitaksel ve

sisplatin kullanılmıştır. Hücre canlılığı, MTT testi ile farklı konsantrasyonlarda (5–200 µg/mL) 24 saatlik tedavi sonrası değerlendirilmiştir. Sonuçlar, 25 µg/mL 2b'nin hücre canlılığını yaklaşık %60, 50 µg/mL 2d'nin %75, 5 µg/mL 4d'nin %50 oranında azalttığını; karşılaştırma için 25 µg/mL sisplatinin %57, 25 µM paklitakselin %58 azalma sağladığını göstermiştir. En yüksek antiproliferatif etki 4d bileşiğinde gözlenmiş olup, 1d de özellikle düşük konsantrasyonlarda (5–50 µg/mL) güçlü inhibisyon sağlamıştır. 1d, 2d ve 4d bileşikleri farklı sitotoksik etkileri nedeniyle seçilerek, 96 saatlik hücre canlılığı izlenmiştir. En güçlü sitotoksik etki 4d'de 24 saat içinde, 1d'de ise 48 saat sonunda belirgin azalma şeklinde gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, 4d ve 1d bileşiklerinin potansiyel ilaç adayları olduğunu göstermektedir (Asmafiliz ve diğerleri, 2013).

Berberoğlu ve arkadaşları, fosfazen türevlerinden 5, 8, 9, 12, 13, 16 ve 18 numaralı bileşiklerin, L929 fibroblast ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, özellikle 5, 8, 9, 12 ve 18 numaralı bileşiklerin 6,25–25 µg/mL konsantrasyonlarında fibroblast hücrelerinin %70'inden fazlası canlılığını koruduğu için bu bileşiklerin, düşük sitotoksositeye sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, 13 ve 16 numaralı bileşikler tüm konsantrasyonlarda fibroblast hücrelerine karşı belirgin toksisite göstermiştir. Ayrıca, bu iki bileşik MDA-MB-231 hücre hattında 6,25 µg/mL konsantrasyonda %66–69 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. Diğer bileşikler ise 50 µg/mL'ye kadar olan konsantrasyonlarda kanser hücrelerine karşı etkili bulunmuştur. Genel olarak, bu bileşiklerin fibroblast hücrelerine göre kanser hücrelerine karşı daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle 13 ve 16 numaralı bileşikler, her iki hücre hattında da <6,25 µg/mL konsantrasyonlarda yüksek sitotoksik potansiyele sahiptir. Bu bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri, sisplatininkinden daha düşük olup, bu durum bileşiklerin sisplatin kadar etkili olabileceğine işaret etmektedir (Berberoğlu ve diğerleri, 2016).

Okumuş ve arkadaşları, fosfazen türevi 4a ve 4c bileşiklerinin MDA-MB-231 kanser hücre hattı ile L929 fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri WST testi ile değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak yalnızca hücre besi ortamı, pozitif kontrol olarak ise cisplatin kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, bileşiklerin konsantrasyona bağlı olarak hem kanser hem de fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle 4c bileşiği kanser hücrelerinde 4a'dan daha yüksek toksisite sergilerken, fibroblast hücrelerinde 4a daha yüksek toksisite göstermiştir. Apoptotik ve nekrotik hücre oranları çift

boyama yöntemi ile belirlenmiş olup, kanser hücrelerinde bileşiklerin apoptotik etkilerinin fibroblast hücrelerine kıyasla yaklaşık %10 daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Cisplatin ise her iki hücre hattında da daha yüksek apoptotik indise sahip bulunmuştur. Sonuç olarak, 4c bileşiği MDA-MB-231 kanser hücrelerinde 4a'ya göre daha etkin sitotoksikite gösterirken, fibroblast hücrelerinde 4a daha yüksek toksisite göstermiştir (Okumuş ve diğerleri,2016).

Koran ve arkadaşları, yeni sentezlenen fosfazen türevlerinin A2780 (over), PC-3 ve LNCaP (prostat) kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmıştır. Fosfazen türevlerinin (DPP 2–8)'in sitotoksik etkileri, mitokondriyal aktiviteyi ölçen MTT yöntemi ile değerlendirilmiş ve bazı bileşiklerin düşük dozlarda yüksek kemoterapötik etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$). A2780 hücrelerinde 1, 5, 25, 50 ve 100 μM dozlarında yapılan testlerde, DPP-3, DPP-4, DPP-5 ve DPP-7 bileşiklerinin diğerlerine göre daha etkili olduğu yüksek Log IC₅₀ değerleri ile desteklenmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca DPP 2–8 bileşikleri PC-3 ve LNCaP hücrelerinde de sitotoksik aktivite göstermiş, özellikle DPP-4 ve DPP-5 bileşikleri anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Koran ve diğerleri,2017).

Şenkuytu ve arkadaşları, paraben ve fosfazen türevlerinin *in vitro* sitotoksik etkileri, insan meme adenokarsinomu (MCF-7) ve Dukes Tip C kolorektal adenokarsinomu (DLD-1) hücre hatları üzerinde MTT yöntemini kullanarak değerlendirmiştir. Elde edilen veriler, ANOVA analiz yöntemleri ile istatistiksel olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar IC₅₀ değerleri şeklinde sunulmuştur. İncelenen tüm bileşiklerin, 12.5–200 μM konsantrasyon aralığında hem MCF-7 hem de DLD-1 hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir ve bileşiklerin potansiyel antikanser ajanlar olarak değerlendirilebileceği ortaya koyulmuştur (Şenkuytu ve diğerleri, 2022).

Şenkuytu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, paraben ile modifiye edilmiş fosfazen türevlerinin 12,5–200 μM konsantrasyon aralığında 24 saat uygulanmasının ardından, MCF-7 (insan meme adenokarsinomu) ve DLD-1 (Dukes Tip C kolorektal adenokarsinom) hücre hatlarında *in vitro* sitotoksik aktiviteleri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ANOVA analiz yöntemiyle istatistiksel olarak hesaplanmıştır ve IC₅₀ değerleri şeklinde belirlenmiştir. Özellikle, MCF-7 hücre hattında bileşik 1 ve 3'ün, DLD-1 hücre hattında ise bileşik 1'in belirgin sitotoksik etki gösterdiği dikkat çekmektedir (Şenkuytu ve diğerleri,2022).

Doğan ve arkadaşları çalışmalarında, fosfazen bileşiklerinin (CP 2-11) *in vitro* sitotoksik etkilerini değerlendirmiş ve moleküler yerleştirme (docking) analizleri Autodock Vina yazılımı kullanılarak potansiyel biyolojik aktivitelerini araştırmıştır. A2780, LNCaP ve PC-3 insan kanser hücre hatları üzerinde yürütülen çalışmalarda, bu bileşiklerin %36–90 arasında değişen oranlarda hücre canlılığını azalttığı ve belirgin sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, CP 2-11 bileşiklerinin farmasötik uygulamalar için güçlü aday moleküller olduğunu ortaya koymaktadır (Doğan ve diğerleri, 2022).

Ozsoy ve Ozay, amino asit türevli fosfazen esaslı mikrokürelerin sitotoksik etkileri, HT-29 kolorektal kanser hücre hattında MTT testi ile değerlendirilmiştir. İncelenen HCCP-PP-LEEMP, HCCP-PP-LEE-ATA-QMP ve Cimetidin yüklü HCCP-PP-LEE-ATA-QMP@Cimetidine mikrokürelerinin tamamı kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Ancak, hücre canlılığındaki azalma özellikle Cimetidin yüklü mikrokürelerde daha belirgin olarak gözlemlenmiştir. Bu mikroküreler, 40 µL’de hücre canlılığını azaltmaya başlamış, 100 µL’de ise anlamlı düzeyde düşürmüştür. Bu hacimlerdeki Cimetidin konsantrasyonları sırasıyla 1.02 µM ve 2.54 µM olarak hesaplanmıştır. İn vitro analizler, DMEM ortamında 48 saatlik salınım süreciyle gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, hücre canlılığı üzerindeki ikincil etkilerin HT-29 hücre hattında değerlendirildiğini ve en belirgin sitotoksik etkinin Cimetidin yüklü mikrokürelerle elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca, HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikroküreleri de hücre canlılığını azaltmış olup, bu etkinin mikroküre yapısındaki amino asit içeriğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Ozsoy ve Ozay, 2023).

Akbaş ve arkadaşları çalışmalarında, fosfazen türevleri (2, 2a ve 2b)’nin prostat (PC-3) ve kolon (HT-29) kanser hücre hatları üzerindeki antiproliferatif ve antimigratuvar etkilerini değerlendirmiştir. Sitotoksisite analizleri MTT testiyle gerçekleştirilmiş; pozitif kontrol olarak 5-fluorourasil, negatif kontrol olarak ise yalnızca hücre besisi ortamı kullanılmıştır. 2 ve 2a numaralı bileşiklerin her iki hücre hattında da tüm konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu baskıladığı ve özellikle prostat kanseri hücrelerinde belirgin sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. 2b bileşiği yalnızca en yüksek dozda (50 µM) etki gösterirken, daha düşük konsantrasyonlarda etkisiz kalmıştır. Bileşiklerin metastaz ve invazyon üzerindeki potansiyel etkileri *in vitro* yara iyileşme analiziyle incelenmiş ve özellikle 2a bileşiği prostat kanseri hücrelerinde, 2 ve 2a bileşikler ise kolon kanseri hücrelerinde anlamlı düzeyde hücre göçünü engellemiştir. Bu sonuçlar, fosfazen türevlerinin migrasyonu baskılayıcı etkinliğe

sahip olduğunu göstermiştir. Apoptoz mekanizmasının değerlendirilmesi amacıyla yapılan qRT-PCR analizlerinde, 2 ve 2a bileşikleri ile muamele edilen PC-3 ve HT-29 hücrelerinde p53 ve BAX gen ekspresyon düzeylerinde artış, anti-apoptotik BCL-2 geninde ise azalma tespit edilmiştir. Bu bulgular, antiproliferatif etkinin moleküler düzeyde apoptoz yoluyla gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, hücre göçüne aracılık eden MMP2, MMP9, VEGF ve HIF-1 α genlerinin ekspresyon seviyelerinin 2 ve 2a bileşikleri tarafından anlamlı düzeyde baskılandığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, *in vitro* bulgularla uyumlu şekilde, bu bileşiklerin antiinvaziv ve antimigratuvar potansiyellerini desteklemektedir (Akbaş ve diğerleri,2023).

Çiftçi ve arkadaşları, fosfazen türevlerinin antioksidan (DPPH), toplam fenolik içerik ve sitotoksik (WST-8) aktiviteleri belirlendikten sonra, MCF-7 hücre hattında çoklu ilaç direnci ve apoptozla ilişkili gen ekspresyonları RT-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Bileşiklerin DPPH aktivitesi %90,56, toplam fenolik içeriği 187,01 mg ve sitotoksik aktiviteye ait IC₅₀ değeri 23,07 μ M olarak saptanmıştır. Gen ekspresyon analizleri, BAX, p53, KASPAZ-3 ve KASPAZ-7 düzeylerinde artış, anti-apoptotik BCL-2 geninde ise azalma olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, bileşiklerin MCF-7 hücrelerinde etkili sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu ve apoptozu BAX üzerinden indükleyebileceğini göstermektedir (Çiftçi diğerleri, 2024).

Çalışkan ve arkadaşları, sentetik fosfazen türevlerinin insan meme (MCF-7) ve kolon (Caco-2) kanser hücre hatları üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkileri MTT testi ile değerlendirmiştir. Bileşiklerin özellikle Caco-2 hücrelerinde belirgin olmak üzere DNA hasarı yoluyla hücre ölümünü indüklediği gözlemlenmiştir. DTVV, DTVG ve DTVA bileşikleri 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında; DTVP ve DTVM ise 25, 50 ve 100 μ M'de sitotoksik etki göstermiştir. Özellikle DTVM bileşiği, MCF-7 hücre hattında 50 μ M'de Tamoksifen'den daha yüksek etkinlik sergilemiştir. DNA hasarına yönelik değerlendirmeler, Comet testi ile gerçekleştirilmiş; kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, olive tail moment, baş uzunluğu ve baş yoğunluğu gibi parametreler incelenmiştir. Bulgular, hücre ölümünün DNA hasarına bağlı bir mekanizma ile gerçekleştiğini desteklemektedir. Ayrıca, DTVA, DTVG, DTVM, DTVP ve DTVV bileşiklerinin VEGFR2 kinaz bölgesi (3VHE) ve Cyclophilin_CeCYP16-benzeri bölge (2HQ6) ile etkileşimleri, bağlanma skorları ve potansiyel aktiviteleri moleküler kenetlenme (docking) analizleriyle incelenmiştir. Elde edilen farklılıklar, bu bileşiklerin kanser hücrelerine özgü ve etkili hedefleme potansiyeline sahip olduğunu

göstermektedir. Sonuçlar, fosfazen-peptit türevlerinin kanser tedavisinde umut vaat eden terapötik adaylar olabileceğini ortaya koymaktadır (Çalışkan ve diğerleri,2025).

Bu tez çalışmasında, anilin türevi siklotrifosfazen olan Bileşik-3'ün, hem insan kolon adenokarsinom hücre hattı (Caco-2) hem de normal insan kolon fibroblast hücre hattı (CCD-18Co) üzerindeki etkileri MTT hücre canlılık testi ve qRT-PCR gen ekspresyon analizleriyle değerlendirilmiştir. MTT sonuçlarına göre, Bileşik-3 Caco-2 hücrelerinde güçlü sitotoksik etki göstermiştir. Hücre canlılığında 100 μ M konsantrasyonda %41,56, 50 μ M ve 25 μ M konsantrasyonda ise %42,20 ve %49,37 oranlarında azalma gözlenmiştir. Bu verilere dayanarak hesaplanan IC₅₀ değeri 11,670 μ M olup, bileşiğin kanser hücrelerinde belirgin antiproliferatif etkisi olduğunu göstermektedir. Bileşik-3'ün CCD-18Co normal hücre üzerinde toksik etkisi bulunmadığı belirlenmiştir. Yüksek doz olan 100 μ M'de hücre canlılığı %50,69 iken, doz miktarı azaldıkça hücre canlılığı üzerine etkisi azalmakta ve sağlıklı hücrelere toksik etki göstermemektedir. Bu sonuç, Bileşik-3'ün kanser hücrelerine karşı seçici sitotoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bileşik-3'ün Caco-2 hücrelerine uygulanarak yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda BAX, BCL-2 ve KASPAS-3 gen ifadelerinde anlamlı azalma gözlenmiştir. BAX gen ifadesi kontrol grubuna göre 0,12 kat, BCL-2 gen ifadesi 0,07 kat ve KASPAS-3 ise 0,81 kat azalmıştır. BAX/BCL-2 oranının 0,95 seviyesine gerilemesi, apoptotik yanıtın azaldığını göstermektedir. Bu bulgular, Bileşik-3'ün hem proapoptotik hem de antiapoptotik genleri baskılayarak, mitokondriyal apoptoz yolunun etkili olmadığını düşündürmektedir. Ancak MTT analizinde ortaya çıkan belirgin sitotoksik etki, hücre ölümünün klasik apoptozun dışında, nekroz, otofaji veya ferroptoz gibi alternatif mekanizmalarla gerçekleştiği ihtimalini güçlendirmektedir.

Soni, Carabin ve Burdock çalışmalarında, p-hidroksibenzoik asidin çeşitli esterleri olan parabenler (metil-, etil-, propil-, butil- parabenler) üzerinde kapsamlı bir toksikolojik değerlendirme gerçekleştirmiştir. Rodent modellerde yapılan akut, subkronik ve kronik toksisite çalışmaları, 2100–8000 mg/kg oral LD₅₀ değerleri ve 1200–5500 mg/kg NOEL/NOAEL değerleri doğrultusunda bu bileşiklerin "pratikte toksik olmadığını" göstermiştir. Genotoksisite testlerinde, yapı olarak karsinojenik potansiyel taşımadığı tespit edilmiş ve güvenlik profili desteklenmiştir. Cilt irritasyonu ve sensitize edici etkilerine nadiren rastlanmış ve bu etkiler hasarlı deri üzerinden özellikle belirgin bulunmuştur. Östrojenik aktivite testlerinde, metil ve butil paraben oral uygulamada inaktif, ancak butil paraben subkutan yoldan zayıf pozitif etki göstermiştir. Metabolizma çalışmaları,

parabenlerin hızla emilip p-hidroksibenzoat'a dönüştükten sonra konjuge edilerek hızlı atıldığını belirtmiş; birikim riski düşük bulunmuştur. Bu bulguların ışığında, yazarlar özellikle östrojenik endişeler nedeniyle reproduktif toksisiteye yönelik ek çalışmalar yapılmasını önermiştir. (Soni, Carabin ve Burdock, 2005).

Engeli ve arkadaşları, paraben bileşiklerinin östrojen metabolizmasını düzenleyen 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (17 β -HSD) enzimleri üzerindeki etkilerini incelediler. Yeni bir farmakofor tabanlı tarama sistemi ile kozmetik kimyasallar veri tabanından aday parabenler seçildikten sonra, *in vitro* enzimatik testlerde bu moleküllerin 17 β -HSD2 ve 17 β -HSD1 aktiviteleri değerlendirilmiştir. p-Hidroksibenzoik asit, negatif kontrol olarak kullanılmış ve herhangi bir inhibisyon göstermemiştir. Test sonuçlarına göre, etil vanillat 17 β -HSD2'yi 1,3 μ M IC₅₀ ile en güçlü inhibe eden madde olurken, etil paraben 4,6 μ M ile ortalama etki göstermiştir. Ayrıca heksilparaben (2,6 μ M) ve heptilparaben (1,8 μ M) 17 β -HSD1'i etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Bu sonuçlar, uzun alkil zincirli parabenlerin hedef enzimler üzerinde güçlü etkili olabileceğini işaret etmiştir. Elde edilen bulgular, parabenlerin lokal östrojenik aktiviteyi artırma veya azaltma yollarıyla endokrin bozucu etkiler oluşturabileceğini göstermektedir (Engeli ve diğerleri, 2017).

Majewska ve arkadaşları çalışmalarında, kültüre edilmiş insan dermal fibroblastlar üzerinde metilparaben (MP)'in kolajen üretimi ve hücre canlılığı üzerindeki etkilerini %0,01–%0,05 konsantrasyon aralığında değerlendirmiştir. Kolajen tip I, III, VI proteinin mRNA ekspresyonlarında doza bağımlı bir azalma saptanmış, toplam kolajen salgısı da belirgin düşüş göstermiştir. Prolidaz aktivitesindeki azalma, kolajen sentezinin sekteye uğradığını, aynı zamanda pro-MMP-2 ve MMP-2 aktivitelerinde artış ile TIMP-2 aktivitesinin azalması ise kolajen yıkımının arttığını düşündürmektedir. MP aynı zamanda hücre canlılığı ve proliferasyonunu baskılamış, KASPAZ-3'ün nükleer translokasyonu, BAX artışı ve BCL-2 azalması ile apoptoz mekanizması açık bir şekilde aktive edilmiştir. Bu veriler, metilparaben'in insan dermal fibroblastlar üzerinde hem kolajen sentezini hem de hücre sağkalımını olumsuz etkileyerek cilt sağlığı açısından potansiyel risk taşıdığını göstermektedir (Majewska ve diğerleri, 2017).

Akbaş ve arkadaşları tarafından yürütülen bu çalışmada, hekzapirolidinosiklotrifosfazen türevli protik eriyik tuzlar sentezlenmiş ve bu yeni bileşiklerin yapısal, termal ve biyolojik özellikleri kapsamlı şekilde araştırılmıştır. Yapısal karakterizasyon, FT-IR, ¹H ve ³¹P NMR

spektroskopileri ile gerçekleştirilmiş, ayrıca bileşiklerin termal davranışları TG/DTG analizleri ile incelenmiştir. Sitotoksik aktiviteleri, insan kolon kanseri (HT-29), rahim ağzı kanseri (HeLa) ve sıçan beyin glioma (C6) hücre hatlarında MTT testi ile değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak sisplatin, negatif kontrol olarak ise yalnızca hücre kültür ortamı kullanılmıştır. Çalışmada, özellikle 3 numaralı bileşik, HT-29 ve HeLa hücre hatlarında en yüksek sitotoksik etkiyi göstermiştir. IC_{50} değerleri 29,4 μ M (HT-29) ve 35,1 μ M (HeLa) olarak tespit edilmiştir. C6 hücre hattında ise daha düşük bir antiproliferatif etki gözlenmiştir. Bu sonuçlar, sentezlenen bileşiklerin hücre tipine bağlı olarak değişen düzeyde antiproliferatif potansiyel sergilediğini ortaya koymuştur. Ayrıca bileşiklerin termal stabilitelerinin yüksek olması, bu tür moleküllerin ileri biyomedikal uygulamalarda da değerlendirilebileceğine işaret etmektedir. Bu bulgular, hekzapirolidinofosfazen temelli yapılarla geliştirilen protik eriyik tuzların hem yapısal hem de biyolojik açıdan umut vadeden adaylar olduğunu göstermektedir (Akbaş ve diğerleri, 2017).

Tümer ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada, *cis*- ve *trans*-dispiro yapısına sahip ferrocenil grubu içeren siklotrifosfazen türevleri sentezlenmiş ve bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri detaylı olarak incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapısal doğrulamaları FT-IR, 1H , ^{13}C ve ^{31}P NMR spektroskopisi ile yapılmıştır. Ayrıca X-ışını kırınım analizleriyle kristal yapıları aydınlatılmıştır. Sitotoksik etkileri, insan akciğer karsinom (A549) ve meme adenokarsinom (MCF-7) hücre hatlarında MTT testi ile değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılırken, negatif kontrol olarak yalnızca hücre kültür ortamı tercih edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, özellikle *trans*-dispiro bileşiklerden biri (Bileşik 6), A549 hücre hattında düşük mikromolar düzeyde yüksek sitotoksik aktivite göstererek (IC_{50} = 10,4 μ M), sisplatine yakın etki profili sergilemiştir. Antimikrobiyal testler kapsamında ise bileşiklerin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* gibi mikroorganizmalara karşı etkili olduğu ve özellikle *cis*-dispiro yapıdaki bileşiğin *S. aureus* üzerinde güçlü bir inhibisyon sağladığı (MIC = 62,5 μ g/mL) belirlenmiştir. Ayrıca moleküler docking analizleri ile bileşiklerin DNA topoizomera II ve aromataz gibi hedef proteinlerle güçlü bağlanma afiniteleri olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, ferrocenil grubu içeren dispiro fosfazen bileşiklerinin hem antikanser hem de antimikrobiyal ajan geliştirilmesinde potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır (Tümer ve diğerleri, 2018).

Han ve arkadaşları çalışmalarında, etil paraben esaslı hidrazid-hidrazon türevleri (3a–3j) sentezleyip bunları hepatosellüler karsinom hücresi HepG2 üzerinde değerlendirmiştir. Yapısal doğrulama için FT-IR, ¹H-NMR ve elementel analiz kullanılmıştır. Hücre canlılığı MTT ile 24 ve 48 saat değerlendirilmiştir, 3i ve 3j türevleri 37,4 ve 42,4 µM IC₅₀ değerleriyle en güçlü antikanser etkili moleküller olarak öne çıkmıştır ve pozitif kontrol doksorubisin kullanılmıştır. Apoptoz belirteçleri olan BAX, BCL-2, KASPAZ-3 genlerinin qRT-PCR ile zaman-bağımlı artışı, bu etkinin apoptoz mekanizmasıyla ilişkili olduğunu destekler niteliktedir. Moleküllerin ADME özellikleri in silico olarak incelenmiş, Lipinski kriterlerini sağlamış ve % absorpsiyon değerleri ile uygun farmakokinetik profiller öngörülmüştür. Bu bulgular, 3i ve 3j'in potansiyel antikanser ajan adayları olarak daha ileri araştırmalara değer olduğunu göstermektedir. Paraben türevleri üzerine yaptığı bu çalışma, paraben iskeletine bağlı yapısal modifikasyonların biyolojik etkinliği büyük ölçüde artırabildiğini ve kolon kanseri hücreleri üzerinde apoptoz indükleyici etkiler ortaya çıkarabildiğini göstermektedir (Han ve diğerleri,2020).

Kuzey ve arkadaşları, 4-bromobenzil taşıyan mono- ve dispiro-siklotrifosfazen türevlerinin (bileşik 5–10) biyolojik aktiviteleri sentez, yapısal karakterizasyon ve hücresel analizler yoluyla değerlendirmiştir. Bileşiklerin sentezi sonrasında yapısal doğrulamaları FT-IR, ¹H, ¹³C, ³¹P NMR spektroskopisi ve kütle spektrometrisi ile yapılmış; kristal yapılarının belirlenmesinde X-ışını kırınım analizinden yararlanılmıştır. Sitotoksik aktiviteler MTT testiyle insan kolon kanseri (Caco-2) ve normal kolonik fibroblast (CCD-18Co) hücre hatlarında incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak 5-fluorourasil, negatif kontrol olarak ise yalnızca hücre kültür ortamı kullanılmıştır. Deneyler sonucunda, özellikle dispiro bileşiklerden 9 ve 10'un Caco-2 hücrelerinde belirgin sitotoksik etki gösterdiği (IC₅₀ değerleri sırasıyla 38,02 µM ve 35,79 µM) ve aynı konsantrasyon aralığında CCD-18Co hücrelerinde daha düşük toksisiteye neden olduğu belirlenmiştir. Bu da söz konusu bileşiklerin kanser hücrelerine karşı seçici sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca bileşiklerin antimikrobiyal etkileri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi mikroorganizmalar üzerinde test edilmiş, bileşik 9'un *S. aureus* (MIC: 62,5 µg/mL) ve *E. coli* (MIC: 125 µg/mL) suşlarına karşı en yüksek inhibisyonu sağladığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 4-bromobenzil grubunun ve dispiro yapının hem sitotoksik hem de antimikrobiyal etkinliği artırıcı yönde sinerjik etki yarattığını ortaya koymaktadır. Bu

bileşiklerin potansiyel antikanser ve antimikrobiyal ajan adayları olabileceğini göstermektedir (Kuzey ve diğerleri, 2020).

Okumuş ve arkadaşları, ferrocenil içeren 2-cis-4-ansa ve spiro siklotetrafosfazen türevlerinin (3a–3f ve 4a–4d) biyolojik özelliklerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmiştir. Bu bileşiklerin yapısal ve stereokimyasal özellikleri FT-IR, NMR (^1H , ^{13}C , ^{31}P), kütle spektrometrisi ve X-ışını kristalografisi gibi yöntemlerle detaylı şekilde karakterize edilmiştir. Sitotoksik etkileri MTT testiyle, MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı ve L929 normal fibroblast hücre hattında analiz edilmiştir ve pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır. 3b ve 3c numaralı bileşiklerin MCF-7 hücrelerinde, düşük konsantrasyonlarda dahi belirgin sitotoksik etki gösterdiği, buna karşın L929 hücrelerinde daha az toksik olduğu belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar bu türevlerin seçici antikanser potansiyelini ortaya koymuştur. Ayrıca bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri çeşitli gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı değerlendirilmiş ve özellikle 3a ve 3b türevlerinin geniş spektrumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Antioksidan etkileri DPPH radikal süpürme analiziyle incelenmiş ve en yüksek serbest radikal temizleyici aktivitenin (%65) 3b bileşiğinde olduğu görülmüştür. Ames testi sonuçlarına göre ise hiçbir bileşik genotoksik özellik göstermemiştir. Bu bulgular, ferrocenil fonksiyonel grubu taşıyan siklotetrafosfazen türevlerinin hem kanser tedavisi hem de mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesi açısından biyolojik olarak anlamlı özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Okumuş ve diğerleri, 2021).

Yazgan ve arkadaşları, 2-hidroksiantraquinon süstitüe siklotrifosfazen türevleri (özellikle yakından incelenen 2, 3, 4 ve 7 numaralı bileşikler) aracılığıyla, göğüs (MÇF-7) ve kolon (DLD-1) kanser hücrelerinde ilaç direnci ve apoptoz sinyal yollarını değerlendirmiştir. Bu bileşikler, qPCR analizleriyle MDR genlerin (ABCB1, ABCC3, ABCC10, ABCC11, ABCG2) ekspresyonunu anlamlı biçimde baskıladığı için potansiyel bir "MDR tersine çevirici" etkiyi göstermektedir. Aynı zamanda, BAX ve p53 genlerinde artış, BCL-2 ve anti-apoptotik proteinlerde azalma tespit edilmiştir. Proteomik membran dizisi sonuçları, pro-apoptotik sinyal yollarının aktive olduğunu desteklemiş, anti-apoptotik yolların bastırıldığını göstermiştir. Ek olarak, HSP27, HSP40, HSP60, HSP90 α ve ER-şaperon (GRP78, GRP94) da bu bileşiklerin uygulanmasıyla düşürülmüş, bu da hücrel stres direncinin azalması ve apoptozun kolaylaşması açısından klinik anlamda önemli bir bulgu sunmuştur. Bu veriler,

bu siklotrifosfazen türevlerinin hem ilaç direncini kırıcı hem de apoptozu tetikleyici etkilerle antikanser tedavi stratejilerinde umut vadettiğini göstermektedir. (Yazgan ve diğerleri,2022).

Beytur ve arkadaşları, hetero-halkalı şalkon grupları içeren hekza-substitüe siklotrifosfazen türevleri (FSC-1–FSC-4) sentezleyip FT-IR, $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ -NMR ve elemental analiz ile karakterize etmişlerdir. Bu bileşikler, A2780 (over-kanser) ile PC-3 ve LNCaP (prostat kanseri) hücre hatlarında 1, 5, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda, 24 saat MTT testi ile incelenmiş; GraphPad Prism 6 yazılımıyla hesaplanan IC_{50} değerleri, tüm hücre tiplerinde doza bağımlı hücre canlılığı azalması ($p < 0,05$) göstermiştir. Comet (tek hücre jel elektroforezi) yöntemiyle yapılan DNA hasarı analizlerinde 100 μM doz sonunda, tail length, tail intensity ve olive tail moment parametrelerinde anlamlı artışlar ($p < 0,05$) gözlenmiştir. Bu veriler, FSC-1–FSC-4'ün hem sitotoksik hem de genotoksik etkiler taşıdığını ortaya koymaktadır. Ayrıca in siliko çalışmaları, sentezlenen bileşiklerin DNA'ya özgü yüksek bağlanma potansiyelini destekler şekilde deneysel sonuçlarla paralellik göstermiştir. Kompozit analizler, FSC-türevlerinin tümör hücre ölümünü, büyük ihtimalle DNA hasarına bağlı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiğini işaret etmektedir. Dolayısıyla, bu yeni şalkon-fosfazen bileşikleri hem hücre canlılığını azaltan hem de genetik bütünlüğü bozan etki profilleriyle kanser tedavisi için umut vadeden aday moleküller olarak öne çıkmaktadır (Beytur ve diğerleri, 2022).

Yazgan, Mesci, Bayık ve Yıldırım tarafından yapılan çalışmada, 2-hidroksiantrakınon ile sübstitüe edilmiş siklotriptosfazen bileşiklerinin MCF-7 (meme kanseri) ve DLD-1 (kolon kanseri) hücre hatlarındaki etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Sitotoksisite analizleri MTT testi ile gerçekleştirilmiş, pozitif kontrol olarak sisplatin ve negatif kontrol olarak hücre kültür ortamı kullanılmıştır. Bileşiklerin her iki hücre hattında da doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. Moleküler analizlerde, bileşiklerin ATP-Binding Cassette (ABC) taşıyıcı proteinlerinin ekspresyonunu düşürdüğü, böylece hücre içi ilaç direncini azaltabileceği belirlenmiştir. Apoptozla ilişkili gen ve protein analizlerinde ise pro-apoptotik BAX ve KASPAZ-3 genlerinin ve proteinlerinin arttığı, anti-apoptotik BCL-2 geninin ise azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, bileşiklerin kanser hücrelerinde hem çoğalmayı engellediğini hem de apoptoz yoluyla hücre ölümünü teşvik ettiğini göstermektedir. Ayrıca, bu bileşiklerin multidrug resistance (MDR) mekanizmalarını hedefleyerek kanser tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar olabileceği ortaya koyulmuştur. (Yazgan, Mesci, Bayık ve Yıldırım, 2022).

Elschly ve arkadaşları çalışmalarında, metil paraben bileşiğinin MCF-7 (östrojen reseptör pozitif meme kanseri hücre hattı) üzerindeki etkilerini incelemiştir. Sitotoksikite ve hücre canlılığı analizleri MTT testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak tamoksifen ve negatif kontrol olarak ise sadece hücre kültür ortamı kullanılmıştır. MTT sonuçları, metil parabenin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu etkilediğini göstermiştir. Özellikle 100 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığında belirgin bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca, metil parabenin yüksek dozlarda östrojenik aktivite gösterdiği ve antioksidan enzim aktivitelerini artırarak hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasını sağladığı bulunmuştur. Moleküler analizler, metil parabenin östrojen reseptörleriyle etkileşime girerek hücre döngüsü ve apoptoz yollarını modüle ettiğini ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, metil parabenin MCF-7 hücrelerinde hem proliferasyonu uyarabildiğini hem de antioksidan savunmayı aktive ederek hücre sağkalımını desteklediğini göstermektedir. Bu sonuçlar, metil parabenin meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin doza bağlı olarak değişebileceğini ve kullanımının dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. (Elschly ve diğerleri, 2022).

Mesci ve arkadaşlar çalışmalarında, 2-Hidroksiantrakinon ile sübstitüe edilmiş spiro ve ansa siklotriptosfazen bileşiklerinin moleküler düzeyde etkileşimleri in silico moleküler docking yöntemleri kullanarak incelemiştir. Çalışmanın temel amacı, bu bileşiklerin MCF-7 ve DLD-1 kanser hücrelerinde apoptoz sürecini düzenleyen ısı şok proteinleri (HSP) üzerindeki etkilerini ortaya koymaktır. Bileşiklerin hedef proteinlerle bağlanma afiniteleri ve etkileşim bölgeleri detaylı olarak modellenmiş; özellikle HSP70 ve HSP90 gibi proteinlerin modülasyonunda yüksek bağlanma potansiyeli gösterdikleri belirlenmiştir. Moleküler docking sonuçları, bileşiklerin apoptozu tetikleyici sinyal yollarına müdahale edebileceğini desteklemekte ve bu bileşiklerin potansiyel antikanser ajanlar olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Çalışmada ayrıca, farklı bileşiklerin bağlanma enerji değerleri kıyaslanmış ve en yüksek etki potansiyeline sahip bileşikler belirlenmiştir. Bu bulgular, biyolojik deneylerle desteklenerek, siklotriptosfazen türevlerinin kanser tedavisinde yeni hedef moleküller olarak geliştirilmesi açısından önemli bir temel oluşturmuştur (Mesci ve diğerleri, 2025).

Bu tez çalışmasında, Anilin-paraben türevi siklotrifosfazen olan Bileşik-5'in, Caco-2 kolon kanseri ve CCD-18Co hücre hatlarında sitotoksik etkisi MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, bileşiğin doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını göstermiştir. 100 μ M

konsantrasyonda hücre canlılığı %41,61, 50 μ M ve 25 μ M konsantrasyonlarında ise %43,79 ve %57,22 olarak belirlenerek IC_{50} değeri 16,620 μ M olarak hesaplandı. Elde edilen verilere göre, 100 μ M konsantrasyonda CCD-18Co hücre canlılığı %53,31 olarak hesaplanmış, 50 μ M ve 25 μ M konsantrasyonlarında ise %63,93 ve %86,18 olarak belirlenmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda (1,56–6,25 μ M) hücre canlılığı %93 ile %102 arasında değişmiş ve bu konsantrasyonlarda anlamlı bir toksisite gözlenmemiştir. Yapılan qRT-PCR analizi sonucunda Bileşik-5'in hücrelerdeki apoptotik gen ekspresyonlarında belirgin etkileri olduğu görülmektedir. Uygulama sonrası BAX gen ifadesinde 0,11 kat artış, BCL-2 gen ifadesinde 0,07 kat azalma ve KASPAZ-3 gen ifadesinde 0,12 kat artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, özellikle BAX/BCL-2 oranının 1,19'a yükselmesi, Bileşik-5'in mitokondriyal apoptoz yolunu aktive ederek proapoptotik sinyalleri güçlendirdiğini göstermektedir. Ayrıca, KASPAZ-3'teki artış, apoptozun yürütücü enzimlerinin aktive olduğunu ve hücre ölüm sürecinin etkinleştiğini desteklemektedir. Bu bulgular, Bileşik-5'in Caco-2 hücrelerinde hem sitotoksik hem de proapoptotik etkiler sergileyerek, kanser hücrelerinin büyümesini baskılamada potansiyel bir antikanser ajan olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; siklotrifosfazen türevi bileşiklerin (bileşik 3 ve 5) sentez, saflaştırma ve karakterizasyonu yapıldıktan sonra, saflaştırılan bu bileşiklerin yapıları kütle spektrometresi, ^{31}P ve 1H NMR spektroskopisi yöntemleri ile incelendi. Anilin-paraben türevi siklotrifosfazen bileşiğinin sitotoksik ve apoptotik etkileri kolon kanseri hücrelerinde ilk kez çalışılmıştır.

CaCo-2 ve CCD-18Co hücre hatlarında bileşik-3 ve bileşik-5 için (1,56 μ M-100 μ M) konsantrasyon aralığında MTT yöntemiyle en etkili dozları belirlendi.

CaCo-2 hücre hattında bileşik-3'ün hücre canlılığı üzerindeki etkili dozları 100 μ M, 50 μ M ve 25 μ M konsantrasyonlarda, absorbans aralığı 0,408 ile 0,767 arasında ve % canlılık 41,558 ile 78,185 aralığında hesaplandı.

CCD-18Co hücre hattında bileşik-3'ün 100 μ M dozda sitotoksik aktivite gösterdiği, diğer dozlarda (50-1,56 μ M) ise kontrol grubu ile yaklaşık olarak benzer aktivite gösterdiği, absorbans aralığı 0,545 ile 1,096 arasında ve % canlılık 50,697 ile 101,921 aralığında belirlendi.

CaCo-2 hücre hattında bileşik-5'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarda en iyi etkiyi gösterdi, absorbans aralığı 0,406-0,877 arasında ve % canlılık 41,607-84,102 aralığında hesaplandı.

CCD-18Co hücre hattında bileşik-5'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 μ M ve 50 μ M dozda sitotoksik aktivite, diğer dozlarda ise benzer aktivite gösterdi. 0,537-1,028 absorbans aralığı ve 53,309-102,052 % canlılık aralığı belirlendi.

Absorbans ölçüm sonuçlarına göre Microsoft excel programı yardımı ile uygulanan doz ve yüzde canlılık ve IC₅₀ değeri Prism 9 programı ile hesaplandı. Bileşik-3 için IC₅₀ değeri 11,670 ve bileşik-5 için IC₅₀ değeri 16,620 olarak hesaplandığında bileşik-3'ün daha iyi sitotoksik aktivite özelliği gösterdiği tespit edildi.

MTT sonuçlarına göre, bileşik-3 Caco-2 hücre hattında bileşik-5'e göre daha güçlü sitotoksik aktivite ve antiproliferatif etki göstermiştir. Test edilen bileşiklerin CCD-18Co normal hücreleri üzerinde doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı ve toksik etkisi olmadığı belirlenmiştir.

CaCo-2 hücre hattında en etkili sitotoksik aktivite dozu bileşik-3 için 12,5 μ M ve bileşik-5 için 25 μ M olarak MTT analiz yöntemiyle belirlendi. Bu konsantrasyonlar kullanılarak RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. Apoptotik sinyal yollarında önemli rol oynayan BAX, BCL-2 ve KASPAZ-3 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri ise qRT-PCR analizleri ile gerçekleştirildi.

Bileşik-3'ün BAX/BCL-2 oranının kontrole göre 0,05 azalması hücrelerde apoptotik yanıtın kontrol grubuna oranla azaldığını göstermektedir. Bu veriler, Bileşik-3'ün hem proapoptotik hem de antiapoptotik genleri baskıladığına işaret etmektedir. Özellikle Kaspaz-3 geninin baskılanması, mitokondriyal apoptoz yolunun aktif olmadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, MTT analizinde belirgin bir sitotoksik etki gözlemlenmesi, hücre ölümünün apoptoz dışında alternatif mekanizmalar (örneğin nekroz, otofaji veya ferroptoz) üzerinden gerçekleşmiş olabileceğini ortaya koymaktadır.

CaCo-2 hücre hattına bileşik-3 uygulandığında; kontrol grubuna göre BAX gen ifadesini 0,12 kat azalttığı, BCL-2 gen ifadesini 0,07 kat azalttığı ve KASPAZ-3 gen ifadesini ise 0,81 kat azalttığı tespit edildi.

Bileşik-5'in uygulandığı CaCo-2 hücre hattında; kontrol grubuna göre BAX gen ifadesinin 0,11 kat arttığı, BCL-2 gen ifadesinin 0,07 kat azaldığı, KASPAZ-3 gen ifadesinin 0,12 kat arttığı görüldü.

Bileşik-5'in BAX/BCL-2 oranının kontrole göre 0,19 artması, proapoptotik gen ekspresyonunun antiapoptotik gene göre daha etkili olduğunu ve hücrelerin apoptoza yöneliminde bir artış olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, Bileşik-5'in apoptozun mitokondriyal yolunu aktive ettiğini ve bu süreçte BAX/BCL-2 dengesini proapoptotik yönde değiştirdiğini göstermektedir. Aynı zamanda KASPAZ-3'ün artması, apoptozun başlatıcı basamağının da aktive olduğunu desteklemektedir.

Elde edilen sonuçlar göre siklotrifosfazen türevi bileşiğinin yapısal modifikasyonlarının biyolojik etkinliği büyük ölçüde artırabildiğini, kolon kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptoz indükleyici etkiler ortaya çıkarabildiğini göstermektedir. Bileşiklerin insan (Caco-2) kolon kanseri hücrelerinde anlamlı derecede sitotoksik aktivite gösterdiği, sitotoksik etkilerin doza bağımlı olduğu ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Apoptotik etkinlik açısından yapılan analizlerde, hücrelerde apoptoz yolaklarını aktive ederek programlı hücre ölümünü teşvik ettiği bulunmuştur.

Antiapoptotik BCL-2 ve proapoptotik BAX gen ailesi ekspresyonundaki ve KASPAZ-3 aktivasyonundaki değişiklikler apoptozun önemli bir göstergesi olarak tespit edilmiştir. Sitotoksik analizler ve sinyal yolları ile ilişkili gen hedeflerine yüksek afinite ile bağlanarak CaCo-2 kolon kanser hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) indüklediği için bu bileşiklerin potansiyel anti-kanser ajanlar olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Farklı kanser hücrelerinde bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri, moleküler modelleme, akış sitometri testleri, protein analizleri ve *in vivo* deneysel çalışmaları yapılarak desteklenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Adelstein, B. A., Macaskill, P., Chan, S. F., Katelaris, P. H. and Irwig, L. (2011). Most bowel cancer symptoms do not indicate colorectal cancer and polyps: a systematic review. *BMC gastroenterology*, 11, 1-10.
- Akbaş, H., Karadağ, A., Aydın, A., Destegül, A. ve Kılıç, Z. (2017). Synthesis, structural and thermal properties of the hexapyrrolidinocyclotriphosphazenes-based protic molten salts: Antiproliferative effects against HT29, HeLa, and C6 cancer cell lines. *Journal of Molecular Liquids*, 230, 482-495.
- Akbaş, H., Şenocak, A., Kılıç, Z., Erden Tayhan, S., Bilgin, S., Yıldırım Kocaman, A. ve Hökelek, T. (2023). Bis (2-furanylmethyl) monospiro (N/N) cyclotriphosphazenes: synthesis, structural characterization, antiproliferative, and antimigratory activity studies. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 198(12), 1040-1049.
- Almosa, H., Alqriqi, M., Denetiu, I., Baghdadi, M. A., Alkhaled, M., Alhosin, M., ... and Damiati, S. (2020). Cytotoxicity of standardized curcuminoids mixture against epithelial ovarian cancer cell line SKOV-3. *Scientia Pharmaceutica*, 88(1), 11.
- Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Süzen, Y. ve Öner, Y. (2013). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 26. Syntheses, spectroscopic and structural investigations, biological and cytotoxic activities, and DNA interactions of mono and bisferrocenylspirocyclotriphosphazenes. *Inorganica Chimica Acta*, 400, 250-261.
- Ateş, Ö., Sivri, B. ve Kilickap, S. (2017). Evaluation of risk factors for the recurrence of colorectal polyps and colorectal cancer. *Turkish journal of medical sciences*, 47(5), 1370-1376.
- Aydın, İ., Şehitoğlu, İ., Özer, E., Yücel, A. F., Pergel, A., Bedir, R. ve Şahin, D. A. (2015). Kolorektal kanser nedeniyle opere ettiğimiz hastaların değerlendirilmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 16(2), 102-109.
- Baillargeon, A. L. and Mequanint, K. (2014). Biodegradable polyphosphazene biomaterials for tissue engineering and delivery of therapeutics. *BioMed research international*, 2014(1), 761373.
- Banias, L., Jung, I., Chiciudean, R. and Gurzu, S. (2022). From dukes-MAC staging system to molecular classification: evolving concepts in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9455.
- Baskin, Y., Yazıcı, Z., Baskin, H., Ozkul, A., Olgun, N. ve Bahar, I. H. (2005). Selective apoptotic behaviour of bovine herpesvirus 1 in an epithelial-like microenvironment. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(4), 479-491.
- Başterzi, N. S., Koçak, S. B., Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Çelik, Ö., ... ve Aydın, B. (2015). Syntheses, structural characterization and biological activities of spiro-ansa-spiro-cyclotriphosphazenes. *New Journal of Chemistry*, 39(11), 8825-8839.

- Berberoğlu, İ., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., ... ve Dal, H. (2016). Phosphorus nitrogen compounds: Part 34. Syntheses, structural investigations, cytotoxic and biological activities of spiro-ansa-spiro and spiro-bino-spiro tetrameric phosphazene derivatives. *Inorganica Chimica Acta*, 446, 75-86.
- Beytur, A., Tekin, Ç., Çalışkan, E., Tekin, S., Koran, K., Görgülü, A. O. ve Sandal, S. (2022). Hexa-substituted cyclotriphosphazene derivatives containing hetero-ring chalcones: Synthesis, in vitro cytotoxic activity and their DNA damage determination. *Bioorganic Chemistry*, 127, 105997.
- Bilge, S., Demiriz, Ş., Okumuş, A., Kılıç, Z., Tercan, B., Hökelek, T. ve Büyükgüngör, O. (2006). Phosphorus– Nitrogen Compounds. Part 13. Syntheses, Crystal Structures, Spectroscopic, Stereogenic, and Anisochronic Properties of Novel Spiro-Ansa-Spiro-, Spiro-Bino-Spiro-, and Spiro-Crypta Phosphazene Derivatives. *Inorganic chemistry*, 45(21), 8755-8767.
- Bonanno, E., Tagliafierro, G., Carlà, E. C., Montinari, M. R., Pagliara, P., Mascetti, G., ... and Dini, L. (2002). Synchronized onset of nuclear and cell surface modifications in U937 cells during apoptosis. *European Journal of Histochemistry*, 46(1), 61-74.
- Braun, J. M., Just, A. C., Williams, P. L., Smith, K. W., Calafat, A. M. and Hauser, R. (2014). Personal care product use and urinary phthalate metabolite and paraben concentrations during pregnancy among women from a fertility clinic. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 24(5), 459-466.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I. and Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263.
- Brodie, C. M., Crotty, P. L. and Gaffney, E. F. (2004). Morphologically distinct patterns of apoptosis correlate with size and high-grade dysplasia in colonic adenomas. *Histopathology*, 44(3), 240-246.
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U. and Pienta, K. J. (2023). Updating the definition of cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142-1147.
- Carampin, P., Conconi, M. T., Lora, S., Menti, A. M., Baiguera, S., Bellini, S., ... and Parnigotto, P. P. (2007). Electrospun polyphosphazene nanofibers for in vitro rat endothelial cells proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80(3), 661-668.
- Cariello, M., Piccinin, E., Pasculli, E., Arconzo, M., Zerlotin, R., D'Amore, S., ... and Moschetta, A. (2022). Platelets from patients with visceral obesity promote colon cancer growth. *Communications Biology*, 5(1), 553.
- Casella, G., Carlotto, S., Lanero, F., Mozzon, M., Sgarbossa, P. and Bertani, R. (2022). Cyclo-and polyphosphazenes for biomedical applications. *Molecules*, 27(23), 8117.

- Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Çoşut, B., Kılıç, Z., Sabah, B. N., Açık, L., ... ve Hökelek, T. (2023). Phosphorus-nitrogen compounds: Part 69—Unsymmetrical dispiro (N/N) cyclotriphosphazenes containing different pendant arms: syntheses, characterization, stereogenism, photophysical and bioactivity studies. *Research on Chemical Intermediates*, 49(5), 2071-2098.
- Chen, J., Li, X., Qiu, J., You, H., Zhang, Q., Dong, G. and Zuo, Y. (2013). Kinetics of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins in rat CA3 hippocampus cells after experimental diffuse brain injury. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67, 1015-1019.
- Chen, Z., Li, K., Yin, X., Li, H., Li, Y., Zhang, Q., ... and Qiu, Y. (2019). Lower expression of gelsolin in colon cancer and its diagnostic value in colon cancer patients. *Journal of Cancer*, 10(5), 1288.
- Chen, Z., Yin, X., Li, K., Chen, S., Li, H., Li, Y., ... and Qiu, Y. (2018). Serum levels of TRIM72 are lower among patients with colon cancer: identification of a potential diagnostic marker. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 245(1), 61-68.
- Chipuk, J. E., McStay, G. P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C. J., Siskind, L. J., ... and Green, D. R. (2012). Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell*, 148(5), 988-1000.
- Corley, D. A., Jensen, C. D., Marks, A. R., Zhao, W. K., Lee, J. K., Doubeni, C. A., ... and Quesenberry, C. P. (2014). Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *New england journal of medicine*, 370(14), 1298-1306.
- Chunyang, L., Fang, L. and Kurunthachalam, K. (2013). Occurrence of and Dietary Exposure to Parabens in Foodstuffs from the United States.
- Çalışkan, E., Yüksel, F., Çapan, İ., Tekin, S., Bouzidi, R., Qaoud, M. T., ... and Orhan Görgülü, A. (2025). Phosphazene Tripeptide Conjugates: Design, Synthesis, In Vitro Cytotoxicity and Genotoxicity, Molecular Interactions in Binding Pockets on Human Breast and Colon Cancer Cell Lines. *ChemMedChem*, 20(3), e202400570.
- Danial, N. N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical cancer research*, 13(24), 7254-7263.
- Darbre, P. D., Byford, J. R., Shaw, L. E., Hall, S., Coldham, N. G., Pope, G. S. and Sauer, M. J. (2003). Oestrogenic activity of benzylparaben. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 23(1), 43-51.
- Delattre, J. F., Cohen, R., Henriques, J., Falcoz, A., Emile, J. F., Fratte, S., ... and Svrcek, M. (2020). Prognostic value of tumor deposits for disease-free survival in patients with stage III colon cancer: a post hoc analysis of the IDEA France phase III trial (PRODIGE-GERCOR). *Journal of Clinical Oncology*, 38(15), 1702-1710.

- Devarajan, E., Sahin, A. A., Chen, J. S., Krishnamurthy, R. R., Aggarwal, N., Brun, A. M. , ... and Mehta, K. (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*, 21(57), 8843-8851.
- Doğan, H., Bahar, M. R., Çalışkan, E., Tekin, S., Uslu, H., Akman, F., ... ve Görgülü, A. O. (2022). Synthesis and spectroscopic characterizations of hexakis [(1-(4'-oxyphenyl)-3-(substituted-phenyl) prop-2-en-1-one)] cyclotriphosphazenes: Their in vitro cytotoxic activity, theoretical analysis and molecular docking studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(7), 3258-3272.
- Eliaser, E. M., Mohd. Hashim, N., Rukayadi, Y. and Abdull Razis, A. F. (2023). 7-Geranyloxycinnamic Acid Isolated from Melicope lunu-ankenda Leaves Perturbs Colon Cancer and Breast Cancer Cell Lines' Growth via Induction of Apoptotic Pathway. *Molecules*, 28(8), 3612.
- Elmas, G., Okumuş, A., Koç, L. Y., Soltanzade, H., Kılıç, Z., Hökelek, T., ... ve Yavuz, M. (2014). Phosphorus–nitrogen compounds. Part 29. Syntheses, crystal structures, spectroscopic and stereogenic properties, electrochemical investigations, antituberculosis, antimicrobial and cytotoxic activities and DNA interactions of ansa-spiro-ansa cyclotetraphosphazenes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 662-676.
- Elsehly, W. M., Mourad, G. M., Mehanna, R. A., Kholief, M. A., El-Nikhely, N. A., Awaad, A. K. and Attia, M. H. (2022). The potential implications of estrogenic and antioxidant-dependent activities of high doses of methyl paraben on MCF7 breast cancer cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(5), e23012.
- Engeli, R. T., Rohrer, S. R., Vuorinen, A., Herdlinger, S., Kaserer, T., Leugger, S., ... and Odermatt, A. (2017). Interference of paraben compounds with estrogen metabolism by inhibition of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 2007.
- Ergül, B., Sarıkaya, M., Doğan, Z. ve Filik, L. (2013). Kolorektal kanserli hastaların asemptomatik birinci derece yakınlarının kolonoskopik değerlendirme sonuçları: Tek merkezli prospektif çalışma. *Endoskopi Gastrointestinal*, 21(2).
- Florento, L., Matias, R., Tuaño, E., Santiago, K., dela Cruz, F. and Tuazon, A. (2012). Comparison of cytotoxic activity of anticancer drugs against various human tumor cell lines using in vitro cell-based approach. *International journal of biomedical science: IJBS*, 8(1), 76.
- Ganapathiappan, S. and Krishnamurthy, S. S. (1987). Studies of phosphazenes. Part 30. Reactions of hexachlorocyclotriphosphazene with aromatic primary amines: interplay of geminal and non-geminal modes of chlorine replacement. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (3), 579-584.
- Guo, R., Sim, W. J., Lee, E. S., Lee, J. H., & Oh, J. E. (2010). Evaluation of the fate of perfluoroalkyl compounds in wastewater treatment plants. *Water research*, 44(11), 3476-3486.
- Gerçeker, E. ve Baykan, A. (2022). Association between diverticular disease and prevalence of colorectal adenomatous polyps or adenocarcinomas: Diverticular disease and

- colorectal adenoma/adenocarcinoma. *Journal of Surgery and Medicine*, 6(12), 994-998.
- Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E. S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13430-13437.
- Güzel Bayülken, D., Ayaz Tüylü, B., Sinan, H. ve Sivas, H. (2019). Investigation of genotoxic effects of paraben in cultured human lymphocytes. *Drug and chemical toxicology*, 42(4), 349-356.
- Habib, R., Akhtar, J., Taqi, M., Yu, C. and Zhang, C. (2015). Lentiviral vector-mediated survivin shRNA delivery in gastric cancer cell lines significantly inhibits cell proliferation and tumor growth. *Oncology reports*, 34(2), 859-867.
- Hajizadeh, Y., Kiani Feizabadi, G. and Feizi, A. (2020). Dietary habits and personal care product use as predictors of urinary concentrations of parabens in Iranian adolescents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(12), 2378-2388.
- Haman, C., Dauchy, X., Rosin, C. and Munoz, J. F. (2015). Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review. *Water Research*, 68, 1-11.
- Han, M. İ., Atalay, P., İmamoğlu, N. ve Küçükgül, Ş. G. (2020). Synthesis, characterization and anticancer activity of novel hydrazide-hydrazones derived from ethyl paraben. *J Res Pharm*, 24(3), 341-349.
- Han, W., Xie, J., Li, L., Liu, Z. and Hu, X. (2009). Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis. *Apoptosis*, 14, 674-686.
- Harvey, P. W. and Everett, D. J. (2012). Parabens detection in different zones of the human breast: consideration of source and implications of findings. *Journal of Applied Toxicology*, 32(5), 305-309.
- Hati, S., Tripathy, S., Dutta, P. K., Agarwal, R., Srinivasan, R., Singh, A., ... and Sen, S. (2016). Spiro [pyrrolidine-3, 3-oxindole] as potent anti-breast cancer compounds: Their design, synthesis, biological evaluation and cellular target identification. *Scientific reports*, 6(1), 32213.
- He, Z., Dang, J., Song, A., Cui, X., Ma, Z. and Zhang, Z. (2019). NEAT1 promotes colon cancer progression through sponging miR-495-3p and activating CDK6 in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 19582-19591.
- HeZ, D. and SongA, C. (2019). NEAT1promotescolon cancerprogressionthroughspongingmiR-495-3pandactivatingCDK6invitroandinvivo. *JCellPhysiol*, 234(11), 19582r19591.
- Hsu, S. L., Yu, C. T. R., Yin, S. C., Tang, M. J., Tien, A. C., Wu, Y. M. and Huang, C. Y. F. (2006). Caspase 3, periodically expressed and activated at G2/M transition, is required for nocodazole-induced mitotic checkpoint. *Apoptosis*, 11, 765-771.

- Hsu, S. Y. and Hsueh, A. J. (2000). Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm. *Physiological reviews*, 80(2), 593-614.
- Hu, P., Overby, H., Heal, E., Wang, S., Chen, J., Shen, C. L. and Zhao, L. (2017). Methylparaben and butylparaben alter multipotent mesenchymal stem cell fates towards adipocyte lineage. *Toxicology and applied pharmacology*, 329, 48-57.
- Huang, Y., Jia, Z., Xu, Y., Qin, M. and Feng, S. (2020). Selenium protects against LPS-induced MC3T3-E1 cells apoptosis through modulation of microRNA-155 and PI3K/Akt signaling pathways. *Genetics and molecular biology*, 43(3), e20190153.
- Ibrahim, S., Riwanto, I., Suharti, C., Putra, A. and Budijitno, S. (2024). Synergistic Cytotoxicity of 5-Fluorouracil and Epigallocatechin-3-Gallate on Colorectal Cancer Stem Cell. *Indonesian Journal of Cancer*, 18(2), 192-198.
- İlter, E. E., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Işıklan, M., Hoেকেlek, T., Caylak, N. ve Şahin, E. (2007). Phosphorus– nitrogen compounds. 14. synthesis, stereogenism, and structural investigations of novel N/O spirocyclic phosphazene derivatives. *Inorganic chemistry*, 46(23), 9931-9944.
- Jain, P. T., Pento, J. T. and Graves, D. C. (1992). Cell-growth quantitation methods for the evaluation of antiestrogens in human breast cancer cells in culture. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 27(4), 203-207.
- Ji, B., Guo, W., Ma, H., Xu, B., Mu, W., Zhang, Z. ... and Cao, L. (2017). Isoliquiritigenin suppresses IL-1 β induced apoptosis and inflammation in chondrocyte-like ATDC5 cells by inhibiting NF- κ B and exerts chondroprotective effects on a mouse model of anterior cruciate ligament transection. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(6), 1709-1718.
- Ji, Z. Z. and Xu, Y. C. (2016). Melatonin protects podocytes from angiotensin II-induced injury in an in vitro diabetic nephropathy model. *Molecular medicine reports*, 14(1), 920-926.
- Jian, J., Xuan, F., Qin, F. and Huang, R. (2016). The antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities of the baubinia championii flavone are connected with protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38(4), 1365-1375.
- Jiang, X., Cao, G., Gao, G., Wang, W., Zhao, J. and Gao, C. (2021). Triptolide decreases tumor-associated macrophages infiltration and M2 polarization to remodel colon cancer immune microenvironment via inhibiting tumor-derived CXCL12. *Journal of cellular physiology*, 236(1), 193-204.
- Kanwar, R., Rathee, J., Salunke, D. B., and Mehta, S. K. (2019). Green nanotechnology-driven drug delivery assemblies. *ACS Omega* 4: 8804–8815.
- Keefe, D., Wang, F., Robinson, L. G., Weissman, S. M., Liu, L., Kalmbach, K. H., and Pan, X. V. (2017). Measurement of telomere length at the single cell level.

- Khadem, S. and Marles, R. J. (2010). Monocyclic phenolic acids; hydroxy-and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules*, 15(11), 7985-8005.
- Kim, M. Y., Lee, H., Ji, S. Y., Kim, S. Y., Hwangbo, H., Park, S. H. ... and Choi, Y. H. (2021). Induction of apoptosis by isoalantolactone in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells through activation of the ROS-dependent JNK signaling pathway. *Pharmaceutics*, 13(10), 1627.
- Koçoğlu, S. (2012). Süstitüe Spiro-Ansa-Spiro-ve Spiro-Bino-Spiro-fosfazen türevlerinin sentezi, kristal yapılarının, spektroskopik özelliklerinin, biyolojik aktifliklerinin ve dna'ya etkilerinin incelenmesi.
- Kolb, T. M., Chang, S. H. and Davis, M. A. (2002). Biochemical and morphological events during okadaic acid-induced apoptosis of Tsc2-null ERC-18 cell line. *Toxicologic pathology*, 30(2), 235-246.
- Kong, D., Zheng, T., Zhang, M., Wang, D., Du, S., Li, X. ... and Cao, X. (2013). Static mechanical stress induces apoptosis in rat endplate chondrocytes through MAPK and mitochondria-dependent caspase activation signaling pathways. *PloS one*, 8(7), e69403.
- Konsoula, R. and Barile, F. A. (2005). Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro*, 19(5), 675-684.
- Koran, K., Tekin, Ç., Çalışkan, E., Tekin, S., Sandal, S. ve Görgülü, A. O. (2017). Synthesis, structural and thermal characterizations and in vitro cytotoxic activities of new cyclotriphosphazene derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 192(9), 1002-1011.f
- Kuzey, N. G., Özgür, M., Cemaloğlu, R., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Açık, L., ... ve Hökelek, T. (2020). Mono-and dispirocyclotriphosphazenes containing 4-bromobenzyl pendant arm (s): Synthesis, spectroscopy, crystallography and biological activity studies. *Journal of Molecular Structure*, 1220, 128658.
- Lan, M., Kong, Z., Liu, F., Zou, T., Li, L., Cai, T., ... and Cai, Y. (2022). Activating caspase-8/Bid/ROS signaling to promote apoptosis of breast cancer cells by folate-modified albumin baicalin-loaded nanoparticles. *Nanotechnology*, 33(43), 435101.
- Lee, J., Bang, S. H., Kim, Y. H. and Min, J. (2018). Toxicities of four parabens and their mixtures to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Environmental Health and Toxicology*, 33(4).
- Leo, R., Therachiyil, L., Siveen, S. K., Uddin, S., Kulinski, M., Buddenkotte, J., ... and Krishnankutty, R. (2019). Protein expression profiling identifies key proteins and pathways involved in growth inhibitory effects exerted by guggulsterone in human colorectal cancer cells. *Cancers*, 11(10), 1478.

- Li, L., Hu, G., Luo, X., Wei, Z., Yu, Z. and He, J. (2023). Association between Urine Parabens and Liver Function in US Adolescents: A cross-sectional study based on NHANES 2007–2016.
- Li, Q., Xiao, K. and Wang, Z. (2015, April). Cytotoxic and apoptotic effects of the venom of the scorpion *Heterometrus liangi* in human KYSE-510 cells (esophageal cancer). In *2015 International Conference on Mechatronics, Electronic, Industrial and Control Engineering (MEIC-15)* (pp. 750-755). Atlantis Press.
- Liang, J., Yang, X., Liu, Q. S., Sun, Z., Ren, Z., Wang, X., ... and Jiang, G. (2021). Assessment of thyroid endocrine disruption effects of parabens using in vivo, in vitro, and in silico approaches. *Environmental science & technology*, 56(1), 460-469.
- Lillo, M. A., Nichols, C., Perry, C., Runke, S., Krutilina, R., Seagroves, T. N., ... and Krum, S. A. (2017). Methylparaben stimulates tumor initiating cells in ER+ breast cancer models. *Journal of Applied Toxicology*, 37(4), 417-425.
- Liu, J., Wang, L., Guo, N., Teng, Y. O. and Yu, P. (2014). Design, synthesis and biological evaluation of the novel isoindolinone derivatives. *J Chem Pharm Res*, 6, 256-263.
- Liu, T., Hou, D. D., Zhao, Q., Liu, W., Zhen, P. P., Xu, J. P., ... and Wang, W. (2013). Phytoestrogen α -Zearalanol Attenuates Homocysteine-Induced Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *BioMed Research International*, 2013(1), 813450.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Loureiro, B., Brad, A. M. and Hansen, P. J. (2007). Heat shock and tumor necrosis factor- α induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9-dependent mechanism. *Reproduction*, 133(6), 1129-1137.
- Lu, P., Shen, Y. M., Hua, T., Pan, T., Chen, G., Dai, T. and Shi, K. Q. (2021). Overexpression of FGF2 delays the progression of osteonecrosis of the femoral head activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 16, 1-11.
- Lu, Y., Cai, G., Cui, S., Geng, W., Chen, D., Wen, J., ... and Chen, X. (2014). FHL 2-driven molecular network mediated Septin2 knockdown inducing apoptosis in mesangial cell. *Proteomics*, 14(21-22), 2485-2597.
- Majewska, N., Zaręba, I., Surazyński, A. and Galicka, A. (2017). Methylparaben-induced decrease in collagen production and viability of cultured human dermal fibroblasts. *Journal of Applied Toxicology*, 37(9), 1117-1124.
- Mankiewicz, J., Tarczyska, M., Fladmark, K. E., Doskeland, S. O., Walter, Z. and Zalewski, M. (2001). Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 16(3), 225-233.
- Meng, Y., Wang, W., Kang, J., Wang, X. and Sun, L. (2017). Role of the PI3K/AKT signalling pathway in apoptotic cell death in the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Ther Med* 13 (5): 2417–2422.

- Mesci, S., Yazgan, B., Demir Demirel, G., Yildirim, T. ve Yenilmez Çiftçi, G. (2025). In Silico Molecular Docking of 2-Hydroxyanthraquinone-Substituted Spiro-/Ansa Cyclotriphosphazenes: Targeting Apoptosis via Heat Shock Protein Modulation in Breast and Colon Cancer Cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, e2767.
- Ming, S., Tian, J., Ma, K., Pei, C., Li, L., Wang, Z., ... and Gao, X. (2022). Oxalate-induced apoptosis through ERS-ROS–NF-κB signalling pathway in renal tubular epithelial cell. *Molecular Medicine*, 28(1), 88.
- Mohan, S., Abdelwahab, S. I., Cheah, S. C., Sukari, M. A., Syam, S., Shamsuddin, N. and Rais Mustafa, M. (2013). Apoptosis effect of girinimbine isolated from *Murraya koenigii* on lung cancer cells in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 689865.
- Moodley, Y. P., Caterina, P., Scaffidi, A. K., Misso, N. L., Papadimitriou, J. M., McAnulty, R. J., ... and Knight, D. A. (2004). Comparison of the morphological and biochemical changes in normal human lung fibroblasts and fibroblasts derived from lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis during FasL-induced apoptosis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 202(4), 486-495.
- Moses Makhoahle, P. (2024). A Review: Understanding the Impact of Cancer During the Search of Safe and Affordable Medicinal Plants. A Need for In Vivo Investigation for the Safety Aspect of *Asparagus Laricinus*?
- Mosmann, 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.
- Nagarsheth, N., Peng, D., Kryczek, I., Wu, K., Li, W., Zhao, E., ... and Zou, W. (2016). PRC2 epigenetically silences Th1-type chemokines to suppress effector T-cell trafficking in colon cancer. *Cancer research*, 76(2), 275-282.
- Nair, L. S., Lee, D. A., Bender, J. D., Barrett, E. W., E. Greish, Y., Brown, P. W., ... and Laurencin, C. T. (2006). Synthesis, characterization, and osteocompatibility evaluation of novel alanine-based polyphosphazenes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 76(1), 206-213.
- Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., Zucco, F. and Felsani, A. (2012). Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in vitro*, 26(8), 1243-1246.
- Nemes, D., Kovács, R., Nagy, F., Mező, M., Poczok, N., Ujhelyi, Z., ... and Bácskay, I. (2018). Interaction between different pharmaceutical excipients in liquid dosage forms—Assessment of cytotoxicity and antimicrobial activity. *Molecules*, 23(7), 1827.
- Oishi, S. (2001). Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 17(1), 31-39.

- Oishi, S. (2002). Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Archives of toxicology*, 76, 423-429.
- Okumuş, A., Akbaş, H., Kılıç, Z., Yasemin Koç, L., Açıık, L., Aydın, B. ve Dal, H. (2016). Phosphorus–nitrogen compounds part 33: in vitro cytotoxic and antimicrobial activities, DNA interactions, syntheses, and structural investigations of new mono (4-nitrobenzyl) spirocyclotriphosphazenes. *Research on Chemical Intermediates*, 42, 4221-4251.
- Okumuş, A., Elmas, G., Kılıç, Z., Binici, A., Ramazanoğlu, N., Açıık, L., ... ve Şimşek, H. (2021). The comparative reactions of 2-cis-4-ansa and spiro cyclotetraphosphazenes with difunctional ligands: Structural and stereogenic properties, electrochemical, antimicrobial and cytotoxic activity studies. *Applied Organometallic Chemistry*, 35(4), e6150.
- Onder, A. ve Ozay, H. (2021). Synthesis and characterization of biodegradable and antioxidant phosphazene-tannic acid nanospheres and their utilization as drug carrier material. *Materials Science and Engineering: C*, 120, 111723.
- Ozsoy, F. ve Ozay, O. (2023). Enhanced drug carrier capacity after post modification process for amino acid substitute phosphazene based microspheres with anticancer activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 86, 104695.
- Pelling, A. E., Veraitch, F. S., Chu, C. P. K., Mason, C. and Horton, M. A. (2009). Mechanical dynamics of single cells during early apoptosis. *Cell motility and the cytoskeleton*, 66(7), 409-422.
- Peng, X., Adachi, K., Chen, C., Kasai, H., Kanoh, K., Shizuri, Y. and Misawa, N. (2006). Discovery of a marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens. *Applied and environmental microbiology*, 72(8), 5556-5561.
- Peng, Y., Zhang, Z., Yang, G., Dai, Z., Cai, X., Liu, Z., ... and Xu, L. (2024). N6-methyladenosine reader protein IGF2BP1 suppresses CD8+ T cells-mediated tumor cytotoxicity and apoptosis in colon cancer. *Apoptosis*, 29(3), 331-343.
- Rahim, N. F. C., Hussin, Y., Aziz, M. N. M., Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Masarudin, M. J. and Alitheen, N. B. (2021). Cytotoxicity and apoptosis effects of curcumin analogue (2E, 6E)-2, 6-bis (2, 3-dimethoxybenzylidene) cyclohexanone (DMCH) on human colon cancer cells HT29 and SW620 in vitro. *Molecules*, 26(5), 1261.
- Rao, X., Lai, D. and Huang, X. (2013). A new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Journal of computational biology*, 20(9), 703-711.
- Ren, B., Hu, X., Cheng, J., Huang, Z., Wei, P., Shi, W., ... and Ao, Y. (2017). Synthesis and characterization of polyphosphazene microspheres incorporating demineralized bone matrix scaffolds controlled release of growth factor for chondrogenesis applications. *Oncotarget*, 8(69), 114314.

- Reyes-Zurita, F. J., Rufino-Palomares, E. E., García-Salguero, L., Peragón, J., Medina, P. P., Parra, A., ... and Lupiáñez, J. A. (2016). Maslinic acid, a natural triterpene, induces a death receptor-mediated apoptotic mechanism in Caco-2 p53-deficient colon adenocarcinoma cells. *PLoS One*, 11(1), e0146178.
- Riedl, S. J. and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(11), 897-907.
- Rodrigo, S. H., Rafael, C. R. and Alejandro, W. S. (2022). Obstructing colon cancer presenting as toxic megacolon. *MedCrave*, 13(5), 190-192.
- Rothmund, S., Aigner, T. B., Iturmendi, A., Rigau, M., Husár, B., Hildner, F., ... and Teasdale, I. (2015). Degradable Glycine-Based Photo-Polymerizable Polyphosphazenes for Use as Scaffolds for Tissue Regeneration. *Macromolecular bioscience*, 15(3), 351-363.
- Schmidt, M., Afione, S. and Kotin, R. M. (2000). Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *Journal of virology*, 74(20), 9441-9450.
- Senkuytu, E., Kızılkaya, P., Olcer, Z., Pala, U., Davarcı, D., Zorlu, Y., ... ve Yenilmez Çiftçi, G. (2020). Electrophoresis and biosensor-based DNA interaction analysis of the first paraben derivatives of spermine-bridged cyclotriphosphazenes. *Inorganic Chemistry*, 59(4), 2288-2298.
- Shaniba, V. S., Aziz, A. A., Joseph, J., Jayasree, P. R. and Manish Kumar, P. R. (2022). Synthesis, characterization and evaluation of antioxidant and cytotoxic potential of *Annona muricata* root extract-derived biogenic silver nanoparticles. *Journal of Cluster Science*, 1-17.
- Smith, K. W., Braun, J. M., Williams, P. L., Ehrlich, S., Correia, K. F., Calafat, A. M., ... and Hauser, R. (2012). Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy. *Environmental health perspectives*, 120(11), 1538-1543.
- Solé, X., Crous-Bou, M., Cordero, D., Olivares, D., Guinó, E., Sanz-Pamplona, R., ... and Moreno, V. (2014). Discovery and validation of new potential biomarkers for early detection of colon cancer. *PLoS One*, 9(9), e106748.
- Soni, M. G., Carabin, I. G. and Burdock, G. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and chemical toxicology*, 43(7), 985-1015.
- Soung, Y. H., Lee, J. W., Kim, S. Y., Park, W. S., Nam, S. W., Lee, J. Y., ... and Lee, S. H. (2004). Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Human genetics*, 115, 112-115.
- Stepczynska, A., Lauber, K., Engels, I. H., Janssen, O., Kabelitz, D., Wesselborg, S. and Schulze-Osthoff, K. (2001). Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene*, 20(10), 1193-1202.

- Su, X., Zhang, L., Kang, H., Zhang, B., Bao, G. and Wang, J. (2019). Mechanical, nanomorphological and biological reconstruction of early-stage apoptosis in HeLa cells induced by cytochalasin B. *Oncology Reports*, 41(2), 928-938.
- Sun, J., Wang, X. and Wu, D. (2012). Novel spirocyclic phosphazene-based epoxy resin for halogen-free fire resistance: synthesis, curing behaviors, and flammability characteristics. *ACS applied materials & interfaces*, 4(8), 4047-4061.
- Şenkuytu, E., Akbaş, N., Yıldırım, T. ve Çiftçi, G. Y. (2022). Synthesis, characterization and cytotoxic activity studies on cancer cell lines of new paraben-decorated monospirocyclotriphosphazenes. *New Journal of Chemistry*, 46(5), 2453-2464.
- Şenkuytu, E., Akbaş, N., Yıldırım, T. ve Çiftçi, G. Y. (2022). The bioactive new type paraben decorated dispiro-cyclotriphosphazene compounds: synthesis, characterization and cytotoxic activity studies. *Journal of Molecular Structure*, 1255, 132438.
- Tahata, S., Yuan, B., Kikuchi, H., Takagi, N., Hirano, T. and Toyoda, H. (2014). Cytotoxic effects of pyrrolidine dithiocarbamate in small-cell lung cancer cells, alone and in combination with cisplatin. *International Journal of Oncology*, 45(4), 1749-1759.
- Tamgadge, L. V., Ahmed, M. H. S., Ugane, S. P. and Gurav, P. D. (2016). Clinical profile and factors affecting surgical outcome of colorectal carcinoma in rural India: a study of 60 cases. *International Surgery Journal*, 3(4), 2129-2134.
- Tao, Y., Zafar, I., Kim, J., Schrier, R. W. and Edelstein, C. L. (2008). Caspase-3 gene deletion prolongs survival in polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(4), 749-755.
- Taysı, m. r. ve köprücü, s. (2022). benekli sazan (cyprinion macrostomus, heckel, 1843)'ın bağırsak ve karaciğerinin histolojik yapısı ve histokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *ecological life sciences*, 17(4), 141-150.
- Teasdale, I. and Brüggemann, O. (2013). Polyphosphazenes: multifunctional, biodegradable vehicles for drug and gene delivery. *Polymers*, 5(1), 161-187.
- Tian, M. and Zhou, Z. (2022). Chemotherapy exacerbates the survival paradox of colon cancer: a propensity score matching analysis. *Translational Cancer Research*, 11(12), 4241.
- Tozar, T., Nistorescu, S., Boni, M., Gradisteanu Pircalabioru, G., Negut, I. and Staicu, A. (2022). Pulsed laser photo-crosslinking of gelatin methacryloyl hydrogels for the controlled delivery of chlorpromazine to combat antimicrobial resistance. *Pharmaceutics*, 14(10), 2121.
- Tsabit, S. S., Trianto, H. F., Pratiwi, S. E. and Hartono, H. (2023). Clinicopathological Profile of Colorectal Adenocarcinoma in the Anatomical Pathology Laboratory of Dr. Soedarso Hospital Pontianak. *Indonesian Journal of Cancer*, 17(4), 292-298.

- Tümer, Y., Asmafiliz, N., Zeyrek, C. T., Kılıç, Z., Açık, L., Çelik, S. P., ... ve Hökelek, T. (2018). Syntheses, spectroscopic and crystallographic characterizations of cis-and trans-dispirocyclic ferrocenylphosphazenes: molecular dockings, cytotoxic and antimicrobial activities. *New Journal of Chemistry*, 42(3), 1740-1756.
- Tümer, Y., Şehirli, E. ve Ataol, Ç. Y. (2017). Syntheses and Structural Characterization of First Paraben Substituted Ferrocenyl Phosphazene Compounds. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 4(1), 299-312.
- Wang, C., Wang, J., Jiang, H., Zhu, M., Chen, B. and Bao, W. (2011). In vitro study on apoptosis induced by Strontium-89 in human breast carcinoma cell line. *BioMed Research International*, 2011(1), 541487
- Wang, S., Xu, Y., Chan, H. F., Kim, H. W., Wang, Y., Leong, K. W. and Chen, M. (2016). Nanoparticle-mediated inhibition of survivin to overcome drug resistance in cancer therapy. *Journal of controlled release*, 240, 454-464.
- Wang, X., Li, J., Wu, D., Bu, X. and Qiao, Y. (2016). Hypoxia promotes apoptosis of neuronal cells through hypoxia-inducible factor-1 α -microRNA-204-B-cell lymphoma-2 pathway. *Experimental Biology and Medicine*, 241(2), 177-183.
- Wang, Y., Wu, J., Chen, X., Ji, R., Zang, S., Nie, Z. and Yin, J. (2023). Glutathione Reductase change the tumor immune microenvironment and prognosis of colon cancer: A study based on proteomic analysis.
- Wilcox, C. M. (2022). Colon cancer screening is for everyone. *The American Journal of the Medical Sciences*, 364(4), 369-370.
- Wolf, A. M., Fonham, E. T., Church, T. R., Flowers, C. R., Guerra, C. E., LaMonte, S. J. and Smith, R. A. (2018). Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(4), 250-281.
- Xiu, L., Yang, Z., Zhao, Y., Liu, X., Jiao, J., Ye, M, and Wei, P. (2019). High-fat diets promote colon orthotopic transplantation tumor metastasis in BALB/c mice. *Oncology Letters*, 17(2), 1914-1920.
- Yakovlev, A., Khafizova, M., Abdullaev, Z., Loukinov, D. and Kondratyev, A. (2010). Epigenetic regulation of caspase-3 gene expression in rat brain development. *Gene*, 450(1-2), 103-108.
- Yan, X. X., Guo, N., Ru, S. W., Wang, Z. Y., Sui, H. J., Xu, Y. S. and Yao, Z. D. (2023). The deficiency of 5-methylcytosine (5mC) and its ramification in the occurrence and prognosis of colon cancer. *Medicine*, 102(34), e34860.
- Yang, J., Song, Q., Cai, Y., Wang, P., Wang, M. and Zhang, D. (2015). RLIP76-dependent suppression of PI3K/AKT/Bcl-2 pathway by miR-101 induces apoptosis in prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 463(4), 900-906.

- Yazgan, B., Mesci, S., Bayık, N. ve Yıldırım, T. (2022). Explorations of ATP-Binding Cassette Transporters and Apoptosis Signal Pathways of 2-Hydroxyanthraquinone Substituted Cyclotriphosphazenes in MCF-7 and DLD-1 Cell Lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 22(6), 1124-1138.
- Ye, G., Ma, C., Gao, Y., Yu, L., Fan, Y., Hu, H., ... and Li, F. Effect of CCK-8 on the expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 of the hippocampus CA1 neurons in morphine in relapsed rats.
- Ye, X., Bishop, A. M., Reidy, J. A., Needham, L. L. and Calafat, A. M. (2006). Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environmental health perspectives*, 114(12), 1843-1846.
- Yenilmez-Çiftçi, G., Köksal, B., Kitmür, İ., Mesci, S., Ay, E. B. ve Yıldırım, T. (2024). The first synthesis and characterization of spiro and ansa-cyclotriphosphazenes with 3-Hydroxyflavone and induction of apoptosis in breast cancer (MCF-7). *Journal of Molecular Structure*, 1317, 139047.
- Yıldırım, T., Bilgin, K., Çiftçi, G. Y., Eçik, E. T., Şenkuytu, E., Uludağ, Y., ... ve Kılıç, A. (2012). Synthesis, cytotoxicity and apoptosis of cyclotriphosphazene compounds as anti-cancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 52, 213-220.
- Yılmaz, S. ve Emre, N. (2021). 50-70 yaş arası kişilerin kolorektal kanser risk faktörleri ve erken tanısına yönelik bilgi tutum ve davranışlarının değerlendirilmesi. *Pamukkale Medical Journal*, 14(3), 726-733.
- Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.
- Yoshida, H. (2003). The role of Apaf-1 in programmed cell death: from worm to tumor. *Cell structure and function*, 28(1), 3-9.
- Yue, B., Sun, B., Liu, C., Zhao, S., Zhang, D., Yu, F. and Yan, D. (2015). Long non-coding RNA Fer-1-like protein 4 suppresses oncogenesis and exhibits prognostic value by associating with miR-106a-5p in colon cancer. *Cancer science*, 106(10), 1323-1332.
- Yue, T., Zuo, S., Bu, D., Zhu, J., Chen, S., Ma, Y., ... and Liu, Y. (2020). Aminooxyacetic acid (AOAA) sensitizes colon cancer cells to oxaliplatin via exaggerating apoptosis induced by ROS. *Journal of Cancer*, 11(7), 1828.
- Zgoła-Grzeškowiak, A., Werner, J., Jeszka-Skowron, M. and Czarczyńska-Goślińska, B. (2016). Determination of parabens in cosmetic products using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Methods*, 8(19), 3903-3909.
- Zhang, M., Cheung, P. C. K., Chiu, L. C. M., Wong, E. Y. L. and Ooi, V. E. C. (2006). Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated β -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers*, 66(4), 455-462.

- Zheng, S. Y., Li, Y., Jiang, D., Zhao, J. and Ge, J. F. (2012). Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer cell line A-549. *Molecular medicine reports*, 5(3), 822-826.
- Zhou, M., Niu, J., Wang, J., Gao, H., Shahbaz, M., Niu, Z., ... and Liang, B. (2020). Integrin $\alpha\text{v}\beta 8$ serves as a novel marker of poor prognosis in colon carcinoma and regulates cell invasiveness through the activation of TGF- $\beta 1$. *Journal of Cancer*, 11(13), 3803.
- Zhou, N., Tian, Y., Wu, H., Cao, Y., Li, R., Zou, K., ... and Lu, L. (2022). Protective effect of resveratrol on immortalized duck intestinal epithelial cells exposed to H₂O₂. *Molecules*, 27(11), 3542.
- Zhou, Y., Huang, X., Kang, X., Fu, J., Zhu, Y. and Tang, X. (2009). Synthesis and Characterization of Novel Polyurethane Composites Based on Hybrid Inorganic/Organic Phosphazene-Containing Microspheres. *Macromolecular Materials and Engineering*, 294(9), 605-610.
- Zhu, W., Yang, X., Liu, S., Wang, Y., Li, W., Zhong, Q., ... and Xu, J. (2024). Lentivirus-based shRNA of Caspase-3 gene silencing inhibits chondrocyte apoptosis and delays the progression of surgically induced osteoarthritis. *Biotechnology Journal*, 19(1), 2300031.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı: Hanife ÇAKAL

Yayınlar

Çakal, H., Yıldırım, T., Şenkuytu, E. Ve Mesci S. (2025). Paraben türevi fosfazen bileşiğinin kolon kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik aktiviteleri, 8. Uluslararası sağlık bilimleri ve yaşam kongresi (ihslc 2025), Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Sağır, Y., Çakal, H., Elmacı, E., ve Çiçek, B. (2023). MgAlSi Üçlü Alaşımının Üretimi ve in-vitro biyo Uyumluluk İncelemesi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 11(4), 2145-2154.

Yıldırım, T., Şenkuytu, E., Mesci S. ve Çakal, H. (2025). Paraben türevi fosfazen bileşiğinin kolon kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik aktiviteleri. (Proje no: FMB- BAB 23-0589), Amasya Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri