



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**EHRLİCH SOLİD TÜMÖR MODELİNDE
BORNİL ASETATIN ANTİKANSER ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nihal TÜRKMEN ALEMDAR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

24.04.2024

Nihal TÜRKMEN ALEMDAR

İthaf

Marie Cure, "Laboratuvarındaki bir bilim insanı sadece bir teknisyen değildir; aynı zamanda onu bir peri masalı gibi etkileyen doğal olayların önüne geçmiş bir çocuktur."

Bilimin büyümeyen çocuklarına...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana bilimsel açıdan önemli katkı sağlayan, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana yol gösteren, beni sürekli teşvik eden ve desteğini esirgemeyen, emekleri ve yardımları için değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na,

Doktora eğitimim süresince çalışmalarımda her daim bilgi ve tecrübeleriyle bana katkı sağlayan ve yönlendiren Sayın Doç. Dr. Selim DEMİR'e,

Doktora eğitimim boyunca her bakımdan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta Sayın Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE olmak üzere Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Birgül KURAL, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN'a,

Doktora çalışmamda maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Sevil KÖR, Arş. Gör. Dr. Elif ŞAHİN, Arş. Gör. Neslihan SAĞLAM'a ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Tanıdığım günden bu yana sevgi dolu, yol gösterici ve yardımsever karakterleriyle her daim yanımda olan Doç. Dr. Serap ÖZER YAMAN ve Doç. Dr. Elif AYAZOĞLU DEMİR'e,

Laboratuvar çalışmalarım süresince, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ersan KALAY'a ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemi sağlayan ve her daim yanımda olan annem Zuhul TÜRKMEN, babam Prof. Dr. İbrahim TÜRKMEN ve kardeşim Faruk Alper TÜRKMEN'e, beni her zaman anlayışla karşılayan ve destek olan sevgili eşim Yakup ALEMDAR'a, tüm dostlarıma ve aileme, en içten dileklerle teşekkür ederim. İyi ki varsınız...

Nihal TÜRKMEN ALEMDAR

Bu tez çalışması KTÜ BAP TSA-2021-9409 numaralı proje bütçesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	xv
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanser Hücresi Özellikleri	5
2.1.1.1. Proliferasyon Sinyalleri Oluşturma	5
2.1.1.2. Büyüme Baskılayıcı Sinyallerden Kaçınma	6
2.1.1.3. Epigenetik Yeniden Programlanma	6
2.1.1.4. Ölümsüzlük	7
2.1.1.5. Hücre Ölümüne Direnç	7
2.1.1.6. İmmün Cevaptan Kaçınma	17
2.1.1.7. İnvazyon ve Metastaz	17
2.1.1.8. Anjiyogenez	18
2.1.1.9. Yaşlanma	21
2.1.1.10. Genomik Kararsızlık	21
2.1.1.11. Hücresel Yeniden Programlanma	22
2.1.1.12. Plastisite	23
2.1.1.13. Tümör Gelişimini Uyaran İnflamasyon	23
2.2. Bornil Asetat	27
2.2.1. Bornil Asetatın Fizikokimyasal Özellikleri	28

2.2.2. Bornil Asetatın Toksisitesi	29
2.2.3. Bornil Asetatın Biyolojik Aktiviteleri	29
2.2.3.1. Bornil Asetatın Antikanserojen Etkileri	31
2.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	32
2.3.1. Antioksidan Savunma Sistemleri	32
2.3.2. Oksidatif Stres Biyobelirteçleri	35
2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Kanser	37
2.4. Ehrlich Solid Tümör Modeli	39
2.5. Western Blot Yöntemi	40
3. GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1. Gereç	41
3.1.1. Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	41
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
3.2. Yöntem	43
3.2.1. Ehrlich Assit Hücrelerinin Çoğaltılması ve Enjeksiyona Hazır Hale Getirilmesi	43
3.2.2. Solid Tümör Modeli Oluşturma	44
3.2.3. Deneysel Grupların Oluşturulması ve Uygulama Prosedürü	45
3.3. Biyokimyasal Analizler	52
3.3.1. Serum Rutin Biyokimya Parametrelerinin Ölçülmesi	53
3.3.2. Doku Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi	53
3.3.3. Tümör Doku Örneklerinde Toplam Oksidan ve Antioksidan Durum Analizi	54
3.3.3.1. Tümör Doku Numunelerinde Toplam Oksidan Seviyelerinin Analizi	54
3.3.3.2. Tümör Doku Numunelerinde Toplam Antioksidan Seviyelerinin Analizi	55
3.3.4. Tümör Doku Numunelerinde Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Analizi	56
3.3.5. Tümör Doku Numunelerinde GPx, eNOS, NOX-1 Seviyelerinin Ölçülmesi	57
3.3.5.1. ELISA Yönteminin Uygulanması	57
3.4. Tümör Doku Örneklerinde Western Blot Analizi	61
3.4.1. Western Blot Çözeltilerinin Hazırlanması	61
3.4.2. Tümör Doku Numunelerinden Protein Lizatların Eldesi	63
3.4.3. SDS-PAGE Jel Elektroforez Aşaması	63
3.4.4. Örneklerin Yükleme Jeline Yüklenmesi	66
3.4.5. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi	66

3.4.6. Bloklama	67
3.4.7. Membrana Primer Antikor Ekleme	67
3.4.8. Membrana Sekonder Antikor Ekleme	68
3.5. Histopatolojik Analiz	68
3.6. İstatistiksel Analiz	68
4. BULGULAR	69
4.1. Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Uygulamalarında Gruplar Arası Hayvan Ağırlıklarının ve Tümör Volümlerinin Değerlendirilmesi	69
4.1.1. Bornil Asetatın İntraperitoneal Uygulamalarında Gruplar Arası Hayvan Ağırlıklarının ve Tümör Volümlerinin Değerlendirilmesi	69
4.1.2. Bornil Asetatın Subkutan Uygulamalarında Gruplar Arası Hayvan Ağırlıklarının ve Tümör Volümünün Değerlendirilmesi	74
4.2. Serum Biyokimya Parametrelerinin İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Değerlendirilmesi	77
4.2.1. İntraperitoneal Gruplar Arası Biyokimya Parametrelerinin Karşılaştırılması	77
4.2.2. Subkutan Gruplar Arası Biyokimya Parametrelerinin Karşılaştırılması	78
4.3. Tümör Doku Numunelerinde Oksidatif Stres Parametrelerinin İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Değerlendirilmesi	79
4.3.1. İntraperitoneal Gruplar Arası Oksidatif Stres Parametrelerin Karşılaştırılması	79
4.3.2. Subkutan Gruplar Arası Oksidatif Stres Parametrelerin Karşılaştırılması	82
4.4. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi	86
4.5. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Hücre Döngüsü Kontrolünün Değerlendirilmesi	94
4.6. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası İnflamasyonun Değerlendirilmesi	98
4.7. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Antioksidan Kapasitenin Değerlendirilmesi	100
4.8. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Anjiyogenezin Değerlendirilmesi	102
4.9. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Otofajinin Değerlendirilmesi	106

4.10. İntraperitoneal ve Subkutan İlaç Uygulama Yollarına Bağlı Olarak Tümör Çapı Değerlendirilmesi	110
4.11. Histopatolojik Değerlendirme	110
4.11.1. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Histopatolojik Değerlendirilmesi	110
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	116
8. KAYNAKLAR	132
EKLER	153
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	154
ÖZGEÇMİŞ	156



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. BA'nın fizikokimyasal özellikleri	28
Tablo 2. Kullanılan cihaz ve malzemeler	41
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler	42
Tablo 4. Deney grupları	46
Tablo 5. MDA uygulama prosedürü	53
Tablo 6. TOS uygulama prosedürü	55
Tablo 7. TAS uygulama prosedürü	56
Tablo 8. Doku homojenat hazırlama prosedürü	62
Tablo 9 Yükleme jeli hazırlama prosedürü	64
Tablo 10. Protein molekül ağırlıklarına göre ayırma jel konsantrasyonlarının belirlenmesi	65
Tablo 11. Ayırma jeli hazırlama prosedürü	65
Tablo 12. İ.p. gruplara ait serum biyokimya sonuçları	77
Tablo 13. S.k. gruplara ait serum biyokimya sonuçları	78
Tablo 14. İ.p. gruplara ait oksidatif stres belirteçlerinin sonuçları	80
Tablo 15. S.k. gruplara ait oksidatif stres belirteçlerinin sonuçları	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Hücre döngüsü	9
Şekil 2.	Apoptoz hücre yolakları	13
Şekil 3.	Otofaji hücre ölüm mekanizması	16
Şekil 4.	BA'nın yapısı ve ana kaynağı	29
Şekil 5.	Antioksidan enzim şeması	35
Şekil 6.	Tümör doku MDA düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	54
Şekil 7.	Tümör doku protein düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik	58
Şekil 8.	Tümör doku GPx seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	60
Şekil 9.	Tümör doku eNOS ölçümünde kullanılan standart grafiği	60
Şekil 10.	Doku NOX-1 ölçümünde kullanılan standart grafiği	61
Şekil 11.	Bornil asetatın i.p. uygulandığı deney gruplarında günlere göre ortalama vücut ağırlığı değişimi	70
Şekil 12.	Bornil asetatın i.p. uygulandığı deney gruplarında günlere göre ortalama tümör volümü değişimi	72
Şekil 13.	Bornil asetatın s.k. uygulandığı deney gruplarında günlere göre ortalama vücut ağırlığı değişimi	74
Şekil 14.	Bornil asetatın s.k. uygulandığı deney gruplarında günlere göre ortalama tümör volümü değişimi	76
Şekil 15.	Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası Bax/Bcl-2 protein seviyeleri oranı grafiği	90
Şekil 16.	Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası Bax/Bcl-2 protein seviyeleri oranı grafiği	91
Şekil 17.	BA ve 5-FU uygulamalarının i.p. ve s.k. gruplar arası % tümör çapı sonuçları	110
Şekil 18.	Bornil Asetat ve 5-FU'nun i.p. uygulamalarının Ehrlich tümör hücreleri üzerine etkilerinin histopatolojik görüntüleri	112
Şekil 19.	Bornil Asetat ve 5-FU'nun i.p. uygulamalarının Ehrlich tümör hücreleri üzerine etkilerinin histopatolojik görüntüleri	113

Şekil 20.	Bornil Asetat ve 5-FU'nun s.k. uygulamalarının Ehrlich tümör hücreleri üzerine etkilerinin histopatolojik görüntüleri	114
Şekil 21.	Bornil Asetat ve 5-FU'nun s.k. uygulamalarının Ehrlich tümör hücreleri üzerine etkilerinin histopatolojik görüntüleri	115



RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. EAC i.p. uygulanan Balb/c stok fareler	44
Resim 2. Stok farelerden toplanan EAC hücre pelletleri	45
Resim 3. Dekapite edilen EAC Balb/c	51
Resim 4. EAC solid tümör-1	51
Resim 5. EAC solid tümör-2	51
Resim 6. EAC solid tümör ağırlık ölçümü	52
Resim 7. EAC solid tümör boy/en ölçümü	52
Resim 8. İ.p. ve s.k. gruplar arası Bax protein seviyelerinin western blot analizi sonuçları	87
Resim 9. İ.p. ve s.k. gruplar arası Bcl-2 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları	89
Resim 10. İ.p. ve s.k. gruplar arası ProCas-3 ve Cas-3 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları	93
Resim 11. İ.p. ve s.k. gruplar arası p53 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları	95
Resim 12. İ.p. ve s.k. gruplar arası p21 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları	97
Resim 13. İ.p. ve s.k. gruplar arası NF-κB protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları	99
Resim 14. İ.p. ve s.k. gruplar arası Nrf2 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları	101
Resim 15. İ.p. ve s.k. gruplar arası VEGF protein seviyelerinin western blot analizi sonuçları	103
Resim 16. İ.p. ve s.k. gruplar arası MMP-9 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları	105
Resim 17. İ.p. ve s.k. gruplar arası LC3II/LC3I protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları	107
Resim 18. İ.p. ve s.k. gruplar arası Beclin-1 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları	109
Resim 19. Bornil asetatın Ehrlich assit solid tümör modelinde antikanser etkisi	131

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

5-FU	5-Florourasil
Akt	Protein kinaz B
ALT	Alanin aminotransferaz
AMBRA1	BECN1 aktive edici-otofaji düzenleyici protein-1
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	AMP ile aktifleştirilen protein kinaz
ARE	Antioksidan yanıt elemanı
Atg	Otofaji ilişkili gen/protein
AST	Aspartat aminotransferaz
BA	Bornil asetat
Bax	Bcl-2 ilişkili X protein
Bcl-XL	B hücre lenfoma ekstra large protein
Bcl-2	B hücre lenfoma 2 protein
Beclin-1	BECN-1 gen kodlu protein
Bim	Bcl-2 benzeri protein 11
BOL	Borneol
BUN	Kan üre azotu
Cas	Kaspaz-3
CAT	Katalaz
CDK	Siklin bağımlı kinaz

CSC	Kanser kök hücre
DMSO	Dimetil sülfoksit
EAC	Ehrlich Assit karsinoma
ECL	Enhanced chemiluminescence
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
FASL	Faktör ilişkili apoptozis ligand
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GLUT-1	Glukoz taşıyıcısı-1
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
H&E	Hematoksilen-Eozin
IL-1β	İnterrlökin-1beta
i.m.	İntramüsküler
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
i.p.	İntraperitoneal
i.v.	İntravenöz
LC-3-I/II	Hafif zincir-3-I/II
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
Mcl-1	Miyeloid lösemi-1 proteini
MDA	Malondialdehit
MDM2/MDM4	Mouse double minute 2/4 homolog
miRNA	MikroRNA
MMP	Matriks metalloproteinaz

mTOR	Memeli hedefli rapamisin
NFκB	Nükleer faktör kappa B
NoXa	Forbol-12-miristat-13-asetat (PMAIP1)
NOX	NADPH oksidaz
Nrf2	Nükleer faktör eritroid-2 ilişkili faktör-2
p21	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1
p53	Tümör supresör protein 53
PA	Plazminojen aktivatör
PBS	Fosfat tamponlu salin
PI3K	Fosfoinositol-3-kinaz
PRX	Peroksiredoksin
PUMA	Apoptotik p53 aktivatör düzenleyici
RAPTOR	mTOR ilişkili düzenleyici protein
RAS	Rat sarcoma virüs gen
RB	Retinoblastoma
ROS	Reaktif oksijen türleri
s.k.	Subkutan
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TNF-α	Tümör nekroz faktör-alfa
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
TRX	Tiyoredoksin
TSC2	Tübero skleroz kompleks protein-2
ULK1/2	Unc 51 benzeri otofaji aktive edici kinaz
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

Simgeler

° Santigrat derece

α Alfa

β Beta

γ Gama

κ Kappa

& Ve

L Litre

μ Mikron

U Ünite

Formüller

$C_{12}H_{20}O_2$ Bornil asetat

H_2O_2 Hidrojen peroksit

H_2O Su

NO Nitrik oksit

O_2^- Süperoksit radikali

OH^- Hidroksil radikali

ÖZET

Ehrlich Solid Tümör Modelinde Bornil Asetatın Antikanser Etkisinin Araştırılması

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi, lokal doku istilası ve metastazı ile karakterize patolojik bir süreçtir. Kanser araştırmalarında deneysel tümörler, modelleme amacıyla büyük öneme sahiptir ve bu alanda Ehrlich assit karsinom (EAC) modeli yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoterapötiklerin keşfi ve mevcut kemoterapötiklerin etkinliklerinin artırılması hedefli çalışmalarda onkogenik proteinlerin inhibisyonu ve antiproliferatif proteinlerin aktivasyonu hedeflenmektedir. Son yıllarda, maligniteyi baskılamak amaçlı tümör hedefli doğrudan ilaç tedavisine yönelinmiştir. *Helichrysum armenium*, tıbbi ve aromatik bitkiler bakımından zengin olan ülkemizin endemik türleri arasında yer almaktadır. Bitkinin çiçek ve yaprak kısımlarından elde edilen bornil asetat (BA), anti-inflamatuar ve anti-oksidan özellikleriyle bilinmektedir. Bu çalışmada EAC solid tümör modelinde BA'nın uygulama yoluna [intraperitoneal (i.p.) ve subkutan (s.k.)], dozuna (50 ve 100 mg/kg), süresine göre (21 gün ve 10 gün) pozitif kontrol 5-florourasil (5-FU) ile karşılaştırmalı olarak antikanser etkisinin ilk kez araştırılması amaçlanmıştır. Kontrol gruplarında 5, deney gruplarında 10 adet Balb/c dişi fare olacak şekilde 16 grup oluşturuldu. EAC hücreleri Balb/c dişi farelere subkutan olarak enjekte edildi. BA'nın 50 ve 100 mg/kg lık dozları, 21 gün ve 10 gün süreyle 5-FU'nun 50 mg/kg lık dozuyla karşılaştırmalı olarak uygulandı. 21. günün sonunda hayvanlar dekapite edilerek tümör dokuları ve serum numuneleri toplandı. Serum numunelerinde AST, ALT ve üre ölçümleri otoanalizörde gerçekleştirildi. Tümör numunelerinde oksidatif hasar derecesi, MDA, TOS ve TAS'ın spektrofotometrik ölçümleriyle belirlenirken, Nrf2, NF-κB, VEGF, MMP-9, Kaspaz-3, Bcl-2, Bax, LC-3, Beclin-1, p21 ve p53 proteinlerinin tayini western blot yöntemi ile gerçekleştirildi. Çalışma neticesinde BA'nın tümör hedefli s.k. uygulandığı deney gruplarının, eş değer i.p. deney gruplarına nazaran tümör volümünün küçültülmesinde başarılı olduğu ortaya kondu. Ayrıca BA'nın tümör doku üzerinde pro-apoptotik, pro-otofajik, anti-oksidan, anti-anjiyogenik, anti-inflamatuar özellikleri de *in vivo* olarak ilk kez gösterildi. Bu çalışmadan hareketle BA, tümör hedefli terapötik araştırmaların yeni hedefini oluşturabilir.

Anahtar Sözcükler: Anjiyogenez, Anti-oksidan, Apoptoz, Bornil asetat, Ehrlich solid tümör, Kanser, Otofaji

ABSTRACT

Investigation of the Anticancer Effect of Bornyl Acetate in the Ehrlich Solid Tumor Model

Cancer is a pathological process characterized by uncontrolled cell growth, local tissue invasion and metastasis. Experimental tumors are of great importance for modeling purposes in cancer research and the Ehrlich ascites carcinoma (EAC) model is widely used in this field. Inhibition of oncogenic proteins and activation of antiproliferative proteins are targeted in studies aimed at the discovery of biotherapeutics and enhancing the efficacy of existing chemotherapeutics. In recent years, there has been a move towards tumor-targeted direct drug therapy to suppress malignancy. *Helichrysum armenium* is among the endemic species of our country, which is rich in medicinal and aromatic plants. Bornyl acetate (BA) obtained from the flower and leaf parts of the plant is known for its anti-inflammatory and anti-oxidant properties. In this study, it was aimed to investigate the anticancer effect of BA according to the route of administration [Intraperitoneal Intraperitoneal (i.p.) and subcutaneous (s.c.)], dose (50 and 100 mg/kg) and duration (21 days and 10 days) in comparison with the positive control 5-fluorouracil (5-FU) in EAC solid tumor model for the first time. Sixteen groups were formed with 5 Balb/c female mice in the control group and 10 in the experimental group. EAC cells were injected subcutaneously into Balb/c female mice. Doses of 50 and 100 mg/kg of BA were administered for 21 days and 10 days in comparison with 50 mg/kg of 5-FU. At the end of the 21st day, animals were decapitated and tumor tissues and serum samples were collected. AST, ALT and urea measurements in serum samples were performed on an autoanalyzer. Oxidative damage in tumor samples was determined by spectrophotometric measurements of MDA, TOS and TAS, and Nrf2, NF- κ B, VEGF, MMP-9, Caspase-3, Bcl-2, Bax, LC-3, Beclin-1, p21 and p53 proteins were determined by western blotting. As a result of the study, it was revealed that the experimental groups in which BA was administered tumor-targeted s.k. were successful in reducing tumor volume compared to the equivalent i.p. experimental groups. In addition, the pro-apoptotic, pro-autophagic, anti-oxidant, anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of BA on tumor tissue were demonstrated for the first time *in vivo*. Based on this study, BA may constitute the new target of tumor-targeted therapeutic research.

Keywords: Angiogenesis, Anti-oxidant, Apoptosis, Autophagy, Bornyl acetate, Cancer, Ehrlich solid tumor

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyada ölüme neden olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer alan kanser, kontrolsüz hücre büyümesi, lokal doku istilası ve metastazı ile karakterize patolojik bir süreçtir (1, 2). Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran temel özellikler, ‘kanserin ayırt edici özellikleri’ olarak adlandırılmakta ve bir hücrenin kontrolsüz olarak çoğalmasını ve büyüme potansiyelini, tümörün primer olarak bulunduğu bölgeden ayrılarak farklı doku ve organlarda da göstermelerine neden olmaktadır. Bu özellikler; 1. Proliferasyon sinyalleri oluşturma, 2. Büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçınma, 3. Epigenetik yeniden programlanma, 4. Ölümsüzlük, 5. Hücre ölümüne direnç, 6. İmmün cevaptan kaçınma, 7. İnvazyon ve Metastaz, 8. Anjiyogenesis, 9. Yaşlanma, 10. Genomik kararsızlık, 11. Hücresel metabolizmanın degranülasyonu, 12. Plastisite, 13. Tümörü teşvik eden inflamasyon olarak sıralanabilir (3). Bu ayırt edici özelliklerin ayrı ayrı ele alınarak irdelenmesi ve birbirleriyle etkileşimde oldukları sinyal yolları üzerinden çalışılması kanser proliferasyonunun anlaşılması ve etkin kanser terapi tekniklerinin geliştirebilmesi için ayrı bir öneme sahiptir (4). Modern tıpta kanser tedavisi için cerrahi girişim, kemoterapi, radyoterapi, hormon replasmanı ve immunoterapi temel tedavi yöntemleridir. Kemoterapinin temel prensibi, tümör hücrelerinin proliferasyonunu önlemek ve tümör hücreleri üzerindeki etkisiyle beraber normal hücreler üzerinde, yan etki olmaksızın ya da minimum yan etki ile malign hücreleri yok etmektir (5). Ancak mevcut kanser kemoterapisinin neoplastik hücreler için özel olarak seçilememesi, hepatoksisite, nefrotoksisite, kardiyotoksisite gibi yan etkilere yol açması ve çoklu ilaç direnci gibi olumsuz etkileri, başarı yüzdesini düşürmektedir (6, 7). Bundan dolayı antikanser ilaçların yan etkilerine karşı kanser tedavisinde kullanılmak üzere, kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerini hedef alan yeni ajan arayışlarına ve mevcut terapötiklerin intravenöz (i.v.), s.k., i.p., intramüsküler (i.m.), oral olmak üzere farklı uygulama yollarına yönelinmiştir.

Deneysel tümörler, modelleme amacıyla büyük öneme sahiptir ve bu alanda EAC yaygın olarak kullanılmaktadır. EAC hücrelerinin tümör spesifik antijeni taşıyamaları, yüksek trasplantasyon kabiliyetleri ve hızlı proliferasyon yetenekleri onları yeni kemoterapötiklerin arayışı çalışmalarında yaygın hale getirmiştir. İlk kez dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkan tümörün, Ehrlich ve Apolant tarafından tümör parçalarının fareden fareye transplante edilmesiyle, bu deneysel tümör modelinin oluşturulduğu bilinmektedir (8). Daha sonraki yıllarda tümörü taşıyan farelerin

peritonunda sıvı halde gelişen formu elde edilmiş ve tümör hücreleriyle beraber assit sıvısı birikiminden dolayı “*Ehrlich ascites carcinoma*” olarak adlandırılmıştır (9). EAC, assit form ya da solid formda kullanılmaktadır. EAC tümör hücre süspansiyonu, i.p. yolla farelere verildiğinde assit formda tümörün oluştuğu gözlenirken s.k. olarak uygulandığında solid formda tümörün oluştuğu bilinmektedir (10).

Son yıllarda maligniteyi kontrol altına almak, çevre dokulara ve uzaktaki sağlıklı organlara fiziksel hasarı azaltmak amaçlı tümör hedefli, doğrudan ilaç tedavisine yönelinmiştir (11). Literatürde önemli bir yere sahip, hedef özgüllüğü ve potansiyeli yüksek, etkili terapötikler olan biyoterapötikler genellikle i.v., i.m., i.p. veya s.k. enjeksiyon yoluyla hastaya uygulanmaktadır. S.k. enjeksiyonun, acı hissinin az olması, yüksek dozlarda dahi çevre doku ve organlara zarar verme riskinin diğer enjeksiyon tiplerine nazaran çok daha düşük olması, ilaca maruziyet süresinin kısa olması, ilacın fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak (bağ doku elemanları ile elektrostatik etkileşimleri, pH, içerisindeki yardımcı maddelerin özellikleri gibi) lenfe geçiş sürelerinin kısa ve küçük dozlarda dahi doğrudan tümörle etkileşerek, biyoyararlılığı arttırması nedenleriyle uygulanması önerilmektedir (12). Literatürde doğal ürünlerin oral ve i.p. yollarla, kemoterapötiklerin i.p. ve i.v. yollarla uygulamalarına sıkça rastlanılmaktadır (13, 14). Deneysel solid tümör modellerinde doğal ürünlerin ve kemoterapötiklerin doğrudan tümör etkileşimini amaçlayan s.k. enjeksiyona ait çalışmalar ise sınırlıdır (15, 16).

Potansiyel kemoterapötik ajanların kaynağı olarak doğal ürünlere ilgi her geçen gün artmaktadır. Doğal ürünler ve bunların türevleri dünya genelinde kullanılan ilaçların %50’sinden fazlasını oluştururken, bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin %25’inden fazlasının kemoterapötiklerin ham maddesini oluşturduğu bilinmektedir (17). Birçok doğal ürün bileşeni tek başına ya da kompleks halde bu amaç için kullanılmaktadır. Aromatik bitkilerden ekstrakte edilen esansiyel yağ bileşenleri arasında yer alan ve farmasötik özellikleriyle de tanınan terpenlerin antioksidan, antiseptik ve anti- inflamatuvar özellikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (18).

Bir monoterpen olan bornil asetatın (BA), başta Pinaceae olmak üzere Asteraceae, Lauracea ve Valerianaceae familyaları türlerinin esas olarak kokularından sorumlu olan esansiyel yağ bileşenidir (19, 20). Aynı zamanda ülkemizin endemik türleri arasında yer alan *Helichrysum armenium* ve *Thymus vulgaris* bitkilerinin çiçek ve yaprak kısımlarının esansiyel yağ içeriğini oluşturan ana bileşiklerdendir.

BA kimyasal ve biyolojik özelliklerine dayanılarak cilt kremlerinde, yara bakımında ve doğal antiseptik ajanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (21).

Bu tez çalışmasında literatürde *in vitro* antikanserojen özelliği ortaya konmuş olan BA'nın antiproliferatif, pro-apoptotik, pro-otofajik, anti-inflamatuar, anti-anjiyogenik potansiyelinin; uygulama yoluna, konsantrasyonuna ve süresine bağlı olarak *in vivo* Ehrlich solid tümör modelinde ilk kez araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser olarak tanımlanan malign tümöral doku, sağlıklı dokuya oranla daha sık ve kontrolsüz çoğalan, invaziv ve metastatik özelliklere sahip hücre kolonisini ifade eder (22). Kanseri hücre kökeni, kanser doku gelişimi, yayılma ve nüksetme mekanizmalarını anlamaya yönelik her geçen gün artan araştırmalara rağmen, hastalık hala gizemini korumaktadır. Bu sebeple kanser, uzun süredir devam eden ve hızla gelişen biyomedikal araştırma ve uygulamalarının odak noktası haline gelmiştir (23).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2020 yılında kansere bağlı 10 milyon ölüm ve yaşam boyu (75 yaşından önce) kansere yakalanma riski %20 olarak bildirilmiştir (1, 24). Dünyada yeni teşhis edilen en yaygın kanser türleri arasında meme (2,26 milyon), akciğer (2,21 milyon) ve kolorektal (1,98 milyon) kanserleri yer almaktadır (25, 26). Ayrıca nüfus artışının ve sosyal yaşlanmanın hızlanmasıyla birlikte küresel kanser yükü de artmaya devam etmektedir. 2040 yılında yeni tanı konulan kanser hastası sayısının 2020 yılına göre %47 artış ile yılda 30,3 milyona ulaşacağı tahmin edilirken, 16,3 milyon kişinin de kansere bağlı hayatını kaybetmesi beklenmektedir (1). Yapılan araştırmalarla ileri evre akciğer, kolorektal, karaciğer ve pankreas gibi kanserler için 5 yıllık göreceli sağkalım oranları, maksimal cerrahi eksizyon, radyasyon, kemoterapi, hormon replasmanı, immünoterapi ve hedefe yönelik tedavilere bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir. Bundan dolayı geleneksel kanser tedavi yöntemlerinin hiçbirisi, ileri evre kanser hastalarını ne yazık ki tamamen iyileştirememektedir (27). Tümör proliferasyonunu etkileyen moleküler mekanizmaların bilgisi, bilhassa geç evre kanserlerin kötü prognozu için yeni ve etkili tedavilere yol açabileceği düşünülmektedir

Fizyolojik şartlarda hücreler, hücre döngüsü kontrol mekanizmaları altında büyüyüp gelişirler. Hücreler, metabolik çevrenin ihtiyaçlarına ve uyarılarına bağlı olarak hücre döngüsüne girerek büyüyüp çoğalmaya devam ederler ya da şartlar uygun değilse bekleme fazına geçerler (28). Hücre döngüsü interfaz (G_0 - G_1 - S- G_2) ve mitotik evre olmak üzere 2 basamakta meydana gelmektedir. Hücre döngüsüne giremeyecek hücreler G_0 fazında uygun şartlar gelişinceye kadar beklemeye geçerler. Ancak DNA hasarı, genetik mutasyonlar, radyasyon gibi etmenlere bağlı olarak gelişen kanser hücreleri sağlıklı hücrelerin sahip olduğu denetleyici ve düzenleyici mekanizmalardan bağımsız, sürekli olarak prolifer olmaktadır (29).

Genel olarak kanser gelişiminin temel nedenleri arasında, söz konusu hücre döngüsünü düzenleyen bir veya daha fazla proteindeki genetik bozukluklar görülmektedir. Bazı durumlarda kusurlu gen kalıtsal olabilirken, diğer bazı durumlarda ise çevresel kanserojenlere yanıt olarak yeni mutasyonlar meydana gelebilmektedir. Genellikle hem kalıtsal hem de çevresel faktörler bir arada bulunur ve kanserin gelişmesi için mutasyonların birikmesi gerekmektedir (30). Oksidatif stres veya ultraviyole radyasyonu gibi çevresel faktörlere bağlı olarak hasar gören hücre DNA'sını korumak amacıyla, onarım mekanizmaları devreye girer ve hasarı onarmaya çalışır. Onarım mekanizmaları, hasarı onarabilecek seviyedeysse hücre ölüm sinyalleri aktive edilir. Ancak bu mekanizmalarda işlev kaybı mevcutsa mutasyona uğramış hücreler çoğalabilir ve mutasyonların birikmesiyle kanserli bir tümör oluşturabilirler (22).

2.1.1. Kanser Hücresi Özellikleri

DNA mutasyonları sonucu gelişen kanser hücreleri sağ kalımlarını, proliferasyonlarını ve metastatik evreye geçişlerini destekleyen *karakteristik özellikler* kazanmışlardır (3). Bu karakteristik özellikleri tek tek irdelersek;

2.1.1.1. Proliferasyon Sinyalleri Oluşturma

Kanser hücrelerinin en temel özelliği, kronik proliferasyonu sürdürme yetenekleridir. Normal dokular, hücre büyümesi, hücre döngüsüne giriş ve bu döngü boyunca ilerlemeyi yönlendiren, böylece hücre sayısının homeostazını ve dolayısıyla normal doku yapısının ve işlevinin korunmasını sağlayan proliferasyon sinyallerini sıkı bir şekilde kontrol edebilmektedirler (22). Tümör hücreleri, düzenleyici bu sinyalleri hedefleri doğrultusunda kullanarak kendi kaderlerinin efendisi olurlar (31).

Kanser hücrelerinde hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının bozulmasının yanı sıra hücre büyüme sinyallerinin düzeninin bozulması da söz konusudur Kanser hücreleri, proliferatif sinyali sürdürme kabiliyetini farklı yollardan kazanabilirler (22). Kanser hücreleri aynı kökenli reseptörlerin ekspresyonu yoluyla yanıt verebilecekleri, otokrin proliferatif stimülasyonla büyüme faktörü ligandlarını üretebilirler (32). Sağlıklı hücrelerden farklı olarak kanser hücreleri büyüme faktörü salınımını arttırmak amacıyla hücre içi sinyal yollarını devamlı olarak aktive ederek otokrin sinyal iletimi sayesinde hücre dışı büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaksızın sağ kalımı ve proliferasyonu sürdürürler. Ayrıca tümör hücreleri, farklı büyüme faktörlerinin senteziyle aktifleşen ve tümör hücre proliferasyonunu

destekleyen *tümörle ilişkili stroma* içindeki normal hücreleri uyaran sinyaller de gönderebilirler (4, 33).

2.1.1.2. Büyüme Baskılayıcı Sinyallerden Kaçınma

Kanser hücreleri hücre proliferasyonunu sürdürme ve hücre döngüsü kontrol mekanizmalarından kaçınma gibi karakteristik özelliklerine ek olarak hücre büyüme ve çoğalmasını durduran mekanizmalardan da korunabilmelidirler. Bu mekanizmaları tümör baskılayıcı genlerin eylemleri düzenlemektedir (31). Hücre büyümesini ve proliferasyonunu sınırlamak amacıyla fonksiyon kazanım veya kaybı deneyleri yoluyla farklı tümör baskılayıcı genler keşfedilmiştir. İki prototipik tümör baskılayıcı gen tarafından kodlanan, retinoblastoma ile ilişkili protein (RB) ve tümör baskılayıcı protein 53 (p53) hücrelerin çoğalma, yaşlanma ve apoptotik programları etkinleştirme kararlarını yöneten iki merkezi anahtar olarak çalışırlar (34). RB, büyük ölçüde hücre dışı kaynaklı büyümeyi engelleyen sinyalleri iletirken, p53 hücre içi kaynaklı stres uyaranlarına yanıt vermektedir (35).

Tümör baskılayıcı protein 53'ün bir genom koruyucusu olduğu ve hücre döngüsü, hücresel farklılaşma, DNA onarımı ve apoptozu düzenlemede önemli bir rol üstlendiği iyi bilinmektedir (34). Genomdaki hasar derecesi, nükleotit havuzlarının seviyeleri, büyümeyi teşvik eden sinyaller, glukoz veya hücre içi oksijen seviyesine göre hücrenin kaderini belirler. p53, bu koşullar normale dönene kadar hücre döngüsü ilerlemesini durdurabilir ya da hasar onarılamaz düzeydeyse apoptozu tetikleyebilir. Kanser hücreleri, büyüme karşıtı sinyallerle ilişkili bu tümör baskılayıcı genleri, mutasyon, gen silinmesi ya da metilasyon aracılığıyla etkisiz kılarak proliferasyonlarına devam edebilmektedirler (36).

2.1.1.3. Epigenetik Yeniden Programlanma

Epigenetik, gen ifadesi ya da hücresel fenotipte DNA diziliminden bağımsız mekanizmaların neden olduğu kalıtsal değişimler olarak tanımlanabilir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve düzenleyici kodlanmayan RNA (miRNA, siRNA, snRNA.) epigenetik mekanizmaların başında yer alırlar (37).

Gen ifadesinde tamamen epigenetik olarak düzenlenen değişiklikleri içeren, bağımsız bir diğer genom yeniden programlama modu mevcuttur ki buna "mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama" adı verilir (38). Mutasyonsuz kanser evrimi ve belirleyici kanser fenotiplerinin tamamen epigenetik programlanması önerisi neredeyse on yıl önce gündeme getirilmiş ve o günden bu yana güncelliğini koruyarak daha fazla

tartılmaktadır (31, 39). Gen ekspresyonunun mutasyona uğramayan epigenetik regülasyonu kavramı elbette embriyonik gelişime, farklılaşmaya ve organogeneze aracılık eden merkezi bir mekanizmaya dayanmaktadır (40). Artan kanıtlar, gen ve histon modifikasyonlarında, kromatin yapısında pozitif-negatif geri besleme döngüleri tarafından muhafaza edilen gen ekspresyon anahtarlarının tetiklenmesindeki değişikliklerin, kanser patogenezinde etken olduğunu göstermektedir. Bu kanıtlar epigenetik değişimlerin, kanser proliferasyonu ve malign ilerleme esnasında ayırt edici fonksiyonların kazanılmasına katkı sağlayabileceği önermesini doğrulamaktadır (3).

2.1.1.4. Ölümsüzlük

Son yıllardaki araştırmalar sonucu, kanser hücrelerinin, replikasyon yetenekleri sayesinde makroskopik tümörler oluşturabilecekleri kabul edilmektedir. Söz konusu özellik, belirli sayıda ardışık hücre döngüsünden geçebilen somatik hücrelerin davranışlarıyla belirgin zıtlık göstermektedir (31). Bahsi geçen proliferasyon sınırlaması, çoğalmanın önündeki iki çeşit engelle ilişkilendirilmiştir: yaşlanma ve hücre ölümü. Buna göre, *in vitro* çoğaltılan hücrelerde tekrarlanan hücre bölünme döngüleri önce yaşlanmanın indüklenmesine ve ardından, yaşlanma engelini aşmayı başaran hücreler için de bu popülasyon hücrelerinin hücre ölümüne yönlendirilmesine yol açar. Ancak tümör hücreleri iki koruma mekanizmasını da aşarak ölümsüzleşme olarak adlandırılan sınırsız replikasyon potansiyeli sergilerler (41).

2.1.1.5. Hücre Ölümüne Direnç

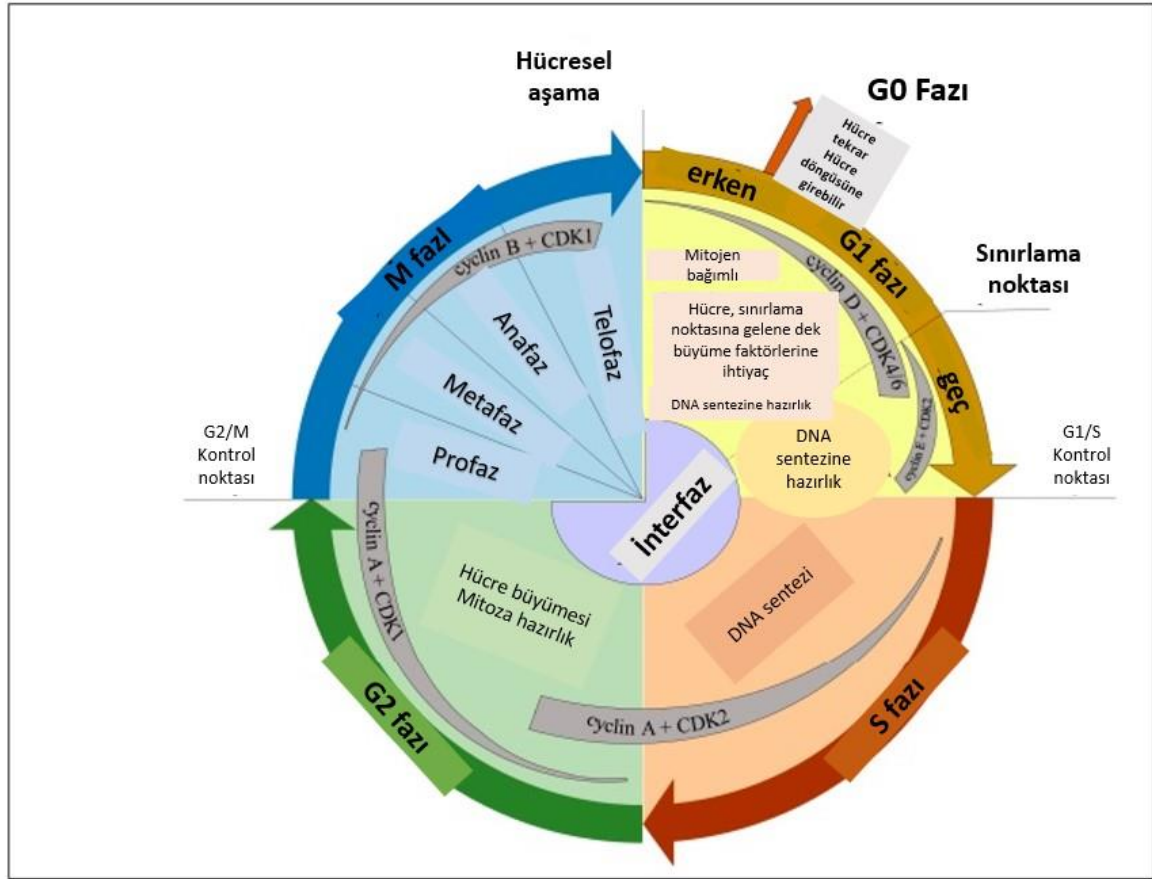
Tümör hücrelerinin *-hücre ölümüne direnç-* karakteristik özelliği; hücre döngüsü kontrol mekanizmaları, apoptotik ve otofajik hücre ölüm sinyal yollarından kaçınmaları başlıklarıyla incelenecektir.

Hücre Döngüsü Kontrolü

Hücre döngüsü çalışmalarının uzun geçmişi 1970'lerin başında ilk hücre döngüsü düzenleyici gen, siklin bağımlı serin/treonin protein kinaz (CDK) 28'in (mayadaki CDK1 analogu) tanımlanmasına dayanmaktadır. Hücre döngüsü CDK ve onlarla kompleks oluşturan siklin proteinleri tarafından katalizlenir. CDK'lar, hücre döngüsünün belirli kontrol noktalarında aktive olan serin/treonin protein kinazlardır. Memeli hücrelerinde en az yedi CDK bulunur. CDK'lar hücre döngüsü süresince ilerleme için kritik önem taşımaktadırlar. Çünkü inaktivasyonları mitozu önlemektedir (42).

Hücre döngüsü, genomik DNA replikasyonuna ve devamında iki yavru hücrenin çoğalmasına yol açan, sıkı kontrol edilen bir dizi olaylar serisidir (43). Bir seri halinde ilerleyen bu hücre döngüsü G_1 , S, G_2 ve M olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır. Aynı zamanda hücre döngüsü morfolojik olarak interfaz (ara faz) ve M (mitotik) faz aşamalarına bölünebilir Ara faz G_1 , S ve G_2 aşamalarından oluşurken mitotik faz profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarından oluşmaktadır. Hücre döngüsünün merkezinde hücre döngüsünün aşamaları boyunca hücrenin ilerlemesini düzenleyen CDK'lar ve siklin proteinleri yer almaktadır (42, 43).

Döngünün G_1 ve G_2 aşamaları, hücre döngüsündeki iki belirgin dönüm noktası olan DNA sentezi ve mitoz arasında meydana gelmektedir. G_1 fazında hücre DNA sentezine hazırlanırken S fazı, DNA replikasyonu ve hücresel bileşenlerin iki katına çıktığı evreden sorumludur. Bu nedenle S fazı 2N ile 4N arasında anöloid DNA içeriğine sahiptir. G_2 fazı, hücrenin M fazına hazırlandığı hücre döngüsü evresidir (Şekil 1) (44). Bahsi geçen evreler durağan dönemler değil, hücrelerin hacim kazandığı, büyüme sinyallerini entegre ettiği, kopyalanmış bir genomu organize ettiği ve kromozom ayrışmasına hazırlandığı dönemlerdir. Bir de bu 3 fazın dışında hücrelerin fizyolojik olarak bölünmeye uygun olmadığı durumlarda hücre döngüsünden ayrılarak beklemeye geçtiği G_0 aşaması mevcuttur (43).



Şekil 1. Hücre döngüsü (Ligasova'dan, 44)

Ara faz boyunca ortaya çıkan DNA hasarı, hücre döngüsünün sonraki aşamalarına geçmeden önce onarım yollarının aktivasyonuna zaman tanımak amacıyla hücre siklusunun durmasına neden olur (45, 46). DNA hasarının kaynağı, metabolik ara ürünler, telomer yıpranması, onkogenin aşırı ekspresyonu ve DNA replikasyon hataları gibi hücre içi kaynaklı olabileceği gibi güneş ışığından kanserojenlere, iyonlaştırıcı radyasyona veya diğer antikanser tedaviler gibi hücre dışı kaynaklı da olabilmektedir. DNA onarımı için hasara özgü pek çok yanıt mevcutken, genomik DNA'daki farklı hasarlar, hasar ortadan kaldırılınca kadar CDK'ları inaktif formda tutan kontrol noktası yollarını aktive edebilmektedirler (45, 47). Söz konusu noktalar tümör supresör p53 aracılı kontrol edilen bölgeler, DNA hasarı kontrol noktaları ve checkpoint kinaz-1 in kontrolünde olan bölgeler olarak sınıflandırılabilir (43, 46). Hücre döngüsü kusur derecesine bağlı olarak gerçekleşebilen kontrol noktası fonksiyon bozuklukları, kanser gelişimine, hücre ölümüne ve hücre döngüsünün yeniden programlanmasına kadar farklı neticelere neden olabilmektedir (47).

Tümör Baskılayıcı Gen p53

1979'da keşfinden bu yana, p53'ün tümör baskılanmasında anahtar rolünü ortaya koyan kapsamlı çalışmalar yapılmıştır (31). p53 geninin mutasyonları ve p53'ün negatif düzenleyicilerinin [örn Mouse double minute 2/4 homolog (MDM2/MDM4) ve Protein fosfataz Mn^{2+}/Mg^{+} bağımlı 1D aşırı ekspresyonu gibi diğer mekanizmalar yoluyla yabancı tip p53 fonksiyonunun kaybı, insanlarda birçok kanser türünün başlatılması ve/veya ilerlemesi için bir ön koşul olarak görülmektedir. Bir transkripsiyon faktörü olarak p53, tümör baskılayıcı işlevini, hedef genleri üzerinde yer alan p53 DNA bağlanma bölgeleri aracılığıyla ilgili gen ekspresyonlarını düzenleyerek gerçekleştirir (48). Bu genleri transkripsiyonel olarak düzenleyen p53, apoptoz, hücre döngüsünün durdurulması, yaşlanma, DNA onarımı, hücre metabolizması ve antioksidan savunma dahil olmak üzere birçok önemli biyolojik süreçte kritik rol oynar (49). Bununla birlikte; p53 mutasyonları tüm kanserlerin %50'sinden fazlasında görülür. İlginç bir şekilde, meme kanseri tip-1 duyarlılık geni (BRCA1), RB ve adenomatöz polipozis koli gibi gen mutasyonları kaynaklı gelişen kanserlerde p53 mutasyonları, ağırlıklı olarak p53'ün DNA bağlanma alanında meydana gelir. Söz konusu durum p53'ün, hedef genlerindeki p53 DNA bağlanma elemanlarına tutunma yeteneğini ve devamında p53'ün transkripsiyonel etkinliğini bozarak tümör hücre gelişimini uyarır (50). Tüm insan kanserlerinin yarısından fazlasında mutasyona uğrayan kritik bir tümör baskılayıcısı p53 gendir. p53'deki mutasyonlar yalnızca antitümör aktiviteyi bozmaz, aynı zamanda mutant p53 proteininin onkogenik özelliklerini de kazandırır. Ek olarak, spesifik p53 mutantları, p53 etkileşimini şekillendirerek hücresel yolları yeniden düzenleyebilir ve kanserin çoğalmasını, göçünü, metastazını destekleyebilir. (31, 48). Son yıllarda ortaya konan farklı hücresel etkileriyle tümör büyümesi üzerindeki rolü p53'ün önemini arttırmıştır. Örneğin, p53 hücresel metabolizmayı düzenleyebilir ve hücreleri ferroptozla ilişkili hücre ölümüne karşı duyarlı hale getirebilir (50, 51). p53 ayrıca tümör gelişiminde kritik süreçler olan apoptoz, otofaji, hücresel farklılaşması ve kök hücre yenilenmesini de kontrol eder (48). İlgili araştırmalar neticesinde p53 mutasyonu aracılığıyla değişebilen sinyal yollarını hedeflemek, etkin bir strateji gibi görünmektedir.

Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü p21

İlk olarak normal hücrelerde siklin bağımlı kinaz inhibitörü (p21WAF1/Cip1) olarak hücre döngüsü inhibitörü ve anti-proliferatif efektör olarak tanımlanan p21, 1994 yılında keşfedilmiştir. Devamında p21 nakavt modellere ilişkin araştırmalarla bahsi geçen proteinin,

p53 transkripsiyon faktörü aktivitesiyle birlikte hücre döngüsünün durdurulmasındaki etkinliği de ayrıca vurgulanmıştır (52). Hücresel dönüşümü uyaran temel düzenleme mekanizmalardan biri, hücre döngüsü kontrol noktalarıdır. Siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21, farklı uyaranlara cevap olarak hücre döngüsünün durdurulmasını düzenler (53). Kontrolsüz çoğalmayı önleyici sinyallerin hem sensörü hem de efektörü olarak işlev görebilecek bir konumda yer almaktadır (54).

Fizyolojik şartlarda organizmanın hücresel bütünlüğünün kaybını izlemek ve bunlara yanıt vermek için birden fazla kontrol noktası mekanizması geliştirmiştir. Kontrol noktaları mevcut hatalar düzeltilene ya da çevre, genetik materyalin aslına uygun şekilde iletilmesine izin verilene kadar hücresel ilerlemeyi durdurmaktadır. Kontrol noktası mekanizmalarındaki bozukluklar, genom bütünlüğüne zarar vererek tümör proliferasyonunu teşvik edebilir ve tedavinin etkinliğini olumsuz seviyelerde etkileyebilir (54, 55). p53 proteini, farklı büyüme faktörü inhibitörleri ya da apoptoz düzenleyici genlerin aktivasyonu üzerinden DNA hasarının uyardığı kontrol noktalarına aracılık eder. Bunlar arasında, 165 amino asitlik küçük protein p21, p53'e bağımlı olarak G₁ fazında hücre döngüsünün durmasına aracılık eder (50). Ek olarak, biyokimyasal ve genetik çalışmalardan elde edilen önemli kanıtlar, p21'in, klasik p53 tümör baskılayıcı yoldan bağımsız olarak antiproliferatif etki gösteren çoklu tümör baskılayıcı yolların ana efektörü olarak da görev yapabildiğini göstermektedir (34). Hücre proliferasyonunu baskılamadaki etkin fonksiyonuna, farklılaşmayı ve hücresel yaşlanmayı uyarma yeteneğine rağmen, güncel araştırmalarla p21'in belirli şartlarda tümör hücre proliferasyonunu ve onkogenezi destekleyebileceği de düşünülmektedir. Sonuç olarak, farklı kanser türlerinde sıklıkla yanlış düzenlenerek tümör proliferasyonuna hizmet edebilen p21 ekspresyonu, sitoplazmadaki veya çekirdekteki lokalizasyonuna ve hücresel koşullara bağlı olarak bir tümör baskılayıcı veya bir onkogen olarak görev yapabilmektedir (52, 54).

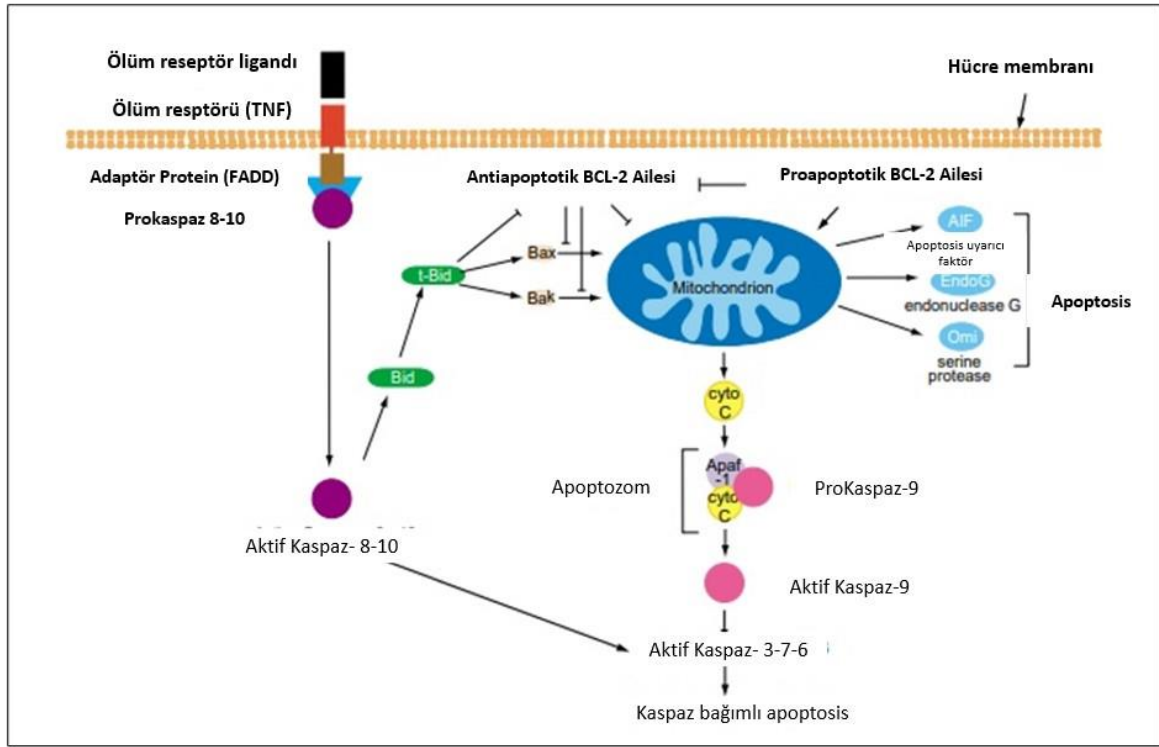
Apoptoz ve Apoptotik Hücre Ölümüne Direnc

Apoptoz kendini yok etmek üzere uyarılan hücrenin farklı moleküler ve fizyolojik süreçleri başlattığı bir olaydır. Apoptozun fizyolojik işleyişini, apoptoza yönelen hücrenin, çevre hücrelerle bağlantısını kopararak bulunduğu ortamdan uzaklaşması, hücre kromatininin artması ve sonuçta hücrenin piknotik bir görünüm alması olarak sıralayabiliriz. Ancak unutulmamalıdır ki bu fizyolojik süreç boyunca hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Çekirdek küçülür, parçalara ayrılır. Ayrıca hücre zarında yer alan

fosfatidil serinin, hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olması da apoptotik sürecin başladığının göstergesi olarak kabul edilir. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır ve apoptotik hücre ölüm süreci tamamlanır (60).

Programlı hücre ölüm türleri arasında yer alan apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik düzenleyiciler aracılığı kontrol edilen bir süreçtir. Apoptoz, pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein seviyeleri arasındaki dengenin yönüne göre düzenlenir (56). B hücre lenfoma- 2 (Bcl-2), ailesinin üyelerinden Bcl-2 ilişkili X (Bax) ve Bcl-2 antagonist öldürücü (Bak) pro-apoptotik proteinler arasında yer alırken, Bcl-2, B-hücre lenfoma-extra large (Bcl-XL) ve indüklenmiş miyeloid lösemi-1 (Mcl-1) anti-apoptotik proteinler arasında yer alır. Apoptotik süreç, biri hücre dışı ölüme neden olan sinyalleri (örneğin Fas ligandı/Fas reseptörünü içeren ekstrinsik apoptotik program) alan ve işleyen, diğeri ise hücre içi sinyalleri (genotoksisite, ER stresi, mitokondriyal hasar vs) algılayan ve bütünleştiren iki ana yolağa ayrılır. Her iki apoptotik yolağın ortak noktaları ise kaspaz aktivasyonunun apoptotik yolaklardaki düzenleyici rolüdür. Hem intrinsik hem de ekstrinsik yolda görevli kaspaz 3 (Cas-3) de dahil olmak üzere apoptozda görevli toplamda 14 kaspaz molekülü bulunmaktadır (57). Söz konusu süreçler gizli bir proteazın (sırasıyla kaspaz 8 ve 9) aktive olmasıyla sonlanır. Aktive olan proteazlar, hücrenin kademeli olarak parçalara ayrıldığı ve daha sonra fagositik hücreler tarafından tüketildiği, apoptozun başlangıç ve ilerleme aşamalarından sorumlu, efektör kaspazları içeren proteoliz kaskadını uyarır. Yapılan araştırmalara göre intrinsik apoptoz kanser proliferasyonunun baskılanmasında daha etkin görünmektedir (58).

B hücre lenfoma-2 protein ailesinin en yakın akrabaları olan Bcl-xL, indüklenmiş Mcl-1 apoptoz inhibitörleridir ve genelde iki pro-apoptotik tetikleyici proteine (Bax ve Bak) bağlanarak inhibe etki gösterirler (59). Anti-apoptotik akrabaları tarafından inhibe durumda olan Bax ve Bak proteinler, uyarılarına bağlı olarak serbest kaldıklarında dış mitokondriyal zarın bütünlüğünü bozarak, pro-apoptotik sinyal proteini sitokrom c salınımını başlatırlar. Serbest kalan sitokrom c, apoptotik çoklu hücrel değişiklikleri indüklemek üzere proteolitik kaspaz dizisini aktive eder (Şekil 2) (61). Bax ve Bak, fiziksel etkileşimlerine aracılık eden anti-apoptotik Bcl-2 benzeri proteinlerle Bcl-2 homolog 3 (BH3) motifleri olarak adlandırılan protein-protein etkileşim alanlarını paylaşır (31). BH3 motifi içeren ilgili proteinler, çeşitli hücrel anomali sensörleriyle etkileştiğinde ya anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine müdahale ederek ya da bu ailenin pro-apoptotik üyelerini doğrudan uyararak etkilerini gösterirler (58).



Şekil 2. Apoptoz hücre yolları (Guerin'den, 61)

Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının aydınlatılması, tümörögenезis sırasında, antikanser tedavinin bir sonucu olarak ya da fizyolojik strese yanıt olarak apoptozun nasıl tetiklendiğini ortaya çıkardı (31). Tümöral gelişim penceresinden değerlendirildiğinde apoptoz yüksek seviyelerde onkogen sinyalizasyonu ve hiper proliferasyonla ilişkili DNA hasarının sonucudur (46). Bununla birlikte yapılan araştırmalar, ileri derece malignite ve tedaviye direnç göstermeyi başaran tümörlerde apoptozun nasıl zayıflatıldığı üzerine yoğunlaşmaktadır. Apoptozu tetikleyen hücresel koşullar araştırılmaya devam ediyorsa da tümör gelişiminde kilit rol oynayan birkaç anomali sensörü tanımlanmıştır (31). En dikkate değer olanı, p53 tümör baskılayıcı aracılığıyla işlev gören DNA hasar sensörüdür (48). p53, BH3 proteinleri BH3 proteinleri Forbol-12-miristat-13-asetat (Noxa) ve apoptotik p53 aktivatör düzenleyici (Puma) ekspresyonlarını up regüle ederek apoptozu indükler ve bunu önemli seviyelerde DNA kırılmalarına ve diğer kromozomal anomalilere yanıt olarak yapar (49).

Tümör hücreleri, apoptozu sınırlandırmak ya da apoptozdan kaçınmak amacıyla farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Söz konusu stratejiler arasında, apoptozu indükleyen kritik hasar sensörü p53 tümör baskılayıcı gen fonksiyonunun kaybı en yaygın olanıdır (48). Öte

yandan tümör hücreleri, anti-apoptotik düzenleyicilerin (Bcl-2, Bcl-xL) ya da hayatta kalım uyarılarının ekspresyonunu artırarak yahut pro-apoptotik faktörlerin [Bax, Bcl-2 benzeri protein 11 (Bim), Puma] aktivasyonunu baskılayarak da apoptozdan kaçabilirler (31, 58). Apoptozdan kaçınma mekanizmalarının çeşitliliği, tümör hücresi popülasyonlarının malign duruma evrimleri esnasında fazla sayıda apoptoz uyarım sinyalleriyle karşılaştığını yansıtmaktadır. Apoptotik mekanizmanın yapısı ve kanser hücrelerinin eylemlerinden kaçınmak için kullandıkları stratejiler, son on yıldan bu yana dikkatleri üzerine çeken bir konu olmuştur (46). Bu anlamda dikkate değer kavramsal ilerlemeler, kansere karşı bir engel olarak programlanmış hücre ölümünün kapsamını genişleterek diğer hücre ölüm mekanizmaları üzerine dikkatleri toplamıştır.

Otofaji ve Otofajik Hücre Ölümüne Direnc

Otofaji, hücresel homeostazı düzenleyen; hücre içindeki proteinlerin, organellerin parçalanması ve geri dönüşümünde rol oynayan kontrollü lizozomal hücresel ölüm yolağıdır. Amino asit yoksunluğu, serum açlığı ve büyüme faktörü yoksunluğu, hipoksi, çeşitli kimyasallara maruz kalma gibi stres koşulları dahil olmak üzere bir dizi uyarı sonucu otofajiyi aktive etme kapasitesine sahiptir. Mayadaki genetik çalışmalar, otofajiyi ilişkili genlerin (Atg) keşfini sağlayarak, otofajik sürecin moleküler sinyal yolunun ayrıntılarını aydınlatmış (62).

Bir dizi otofajik uyarım sinyalinin başlatılmasından ve iletilmesinden sorumlu olan memeli hedefli rapamisin (mTOR), evrimsel olarak korunmuş serin/treonin kinazdır. mTOR kompleksleri, anabolik ve katabolik süreçleri koordine ederek hücresel enerji homeostazisini düzenleyen sinyal yollarının entegrasyonunda kritik bir kavşak oluşturur (63). Otofaji, hücresel enerji ve ATP düzeylerini algılayarak aktive olan AMP ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) tarafından uyarılır. ATP konsantrasyonunun azalmasıyla beraber AMPK, ADP veya ATP ile doğrudan etkileşerek aktive olur. AMPK ve mTOR aktivitesi arasında çapraz düzenleme gerçekleşmektedir. ATP/ADP oranının azalması AMPK'yi aktive ederken bu aktivasyon tüberoz skleroz kompleks protein-2 (TSC2) ve mTOR ilişkili düzenleyici proteinin (RAPTOR) fosforilasyonuna bağlı olarak mTOR'un inhibisyonu ile otofajiyi aktive edebilir. Ayrıca besin yoksunluğuna yanıt olarak mTOR1, mayada otofaji düzenleyici serin/treonin kinaz Atg1 in memeli homologu Unc 51 benzeri otofaji aktive edici kinaz (ULK1/2) kompleksinden ayrılarak aktive edilir ve bu da fosfoinositol 3 kinaz (PI3K) yolağı üzerinden otofajiyi aktive edebilmektedir (Şekil 3) (62).

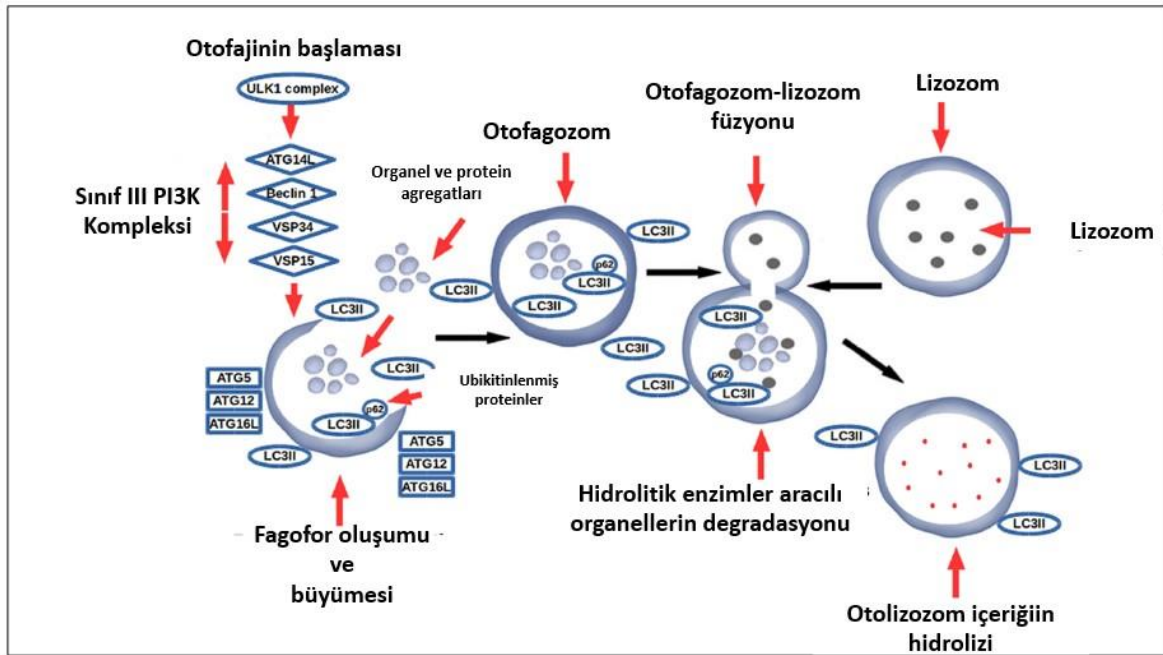
Otofajik membranlar PI3K kompleksi aracılığıyla çekirdeklenirler. PI3K ailesi üyesi vacuolar protein sorting 34 (VPS34), mayada otofaji düzenleyici gen, Atg6'nın memeli ortoloğu olan BECN1 gen proteini (Beclin-1), BECN1 aktive edici- otofaji düzenleyici protein-1 (AMBRA1), gibi çeşitli proteinler, fagofor oluşumunda yeni düzenleyici proteinler olarak tanımlanmaktadır. Beclin-1, membran çekirdeklenmesinde görevli temel proteinler arasında yer alır ve Bcl-2 ile etkileşimi, otofajiyi engeller (64). Tersine, bu etkileşimin bozulması Beclin-1'in lipid kinaz VPS34'e bağlanmasını ve membran çekirdeklenmesini desteklemesini sağlar (65).

Memeli hücrelerinde fagofor membranların gelişimi, trans-Golgi ve geç endozomlar gibi sitozolik membran yapılarıyla denge içerisinde ve ilk olarak da ER' den başlamaktadır (66). Atg1 kinaz aktivitesi, Atg13 ve Atg17 ile kompleks içinde, büyüyen fagofora lipid alımını teşvik eden Atg9 uyarımını düzenler. Konjuge Atg5-Atg12 kompleksleri, genişleyen fagoforla birleşen multimerik bir Atg5-Atg12-Atg16L kompleksi oluşturmak üzere Atg16L dimerleriyle çiftler halinde birleşir (62). Atg5-Atg12 konjugasyonu ile beraber otofajinin aktivasyonundan bağımsız olarak, otofagozom oluşumuyla, Atg5-Atg12-Atg16L membrandan ayrışır (Şekil 3). Bu durum konjuge Atg5 Atg12'yi nispeten zayıf bir otofaji belirteci haline getirir (65, 67).

Otofagozom oluşurken Atg5-Atg12 konjugasyon adımı ve hafif zincir 3 (LC3) işleme adımı otofajik anahtar rolünde iki ubikuitin benzeri sistem vardır. Bu sistemlerden ilkinde, bir E1 ubikuitin aktive edici enzim gibi davranan Atg7, karboksiterminal glisin kalıntısına bağlanarak Atg12'yi ATP'ye bağımlı bir şekilde aktive eder. Atg12, Atg5'in lizin kalıntısına kovalent bağlanarak kompleks oluşturur (64). İkinci ubikuitin benzeri sistem, Atg8 tarafından kodlanan mikrotübülle ilişkili protein LC3 işlenmesidir. LC3-I, pek çok hücre türünde, otofajinin uyarılmasıyla LC3-II'yi oluşturmak hedefli bir sistein proteaz olan Atg4 aracılı sitozolik protein olarak eksprese edilir (62). Atg4'e bağlı bölünmeyle meydana gelen karboksiterminal glisin, Atg12 üzerinde Atg7 aracılığıyla beraber ATP bağımlı olarak aktive olur. Uyarılan LC3-I, işlenmiş LC3-II'yi meydana getirmek üzere, fosfatidiletanolamin (PE) karboksil glisine konjuge olmadan evvel bir taşıyıcı protein olan Atg3'e aktarılır (68). LC3-II'nin büyüyen fagofora alımı ve entegrasyonu Atg5-Atg12'ye bağlıdır. LC3-II, otofagozomun hem iç hem de dış yüzeyinde yer alır; burada hem membranların hemifüzyonunda hem de bozunma için kargo seçiminde etkilidir. Otofaji sırasında LC3'ün sentezi ve işlenmesi artar, bu da onu hücrelerdeki otofaji seviyelerinin

önemli bir göstergesi haline getirir (69). LC3 ilişkili moleküllerin otofajik hücre ölümündeki ehemmiyeti tamamen aydınlatılamamış olsa da protein-protein etkileşimlerindeki farklılıkları ve moleküllerin otofagozomlarla toplanması için hangi kargo moleküllerin seçileceğini belirleyebileceği düşünülmektedir (62).

Otofagozom membranının oluşumundan sonra otofajik veziküller parçalanmak üzere lizozomlara taşınır. Otofagozomla ilişkili LC3 proteinleri, füzyondan önce elimine edilir ve geri dönüştürülür (68). Son evrede, otolizozomal kargonun, lizozomal proteazlarla parçalandığı otofagozom- lizozom füzyonu meydana gelir. Kargo moleküllerin parçalanması ile serbestleşen amino asitler, yağ asitleri gibi monomerler farklı metabolik işlemlerde yeniden kullanılmak hedefli sitozole yönlendirilir (66).



Şekil 3. Otofaji hücre ölüm mekanizması (Darcy'den, 67)

Otofaji, apoptoz gibi hücrelerde fizyolojik şartlarda bazal seviyelerde işleyen, ancak başta besin eksikliği olmak üzere belirli hücresel stres durumlarında indüklenabilen hücresel yanıtı temsil eder (31). Otofajik yolda otofagozom olarak adlandırılan hücre içi veziküller, hücre içi organelleri sarar, lizozomlarla birleşir ve oluşan otofagozomal içerik bozunmaya uğrar. Kanser hücreleri otofaji ile besin yoksunluğunun oluşturduğu hücresel strese karşı sağ kalımlarını destekleyeni düşük moleküler ağırlıklı metabolitler üretebilmektedirler (70). Bir paradoks olarak, bazı sitotoksik ilaçlar, radyoterapi ya da besin açlığı gibi stres faktörleri

kanser hücreleri için görünüşte sitoprotektif olan otofajiye neden olabilir. Bu durum strese giren kanser hücrelerinin otofaji aracılı geri dönüşümlü uyku durumuna geçmesine neden olmaktadır (66). Söz konusu sağ kalım tepkisi, güçlü antitümöral ajanlarla tedavinin ardından bazı geç evre kanser türlerinin kalıcılığını ve nihai olarak tekrarlı proliferasyonunu sağlayabilmektedir.

2.1.1.6. İmmün Cevaptan Kaçınma

İmmün sistemin başlangıç evresindeki neoplazilerin, geç evre tümörlerin ve metastazların gelişimine, ilerlemesine ya da yok edilmesine dirençte oynadığı rol, tümör gelişimini kapsayan ve hala çözülememiş bir problem olarak önem taşımaktadır. Uzun süredir güncel literatüre konu olan bağışıklık gözetimi teorisine göre, hücreler ve dokular sürekli tetikte olan bir bağışıklık sistemi tarafından izlenip, yeni başlayan kanser hücrelerinin ve gelişmekte olan tümörlerin tanınarak, devam eden süreçte ortadan kaldırılırlar (31). Ancak gelişen solid tümörler, bağışıklık sisteminin farklı kolları tarafından yakalanmamayı başarmaktalar ya da immünolojik olarak yok edilmekten kurtulabilmektedirler. Kanser immünolojisine ilişkin tartışmalar, tümör- konakçı immünolojik etkileşimi etrafında toplanmaktadır. Çünkü immünojenik kanser hücrelerinin kendilerini ortadan kaldırmayı hedefleyen bağışıklık sistemi elemanlarını devre dışı bırakarak immün tahribatından kaçınabildiği yollar gizemini hala korumaktadır (71, 39).

2.1.1.7. İnvazyon ve Metastaz

Günümüzde kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz mekanizmaları büyük oranda aydınlatılmıştır. Kanser hücrelerinin invaziv evreden metastatik evreye geçinceye kadar hücrede gerçekleşen adımlar; 1. Kanser hücrelerinin yapışması ve ayrılmasında azalma, 2. Bazal membranın bozulması, 3. Kanser hücresi hareketinin ve stromal infiltrasyonun kazanılması, 4. İntravazasyon, 5. Damar içi göç, 6. Ekstravazasyon, 7. Metastatik odaklarda kanser hücresi büyümesi olarak sıralanabilir (39).

İnvazyon ve metastaz süreci, lokal doku istilası ile başlayarak, devamında tümör hücrelerinin yakındaki lenfatik ve kan damarlarına nüfuz etmesi, kanser hücrelerinin lenfatik ve vasküler sistemlerdeki yolculuğu ve ardından söz konusu tümör hücrelerinin hücre lümenlerinden kaçışı ile başlayan sıralı bir süreçtir (31). Bir dizi biyolojik hücre değişimi ile damarların uzak doku parankimine yayılması ekstravazasyon, küçük kanser hücresi nodüllerinin oluşması mikrometastaz ve son olarak mikrometastatik lezyonların makroskopik tümörlere dönüşmesi kolonizasyon olarak adlandırılmaktadır. İnvazyon ve

metastaik gelişim bakımından değerlendirildiğinde E-kaderin, endotelial mezenşimal geiş (EMT) ve ekstrasellüler matriks (ECM) elemanlarının moleküler düzenlenmeleri ayrı bir önem teşkil etmektedir (39).

2.1.1.8. Anjiyogenez

Tümörler, diğler fizyolojik dokular gibi oksijen ve besin teminlerinin yanı sıra metabolik atıkları ve karbondioksiti uzaklaştırmak zorundadırlar Anjiyogenez süreci tarafından üretilen, tümörle ilişkili yeni damar oluşumları bu ihtiyaçları karşılarlar (31). Anjiyogenez ve lenfatik anjiyogenez (yeni lenfatik damarların çoğalması), kanser hücrelerinin büyümesi, invazyonu ve metastazı için gereklidir (72). Kronik olarak aktive edilmiş anjiyogenez ve pro-anjiyogenik sinyallerin dengesiz düzenlenmesi nedeniyle, tümöral kan damarları tipik olarak anormaldir. Bu oluşumlar, erken gelişmiş kılcal filizlenme, mikro kanama, bozuk ve genişlemiş damarlar, düzensiz kan akışı, kıvrımlı ve aşırı damar dallanması, anormal endotel hücre proliferasyonu ve apoptotik direnç ile karakterizedirler (73).

Anjiyogenik geiş, anjiyogenezi indükleyen ya da baskılayan dengeleyici faktörler tarafından yönetilmektedir. Bahsi geçen anjiyogenik düzenleyicilerden bazıları, vasküler endotel hücreleri tarafından uyarıcı ya da inhibe edici hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan sinyal molekülleridir (74). Anjiyogenez uyarılarının veya inhibitörlerinin iyi tanınan prototipleri; vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF-A/B/C/D) ve trombospondin-1 olarak sıralanabilmektedir (31). VEGF geni, embriyonik ve doğum sonrası gelişim sırasında, endotel hücrelerin homeostatik olarak sağ kalımı, yetişkinlerde fizyolojik ve patolojik durumlarda yeni kan damarı gelişiminde görevli ligandları kodlar. Üç reseptör tirozin kinaz (VEGFR-1/2/3) aracılığıyla VEGF sinyalleri, söz konusu karmaşık amacı yansıtmak düzeylerde düzenlenir. (72). Tümör hücrelerinde VEGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF- β), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) gibi pro-anjiyogenik faktörler ve matriks metaloproteinazlar (MMP), anjiyogenez ve metastazı teşvik ederek tümör proliferasyonuna hizmet eden elemanlar olarak da bilinmektedirler (75).

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü, ilk kez 1983 yılında keşfedilen ve memeliler arasında yüksek oranda korunan, 40-45 kDa ağırlığında dimerik, sistein açısından zengin bir proteindir. Tümör doku vasküler damarlarının geçirgenliğini arttırdığı ve asit ortam oluşumunu teşvik ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. 1989 yılında VEGF proteinini

ilk kez izole edildi ve anjiyogenez sürecindeki rolü belirlendi (76). Vasküler endotelial büyüme faktörü ailesi, VEGF (VEGF-A olarak da anılır), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü olmak üzere beş proteinden oluşur. Anjiyogenezin en güçlü indükleyicilerinden biri olan VEGF, başlangıçta vasküler geçirgenlik faktörü olarak tanımlanmıştır (73).

Kanser gelişiminde VEGF, tümör hücreleri ve mikroçevreyi teşkil eden stroma aracılı üretilir ve salgılanır. Tümör proliferasyonu, artan damar yoğunluğu, invazivlik, metastaz ve tümörün tekrarlaması ile karakterizedir (77). Hipoksik ortamda VEGF ekspresyonu artar ve endotel hücreleri tarafından eksprese edilen VEGFR-2 aktivasyonu yoluyla kan damarı oluşumunu düzenler (78).

Vasküler endotelial büyüme faktörü, reseptörüne (VEGFR 1/2/3) bağlanarak tümör anjiyogenezini düzenler ve hücre içi sinyal yollarını aktive eder. VEGF reseptörü üç bölgeden oluşmaktadır; hücre dışı VEGF bağlama alanı, transmembran alan ve hücre içi alan (tirozin aktivasyon alanı). VEGF, VEGFR' nin hücre içi tirozin kalıntıları fosforillemek üzere hücre dışı alana bağlanır ve hücre içi sinyal yollarını aktive eder (73, 77). VEGFR-1 ve VEGFR-2 ağırlıklı olarak vasküler endotel hücrelerle birlikte makrofajlar ve tümör hücrelerinde eksprese edilirken, VEGFR3 endotelial lenfositlerde yüksek düzeyde eksprese edilir (2). Endotelial hücrelerin tümör anjiyogenezindeki rolü, endotelial hücre sinyalizasyonunun düzenlenmesi, tümör anjiyogenez ve gelişimi açısından ayrı bir öneme sahiptir. Endotel hücre göçü, tümör anjiyogenezinde bir önkoşul olarak kabul görmektedir. VEGF, VEGFR2 aracılığıyla aktivasyonu, hücrenin hayatta kalması, proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu, vasküler geçirgenliği ve vasküler inflamasyonu gibi spesifik endotelial yanıtlara yol açan çeşitli sinyal yollarını uyarır (76, 78).

Matriks Metalloproteinazlar

Kanser araştırmaları temel olarak tümör mikroçevresinde aşırı eksprese edilen moleküllere ve bunların kanser hücresi ilerlemesine yardımcı olduğu sürece odaklanmaktadır. ECM'nin tümör proliferasyonunda sahip olduğu rol bilinmektedir. Tümör hücreleriyle ECM bileşeni arasındaki etkileşim, karsinogenez ve hücre transformasyonu için esastır (79). Kanser türlerinde yüksek seviyelerde eksprese edilen MMP'ler, kanser gelişiminin her aşamasında yer almaktadırlar (75). Tümör hücreleri, MMP ekspresyonunu uyaran büyüme faktörleri, interlekinler ve interferonlar gibi farklı molekülleri de salgırlar (80).

Matriks metalloproteinazlar 20'den fazla farklı üyesi olan Cu^{+2} bağımlı endopeptidaz ailesidir. MMP ailesi jelatinazlar, kollajenazlar, stromelizinler, matrilizinler ve membran tipi MMP üyeleri olarak sınıflandırılabilirler (73). Bilhassa tümör hücre invazyonu ve metastazında hayati role sahip MMP-9, en çok araştırılan aile üyeleri arasındadır. MMP-2 ile beraber MMP-9, MMP ailesinin jelatinaz sınıfında yer almaktadır. Kanseri, kardiyovasküler hastalıklar ve otoimmün hastalıklarla birlikte pek çok hastalığın patolojisiyle ilişkilendirilen MMP-9'un, farklı malign tümörlerde aşırı ekspresyonu olduğu bilinmektedir (73, 81). MMP-9, farklı kanser türleri ve diğer bazı hastalıklar için önemli bir hedef olduğundan, terapilerde bu proteazı hedeflemek yüksek değere sahiptir. Bu amaçla MMP-9 inhibitörünün geliştirilmesi günümüzde önemli bir araştırma alanıdır. Buradan hareketle pek çok çalışma, MMP-9'un farklı kanser türlerinde biyobelirteç olabilirliği üzerinde yoğunlaşmaktadır. Öte yandan bu proteini tespit etmek amacıyla farklı MMP-9 biyosensörleri geliştirilmiştir (80).

Matriks metalloproteinaz-9'un substratları arasında jelatin, kolajen ve elastini yer almaktadır. MMP-9, ECM'nin yeniden şekillenmesini düzenlemek amacıyla proteolitik bölünme ile pek çok ECM proteinini parçalayabilir. Ayrıca bazı plazma membran proteinleri de MMP-9'un hedefleri arasındadır (82). ECM'nin yeniden şekillenmesi ve membran protein yapılarının bölünmesindeki rolleriyle MMP-9 tümör patolojisinde ayrı bir öneme sahiptir (80). Literatürde MMP-9'un tümör mikro ortamına aracılık ederek, tümör hücre invazyonunda, metastazında ve anjiyogenezinde rol oynadığı belirtilmektedir. Ayrıca kolon ve meme kanserlerinde sağ kalım oranlarının azalması ve metastaz ile ilişkili olarak MMP-9'un aşırı ekspresyonu sorumlu tutulmaktadır. MMP-9'un akciğer metastazı sırasında VEGF tarafından indüklenebileceği, MMP-9 ekspresyonunun azalmasıyla metastazın baskılanabileceği ortaya konmuştur (75, 82). MMP-9, ECM'nin fiziksel bariyerinin parçalanması yoluyla metastazı teşvik eder (82). MMP-9, metastaz için gerekli olan jelatin ve tip IV, V, XI ve XVI kollajenlerinin bozulmasına neden olur. Ayrıca MMP-9'un tip IV kollajenin yıkımını uyararak invazyona katkı sağladığı da rapor edilmektedir. Buradan hareketle MMP-9 inhibitörlerinin metastatik aktivitenin baskılanmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (73, 83).

2.1.1.9. Yaşlanma

Onkogen etkisine ilişkin ilk çalışmalar, bu tür genlerin giderek artan ifadesinin ve protein ekspresyonlarında ortaya çıkan sinyallerin, kanser hücresi çoğalmasının ve

dolayısıyla tümör büyümesinin artmasına yol açacağı fikrini ortaya koymakla beraber, son dönem araştırmalar, onkoproteinlerin aşırı ekspresyonunun, özellikle hücre yaşlanması ve/veya apoptozun indüklenmesi gibi hücrelerden karşı tepkileri tetikleyebileceğinden, bu düşünceyi zayıflatmıştır (84). Örneğin, guanin-nükleotit bağlı bir onkoprotein olan rat sarcoma virüs (RAS)'ı yüksek seviyelerde eksprese eden kültürlenmiş hücreler, yaşlanma adı verilen ve proliferatif olmayan sürece girerek, bazal seviyede metabolik aktiviteyle yaşamlarına devam edebilirler. Söz konusu durumun aksine, bu proteinin daha düşük seviyelerdeki ekspresyonuna sahip hücreler yaşlanmayı önleyerek çoğalabilirler (31). Paradoksal olarak söz konusu tepkilere göre, tümör hücrelerinde onkogenik sinyalizasyonun göreceli yoğunluğu, mitojenik uyarı ile bu antiproliferatif savunmalardan kaçınma mekanizmaları arasındaki dengeyi oluşturmaktadır (31, 85). Genel olarak farklı kanser hücreleri, yaşlanmayı veya apoptozu tetikleyen etkenleri devre dışı bırakarak yüksek düzeyde onkogenik sinyallemeye uyum sağlayabilmektedirler.

2.1.1.10. Genomik Kararsızlık

Tümörün farklı ayırt edici özelliklerini kazanması, büyük ölçüde neoplastik hücrelerin genomlarındaki bir dizi değişikliğe bağlıdır. Genom kararsızlığı, farklı tümör türleri arasında değişiklik gösterebiliyorsa da insan tümörlerinde belgelenmiş olan çok sayıda genom bakım ve onarım kusuru, gen kopya sayısı ve nükleotit dizi değişimleri genomik istikrarsızlığın, insan kanser hücrelerinin doğasını oluşturduğunu göstermektedir (86). Bu durum özellikle genom onarımındaki kusurların, kanser hücreleri için seçici olarak avantajlı olduğu ve tümörün ilerlemesi için aracı olduğu sonucuna götürmektedir. Çünkü evrim geçiren premalign hücrelerin uygun genotipleri biriktirme hızını arttırmaktadır (86, 31). Öte yandan tümör hücreleri, normalde genomik bütünlüğü korunan, ancak genetik hasar görmüş hücrelerin yaşlanmaya veya apoptoza yönlendirilmesini uyaran sistemleri de devre dışı bırakarak ilgili mutasyonların birikimini hızlandırılabilirler (31). Bu nedenle genom istikrarsızlığı, ayırt edici özelliklerin kazanılmasıyla nedensel olarak ilişkili olan etkinleştirici bir özelliktir.

2.1.1.11. Hücresel Metabolizmanın Yeniden Düzenlenmesi

Kanserin özünü temsil eden kronik ve kontrolsüz hücre çoğalması, hücre proliferasyonunu ve bölünmesini hızlandırmak amacıyla enerji metabolizmasının ilgili düzenlemelerini de kapsar (31). Aerobik koşullar altında, normal hücreler glukozu kullanır. Sitozolde glikoliz yoluyla piruvata ve ardından mitokondride karbondioksit indirgenen

glukoz, anaerobik koşullar altında sadece pirüvata kadar indirgenerek laktik asite dönüştürülür (87). Aksine hızlı proliferen olan tümör hücreleri, bir molekül glukozdan elde edilecek ATP miktarının aerobik glikolizle karşılaştırıldığında 18 kat daha düşük verimlilikte olmasına rağmen, glukozu aerobik ortamda dahi laktata dönüştürmektedirler. "Warburg Etkisi" olarak adlandırılan bu etki, artan glukoz alımı sayesinde nükleozitlerin ve aminoasitlerin üretimine katkı sağlamakta ve enerji üretimi için hızlı bir yol oluşturmaktadır. Artan glukoz alımı ve katabolizmanın laktat yönüne kaymasının, tümör hücrelerinin biyokütle birikimini destekleme ve proliferen olan hücrelerde redoks dengesinin korunmasına yönelik olduğu düşünülmektedir (76). Glukoz metabolizmasının bu şekilde yönlendirilmesi, spesifik glukoz membran taşıyıcıları (GLUT-1), laktat taşıyıcıları ve glukozun laktata dönüşmesinde görev alan sorumlu enzimlerin artışı ile sağlandığı bilinmektedir. Teoriyi doğrulayacak şekilde glukoz alımının ve kullanımının birçok insan tümör tipinde belirgin bir şekilde arttığı belgelenmiştir. Ayrıca GLUT-1'in aşırı ekspresyonunun ilaç direncini uyarak kötü prognoza neden olduğu da ayrıca belirtilmektedir (87).

Kanser hücreleri glikolitik yakıtı, onkogenlerin (örn. Ras, Myc) aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu, hücre proliferasyonu, sitostatik kontrollerden ve hücre ölüm mekanizmalarından kaçınmak amacıyla kullanırlar. Glikolize olan bu bağımlılık, birçok tümörde faaliyet gösteren hipoksik koşullar altında artış göstermektedir. Hipoksiye yanıt, glukoz taşıyıcılarını ve glikolitik yolun çoklu enzimlerini up regüle ederek gelişir (31, 88). Bu nedenle hipoksik koşullarla birlikte onkogenler (bilhassa Ras onkogeni), hipoksiyle uyarılabilir faktör-1/2 α (HIF-1 α /HIF-2 α) transkripsiyon faktörlerinin seviyelerini artırarak glikolizi hızlandırabilirler (89). Bir başka hipoteze göre artan glikoliz hızı, glikolitik ara ürünlerin, nükleozid ve amino asit üreten yollar da dahil olmak üzere biyosentetik yollara sapmasına izin verir. Böylece yeni hücrelerin bir araya getirilmesi için gerekli olan makromoleküllerin ve organellerin biyosentezini kolaylaştırır (90). Bu hipotez Warburg benzeri metabolizmanın hızla bölünen, aktif hücre proliferasyonu için gerekli olan büyük ölçekli biyosentetik programların düzenlenmesinde rolü olduğunu desteklemektedir. Yeniden programlanmış enerji metabolizması ortaya çıkan bir ayırt edici özellik olarak tanımlanabilir. Bu durum kanser hücrelerinde metabolik yeniden düzenlenmenin önemine dikkat çekerken, temel ayırt edici özelliklerden işlevsel bağımsızlığını da ortaya koymaktadır (31, 87).

2.1.1.12. Plastisite

Neoplastik hücrelerin ayrı bir fenotipik alt sınıfı olan kanser kök hücreleri (CSC) tümör proliferasyonu ve karakteristik özellikleri bakımından ayrı bir öneme sahiptir. Giderek artan sayıda insan tümörünün, kanser kök hücrelerinin özelliklerine sahip alt popülasyonlar içerdiği yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (31). Buradan hareketle tümör dokuda işleyen fenotipik plastisitenin, CSC'ler ve CSC olmayanlar arasında özellikle kanser kök hücrelerinin dinamik varyasyonuna dayalı çift yönlü bir dönüşüm yolağı başlatması olasıdır (86). Tümör heterojenitesinin bu yeni boyutuyla kanser terapilerinde başarı yüzdelerinin artacağı aşıkardır. Tümörlerde CSC'lerin ve biyolojik plastisitenin keşfi, bir tümör içindeki tek çeşit ve genetik olarak homojen hücre popülasyonunun, mikroçevrelerindeki farklı hücrelerin varlığı nedeniyle fenotipik olarak heterojen olabileceğini göstermektedir (91). Artan kanıtlarla farklı tümör tiplerinde CSC plastisite özelliklerine sahip hücrelerin yaygın olarak kullanılan kemoterapötiklere direnç ve nüksetme gibi malign özelliklerin temelini oluşturduğu bilinmektedir (92).

2.1.1.13. Tümör Gelişimini Uyaran İnflamasyon

İnflamasyon, organizmaya yabancı alerjenlere, patojenlere ve virüslere de dahil karşı verilen fizyolojik ve hücrel mekanizmalar bütünüdür. Son araştırmalar, inflamasyonun, diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, göz bozuklukları, artrit, obezite, otoimmün hastalıklar ve inflamatuvar bağırsak hastalığı dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalıkların ilerlemesinde önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur (93).

İnflamatuvar hücreler (makrofajlar, doğal öldürücü hücreler, dentritik hücreler, T ve B hücreleri), tümörü teşvik eden sitokinler üreterek kanserin gelişimini, ilerlemesini ve metastazını teşvik ederler. İnflamasyon, büyümeyi, hayatta kalmayı, pro-anjiyogenik faktörleri ve reaktif oksijen türlerini indükleyerek tümör mikroçevresini değiştirebilir, ayrıca hücre dışı matrisi modifiye ederek anjiyogenezi, invazyonu ve metastazı teşvik edebilirler (31). Araştırmacılar, bazı tümörlerin, bağışıklık sisteminin hem doğal hem de adaptif kollarının hücrelerinin neoplastik olmayan dokulara yoğun bir şekilde sızarak pro-inflamatuvar durumu yansıttığını uzun zamandır kabul etmişlerdir. Bağışıklık sisteminin farklı hücre tiplerini doğru bir şekilde tanımlamak için daha iyi belirteçlerin ortaya çıkmasıyla birlikte, hemen hemen her neoplastik lezyonun, yalnızca hücre tipine özgü antikolarla saptanabilen ince infiltrasyonlardan, belirgin olan büyük inflamasyonlara kadar değişen yoğunluklarda bağışıklık hücrelerini içerir. (94). Tarihsel olarak, bu tür bağışıklık

tepkilerinin, büyük ölçüde, bağışıklık sisteminin, tümörleri ortadan kaldırma girişimini yansıttığı düşünülmektedir (95).

İki binli yıllarda yapılan araştırmalarla, tümörle ilişkili inflamatuvar tepkinin, beklenmedik bir biçimde tümörögenezi ve proliferasyonu arttıran paradoksal bir etkiye ve yeni başlayan neoplazilerin ayırt edici yetenekler kazanmasına yardımcı olduğuna dair ipuçları mevcuttur (31). Günümüze gelindiğinde inflamasyon ve kanser patogenezi arasındaki kesişme noktalarına ilişkin araştırmalar inflamasyonun neoplastik ilerleme üzerindeki tümör teşvik edici etkilerini ortaya koymaktadır (94).

İnflamasyon tümör mikroçevresinde, proliferatif sinyali sürdüren büyüme faktörleri, (VEGF, EGF, PDGF, TGF- β , IGF-1 gibi) hücre ölümünü sınırlayan sağ kalımı uyaran mutasyonları (p53/p21/RB gen mutasyonları gibi), pro-anjiyogenik faktörler (MMP enzimleri, VEGF gibi) anjiyogenezi, invazyon ve metastazı kolaylaştıran hücre dışı matrisi değiştiren enzimler/ biyoaktif molekülleri [plazminojen aktivatör (PA), Katepsin B/D, MMPs, Kolajenaz] uyarak çoklu ayırt edici özelliklere katkıda bulunabilir (96). Daha da önemlisi, inflamasyon bazı durumlarda neoplastik ilerlemenin en erken aşamalarında belirgindir ve yeni başlayan neoplazilerin malign kanserlere dönüşmesini teşvik etme yeteneğine sahiptir. Ek olarak, inflamatuvar hücreler, yakındaki kanser hücreleri için aktif olarak mutajenik olan kimyasalları, özellikle reaktif oksijen türlerini açığa çıkarabilir ve genetik evrimlerini yüksek malignite durumlarına doğru hızlandırır (95). Bu nedenle, inflamasyon, temel ayırt edici özelliklerin kazanılmasında karakteristik bir özellik olarak kabul edilebilir.

Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)

1986 yılında, aktive olmuş B hücrelerinin immünoglobulin kappa hafif zincirine bağlanan bir nükleer faktör olarak keşfedilen NF- κ B, transkripsiyon faktörüdür. Devam eden çalışmalarla, bu spesifik DNA bağlanma aktivitesine sahip proteinlerin hemen hemen tüm hücre tiplerinde eksprese edildiği ve pek çok farklı işlevlere sahip hedef geni düzenlediği bulundu (97). Daha sonra yapılan araştırmalarla transkripsiyon faktörü NF- κ B/Rel ailesinin; p50, p52, p65 (Rel-A), c-Rel ve Rel-B proteinleri olmak üzere beş üyeden oluştuğu ortaya kondu. Bu protein ailesinin üyeleri kendi aralarında homodimer veya heterodimer yapıları oluşturmaktadır. Fizyolojik şartlarda hücrelerde dimerler, NF- κ B β inhibitör (I κ B) ailesinin inhibitör moleküllerine bağlı formda beklememektedirler. I κ B inhibitör ailesi üyeleri,

transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanma alanları ile etkileşime girerek onları transkripsiyonel olarak inaktif halde tutarlar (98).

Yapılan araştırmalar neticesinde iki farklı NF- κ B sinyal yolu olduğu ortaya konmuştur; 1. Patojenler ve inflamatuvar araçlar tarafından aktive edilen kanonik yol, 2) hücre içi gelişimsel sinyallerle [Tümör nekroz faktör (TNF), B hücre aktive faktör (BAF) gibi] aktive olan kanonik olmayan yol. Kanonik yol aracılı patojen uyarılarla aktive olan NF- κ B'nin en yoğun formu p65:p50 heterodimeridir. Uyarın şiddetine bağlı olarak p65'teki dengesiz artış ve devamında efektör moleküllerin transaktivasyonu, inflamatuvar bağırsak hastalığı, multipl skleroz, romatoid artrit ve nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere, birçok kronik patogenezin gelişiminden sorumludur. Bu sebeple, NF- κ B p65 sinyal yolu, tümör proliferasyonunun durdurulmasını hedefleyen ilaç keşfi ve geliştirilmesi araştırmalarında önemli bir dönüm noktasıdır (97, 98). Kanonik aktivasyon sinyal yolağının, uyarılmasından Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), İnterlökin-1 reseptörü (IL-1R), tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) ve antijen reseptörleri sorumludurlar. NF- κ B aktivasyonunun alternatif yolu olarak tanınan kanonik olmayan sinyal yolağı ise B hücre aktivasyon faktörü, lenfotoksin β -reseptör, CD40 da dahil olmak üzere farklı reseptör sınıfları aracılığıyla gerçekleşir (97, 99).

Nükleer faktör kappa B transkripsiyon faktörü ailesi, inflamasyon, hücre stres, hücre farklılaşması veya çoğalması ve hücre ölüm yollarında önemli rollere sahiptir. Öte yandan NF- κ B, adezyon molekülleri, transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, hücre içi sinyal molekülleri, sitokinler ve miRNA'lar gibi düzenleyicilerin farklı bileşenlerini içeren karmaşık geri bildirim devrelerinin hedef genlerini de düzenleyebilmektedir (97). Söz konusu özelliklerin yanı sıra NF- κ B, tümör proliferasyonu, invazyonu ve metastazında düzenleyici bir oyuncu olarak da bilinmektedir. Bilhassa tümör proliferasyonunda NF- κ B, diğer pek çok sinyal molekülüyle kordine formda çalışmaktadır. Sinyal yollarında öne çıkan p53 ya da miRNA gibi başka transkripsiyon faktörleriyle de iş birliği içerisinde. İlgili transkripsiyon faktörleri ya doğrudan NF- κ B dimerleriyle etkileşir ya da NF- κ B'nin hedef genlerini uyarır (98).

Oksidatif ya da fizyolojik strese yanıt olarak kalıtsal bağışıklık süreci olarak tanımlanabilen inflamasyon, özellikle memelilerde korunan kanonik NF- κ B sinyal yolağının uyarılarak aktive olmasıyla yakından ilişkilidir (100). İnfamasyon ve özellikle de NF- κ B, kanser gelişiminde iki ucu keskin bir role sahiptir. Bir yandan NF- κ B aktivasyonu,

transforme hücreleri hedef alan ve ortadan kaldıran immün savunmanın bir parçasıyken, aynı zamanda NF- κ B, pek çok kanser türünde ve tümör gelişim evresinde aktive olarak protümörojenik fonksiyonları da uyarabilir. Kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösteren immün hücrelerin yüksek aktivite göstermeleriyle gelişen akut inflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde NF- κ B aktivasyonu kaçınılmazdır. İmmün sistemin düzenlenmesinde efektör rolde yer alan NF- κ B'nin antitümörojenik fonksiyonları arasında tümör immün gözetim sistemi ayrı bir öneme sahiptir. Ancak, tümör proliferasyonuna karşı bu immün gözetim savunma sistemi, tüm anormal hücreleri yok edebilecek kadar etkin değildir. Tümör inflamasyon sürecini antitümörojenik ve protümörojenik dengenin sıklıkla tümör lehine kaydığı bir "kaçış" aşaması izlemektedir. Bağışıklık sistemi bu aşamada kanser hücrelerinden daha iyi performans gösterirler (97, 98). İnflamasyonun, özellikle de NF- κ B'nin tümör proliferasyonuna ve ilerleyişine olan katkısı karmaşıktır. NF- κ B hem immün yanıtı düzenleyen sitokinleri (TNF- α , IL-8, IL-6 ve IL-1 gibi) hem de lökositlerin inflamasyon alanlarına toplanmasına neden olan adezyon moleküllerini uyarır (101). Doğal immünitede üstlendiği rolünün yanı sıra NF- κ B sinyalizasyonunun, apoptoz ve hücre proliferasyonunu da içine alan çok farklı hücresel olayları da kontrol ettiği bilinmektedir. Apoptozdaki düzenleyici rolü ele alındığında NF- κ B, anti-apoptotik proteinlerin aktivasyonlarıyla, inflamatuvar cevabı başlatan hücrelerin apoptozdan korunarak sağ kalımlarını destekler (100).

Nükleer faktör kappa B sinyalizasyonunun EMT aracılı metastazı kontrol ederek tümör proliferasyonuna katkı sağladığı bilinmektedir. Ayrıca NF- κ B, MMP, VEGF ve reseptörlerinin aktivasyonlarını uyararak tümör anjiyogenezisini de uyarabilmektedir (98, 101). Herhangi bir tümöral doku iç veya dış uyaranlara bağlı olarak yüksek seviyelerde NF- κ B aktivitesini uyarabilir. Yani NF- κ B aktivite artışı, ya NF- κ B ya da onkogenlerin mutasyonları aracılı doğrudan indüklenmesine bağlı olarak gerçekleşebilir. Öte yandan tümör mikroçevresinde sitokin salınımına bağlı olarak da yüksek NF- κ B aktivitesi oluşabilmektedir (100).

2.2. Bornil Asetat

Potansiyel kemoterapötik ajanların kaynağı olarak doğal ürünlere ilgi her geçen gün artmaktadır. Doğal ürünler ve bunların türevleri dünya genelinde kullanılan ilaçların %50'sinden fazlasını oluştururken, bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin %25'inden fazlasının

kemoterapötiklerin ham maddesini oluşturduğu bilinmektedir (17, 102). Birçok doğal ürün bileşeni tek başına ya da kompleks halde bu amaç için kullanılmaktadır.

Terpenoidler, bitki kaynaklı uçucu (esansiyel) yağların bir bileşeni olarak inflamasyon nörodejeneratif hastalıklar ve kanser tedavisinde önemli bir rol üstlenmektedir. Bisiklik bir monoterpen olarak BA, *Amomum villosum* (Zingiberaceae), *Inula graveolens* (Asteraceae) (103), *Tetraclinis*, *Articulata* (Cupressaceae) (104), gibi çeşitli bitkilerde tipik uçucu bileşimdir. BA bakımından zengin bitkiler geniş tıbbi değere sahiptir (105). Aynı zamanda ülkemizin endemik türleri arasında yer alan *Helichrysum armenium* ve *Thymus vulgaris* bitkilerinin çiçek ve yaprak kısımlarının esansiyel yağ içeriğini oluşturan ana bileşiklerdendir (21). İlk olarak Ohi ve arkadaşları tarafından köknar iğnelerinden izole edilen BA, parfüm ve gıda alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca BA Amerika Birleşik Devletleri '*Flavor and Extract Manufacturers Association* (FEMA No. 2159)' tarafından da güvenli olarak derecelendirilmiştir (106).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarla BA'nın çok sayıda doğal kaynağı rapor edilmiş olup, antimikrobiyal, antikanser ve anti-inflamatuar etkileri de dahil olmak üzere farmakolojik aktiviteleri vurgulanmıştır. BA şu anda tıbbi amaçlarla kullanılamıyor olsa da birçok tescilli Çin ilacında önemli bir bileşen olarak etki etmektedir. BA'nın öncüsü olarak tanınan borneol (BOL), genellikle kardiyolojik/serebrovasküler hastalıkların tedavisinde ve kan beyin bariyerinin (BBB) geçirgenliğinin artırılmasında kullanılmaktadır. Günümüzde klinik kullanımda olan BOL ile yapısal benzerliği olan BA ile yapılan *in vivo* araştırmalar BA'nın BOL'e göre toksisitesinin düşük, biyoyararlanımının ise yüksek olduğunu göstermiştir (107).

Bir anti-inflamatuar ya da bir immünomodülatör ajan olarak da ele alınabilen BA, hamilelikte kullanılabilen ilaçlar, aromaterapi ve sedatif uygulamalar bakımından farmakolojik potansiyeli yüksektir (108). Farmakolojik olarak ümit veren söz konusu bu gelişmelere rağmen BA'nın kanser ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanımını destekleyen araştırmalar ise geri planda kalmıştır. BA'nın bilhassa tümör gelişimi üzerine etkisinin detaylı olarak ele alınması, aktif potansiyelinin ortaya konması açısından ayrıca önem teşkil etmektedir.

2.2.1. Bornil Asetatın Fizikokimyasal Özellikleri

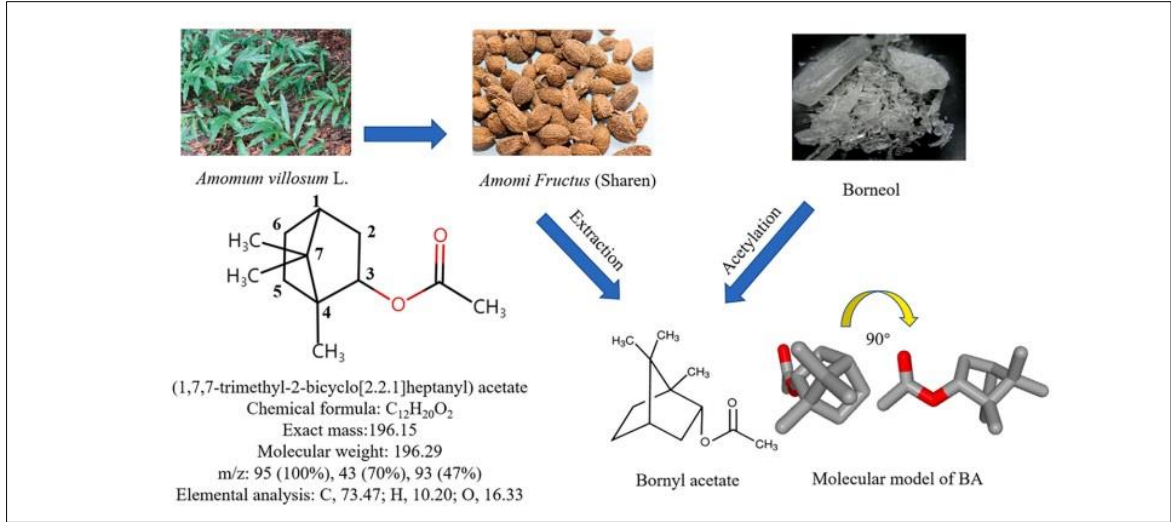
Bornil asetat hoş, serin bir çam aroması kokusuyla tanınan ~220-224°C kaynama noktasına, 196.29 g/mol moleküler ağırlığa sahip, renksiz bir sıvı veya beyaz yarı kristalimsi

bir yapıya sahiptir (PubChem CID 6448). BA'nın moleküler yapısı [1,7,7-trimetil-2 bisiklo[2.2.1] heptanil] asetat, açık formülü ise $C_{12}H_{20}O_2$ olarak gösterilmektedir. Alkol ve sabit yağlarda çözünebilir karakterdedir. BA'nın ayrıntılı fizikokimyasal özellikleri ise Tablo 1'de gösterilmektedir (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, 2023).

Tablo 1. BA'nın fizikokimyasal özellikleri

İsim	Bornil Asetat
Moleküler Formül	$C_{12}H_{20}O_2$
Kimyasal İsim	1,7,7-trimetilbisiklo[2.2.1]heptan-2-il asetat
Molekül Ağırlığı	196.29 g/mol
Fiziksel Görünüm	Kuru toz/sıvı/ renksiz
Koku	Çam/kafur/balzamik
Kaynama Noktası	~ 220-224°C
Alevlenme Noktası	88°C
Çözünürlük	25°C de suda 9,721 mg/l, alkolde, sabit yağlarda çözünür.
Yoğunluk	0,981- 0,985

Hidroksil grubunda yer alan hidrojen atomunun, asetil gruplarıyla yer değiştirmesi sonucu oluşan BA, bisiklik monoterpenler sınıfında yer alan BOL ile de aynı çift halka yapısını sergilemektedir (Şekil 4). Bisiklik monoterpen bileşiklerin karakteristik özellikleri arasında yer alan sert kafes benzeri yapıları sayesinde Gama aminobütirikasit reseptörlerinin aktivasyonları üzerinden sedatif etkilerini gösterebilmektedirler. Ayrıca söz konusu hidroksil grubunun asetilasyonunun sedatif etkiyi arttığı bildirilmektedir. Ayrıca BA'nın yapısal grupları CH ve COO^- 'nin *Bacillus subtilis*'e karşı sporisidal etki gösterebildikleri de rapor edilmiştir (109).



Şekil 4. Bornil asetatın moleküler yapısı ve kaynağı (Zhao'dan, 107). *A. fructus* bitkisinden uçucu yağ ekstraksiyonu ya da BA'nın öncü bileşiği BOL'ün asetilasyon işlemleri aracılı elde edilebilir.

2.2.2. Bornil Asetatın Toksisitesi

Literatürde yapılan araştırmalarda BA'nın toksisitesine dair doğrudan bir raporlama yapılmamıştır. Bununla birlikte farelerle gerçekleştirilen bir araştırmada BA'nın akut toksik ölümcül dozu 2191,9 mg/kg (1860,3~2582,7 mg/kg) olarak hesaplanmıştır (110). BA'nın güvenilirliği farklı hayvan çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Tavşan derisine topikal uygulama hafif derecede tahriş edici etki göstermiştir. Ayrıca erkek sıçanlarda BA'nın 90 ve 270 mg/kg/gün dozlarındaki oral uygulamalarının nefrotoksisite ve hepatotoksisite oluşturabileceği gösterilmiştir. Farelerde yapılan üreme çalışmasında (erkek için 100, dişi için 300 mg/kg/gün), BA'nın gelişimsel toksisite oluşturmadığı belirtilmiştir (109).

2.2.3. Bornil Asetatın Biyolojik Aktiviteleri

Bornil asetat açısından zengin bitkilerin tıbbi özellikleri klinik araştırmalar açısından önem teşkil etmektedir. İyi bilinen anti-inflamatuar ve antikanser aktivitelerine ek olarak, bu bitkiler antimikrobiyal ve ishal önleyici etkileriyle farklı patolojilerin tedavisinde dikkatleri çekmektedirler (107). Söz konusu bitkilerin biyoaktiviteleriyle ilgili *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bitkilerin terpenoid içeriğini oluşturan BA'nın, terapötik fonksiyonlarını yansıtan farklı fenotipik potansiyellerini de sergilemektedir.

Monoterpenler antimikrobiyal aktiviteleriyle literatürde tanınmalarıyla birlikte araştırmalar aynı sınıfta yer alan BA üzerine yoğunlaşmıştır. Günümüze kadar ulaşan

alışmalarla BA'nın *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli* olmak üzere farklı bakteri türlerine karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediği belirtilmektedir. Ayrıca, BA'nın hidrofobik grupları ile bakteri spor yüzeylerinde bulunan hidrofilik gruplar arası etkileşimin, bakteri spor yüzeyi protein yapısını bozarak çoğalmayı engelleyebildiği bilinmektedir (109). BA'nın *Escherichia*, *Bacteroides*, *Helicobacter*, *Desulfovibrio*, *Ruminococcus*, *Parabacteroides*, *Clostridium* dahil olmak üzere patojenik bakterileri önemli ölçüde inhibe ederek patojenin neden olduğu inflamatuvar bağırsak hastalıklarını azaltabildiği gösterilmektedir. Aynı zamanda probiyotik *Lactobacillaceae*'nin çoğalmasını uyararak bağırsak mikrobiyal dengenin düzenlenmesinde de etki göstermektedir (111).

Literatür araştırmaları BA'nın bağırsak ve akciğer hastalıklarının tedavisinde anti-inflamatuvar etki gösterebildiği belirtilmektedir. BA ile n tedavi neticesinde lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı akut akciğer hasarı uyarılan farelerin akciğer dokusundaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunda alveolar kanamayı, interstisyel demi önemli ölçüde iyileştirilmiştir (112). Ayrıca BA tedavisinin, 5-FU'ya bağlı bağırsak mukozitinin semptomları olan ishalin ve iştahsızlığın önlenmesinde etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. İlgili araştırmalarda BA'nın pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-6 ve TNF-) seviyelerini azaltabileceği de ayrıca belirtilmektedir (111, 113). Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada insan endotel hücrelerinde bornil asetatın okside düşük yoğunluklu lipoprotein kaynaklı azalan hücre canlılığını arttırdığını ve NF-B sinyal yolunun aktivasyonunu inhibe ederek, pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- ve IL-1) ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (114). Chen ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada LPS aracılı akut akciğer hasarına karşı BA'nın pro-inflamatuvar sitokinlerin seviyelerini azalttığını ve NF-B'yi inhibe ettiğini belirtmişlerdir (112).

Noor ve arkadaşlarının araştırmalarında anestezi altında normotansif sıçanlarda BA'nın hipotansif etkinliğini değerlendirmişler ve BA'nın intravenöz uygulanmasıyla sistolik kan basıncında doza bağlı olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğunu göstererek muhtemel anjiotensin konverting enzim inhibitörü potansiyeline sahip olabileceğini belirtmişlerdir (107). Lee ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği başka bir çalışmada *Mycobacterium tuberculosis* ekstraktı ile immünize edilen C57BL farelere 100, 200, 400 mg/kg BA oral olarak 14 gün boyunca uygulayarak, farklı dozlarda BA'nın pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6, and TNF-), enzimlerin [indüklenebilir NADPH oksidaz (iNOS)

ve siklooksigenaz-2] ekspresyonunu azalttığını, mitojen aktive edici protein (MAPK) ve NF-κB sinyal yollarını baskılayabildiğini göstermişlerdir (115).

Günümüzde aromaterapi uygulamaları depresyon, anksiyete ve doğum ağrısı gibi durumlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (116, 117). BA'nın da çam ormanı aromalı sedatif kokusu, onu aromaterapi uygulamaları için etkili bir aday haline getirmektedir. Hayvanlar ve insanlar üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar, BA buharının solunmasının gösterdiği sedatif etkinin, onun aromaterapi uygulama kapsamını genişlettiğini belirtmektedirler (107, 118).

Mevcut çalışmalar BA'nın anti-inflamatuar etkisi hakkında memnun eden farklı raporlar ortaya koymuştur. BA'nın, MAPK ve NF-κB sinyal yollarının inhibisyonu aracılığıyla bağırsak florasını ve bağırsak epitel fonksiyonlarını düzenleyerek gastro-intestinal sistem üzerinde hem koruyucu hem de anti-inflamatuar etki gösterebileceği de ortaya konmuştur (111, 119). Dikkat çeken başka bir çalışmada, BA ile uygulanan tedavinin, NO düzeylerinde kayda değer bir azalışa neden olarak anti-oksidan etki gösterebileceği bulunmuştur. NO, inflammatuar bir aracı olmasına rağmen, belli oranlarda salınımının bağırsak yolu üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu bildirilmektedir (107). Bahsi geçen tüm bu araştırmalara rağmen BA'nın anti-inflamatuar ve analjezik etki mekanizmaları belirsizliklerini korumaktadır.

2.2.3.1. Bornil Asetatın Antikanserojen Etkileri

Monoterpen yapılı bileşiklerin etkili antikanserojen araçlar olarak hareket etme yetenekleri bilinmektedir. Öte yandan BA'nın *in vitro* antikanserojen etkilerine dair çalışmalar literatürde yer alırken hala hazırda *in vivo* bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Monoterpen sınıfında yer alan BA'nın da *in vitro* kanser hücreleri üzerindeki antikanserojen etkileri ayrıca incelenmiştir. Karan ve arkadaşları BA'nın rahim ağzı kanseri (HeLa), kolorektal kanseri (HT-29), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) ve meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin canlılığını konsantrasyonla paralel olarak inhibe ettiğini ve en büyük etkinin de A549'a karşı gözlemlendiğini göstermişlerdir (103). Literatürde benzer şekilde BA'nın kolon kanseri LoVo hücreleri üzerinde, yumurtalık kanseri (A-2780) ve böbrek fibroblast (BHK-21) hücre hatlarında sergilediği sitotoksik aktivitesi de test edilmiş ve *in vitro* olarak antikanser etkisi ortaya konmuştur (120, 121). BA'nın *in vivo* antikanserojen etkinliğinin değerlendirilebilmesi için bu yöndeki araştırmalar yoğunlaştırılmalıdır.

2.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS), moleküler oksijenin kısmi azalması sonucu oluşan, eşleşmemiş elektron içeren kısa ömürlü moleküllerdir. Bunlar, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\bullet$), peroksil radikali ($LOO^\bullet$), alkoksil radikali ($LO^\bullet$), lipid hidroperoksit ($LOOH$), peroksinitrit ($ONOO^\bullet$), hipokloröz asit ($HOCl$) ve ozon (O_3) olarak sıralanabilir (122, 123).

Hücre fizyolojisindeki tartışmalı rolleri ile bilinen ROS, metabolizmada yararsız/atık moleküller değildirler. Onlar fizyolojik araçlar ve ikinci haberciler olarak sinyal iletimi, farklılaşma, proliferasyon, inflamasyon, fosfolipaz aktivasyonu, yaşlanma ve diğer metabolik süreçlerde hücresel düzenleyiciler olarak görev alabilmektedirler (124). Redoks sinyalleri, belirli proteinlerin geri dönüşümlü ve spesifik modifikasyonları ile aktive olur. Sistein kalıntıların geri dönüşümlü modifikasyonları arasında sülfanillenme, disülfid bağları oluşumu ve S-glutatyonillenme yer alır. ROS aracılığıyla başlatılan bu redoks sinyalleri ilişkili değişiklikler, iyon kanalları, fosfatazlar, kinazlar ve apoptotik sinyal yollarında görevli protein aktivitelerini hedefleyerek, transkripsiyonel aktivitelerinde değişikliklere neden olabilirler (125).

Reaktif oksijen türleri oluşumu ile enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar arasındaki redoks dengesinin oksidanlar lehine kayması olarak tanımlanan oksidatif stres, redoks sinyalinin ve fizyolojik fonksiyonun bozulmasına yol açar (125). Oksidatif stres, doğrudan ya da dolaylı yoldan ROS aracılı nükleik asitlerin, proteinlerin ve lipidlerin zarar görmesine neden olarak kanser, nörodejenerasyon, ateroskleroz ve diyabet gibi metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Bu yüzden oksidatif stresin biyobelirteçleri, hastalık durumunun ve antioksidanların koruyucu etkilerinin değerlendirilmesinde önemlidir (126)

2.3.1. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir. Antioksidan savunma sistemlerinin temel görevi aşırı ROS oluşumunu engelleyerek fizyolojik redoks dengesinin devamlılığını sağlamaktır (7). Antioksidanlar, $O_2^\bullet$ ve H_2O_2 'nin indirgenmesiyle oksidatif hasarın baskılanmasında önemli rollere sahiptirler. ROS homeostazisi, hücrenin hayatta kalması, hücresel hasarın önlenmesi ve fizyolojik hücre içi sinyal üretimi için gereklidir (126). Hücre içi ROS seviyelerinin düzenlenmesi, farklı enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından gerçekleştirilir. Enzimatik

olmayan moleküller arasında glutatyon, flavonoidler, A, C ve E vitaminlerini yer alır. Hücre içi H_2O_2 'yi H_2O 'ya indirgeyerek hücresel sinyalleşme için H_2O_2 seviyelerini koruyan enzimatik antioksidanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit redüktaz, katalaz, glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), peroksiredoksin (PRX) ve tioredoksin (TRX) olarak sıralanabilir (123).

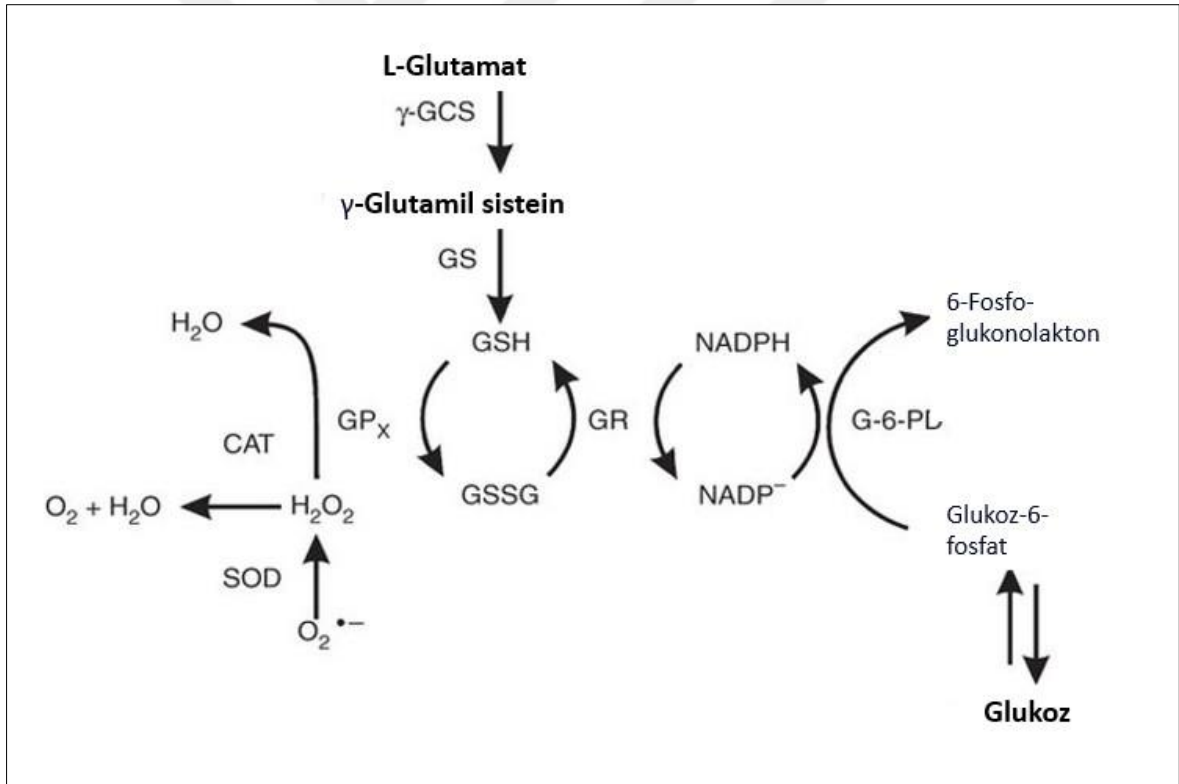
Süperoksit radikalının H_2O_2 'ye indirgenmesinden sorumlu SOD enzimleri, farklı hücre alt birimlerinde yer alan metaloenzimlerdir. SOD1 (Cu/ZnSOD) sitozolde, SOD2 (MnSOD) mitokondride bulunurken, SOD3 (Cu/ZnSOD) hücre dışında yer almaktadır. SOD enzimleri kofaktör olarak bakır (Cu^{2+}), demir (Fe^{2+}), çinko (Zn^{2+}) ya da manganez (Mn^{2+}) gibi metal iyonlarını kullanabilirler (127). Katalaz öncelikle sitozolde ve oksizomlarda bulunur ve H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye dönüştürür. Hücrelerden H_2O_2 nin uzaklaştırılması engellenirse, H_2O_2 aracılı hasardan kaynaklanan doğrudan toksisite ortaya çıkar. Yüksek aktivite gösterebilmek için GSH, NADPH ve glukoz 6-fosfat gibi kofaktörlere ihtiyaç duyan GPX, GR ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) gibi farklı ikincil enzimlere de ihtiyaç duymaktadır. GR, inhibe olduğu hücrelerde H_2O_2 'yu GP antioksidan savunma sistemi aracılı uzaklaştıramaz ve glutatyon disülfür (GSSG) düzeyleri artar. Glutatyon sentezi, glutatyon sentetazın (GS) ya da γ -glutamil sistein sentetazın (γ -GCS) inhibisyonları, GSH yoksunluğuna ve H_2O_2 birikimine neden olmaktadır (Şekil 5).

Peroksiredoksinler ve TRX'ler, aktif bölgelerinde bulunan reaktif sisteini kullanarak peroksinitritlerin ve hidroperoksitlerin H_2O 'ya indirgenmesini kolaylaştırır. Sitozol, endoplazmik retikulum, peroksizomlar ve mitokondride yer alan PRX'ler, etkin H_2O_2 süpürücüleridirler (123, 127).

Düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 , hücre proliferasyonu ve ölümü, hücreler arası sinyalizasyon, karbonhidrat metabolizması, trombosit aktivasyonu, tiyol indirgenme-yükseltgenme dengesi, mitokondriyal fonksiyon gibi pek çok metabolik sürecin düzenlenmesinde etkin rol almaktadır. Bununla birlikte fizyolojik sınırın üzerine çıkan H_2O_2 seviyelerinin metabolizmada patolojik etki oluşturulacağı da bilinmektedir (128). Bundan dolayı CAT'ın hücrede H_2O_2 konsantrasyonunu düzenleyerek organizmada birincil basamak antioksidan savunma enzimi olarak yer alması önemlidir. Peroksizomlarda yer alan CAT enzimi, SOD aracılı açığa çıkan H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenerek detoksifikasyonunu gerçekleştirir. CAT, düşük K_m (Michaelis-Menten Sabiti) değeri ile H_2O_2 'ya ilgisi yüksek olan GPx'e nazaran daha yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin indirgenmesinden

sorumludur. CAT enzimin eksikliği ya da mutasyonu farklı anomalilerle ilişkilendirilmektedir. Literatürde CAT gen aktivitesinin değişmesi veya genetik varyasyonlu kişilerde oksidatif DNA hasarı, kanser, diyabet, ateroskleroz gibi hastalıklara yatkınlığın arttığı belirtilmektedir (129).

Glutasyon sistemi; glutatyon, GR, GPx ve glutatyon-S transferazı (GST) içerir (Şekil 5). Redükte glutatyon (GSH), sitoplazmik proteinlerin sisteinlere olan disülfid bağlarını indirgeyerek hücrelere koruma sağlar (125). Sekiz adet GPX vardır ve PRX' ten daha az miktarda bulunmalarına rağmen oldukça aktiftirler ve H_2O_2 'yi daha yüksek seviyelerde temizledikleri bulunmuştur. GPX'ler sitozol ve mitokondride bulunur. Aynı zamanda Nrf2'nin hedef proteini olan GPX, H_2O_2 ve GSH reaksiyonunu hızlandırarak H_2O ve okside glutatyon (GSSG) üretir (126).



Şekil 5. Antioksidan enzim şeması (Weydert'den, 126).

Nükleer Faktör Eritroit 2 İlişkili Faktör-2

Organizmada hücre çoğalması, apoptoz ve hücre döngüsünü düzenleyerek kanser gelişimini ve ilerlemesini önlemede hayati rol oynayan Nükleer faktör eritroit-2 ilişkili faktör-2 (Nrf2), hücreleri oksidatif ve elektrofilik saldırılardan koruyarak antikanserojen etki gösteren tümör baskılayıcı bir gendir. Fizyolojik şartlarda Nrf2, negatif regülatörü Keap1'e bağlı inaktif formda beklemektedir. Hücreler oksidatif strese maruz kaldığında Keap1'den serbestleşmek üzere Nrf2, 26S proteozom yolu üzerinden yıkıma uğrar. Sitozolde Keap1'den ayrılan Nrf2, çekirdeğe yer değiştirir ve antioksidan yanıt elemanına (ARE) bağlanarak antioksidan hedef genlerinin aktivasyonunu düzenler (130).

Fizyolojik sınırın üzerine çıkan ROS'a karşı Nrf2, antioksidan enzim hedef genlerini (SOD, CAT, HO₁, GPx, GST, TRX redüktaz) aktive ederek organizmayı koruma altına alır (131). Hücrel redoks homeostazisinin yeniden kurulması üzerine Keap1, Nrf2'yi ARE'den ayırmak için çekirdeğe yer değiştirir ve bu durum Nrf2'nin yıkımına yol açar. Çalışmalar, Nrf2'nin kanser, nörolojik hastalıklar, kardiyovasküler problemler, yaşlanma ve inflamasyonla gelişen çeşitli hastalıklarda koruyucu bir işlevi olduğunu göstermiştir (130).

2.3.2. Oksidatif Stres Biyobelirteçleri

Reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin artmasıyla enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması neticesinde oksidatif stres gelişir. Oksidatif stresin biyobelirteçleri, hastalık durumunun ve antioksidanların iyileştirici etkilerinin değerlendirilmesinde önemlidir (126). Lipitler, proteinler ve DNA aşırı ROS birikimi ile modifiye edilebilecek moleküler örneklerdir. Klinik uygulanabilirlik bakımından, oksidatif değişimlerin biyolojik fonksiyonlar üzerindeki rolü, seçilen biyolojik belirteçlerin geçerliliği bakımından merkezi özelliktedir (125).

Reaktif oksijen türleri aracılı DNA bileşenlerinin oksidasyonu, nükleotit oksidasyonu, zincir kırılması, baz kaybı ve eklenti oluşumu dahil farklı DNA modifikasyonlarını uyararak DNA hasarlarının ana kaynağıdır (123). DNA molekülünde oksidatif hasarı uyaran HO[•] radikali, tüm pürin ve pirimidin bazlarıyla beraber deoksiriboz omurgasıyla da reaksiyona girerek belirteç olarak kullanılabilen farklı moleküllerin oluşumuna neden olurlar. Bu nükleotid oksidasyon ürünleri arasında yer alan 7,8-dihidroksi-8-okso-2'-deoksiguanozin en sık kullanılan oksidatif hasar belirtecidir (132).

Proteinler, normal veya oksidatif stres koşulları altında üretilen ROS için ideal bir hedef kaynağıdır. Birçok aminoasit kalıntısı farklı oksidatif modifikasyonlara maruz kalabilir (132). Kükürt kalıntılarının oksidasyonu, aromatik ve alifatik grupların hidroksilasyonu, aromatik grupların ve birincil amino gruplarının klorlanması, tirozin kalıntılarının nitrasyonu, sistein kalıntılarının nitrozillenmesi, glutatyonillenmesi ve bazı amino asit rezidülerinin karbonil türevlerine dönüşümü söz konusu modifikasyonların başında gelmektedir. Buradan yola çıkılarak proteinlerin karbonil seviyelerinin analizi, oksidatif protein hasarının en yaygın kullanılan belirteçidir ve oksidatif stres nedeniyle hasarlanan dokular, özellikle artan konsantrasyonlarda karbonillenmiş proteinler içerirler (125).

Lipid oksidasyonu son ürününün analiziyle oksidatif hasarın belirlenmesi, yaygın olarak kullanılan oksidatif stres belirteçidir (125). Başta araşidonik asit (AA) olmak üzere çoklu doymamış yağ asitlerinin yapısında yer alan doymamış çift bağ yapıları, söz konusu bileşikler, serbest radikallerin varlığında oksidatif strese karşı hassas hale getirir. Serbest radikalleri neden olduğu oksidasyon, başta HO[•] ve ROO[•] olmak üzere farklı ROS bileşikler tarafından uyarılan otokatalitik bir zincir reaksiyonunu başlatır. Zincir reaksiyonu, zincir taşıyıcı radikaller olarak görev yapan lipid peroksil radikalinin ve lipid hidroperoksitlerin oluşmasıyla ilerler. Malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi-2-nonenal lipid oksidasyonunun en çok araştırılan biyobelirteçleri arasında yer alır (132, 133).

Malondialdehitin tiobarbitürik asit (TBA) analizi, biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi için uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. MDA-TBA reaksiyonunu oluşturmak amacıyla numunenin asidik koşullar altında ısıtılmasına dayanan spektrofotometrik bir analizdir (134). Ayrıca ortamdaki toplam oksidan seviyelerinin (TOS) ve serbest oksidanlara karşı toplam anti-oksidan seviyelerinin (TAS) ölçülerek, mevcut oksidan konsantrasyonunun antioksidan konsantrasyonuna oranlandığı oksidatif stres indeksi (OSI) de oksidatif stres biyobelirteçleri arasında önemli bir yere sahiptir (135).

NADPH oksidazlar (NOX'ler), başta hidrojen peroksit ve süperoksit radikali olmak üzere ROS oluşumunu düzenleyen bir enzim ailesidir. NOX ailesi: beş farklı NOX enzim izoformlarından (NOX1-5) ve iki farklı ikili oksidazı (Duox1 ve Duox2) içeren yedi enzimden meydana gelir. NOX, NADPH'ye aracılı bir veya iki elektronlu oksijen indirgenmesi yoluyla O₂[•] veya H₂O₂ radikallerini üretirler (136). NOX aracılı üretilen ROS, hücresel bölünme, farklılaşma, anjiyogenez ve hücre göçünü de kapsayan birçok fizyolojik

fonksiyona sahiptir. Bununla birlikte artmış NOX aktivasyonunun genomik kararsızlık, oksidatif hasara bağlı gelişen DNA hasarı ile tümör proliferasyonuna invazyon, metastaz, anjiyogenez, sağ kalım ve tümör inflamasyonuna katkı sağladığı yapılan çalışmalarla gösterilmektedir (31).

Nitrik oksit eşleşmemiş elektronlarının oksijen ve azot atomlarında yer değiştirmesi ile rezonans stabilitesi ($:N::O:$) sağlamaktadır. Reseptöre ihtiyaç duymaksızın membranlardan kolayca difüze olabilmektedir. Rezonans kararlılığı ve membrandan transfüze olabilmeleri gibi özellikleri NO'ya ideal bir haberci molekülü olabilme fonksiyonu kazandırmaktadır. NO, sitokrom P-450 redüktaz enzim homoloğu Nitrikoksit sentaz (NOS) aracılığıyla L- argininden sentezlenir ($L\text{-arginin} \rightarrow \text{sitrüllin} + \text{NO}$). NOS'un nöronal (nNOS: NOS1,) uyarılabilir (iNOS: NOS-2) ve endotelial nitrik oksit sentazı da (eNOS: NOS-3) içine alan üç farklı izoformu mevcuttur (137). eNOS Ca^{2+} bağımlı bir enzimdir ve ilk olarak vasküler endotelial hücrelerde tanımlanmıştır. eNOS, VEGF ve prostaglandin E_2 gibi farklı endotel büyüme uyarıcılarının merkezi bir aracısı olarak tanınmaktadır. Mesane, kolon ve pankreas kanserleri de dahil olmak üzere pek çok tümöral yapının damar yapısında eNOS ekspresyonunun arttığı kaydedilmiştir. Öte yandan eNOS'un anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi tümör proliferasyonu ile ilişkili basamakları da düzenleyebildiği bildirilmektedir (138).

2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Kanser

Kanser ve ROS arasındaki ilişki uzun süredir dikkatleri üzerine çekmektedir. Mevcut araştırmaların ışığında, farklı yapılarıdaki kanser hücrelerinin fizyolojik hücrelere oranla yüksek konsantrasyonlarda ROS ürettiği gösterilmektedir (123). Artan ROS konsantrasyonlarının, lipidleri, proteinleri ve DNA'yı hasara uğratarak, genomik kararsızlığı ve tümör proliferasyonunu uyararak onkogenik etki oluşturduğu bilinmektedir. Öte yandan tümör gelişiminde farklı protümörojenik sinyal yolları üzerinde de görev üstlenebilen ROS, anormal hücre büyümesine, invazyonuna, anjiyogeneze, metastazına, apoptotik dirence katkı sağlayabilmektedir (139). Yüksek seviyelerde ROS konsantrasyonları, onkogenik mutasyonları ve sağ kalımı uyarıcı sinyalizasyonları aktive ederek, tümör supresör gen fonksiyonlarının baskılanmasını uyararak, glukoz metabolizmasına (Warburg etkisi) ve hipoksiye adaptasyonu geliştirerek protümörojenik etkiye neden olabilmektedir (123).

Antioksidan savunma sistemlerinin temel görevi, fizyolojik seviyelerin çok üzerine çıkan ROS konsantrasyonlarını azaltmak ve redoks dengesini sürdürmektir. Kanseri hücrelerinin antioksidan kapasitesi, artmış ROS seviyelerini indirirken, protümöral ROS konsantrasyonlarını koruyarak tümör proliferasyonuna ve hücre ölüm mekanizmalarına karşı direnç gelişimine izin verir (123). ROS üretiminin, tümör hücre gelişimine, DNA hasarı ve genomik kararsızlığa, metabolik adaptasyona, hücre ölüm mekanizmalarına ve ilaç direncine, artmış nüksetme insidansına neden olduğu bilinmektedir. Öte yandan, kanser gelişiminde ROS seviyelerinin toksik seviyeleri antitümörojenik etki göstererek oksidatif hasar artışına ve tümör hücre ölümünün uyarılmasına da sebep olabilir (139). Söz konusu çapraz ilişkiye rağmen, ROS' u ortadan kaldırmak ya da ROS konsantrasyonlarını arttırmak hedefli uygulanan tedaviler, riskli bir süreç oluştursalar dahi etkili kanser tedavileri olarak potansiyel oluşturmaktadırlar.

Hücrelerdeki artmış ROS düzeylerinin hücre döngüsünün kontrolünü, apoptozu ve yaşlanmayı başlatabileceği bilinmektedir (138). Kanseri hücrelerinde tedavi amaçlı kemoterapi uygulamaları, organizmada immün hücreler aracılığıyla yükselen ROS konsantrasyonları ya da hücreler antioksidanların tükenmesi de ROS düzeylerinde denge kaybına olabilmektedir. Yüksek düzeydeki ROS, apoptotik hücre ölümünün belirgin işaretleri olan kaspaz aktivasyonunu, poli ADP riboz polimeraz bölünmesini, DNA fragmentasyonunu doğrudan etkileyebilir (139). Mitokondriyal elektron transport zincirinden kaçan $O_2^{\cdot}$ üretimi, mitokondriyal membranda hasara neden olmaktadır. Hasar sonucunda sitokrom c'nin membrandan sitozole salınması ve translokasyonu kaspaz aracılığıyla ve kaspaz bağımsız sitozolik sinyal yolları tetiklenir. Mitokondriden önemli miktarda sitokrom c kaybı, mitokondriyal ETC' nin bozulması ve hasar görmesinin ardından ROS üretiminin daha da artmasına neden olabilmektedir (138).

Hücre içi ROS konsantrasyonlarının patolojik düzeylere yükselmesi ve hücreler antioksidanların tükenmesiyle ROS'un antitümöral etkinliği kanserde bir tedavi olarak hedeflenebilmektedir (125). Kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan belirli kemoterapötik ajanların temel prensibi, hücre içi ROS seviyelerini artırarak hücrenin onarılamaz hasarıyla hücre ölümüne yönlendirilmesidir. Öte yandan kanseri hücrelerinde ROS üretiminin inhibisyonu, protümöral etkinin baskılanmasıyla da sonuçlanabilir. ROS düzeylerindeki azalış, tümör hücre sağ kalımının ve proliferasyonunun baskılanmasına,

metabolik adaptasyon kaybına, DNA hasarı seviyelerinde ve genomik kararsızlıkta iyileşmeye yol açabilmektedir (123).

2.4. Ehrlich Solid Tümör Modeli

Ehrlich assit karsinomu, ilk kez tanımlanmasından bu yana, assit tümörü araştırmacılar tarafından sıklıkla kemoterapötik çalışmalar için karşılaştırmalı olarak kullanılmaktadır (5, 10). Proliferatif fazdan plato fazına geçişte, azalmış glutatyon konsantrasyonu ve artan trigliseritler, kolesterol esterleri ve serbest yağ asitleri gibi morfolojik ve metabolik değişiklikler meydana gelir. Bu özellikleri nedeniyle EAC, artan konsantrasyonlarda oksidatif stres ve doku kolesterolü ile karakterizedir (140).

Başlangıçta hiperdiploidi olan EAC, yüksek transplantasyon kabiliyetine, hızlı proliferasyon ve %100 maligniteye sahiptir (140). EAC, asit form ya da solid formda kullanılır. EAC tümör hücre süspansiyonu, intraperitoneal yolla farelere verildiğinde asit formda tümörün oluştuğu gözlenirken s.k. olarak uygulandığında solid formda tümörün oluştuğu gözlenmektedir (10).

Ehrlich assit karsinomuun karakteristik özelliği tümör hücrelerinin periton içi enjeksiyonundan sonra büyük miktarda asitliğin gelişimidir (10). Aşılanan farenin toplam ağırlığı, büyüyen tümör ve asit üretimi ile artar. Ağırlık artışı şu 3 faktörün sonucudur; 1. Çoğunlukla organizmayı kısmen istila eden ve büyüyen assit tümör hücrelerinin ağırlık artışı, 2. Assit sıvı ağırlığı artışı, 3. Konakçının ağırlık artışı. Farenin ağırlığının değişimi belirleyici değildir. Bununla birlikte, assit tümörünün büyümesinin inhibe edildiği hayvanlarda, daha uzun bir hayatta kalma süresi ile hayvan içindeki katı tümörlerin gelişimi gözlemlenebilir (8, 10).

2.5. Western Blot Yöntemi

Analiz edilmek üzere hazırlanan ve çok sayıda protein içeren herhangi bir numuneden istenen tek bir proteini spesifik olarak saptamak amacıyla yaygın olarak kullanılan immünolojik yöntemler arasında yer almaktadır. Western blot yöntemi ile tespit edilmek istenen bir proteinin analiz edilen numune içerisinde bulunup bulunmadığı ve bulunuyorsa yarı kantitatif olarak farklı gruplar arasındaki miktarı hesaplanabilir (141).

Western blotlama (142),

- Proteinlerin jel elektroforezi ile ayrılması,
- Elektroforezde yürütülerek ayrılan proteinlerin membrana aktararak sabitlenmesi (blotlanması)
- Sabitlenmiş bir antijenin (ilgili proteinin) seçici antikor aracılığıyla immün tespiti
- Oluşan antikor- antijen etkileşiminin kemilüminesans, floresans veya kolorimetrik yöntemlerle analiz edilmesini içeren immüno blot tekniğidir.

Western blot, antikor-antijen etkileşiminin spesifikliğıyle ilişkili olarak protein analizinde etkili ve rutin bir metottur. Bir karışımdan özgül proteinlerin moleküler ağırlıklarının kalitatif ya da yarı kantitatif tanımlanması için verimlidir (141).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Tez çalışmasının gerçekleştirildiği laboratuvarda kullanılan cihazlar, malzemeler üretici firmalarıyla birlikte Tablo 2 üzerinde belirtilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihaz ve malzemeler

Cihaz ve Malzemeler	Üretici Firma
-80°C Derin Dondurucu	Thermo Electron Corporation
-20°C Derin Dondurucu	Vestel
Mikropleyt Okuyucu	Molecular Devices VersaMax
Etüv	Heraeus
Çalkalamalı etüv	Shel Lab SI4
Farklı hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf, Brand
Mikrosantrifüj	MicroMax IEC Thermo
pH metre	Hanna- HI 9321
Sonikatör	Sonics Vibra- VCX 500
Vorteks	IKA- Genius 3
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf- 5810R
Elektroforez sistemi	BioRad- 1658001FC
Görüntüleme sistemi	BioRad- ChemiDoc XRS+
Analitik hassas terazi	Mettler Toledo AB204S
Balon joje-Erlen-Beher (Cam malzeme)	IsoLab, SH&GLASS
El homojenizatörü	OMNI- 125
Serum biyokimya tüpü	Vacutainer BD
Otomatik mikrotom	Leica- 2255
Distile su arıtma cihazı	PureLab DV 25
Termocycler	Techne Genius
Buz makinesi	Scotmann

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler, ticari kitler ürün kodları ve temin edildikleri firmalarla birlikte Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde-Ticari Kit- Antikor	Üretici Firma	Ürün Kodu
5-FU	Appchem	A7686
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Carlo Erba	445106
Bornil asetat	Sigma	B55203
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck	822050
Sodyum florür (NaF)	Sigma	S7920
PBS	Sigma	P4417
Glisin	Sigma	G8898
NaCl	Sigma	7647-14-5
EDTA	Merck	108454
Akrilamid/bisakrilamid	BioRad	1610148EDU
Tris-HCl (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck	648317
Triton X100	Sigma	9002-93-1
Tween20	JTBaker	73-74
FBS	Biochrom	S 0115
DMEM besi yeri	Sigma	D6046
p53 antikor	SantaCruz	Sc-126
Bax antikor	Cell Signaling	2772
p21 Waf1/Cip1(12D1) antikor	Cell Signaling	2947
Bcl-2 antikor	Cell Signaling	3498
LC3A/LC3B antikor	SantaCruz	Sc-398822
BECN1/Beclin-1 antikor	SantaCruz	Sc-48341
Nf-kB p65 antikor	SantaCruz	Sc-8008
MMP9 antikor	SantaCruz	Sc-393859
VEGF antikor	SantaCruz	Sc-7269
CAS-3 antikor	SantaCruz	Sc-56053

Tablo 3. (Devam)

Nrf2 antikoru	Abcam	92946
Vinculin antikoru	İnvitrogen	700062
Immun-star Goat anti mouse-HRP	BioRad	170-5047
Immun-star Goat anti rabbit-HRP	BioRad	170-5046
ECL (Enhanced chemiluminescence)	BioRad	170-5061
Total Oksidan Status ölçüm kiti	Rel Assay Diagn.	RL0024
Total Antioksidan Status ölçüm kiti	Rel Assay Diagn.	RL0017
Fare GPx ELISA kit	BT-Lab	E1483Mo
Fare eNOS ELISA kit	BT-Lab	E0387Mo
Fare NOX ELISA kit	BT-Lab	E4090Mo

Tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yürütülen TSA-2021-9409 nolu ve "Bornil Asetatın Ehrlich Solid Tümör Modelinde Tümör Mikroçevresi Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı Temel Araştırma Projesi kapsamında desteklenmiştir. Çalışmanın etik kurul izni 12.03.2020 tarihli, 53488718-243 protokol numaralı karar ile KTÜ Tıp Fakültesi-Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Bkz. Ek 1 Etik Kurul Onay Yazısı).

3.2. Yöntem

3.2.1. Ehrlich Assit Hücrelerinin Çoğaltılması ve Enjeksiyona Hazır Hale Getirilmesi

Hücre kültürü çalışmaları için daha önceden Bezmialem Üniversitesi'nden temin edilen ve sıvı azot tankında saklanan fare kökenli EAC kullanıldı. Hücreler üretici firmanın önerileri doğrultusunda %10 fetal bovin serum (FBS), 0.1 M esansiyel olmayan amino asit çözeltisi, 1 mM sodyum pirüvat, 2 mM L-glutamin ve %1 gentamisin çözeltileri ile zenginleştirilmiş RPMI-1640 besiyeri ile 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatör ortamında kültüre edildi. Flasklardaki besiyeri iki günde bir yenilenerek, hücre yoğunluğu %70 düzeylerine ulaştığında hücreler pipetajla steril kapaklı 15 mL'lik tüplere aktarıldı. Flask yüzeyinde kalan hücreler için pasajlama işlemi tripsin-EDTA yardımıyla gerçekleştirildi. Santrifüjlenen tüplerin süpernatant kısımları dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücre pelletleri 2 kere steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı.

Pasajlanan hücrelerden bir kısmı stok Balb/c farelerde assit tümör oluşumu için ayrılırken bir kısmı da dondurularak stok halde kaldırıldı. Stok hazırlama prosedüründe her pasajdan 1×10^6 hücre kriyoviallere aktarıldı ve üzerine %7,5 oranında (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilerek -20°C 'de 2 saat, -80°C 'de 24 saat bekletildikten sonra sıvı azot buharında saklandı (144).

3.2.2. Solid Tümör Modeli Oluşturma

Literatürde farelerde Ehrlich Solid Tümör modelinin 2 aşamada gerçekleştirildiği görülmektedir (145).

I. Adım: Yukarıda anlatılan prosedüre göre hücre kültüründe çoğaltılan EAC 0.5 ml de 2.5×10^6 hücre olacak şekilde 6 adet stok fareye (Resim 1) i.p. olarak uygulandı. İki günde bir hayvanların kilo değişimleri kaydedilerek abdominal muayeneleri yapıldı. Abdominal muayenede peritonda biriken assit tümör hücrelerinin oluşturduğu abdominal gerginlik kontrol edildi.



Resim 1. EAC i.p. uygulanan Balb/c stok fareler

II. Adım: İnokülasyondan sonra 7. günde hayvanların peritonunda biriken assit tümör hücreleri 15 mL’lik tüplere toplandı ve 3 kez PBS ile yıkandı. Santrifüjlenen tüplerin süpernatant kısımları dikkatlice uzaklaştırıldı, PBS ile sulandırılan hücre pelletleri (Resim 2) ise 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre olacak şekilde sağ uyluktan s.k. enjeksiyon yoluyla deney gruplarına verildi.



Resim 2. Stok farelerden toplanan EAC hücre pelletleri

İnokülasyon aşamasının 2 adımda gerçekleştirilmesinin temel sebebi; EAC hücrelerinin agresifliğini arttırarak hayvanların kanser olma olasılığını arttırmaktır. Deney süresince iki günde bir tüm grupların ağırlık değişimleri ve EAC enjekte edilen hayvanların tümör boyutları kaliper ile ölçülerek kaydedildi. Hayvanların tümör boyutlarındaki değişimler 10. günden itibaren 21. gün sonuna kadar aşağıdaki formülle hesaplandı (146).

$$V(\text{cm}^3) = a^2 \times (b/2) \quad (\text{Eşitlik 1})$$

a: Tümör eni (cm)

b: Tümör uzunluğu (cm)

3.2.3. DeneySEL GrUplArın OlUşturulması ve Uygulama Prosedürü

Çalışmada 6-8 haftalık, 20-25 g ağırlığında BALB/c ırkđ dişi fare kullanıldı. Dişi farelere aynı laboratuvarda 12 saat karanlık-12 saat aydınlık ortam sağlandı. 1’den 140’a kadar numaralandırılmış fareler kura ile randomize edilerek 16 gruba ayrıldı. Deney çalışması için 6 hayvan stok olmak üzere toplam 146 adet dişi fare kullanıldı. Deney gruplarını oluşturan fareler her grupta 10 hayvan olacak formda 16 gruba ayrıldı (Tablo 4).

Ticari olarak temin edilen BA ve 5-FU, DMSO ile çözülererek farelere uygulandı. BA ve 5-FU dozları ile çözücülerini literatürdeki *in vivo* çalışmalar doğrultusunda belirlenmiştir (111, 112). Aynı zamanda BA ilk kez uygulanacak olan s.k. enjeksiyon tipinde uygun konsantrasyonların belirlenebilmesi ve deneySEL tümör modelinin başarıyla uygulanabilmesi amacıyla KTÜ Hayvan Deneyleri Cerrahi Araştırma merkezinde ön çalışma gerçekteştirilmiş, tez çalışması kapsamında uygun dozlar ve minimum hayvan sayısı belirlenmiştir. Öte yandan gruplardaki hayvan sayıları daha önce bu alanda gerçekteştirilmiş olan yöntemSEL çalışmalarda kullanılan hayvan sayısı, hayvanlarda kanser modeli oluşturulamaması, kronik enfeksiyonun yaratabileceği olumsuzluklar ve proje ekibimiz tarafından yapılan ön deneme sonuçları göz önüne alınarak 10 olarak belirlenmiştir (10, 147).

Tablo 4. Deney grupları

Deney ve Kontrol Grupları		Hayvan Sayısı
Grup-0	Stok Fare	6
Grup-1	Sham Kontrol (21 gün s.k. serum fizyolojik enjeksiyonu)	5
Grup-2	Sham Kontrol (21 gün i.p. serum fizyolojik enjeksiyonu)	5
Grup-3	EAC Kontrol (EAC solid tümör + 21 gün s.k. serum fizyolojik enjeksiyonu)	5
Grup-4	EAC Kontrol (EAC solid tümör + 21 gün i.p. serum fizyolojik enjeksiyonu)	5
Grup-5	EAC + 5-FU 50 mg/kg s.k. (EAC solid tümör + 1.günden 21. güne kadar gün aşırı 10 doz 5-FU 50mg/kg s.k. enjeksiyonu)	10
Grup-6	EAC + 5 FU 50 mg/kg i.p. (EAC solid tümör + 1.günden 21. güne kadar gün aşırı 10 doz 5-FU 50mg/kg i.p. enjeksiyonu)	10

Tablo 4. (Devam)

Grup-7	EAC + 5-FU 50 mg/kg s.k. (EAC solid tümör + 11. günden 21. güne kadar gün aşırı 5 doz 5-FU 50mg/kg s.k. enjeksiyonu)	10
Grup-8	EAC + 5 FU 50 mg/kg i.p. (EAC solid tümör + 11. günden 21. güne kadar gün aşırı 5 doz 5-FU 50mg/kg i.p. enjeksiyonu)	10
Grup-9	EAC + Bornil asetat 100 mg/kg s.k. (EAC solid tümör + 1.günden 21. güne kadar gün aşırı 10 doz 100mg/kg s.k. BA enjeksiyonu)	10
Grup-10	EAC + Bornil asetat 100 mg/kg i.p. (EAC solid tümör + 1.günden 21. güne kadar gün aşırı 10 doz 100mg/kg i.p. BA enjeksiyonu)	10
Grup-11	EAC + Bornil asetat 100 mg/kg s.k. (EAC solid tümör + 11. günden 21. güne kadar gün aşırı 5 doz 100mg/kg BA s.k. enjeksiyonu)	10
Grup-12	EAC + Bornil asetat 100 mg/kg i.p. (EAC solid tümör + 11. günden 21. güne kadar gün aşırı 5 doz 100mg/kg BA i.p. enjeksiyonu)	10
Grup-13	EAC + Bornil asetat 50 mg/kg s.k. (EAC solid tümör + 1.günden 21. güne kadar gün aşırı 10 doz 50mg/kg s.k. BA enjeksiyonu)	10
Grup-14	EAC + Bornil asetat 50 mg/kg i.p. ((EAC solid tümör + 1.günden 21. güne kadar gün aşırı 10 doz 50mg/kg i.p. BA enjeksiyonu)	10
Grup-15	EAC + Bornil asetat 50 mg/kg s.k. (EAC solid tümör + 11. günden 21. güne kadar gün aşırı 5 doz 50mg/kg BA s.k. enjeksiyonu)	10
Grup-16	EAC + Bornil asetat 50 mg/kg i.p. (EAC solid tümör + 11. günden 21. güne kadar gün aşırı 5 doz 50mg/kg BA i.p. enjeksiyonu)	10
Kullanılan Toplam Fare Sayısı		146

Grup-1 Kontrol (s.k. serum fizyolojik enjeksiyonu): Farelere 21 gün boyunca iki günde bir s.k. yolla 0.2 mL serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup-2 Kontrol (i.p. serum fizyolojik enjeksiyonu): Farelere 21 gün boyunca iki günde bir i.p. yolla 0.2 mL serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup-3 EAC (s.k. serum fizyolojik enjeksiyonu): Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 24 saat sonra farelere 21 gün boyunca iki günde bir s.k. yolla 0.2 mL serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup-4 EAC (i.p. serum fizyolojik enjeksiyonu): Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 24 saat sonra farelere 21 gün boyunca iki günde bir i.p. yolla 0.2 mL serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup-5 EAC+5-FU 50 mg/kg s.k. 21 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 24 saat sonra farelere 0.2 mL hacimde 50 mg/kg konsantrasyonda 5-FU s.k. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından 5-FU iki günde bir s.k. olarak, toplamda 10 doz olacak şekilde 21 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-6 EAC+5-FU 50 mg/kg i.p. 21 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 24 saat sonra farelere 0.2 mL hacimde 50 mg/kg konsantrasyonda 5-FU i.p. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından 5-FU iki günde bir i.p. olarak, toplamda 10 doz olacak şekilde 21 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-7 EAC+5-FU 50 mg/kg s.k. 10 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 10 gün sonra farelere 0.2 mL hacimde 50 mg/kg konsantrasyonda 5-FU sağ uyluktan s.k. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından 5-FU iki günde bir s.k. olarak, toplamda 5 doz olacak şekilde 11 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup- 8 EAC+5-FU 50 mg/kg i.p. 10 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 10 gün sonra farelere 0.2 mL hacimde 50 mg/kg konsantrasyonda 5-FU i.p. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından 5-FU iki günde bir i.p. olarak, toplamda 5 doz olacak şekilde 11 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-9 EAC+Bornil asetat 100 mg/kg s.k. 21 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 24 saat sonra farelere 0.2 mL hacimde 100 mg/kg konsantrasyonda bornil asetat sağ uyluktan s.k. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından bornil asetat iki günde bir sağ uyluktan s.k. olarak, toplamda 10 doz olacak şekilde 21 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-10 EAC+Bornil asetat 100 mg/kg i.p. 21 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 24 saat sonra farelere 0.2 mL hacimde 100 mg/kg konsantrasyonda bornil asetat i.p. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından bornil asetat iki günde bir i.p. olarak, toplamda 10 doz olacak şekilde 21 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-11 EAC+Bornil asetat 100 mg/kg s.k. 10 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 10 gün sonra farelere 0.2 mL hacimde 100 mg/kg konsantrasyonda bornil asetat sağ uyluktan s.k. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından bornil asetat iki günde bir s.k. olarak, toplamda 5 doz olacak şekilde 11 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-12 EAC+Bornil asetat 100 mg/kg i.p. 10 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 10 gün sonra farelere 0.2 mL hacimde 100 mg/kg konsantrasyonda bornil asetat i.p. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından bornil asetat iki günde bir i.p. olarak, toplamda 5 doz olacak şekilde 11 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-13 EAC+Bornil asetat 50 mg/kg s.k. 21 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 24 saat sonra farelere 0.2 mL hacimde 50 mg/kg konsantrasyonda bornil asetat sağ uyluktan s.k. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından bornil asetat iki günde bir sağ uyluktan s.k. olarak, toplamda 10 doz olacak şekilde 21 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-14 EAC+Bornil asetat 50 mg/kg i.p. 21 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 24 saat sonra farelere 0.2 mL hacimde 50 mg/kg konsantrasyonda bornil asetat i.p. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından bornil asetat iki günde bir i.p. olarak, toplamda 10 doz olacak şekilde 21 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-15 EAC+Bornil asetat 50 mg/kg s.k. 10 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. enjekte edildi. İnokülasyondan 10 gün sonra farelere 0.2 mL hacimde 50 mg/kg konsantrasyonda bornil asetat sağ uyluktan s.k. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından bornil asetat iki günde bir s.k. olarak, toplamda 5 doz olacak şekilde 11 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

Grup-16 EAC+Bornil asetat 50 mg/kg i.p. 10 Gün: Farelere sağ uyluktan 0.5 mL de 2.5×10^6 hücre s.k. olarak enjekte edildi. İnokülasyondan 10 gün sonra farelere 0.2 mL hacimde 50 mg/kg konsantrasyonda bornil asetat i.p. olarak uygulandı. Bu enjeksiyonun ardından bornil asetat iki günde bir i.p. olarak, toplamda 5 doz olacak şekilde 11 gün boyunca uygulanmaya devam etti.

5-FU (50 mg/kg) ve BA'nın (50 mg/kg ve 100 mg/kg) doz hesaplamaları aşağıdaki formüle göre gerçekleştirildi.

$$\text{Enjeksiyon Volümü (mL)} : \frac{\text{Hayv. Ağırlık (kg)} \times \text{İlaç Doz (mg/kg)}}{\text{Konsantrasyon (mg/mL)}} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

1. ve 2. negatif kontrol gruplarında sağlam hayvanlarda i.p. ve s.k. enjeksiyon uygulamalarına bağlı olarak oluşabilecek stresin biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. ve 4. pozitif kontrol gruplarında sadece EAC solid tümör oluşturulmuş hayvanlarda bornil asetat ve 5-FU enjeksiyonlarından bağımsız olarak i.p. ve s.k. serum fizyolojik enjeksiyon uygulamaları kapsamında oluşabilecek muhtemel stresin biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

5. ve 6. gruplar arasında 5-FU'nun 50 mg/kg'lık dozunun farklı uygulanma yollarına göre tümör inokülasyonu ile eş zamanlı olarak erken evredeki etkilerinin belirlenmesi ve farklı konsantrasyonlardaki BA'nın muhtemel tedavi edebilirliğiyle karşılaştırılması amaçlandı. Tez çalışması kapsamında kemoterapötik etkisi bilinen 5-FU, pozitif kontrol olarak kullanıldı.

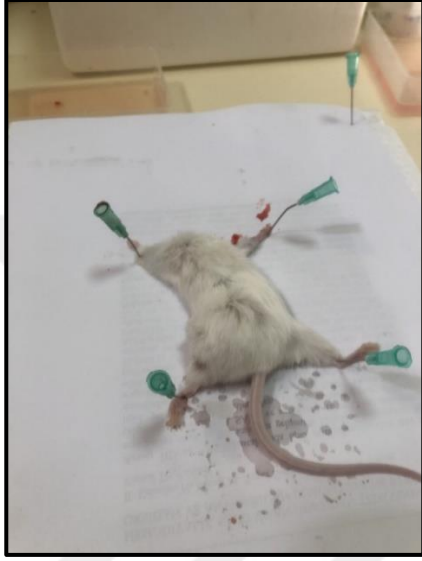
7. ve 8. gruplar arasında 5-FU'nun 50 mg/kg'lık dozunun farklı uygulanma yollarına göre tümör inokülasyonundan 10 gün sonraki, 11.gün itibariyle uygulanan 5 dozun (geç evrede) etkilerinin belirlenmesi ve farklı konsantrasyonlardaki BA'nın muhtemel tedavi edebilirliğiyle karşılaştırılması amaçlandı.

9.10. ve 13.14. gruplar arasında bornil asetatın farklı konsantrasyonlarının ve farklı uygulanma yollarının tümör inokülasyonu ile eş zamanlı olarak erken evredeki etkilerinin belirlenmesi ve bir kemoterapötik olan, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU ile karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

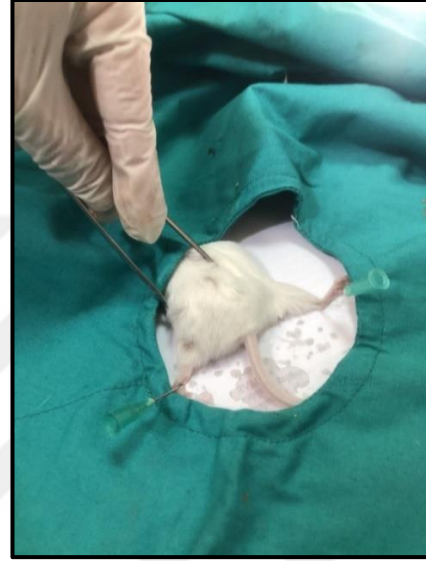
11.12. ve 15.16 gruplar arasında bornil asetatın farklı konsantrasyonlarının ve farklı uygulama yollarının tümör inokülasyonundan 10 gün sonraki (geç evrede) etkilerinin belirlenmesi ve bir kemoterapötik olan, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU ile karşılaştırılması amaçlandı.

Gruplarda 21 gün süreyle yukarıda anlatılan işlemler uygulandıktan sonra 22.günde (21. gün son ilaç uygulamasının ardından) dekapite edilen (Resim 3) hayvanların kan ile tümör doku örnekleri (Resim 4, Resim 5) toplandı. Çıkarılan tümör dokularının ağırlık (Resim 6) ve boyutları (Resim 7) ölçülerek kayıt altına alındı. Serum biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri pıhtılaşmalarını takiben 1000xg'de santrifüj edildi. Elde edilen serum

örnekleri mikrosantrifüj tüplerine alınarak aynı gün rutin biyokimya analizleri için +4 °C’de bekletildi. Aynı bölgeden alınan doku örneklerinin bir kısmı mikro hacimli kapaklı tüplere aktararak ilgili biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80 °C’de saklandı. Kalan kısmı ise histopatolojik incelemeler için %10’luk formaldehit içerisinde alınarak incelemeyi yapacak araştırmacıya teslim edildi.



Resim 3. Dekapite edilen EAC Balb/c



Resim 4. EAC solid tümör-1



Resim 5. EAC solid tümör-2



Resim 6. EAC solid tümör ağırlık ölçümü



Resim 7. EAC solid tümör boy/en ölçümü

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. Serum Rutin Biyokimya Parametrelerinin Ölçülmesi

Deney gruplarından alınan serum numunelerinde BA'nın ve karşılaştırmalı olarak 5-FU'nun karaciğer ve böbrek dokularındaki muhtemel toksisitesine karşı aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve kan üre azotu (BUN) ölçümleri KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nda halihazırda kullanılmakta olan Beckman Coulter Analyzer AU 5800 (Kaliforniya, ABD) otoanalizörü aracılığıyla belirlendi. AST, ALT ve BUN parametreleri U/L birimiyle verildi.

3.3.2. Doku Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi

Lipid oksidasyonu son ürünlerinin miktarının belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir oksidatif stres belirtecidir. Bu son ürünlerden MDA en çok tercih edilen biyobelirteçlerden bir tanesidir. MDA'nın TBA ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe tonundaki rengin şiddeti oksidatif stres derecesi ile doğru orantılıdır. Doku MDA analizi Mihara ve Uchiyama tarafından ortaya konan yönteme göre gerçekleştirildi (148). Bu metodun esası, MDA'nın asidik ortamda TBA ile oluşturduğu kompleksin renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanmakta ve absorbansın büyüklüğü lipid peroksidasyonu ile orantılı olmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler;

1. **Homojenizasyon Tamponu (0.05 Triton X-100 ihtiva eden %1.15'lik KCl çözeltisi):**
Hassas terazide tartılan 5.75 g KCl üzerine 0.25 mL Triton X-100 ilave edilerek son hacmi saf su ile 500 mL'e tamamlandı.
2. **%1'lik H₃PO₄ çözeltisi:** 1 L'lik balon jojeye eklenen bir mikar saf su üzerine 11.77 mL %85'lik H₃PO₄ eklendi. Çözelti hacmi saf su ile 1L'ye tamamlandı.
3. **%0.67 lik TBA çözeltisi:** 1.34 g olarak tartılan TBA üzerine 100 mL saf su ilave ederek magnetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözüldü. Soğumaya alınan TBA çözeltisi üzerine 100 mL asetik asit eklenerek karıştırılır.
4. **Standart Çözelti:** Standart olarak 1,1,3,3-tetrametoksipropan kullanıldı. 10 µmol/mL'lik tetrametoksipropan ana çözeltisi hazırlamak amacıyla 82.5 µL 1,1,3,3-tetrametoksipropan, 0.01 M 50 mL HCl solüsyonuna ilave edilerek 50°C'de 60 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Hazırlanmış olan ana stoktan sırasıyla 200, 100, 50, 25, 12.5 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Doku homojenatlarının hazırlanması,

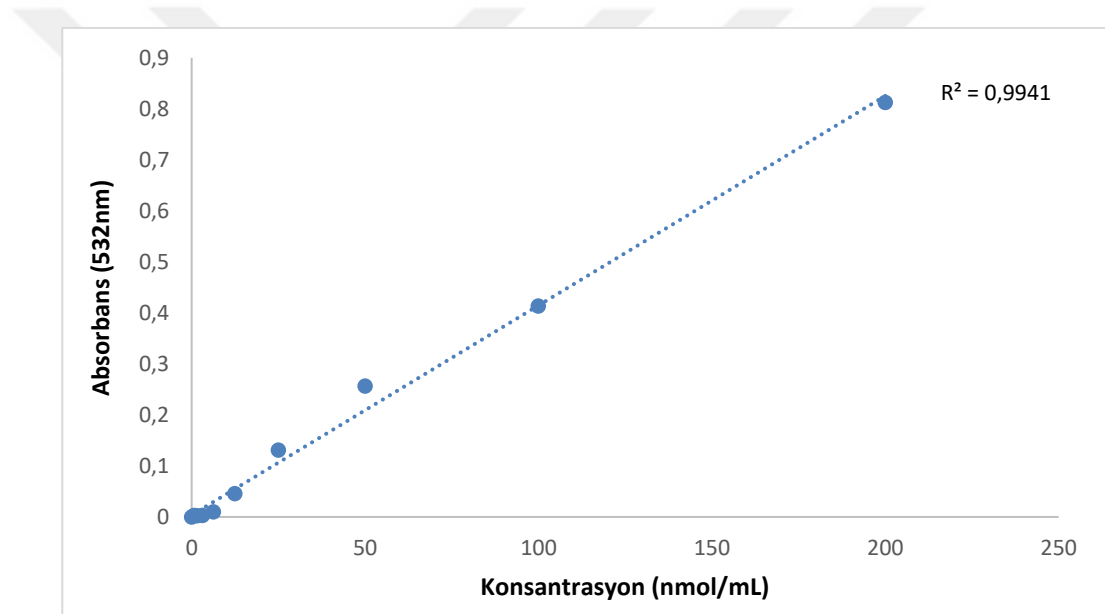
- Tümör doku numunelerinden yaklaşık 50 mg tartılarak 2 mL'lik homojenizasyon tamponu içerisine alındı.
- Tampon içerisinde yer alan tümör doku numunesi 45 s süreyle buz üzerinde 5000 rpm'de homojenizatör yardımıyla homojenize edildi.
- Homojenizasyon işleminin ardından homojenize tüpler 1000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı doku MDA tayini için ayrıldı.

Tablo 5. MDA uygulama prosedürü

Reaktif	Hacim (µL)
Standart/ Numune/ Kör	500
%0.67'lik TBA Çözeltisi	1000
%0.1'lik H ₃ PO ₄ çözeltisi	3000

Tablo 5’de belirtilen hacimlerde sırasıyla cam tüplere eklenen reaktifler vorteksenerek metal raklara yerleştirildi ve önceden 100°C’ye ayarlanmış inkübatörde 45 dakika süreliğine inkübasyona bırakıldı. Sürenin tamamlanmasıyla soğumaya bırakılan cam deney tüpleri 1000xg’de 15 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen süpernatantlardan 250 µL hacimde alınarak mikropleyte yüklendi. 532 nm dalga boyuna ayarlanan spektrofotometride mikropleyt absorbans okuması gerçekleştirildi. Standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı Şekil 6’da verilen grafiğe aktararak standart doku MDA seviyeleri nmol/mL cinsinden hesaplandı. Bu grafikten yola çıkılarak doku MDA düzeyleri, nmol MDA/mg protein birimiyle verildi.



Şekil 6. Tümör doku MDA düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

3.3.3. Tümör Doku Örneklerinde Toplam Oksidan ve Antioksidan Durum Analizi

Toplam oksidan durum bir litre vücut sıvısındaki oksidan karakterdeki moleküllerin mikromolar hidrojen peroksite eşdeğer ifadesidir. Toplam antioksidan durum ise bir litre vücut sıvısındaki antioksidan karakterdeki moleküllerin milimolar troloksa (E vitaminin suda çözünür analogu) eşdeğer ifadesidir. Günümüzde her iki parametre de ticari kitlerle ölçülebilmekte ve çalışılan biyolojik sıvıdaki toplam oksidan ve antioksidan durum hakkında fikir sağlamaktadır (125).

3.3.3.1. Tümör Doku Numunelerinde Toplam Oksidan Seviyelerinin Analizi

Tez çalışması kapsamında elde edilen tümör doku örneklerinde TOS ölçümü ticari kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, REF RL0024) kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ölçüldü (149). Tablo 6’da yer alan prosedüre göre ölçümü gerçekleştirilen TOS seviyeleri μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L birimiyle verildi.

Tablo 6. TOS uygulama prosedürü

Reaktif	Standart (μL)	Numune (μL)
TOS Standart	15	-
Numune	-	15
Reaktif- 1	100	100
Mikropleyte yukarıda belirtilen hacimlerde ilave edilen numune/standart/reaktifler 30 saniye oda sıcaklığında beklemeye alındı. Ardından 530 nm dalga boyuna ayarlı ELISA okuyucuda ilk okumaları (A1) gerçekleştirildi.		
Reaktif- 2	5	5
Reaktif- 2 ilavesinin ardından oda sıcaklığında 10 dakika beklemeye alınan pleyt içindeki örneklerin 530 nm dalga boyuna ayarlı ELISA okuyucuda ikinci okumaları (A2) yapıldı. Reaktif 1: 25mM pH:1.75 H_2SO_4 Reaktif 2: 25 mM pH: 1.75 H_2SO_4 , 5 mM Fe^{2+} iyonu, 10 mM O-dianizidin		

Tümör doku numunelerinin TOS analiz sonuçları için yukarıdaki prosedüre göre ölçülen A1 ve A2 absorbans değerleri kullanıldı ($\Delta A = A2 - A1$).

TOS: $(\Delta A_{\text{Numune}} / \Delta A_{\text{Standart}}) \times \text{Standart konsantrasyonu}$ (Eşitlik 3)

Verilen formüle göre hesaplanan TOS seviyeleri μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L birimiyle ifade edildi.

3.3.3.2. Tümör Doku Numunelerinde Toplam Antioksidan Seviyelerinin Analizi

Tümör doku örneklerinde TAS ölçümü ticari kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, REF RL0017) kullanılarak belirlendi. Tablo 7’de yer alan prosedüre göre ölçümü gerçekleştirilen TAS seviyeleri milimol troloks eşdeğeri/L birimine göre ifade edildi.

Tablo 7. TAS uygulama prosedürü

Reaktif	Standart (µL)	Numune (µL)	H ₂ O (µL)
Deiyonize Su	--	--	6
TOS Standart	6	--	--
Numune	--	6	--
Reaktif- 1	100	100	100
Mikropleyete yukarıda belirtilen hacimlerde ilave edilen H ₂ O/numune/standart/reaktifler 30 saniye oda sıcaklığında beklemeye alındı. Ardından 660 nm dalga boyuna ayarlı ELISA okuyucuda ilk okumaları (A ₁) gerçekleştirildi.			
Reaktif- 2	5	5	
Reaktif- 2 ilavesinin ardından oda sıcaklığında 10 dakika beklemeye alınan pleyt içindeki örneklerin 660 nm dalga boyuna ayarlı ELISA okuyucuda ikinci okumaları (A ₂) yapıldı.			
Reaktif- 1: 0.4 mol/L pH: 5.8 Asetat Tamponu			
Reaktif- 2: 0.4 mol/L pH: 3.6 Asetat Tamponu, 30 mmol/L ABTS			

Tümör doku numunelerinin TAS analiz sonuçları için yukarıdaki prosedüre göre ölçülen A₁ ve A₂ absorbans değerleri kullanıldı ($\Delta A = A_2 - A_1$).

$$TAS = [(\Delta A_{H_2O}) - (\Delta A_{Numune})] / [(\Delta A_{H_2O}) - (\Delta A_{Standart})] \times \text{Standart konsantrasyon} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Verilen formüle hesaplanan TAS seviyeleri milimol troloks eşdeğeri/L birimine göre ifade edildi.

3.3.4. Tümör Doku Numunelerinde OSI Analizi

Yukarıda belirtilen şekilde elde edilen TOS ve TAS değerleri kullanılarak OSI aşağıdaki formüle göre hesaplandı (132);

$$\text{OSI} = \text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / (\text{TAS } (\mu\text{mol troloks eşdeğeri/L}) \times 100 \text{ (Eşitlik 5)}$$

3.3.5. Tümör Doku Numunelerinde GPx, eNOS, NOX-1 Seviyelerinin Ölçülmesi

Glutasyon peroksidaz, eNOS, NOX-1 düzeylerinin doku örneklerinde tayin edilebilmesi amacıyla Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi uygulandı.

3.3.5.1. ELISA Yönteminin Uygulanması

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay yönteminin aşamalarını, doku örneklerinin homojenizasyonu, doku örneklerinin protein tayini işlemini kapsayan hazırlık evresi ve analiz evresi olarak iki bölümde inceleyebiliriz.

Ön Hazırlık Evresi

Doku Örneklerinin Homojenizasyonu

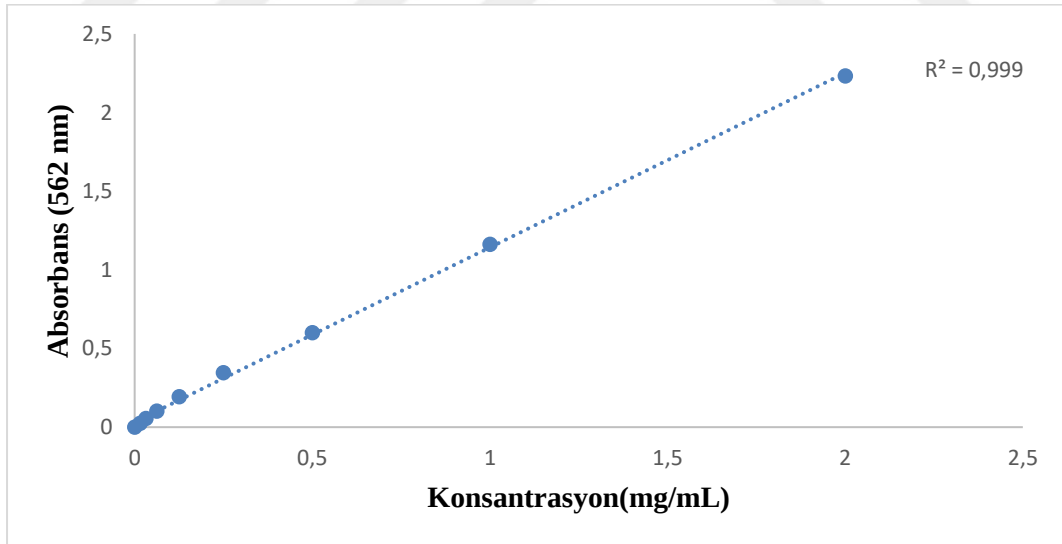
Her biri yaklaşık 10 mg olarak tartılan tümör doku numuneleri pH: 7.4 olan 2 mL'lik PBS içeren ayrı cam tüplerde homojenizatör (IKA Ultra-Turrax T-25, Staufen im Breisgau, Almanya) aracılığıyla buz üzerinde 45 saniye homojenize edildi. Daha sonra homojenize edilen örnekler 1800xg'de 15 dakika santrifüj edilerek, üstte kalan süpernatantlar temiz cam tüplere ayrıldı.

Doku Örneklerinde Protein Tayin Analizi

Tümör doku örneklerinde protein miktar analizinin tespiti amacıyla ticari kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat No: 23227, Rockford, IL, ABD) kullanıldı. Kitin analiz prensibi, alkali ortamda mevcut proteinler tarafından Cu^{+2} 'nin Cu^{+} 'a indirgenmesi temeline dayanmaktadır. Oluşan bakır katyonunun (Cu^{+}) bicinchoninic asit (BCA) ile reaksiyona girmesiyle kolorimetrik tayin gerçekleştirilir. Gerçekleştirilen deneysel araştırmada standart olarak 2 mg/mL konsantrasyonda albümin kullanıldı. Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı Şekil 7'de verilen grafiğe geçirilerek protein standart eğrisi çizildi. Bu grafikten yararlanılarak tümör doku başına protein miktarı mg/mL olarak verildi (150).

Kit protokolüne göre,

1. Çalışma Reaktifi Hazırlanması: Her bir örnek üzerine 200 µL çalışma reaktifi ilave edilecek formda, 50x BCA Reaktif A'dan ve 1x BCA Reaktif B'den (50:1; A: B) bir falkon içerisine alınarak karıştırılmasıyla çalışma reaktifi hazırlandı. (x: kullanılan numune sayısına göre belirlendi)
2. Kit içerisinde hazır olarak yer alan BSA standart solüsyon çözeltisinden 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Homojenizasyon tamponu olan PBS kör olarak kullanıldı.
3. Mikropleyt kuyucuklarına numune ve farklı konsantrasyonlardaki standartlardan 25 µL, çalışma reaktifinden ise 200 µL eklenerek 37°C'ye ayarlı ShelLab çalkalamalı inkübatörde 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı.
4. Inkübasyon süresinin dolmasının ardından numune/ standart yüklü mikropleyt 562 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometride (VersaMax Mikroplate Okuyucu) ölçüme alındı.
5. Farklı konsantrasyonlardaki standartların absorbanlarına karşı oluşturulan standart grafiğine göre tümör numunelerinin protein konsantrasyonları mg/mL olarak hesaplandı.



Şekil 7. Tümör doku protein düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

Analiz Evresi

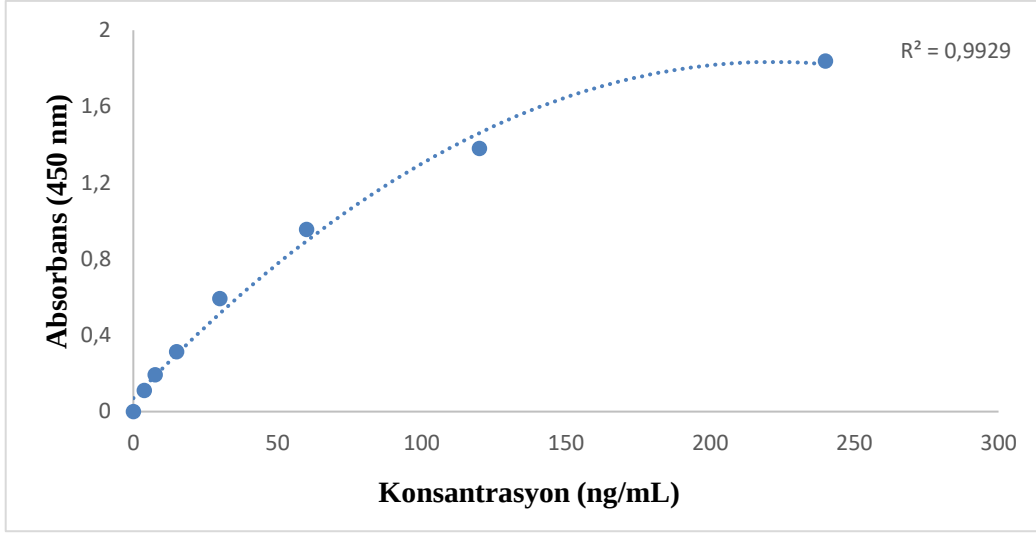
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay analizine başlamadan evvel kit içeriğini oluşturan reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Homojenize edilen ve protein konsantrasyonları

belirlenen tümör doku numuneleri üretici markanın belirttiği prosedüre göre analiz işlemine alındı.

1. Kit içerisinde hazır halde bulunan standart solüsyonundan dilüe edilerek hazırlanan, farklı konsantrasyonlardaki standartlardan 50 µL alınarak kit mikropleytine yüklenir.
2. Kit mikropleyti üzerinde boşta kalan kuyucuklara 40 µL numune yüklenir.
3. Numune kuyucuklarına 10 µL biotin işaretli antikor ilave edildi.
4. Numune ve standart kuyucuklarına 50 µL HRP-Streptavidin konjugat eklenerek üzeri kaplandı. 37°C'ye ayarlı çalkalamalı etüvde 1 saat inkübasyona alındı.
5. İnkübasyonun ardından kaplama üzerinden kaldırılan mikropleyt 5 kez yıkandı.
6. Yıkama işleminin tamamlanmasının ardından mikropleyt, kağıt havlu yardımıyla iyice kurulandı.
7. Mikropleytin her bir kuyucuğuna 50 µL substrat solüsyonu A ve ardından substrat solüsyonu B ilave edilerek yeniden kaplandı. Mikropleyt karanlık ortamda 37°C'de 10 dakika süreyle beklemeye alındı.
8. İnkübasyonun tamamlanmasıyla her bir kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu ilave edildi. (Burada mevcut sarı rengin maviye dönüşümü gözlemlendi)
9. Durdurma solüsyonun ilavesini takiben 10 dakika içerisinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropleyt okuyucu aracılığıyla her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) tespit edildi.
10. Farklı standart konsantrasyonlarının 450 nm'deki absorbanlarına karşı çizilen eğri yardımıyla deney numunelerine ait konsantrasyon değerleri ayrı ayrı hesaplandı.

Doku GPx Seviyelerinin Belirlenmesi

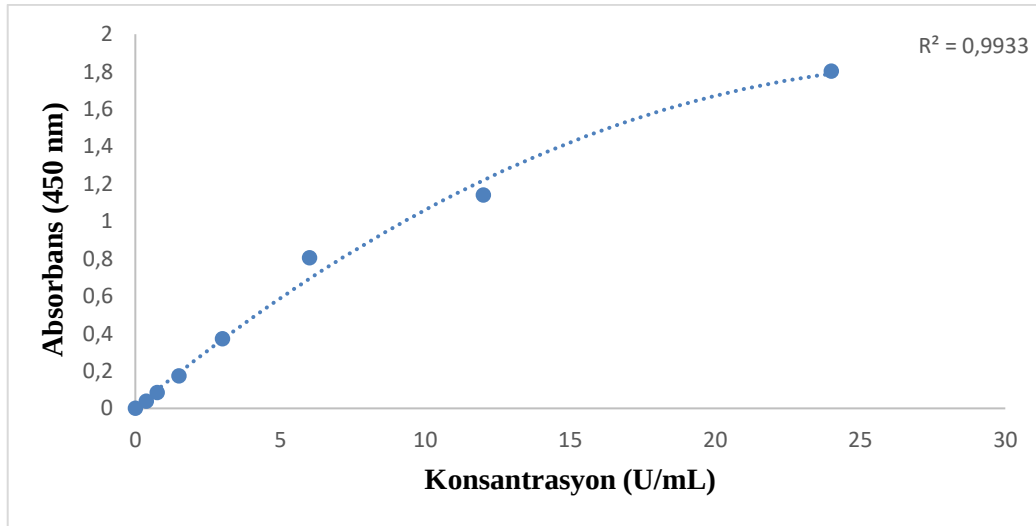
Tümör doku örneklerde GPx seviyeleri, üretici firmanın önerilerine göre ticari ELISA kit (Bioassay Technology Laboratory (BT Lab), Cat No: E1483Mo, Zhejiang, Çin) kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Şekil 8'de verilen grafiğe göre ng/mg protein birimiyle verildi.



Şekil 8. Tümör doku GPx seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

Doku eNOS Seviyelerinin Belirlenmesi

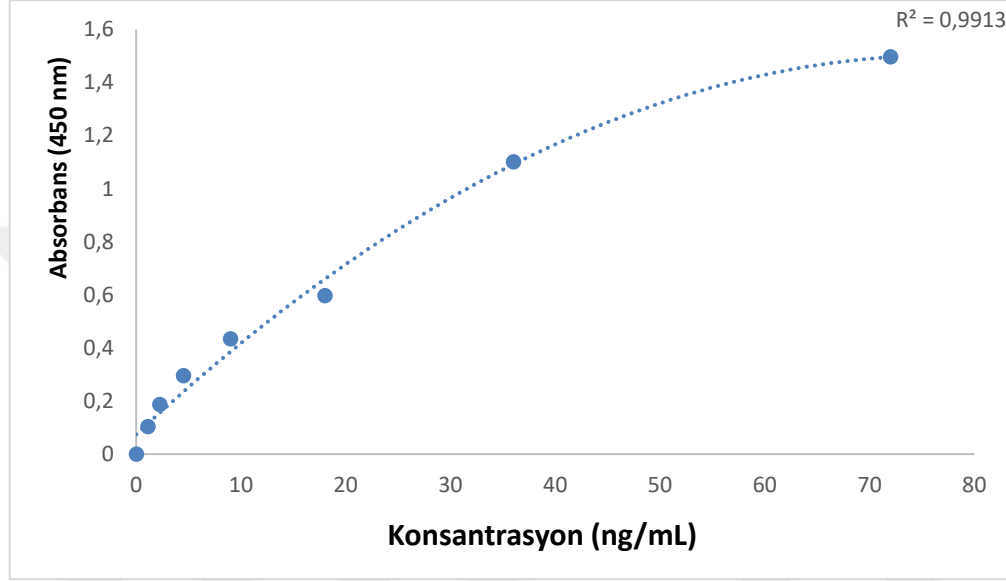
Tümör doku numunelerinde eNOS seviyeleri, ticari bir ELISA kit (Bioassay Technology Laboratory (BT Lab), Cat No: E0387Mo, Zhejiang, Çin) kullanılarak üretici markanın tavsiyeleri doğrultusunda analiz edildi. Elde edilen veriler Şekil 9’da verilen eğriye göre hesaplanarak U/mg protein birimiyle ifade edildi.



Şekil 9. Tümör doku eNOS ölçümünde kullanılan standart grafiği

Doku NOX-1 Seviyelerinin Belirlenmesi

Tümör doku örneklerinde NOX-1 seviyeleri, ticari bir ELISA kit (Bioassay Technology Laboratory (BT Lab), Cat No: E4090Mo, Zhejiang, Çin) üretici markanın tavsiyeleri doğrultusunda ölçüldü. Elde edilen veriler Şekil 10'da yer alan konsantrasyon-absorbans grafiğine göre hesaplanarak ng/mg protein birimiyle verildi.



Şekil 10. Doku NOX-1 ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.4. Tümör Doku Örneklerinde Western Blot Analizi

Herhangi bir örnekten elde edilen ve çok sayıda protein içeren bir karışımın içinde istenen tek bir proteini özgün şekilde saptamak için yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Bahsi geçen teknikle aranan bir proteinin örnekte bulunup bulunmadığı ve şayet bulunuyorsa göreceli olarak (yarı kantitatif) farklı gruplar arasındaki konsantrasyonu hesaplanabilir (141).

3.4.1. Western Blot Çözeltilerinin Hazırlanması

Liziz Tamponu: Doku homojenat hazırlamada kullanılan liziz tamponu Tablo 8 de verilmiştir.

Tablo 8. Doku homojenat hazırlama prosedürü

Liziz Tamponu	
Reaktif	Proteaz İnhibitör Kokteyl
50 mM Tris-HCl pH 7.4	1 mM EDTA,
150 mM NaCl	1x mM NaPPi
%0.5 Triton X-100,	1x PI
dH₂O	1x NaVan
	1x NaF,
	1x PMSF

Reaktiflerden oluşan stok solüsyon içerisine proteaz inhibitör kokteyli taze olarak ilave edilir.

200 mM Sodyum orthovanadat (NaVan- 100x) Tamponu: Hassas terazide 3.68 g olarak tartılan Na_3VO_4 ısıtılan magnetik karıştırıcı üzerinde bir miktar deiyonize suyla çözüldü. Sarı renkli olan çözelti renksizleşinceye kadar kaynatıldı. Oda sıcaklığına soğutulan solüsyonun pH: 10 olarak ayarlandı ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

1M Sodyum florür (NaF- 50X) Tamponu: Terazide 4.2 g olarak tartılan NaF bir miktar çift distile suda çözünerek son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

100 mM Sodyum pirofosfat (NaPPi- 20X) Tamponu: Hassas terazide 4.44 g NaPPi tartılarak magnetik karıştırıcı üzerinde bir miktar dH_2O içinde çözüldü ve son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

100 mM Fenilmetansülfonil fluorür (PMSF- 100X) proteaz inhibitör Tampon: Terazide 0.174 g PMSF tartılarak bir miktar saf etanol içerisinde çözülerek son hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

%10'luk Sodyum dodesil sulfat (SDS) çözeltisi: Hassas terazide 10 g olarak tartılan SDS, 100 mL deiyonize suda çözülerek hazırlandı.

%10'luk Amonyum persülfat (APS) Tamponu: Hassas terazi üzerinde 100 mg olarak tartılan APS 1 mL deiyonize suda çözülerek hazırlandı. Taze kullanılması önerilir.

%40 Akrilamid\Bisakrilamid: 4°C 'de muhafaza edilen ve Biorad tarafından ticari olarak temin edilen solüsyon kullanıldı.

Ayırma Jeli Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 8.8): 36.33 g olarak tartılan Tris magnetik karıştırıcı üzerinde bir miktar deiyonize suda çözüldü. HCl kullanılarak, solüsyon pH'sı 8.8'e ayarlandı ve ardından son hacim 200 mL'ye tamamlandı.

Yükleme jel tamponu (0.5 M Tris-HCl pH 6.8): 6.057 g tartılan Tris, bir miktar deiyonize suda çözülerek HCl aracılı pH:6.8'e ayarlandı. Son hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10X Tris-Glisin Çözeltisi: 30.3 g tartılan Tris bazı ve 144 g olarak tartılan glisin bir miktar deiyonize suda çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlandı.

1X SDS-PAGE Yürütme Çözeltisi: 10X'lik Tris-Glisin tamponu 1X'e seyreltilti. Solüsyona 10 mL %10 SDS eklendi ve devamında toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

10X SDS-PAGE Transfer Çözeltisi: 10X'lik Tris-Glisin tamponu 1X olacak şekilde seyreltilti. Çözeltiye 200 mL metanol eklenerek son hacim 1 L olacak şekilde tamamlandı.

Primer Antikor: Ticari olarak temin edilen primer antikorlar üretici firmanın önerileri doğrultusunda bloklama tamponunda (%5'lik yağsız süt tozu ya da %5'lik BSA) seyreltilerek hazırlandı.

Sekonder Antikor: Ticari olarak temin edilen primer antikorlar üretici firmanın önerilerine göre %5'lik yağsız süt tozu içeren bloklama tamponu ile seyreltilerek hazırlandı.

3.4.2. Tümör Doku Numunelerinden Protein Lizatların Eldesi

1. Yaklaşık 10 mg olarak tartılan tümör doku örnekleri mikrosantrifüj tüplerine alınarak üzerlerine takriben 600 µL soğuk liziz tamponu eklendi.
2. Mikrosantrifüj tüplerinde yer alan numune ve liziz tamponu buz üzerinde el homojenizatörüyle homojenize edildi. Homojenatlar 2 saat süreyle 4°C de orbital çalkalayıcıya bırakıldı.
3. Süre sonunda tüpler 4°C'de 12.000 rpm'de mikrosantrifüje yerleştirilerek 20 dakika boyunca santrifüje edildi.
4. Santrifüjden çıkan tüpler buz üzerine yerleştirildi ve süpernatant aspire edilerek temiz mikrosantrifüj tüplerine alındı. Analiz süresine kadar tüpler -20°C'ye kaldırıldı.

3.4.3. SDS-PAGE Jel Elektroforez Aşaması

SDS- PAGE Cam Plakaların Hazırlanması: Çalışmada kullanılmak üzere 10 mm uzun camlar, 1 mm'lik 10'lu taraklar ve uzun cam üzerine yerleştirilen ince camlar deiyonize su ile yıkandı. Ardından %70'lik etil alkol ile temizlenmiş iki cam plaka, aralarına plastik aralık oluşturuucu (spacer) yerleştirilerek birbiri üzerine konuldu ve elektroforezin jel dökme standına sabitlendi.

SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması: Analiz edilecek proteinlerin Tablo 9'da verilen molekül ağırlıklarına göre 3 farklı akrilamid konsantrasyonunda; yükleme jeli %5 (yükleme jeli hazırlama prosedürü Tablo 9), ayırma jeli %10 ve %12,5 olacak şekilde, SDS-PAGE jel elektroforezi Laemmli tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirilerek proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrıldı (Tablo 10) (143).

Elektroforez işlemi için numunelerin yüklendiği yükleme jeli ve molekül ağırlıklarına göre ayrıldığı ayırma jeli olmak üzere iki farklı jel hazırlandı.

Ayırma Jelinin Hazırlanması: Aşağıdaki tabloda verilen proteinlerin molekül ağırlıklarına göre 3 farklı akrilamid konsantrasyonunda ayırma jeli hazırlandı.

Tablo 10'da belirtilen prosedüre göre hazırlanan ayırma jelleri jel hazırlama standında bekleyen uzun- kısa cam bileşimin arasına, kısa jelin yaklaşık 1 cm altında kalacak şekilde pipet yardımıyla, polimerleşmeye izin vermeden hızlıca döküldü. Jelin hava ile temasının kesilmesiyle amacıyla yaklaşık 1 ml'lik izopropil alkol cam plakalar arasına ilave edildi.

Tablo 9. Yükleme jeli hazırlama prosedürü

%5'lik Yükleme Jeli	Hacim
Acrylamide/%40 solution	500 µl
%10'luk SDS	50 µl
Distile su	3140 ml
TEMED	3 µl
0.5 M Tris-Base pH. 6.8	125 µl
%10'luk APS	50 µl
Taze hazırlandı.	

Tablo 10 Protein molekül ağırlıklarına göre ayırma jel konsantrasyonlarının belirlenmesi

%10	%12,5	
Nrf2 (110- 68 kDa)	Bcl- 2 (28 kDa)	LC3- I/II (17- 15 kDa)
MMP-9 (92 kDa)	CAS-3 (35- 21 kDa)	Bax (21 kDa)
	Beclın (52 kDa)	VEGF (21 kDa)
	p53 (53 kDa)	P21 (21 kDa)
	Nf-kB (65 kDa)	

Tablo 11. Ayırma jeli hazırlama prosedürü

İçerik	%10'luk Ayırma Jeli	%12,5'luk Ayırma Jeli
Acrylamide %40 solution	1250 µl	1560 µl
%10'luk SDS	50 µl	50 µl
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1250 µl	1250 ml
Distile Su	2415 µl	2085 µl
TEMED	5 µl	5 µl
%10'luk APS (en son eklenir)	50 µl	50 µl
Taze hazırlandı		

Yükleme Jelinin Hazırlanması: Ayırma jelinin yaklaşık 45 dakika sonrasında polimerleşmesiyle jel üzerinde bulunan izopropil alkol distile su ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı.

Tablo 9’da verilen prosedüre göre hazırlanan yükleme jeli yine polimerleşmeye izin vermeden hızlıca cam plakalar arasına, ayırma jelinin üzerinde yer alan 1 cm’lik boşluğa yüklendi. Ardından hava kabarcığı kalmamasına özen göstererek 1 mm’lik 10’lu tarak yükleme jeli üzerine konuldu.

3.4.4. Örneklerin Yükleme Jeline Yüklenmesi

-20°C dondurucuda beklemeye alınan protein lizatları buz üzerinde çözünmeye alındı. Yukarıda 3.3.5.1./2. bölümde anlatılan prosedüre ve Şekil 7’de çizilen eğriye göre lizatların protein konsantrasyonları hesaplandı. Her bir kuyucuğa 20 µl de 25 µg olacak şekilde protein lizat konsantrasyonları belirlendi.

Mikrosantrifüj tüpleri içerisinde protein konsantrasyonları belirlenen protein lizatlar üzerine 1:4 oranında; 5x yükleme boyası eklenerek numune solüsyonunun son hacmi 1x’e ayarlandı.

Örnek yükleme tamponu protein denatürasyon işleminin gerçekleştirilmesi amacıyla 99°C’de 5 dakika kaynatıldı. Numuneler 1000xg’de 2 dakika süreyle santrifüj edildi.

+4°C’de bekletilen jellerin tarakları çıkarılarak jelde oluşan kuyucuklar distile su ile yıkandı. Jeller, yükleme standı içine yerleştirilerek tank içerisine konuldu. Tank yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra ilk kuyucuğa 1 µl protein marker, diğer kuyucuklara da örneklerden 20 µl olacak şekilde yükleme jeline yüklendi.

Jel öncelikle 70 volt’da 15 dakika, sonrasında 100 volt’da 100 dakika süreyle yürütüldü.

Yürütme sürenin tamamlanmasıyla birlikte tamamı eksi yükle yüklenmiş olan proteinler SDS-PAGE elektroforezde moleküler büyüklüklerine göre katotdan anoda doğru hareket ederek ayrıldılar. Cam plakalar spacer aracılığıyla jele zarar vermeden gevşetilerek ve ortaya çıkarılan jelin üst kenarındaki kuyucuklar, jelin parçalanmamasına özen gösterilerek çıkarılıp, atıldı.

3.4.5. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

1. Cam plakalardan ayrılan ayırma jeli transfer aşamasına geçilmeden önce dengeye gelmesi amacıyla transfer tamponunda beklemeye alındı.

2. Jelle aynı büyüklükte olacak şekilde kesilen PVDF membran aktifleşmesi için soğuk metanolde takriben 5 dakika süreyle beklemeye bırakıldı.

3. 3 MM Whatman filtre kağıtları da uygun boyutlarda kesilerek transfer tamponu içerisinde dengelenmeye bırakıldı.

4. Western blot transfer kasetleri ve jel, membran, filtre kağıtlarıyla birlikte aşağıdaki sıraya göre transfer sandviçi hazırlandı.

siyah çerçeve (negatif elektrot) >> transfer tamponuyla ıslatılmış sünger >> 2 adet filtre kağıdı >> SDS-PAGE jel >> PVDF membran >> 2 adet filtre kağıdı >> transfer tamponuyla ıslatılmış sünger >> kırmızı çerçeve (pozitif elektrot).

5. Hazırlanan transfer sandviç kaset, siyah (anot) ve kırmızı (katot) tarafta denk şekilde tanka yerleştirildi ve transfer çizgisine kadar transfer tamponuyla dolduruldu.

6. Hazırlanan transfer tankı magnetik karıştırıcı üzerinde buza gömülerek 100 voltta (500 mA, 150 W) 1 saat süreyle transfere bırakıldı.

7. Sürenin tamamlanmasıyla kasetten çıkarılan membran bloklama işlemine alındı.

3.4.6. Bloklama

Membranla antikorlar arasındaki non-spesifik bağlanmaları en aza indirmek için uygulanır. Bu amaçla yağsız süt tozu, TBST (Tris tamponu + %0,1 Tween-20) ile sulandırılarak membran üzerine ilave edildi. Süt tozu– TBST karışımı ilave edilmiş membran 60 rpm’de çalkalayıcıda 1 saat çalkalama işlemine alındı.

3.4.7. Membrana Primer Antikor Ekleme

Ticari olarak temin edilen olan primer antikorlar, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda TBST ile sulandırılmış yağsız süt tozu ya da BSA da dilüe edilerek membran üzerine ilave edildi Membran, primer antikor çözeltisinde gece boyu +4°C buzdolabında 60 rpm’de çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda membran üzerindeki antikor ayrıldı ve membrana 20 mL TBST eklenerek 3 kez 10’ar dakika arayla çalkalayıcı üzerinde yıkama işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonunda membran, sekonder antikor ile muamele ve görüntüleme için hazır hale getirilmiş oldu.

Not: Çalışmada proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrı ayrı hazırlanmış olan membranlar, ticari olarak temin edilen, Anti Nrf2 poliklonal primer antikor, Anti Nf-KB p50 monoklonal primer antikor, Anti VEGF monoklonal primer antikor, Anti MMP-2 monoklonal primer antikor, Anti CAS-3 monoklonal primer antikor ve Anti Bcl-2 ve Anti Bax monoklonal primer antikor, Anti p21 monoklonal primer antikor, Anti p53 monoklonal primer antikor, Anti Beclin-1 ve Anti LC-3 monoklonal primer antikor ile üretici markanın tavsiyelerine göre muamele edildi.

3.4.8. Membrana Sekonder Antikor Ekleme

Ticari olarak temin edilen ve firmanın tavsiyeleri doğrultusunda 1:8 oranında TBST ile dilüe edilen Anti-Rabbit HRP ya da Anti-Mouse HRP (primer antikora göre seçildi) sekonder antikor membran üzerine ilave edildi ve 1 saat süreyle çalkalayıcıya bırakıldı.

İşlemin ardından membran üstündeki sekonder antikor dökülerek ve üzerine 20 ml TBST (TBS+ %0,1 Tween-20) eklendi 3 kez 10'ar dakika arayla çalkalayıcıda yıkama yapıldı. Yıkama işleminin ardından membran bir plastik şeffaf dosya üzerine konarak görüntüleme için hazırlandı.

Görüntüleme işlemi için sekonder antikorla aynı konjuge grubu taşıyan ve ticari olarak temin edilen Bio-Rad ECL kemiluminesans substrat solüsyonundan membran yüzeyine 1 mL uygulandı ve görüntüleme işlemine alındı (Temel prensip; kemiluminesans ajan sekonder antikora bağlanarak ışımaya yapar).

11. Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System de görüntüleme yapılarak membran analizi tamamlandı.

3.5. Histopatolojik Analiz

Tümör dokusu %10 formalinde 24 saat süreyle fiksasyona bırakıldı Tümör numuneleri tam otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1010; Leica Wetzlar, Germany) %70- %100 aralığındaki alkol ve kloroform serileriyle muamele edilmelerinin ardından önce 43°C'de yumuşak parafine, takiben 57°C'de parafine gömüldü. Daha sonra. 5-µm kalınlığında alınan kesitler [Microtome, Leica RM2155; Leica Inc., Nussloch (Almanya)] hematoksinin ve eozin (H&E) kullanılarak boyandı. Histolojik analizler ışık mikroskobu altında gerçekleştirildi (Olympus Elektron Mikroskobu, Olympus; Japonya).

3.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçların normal dağılıma uygunlukları SPSS version 18 programı kullanılarak Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyan ikiden fazla bağımsız grubun kıyaslanmasında ANOVA, post-hoc Tukey testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan grupların kıyaslanmasında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılıma uyan veri setleri aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak, uymayanlar ise medyan (%25-75 çeyreklikler) şeklinde ifade edildi. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Bornil Asetatın İntraperitonel ve Subkutan Uygulamalarında Gruplar Arası Hayvan Ağırlıklarının ve Tümör Volümlerinin Değerlendirilmesi

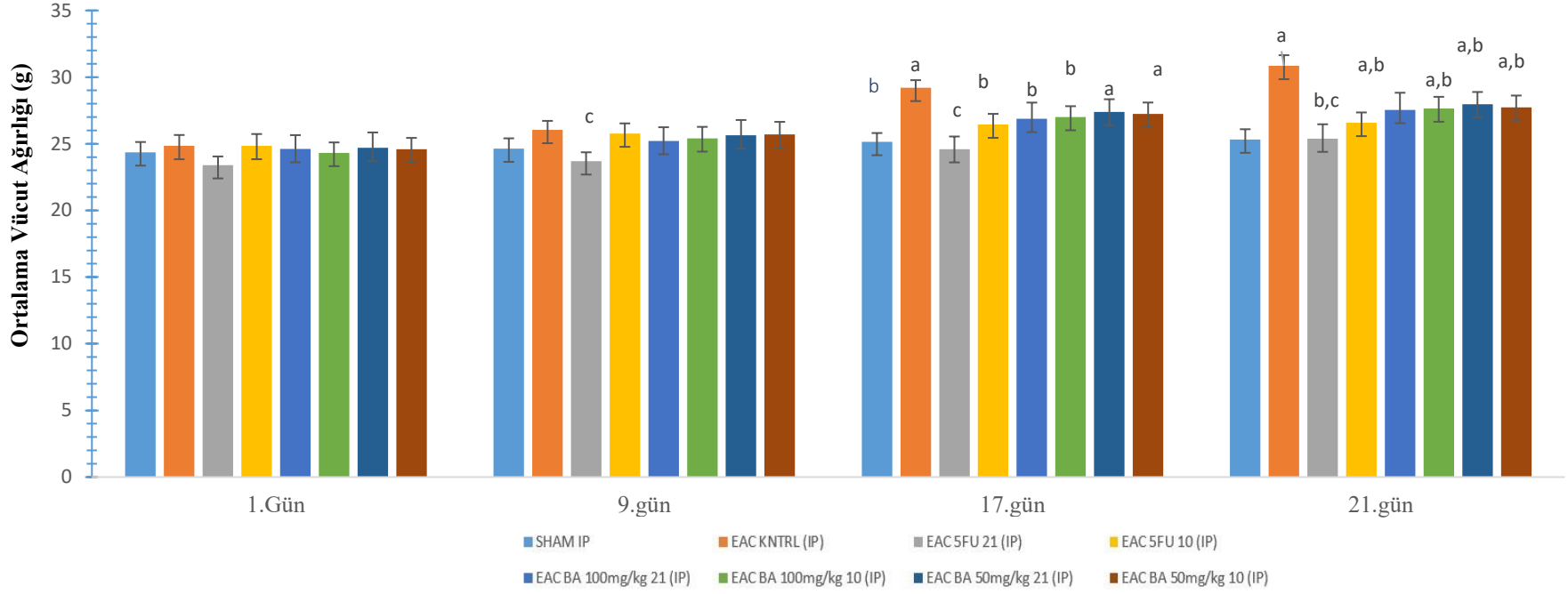
4.1.1. Bornil Asetatın İntraperitonel Uygulamalarında Gruplar Arası Hayvan Ağırlıklarının ve Tümör Volümlerinin Değerlendirilmesi

Tümör hücre inokülasyonunu takiben 10.gün itibariyle gelişmeye başlayan s.k. tümör doku ağırlığının fare ağırlıklarına yansıdığı tespit edildi (Şekil 11). Deney süresinin 9.gününde Sham kontrol grubuna göre artış gösteren EAC kontrol, EAC+5-FU 10 gün, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün, EAC+BA 100 mg/kg 10 gün, EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün gruplarına karşılık EAC+5-FU 21 gün grubunda gözlenen ağırlık azalışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.005$).

İnokülasyonun 17. gününde Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.014$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.033$) gruplarında belirlenen artış anlamlı olarak bulundu. Aynı zamanda EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC 5-FU 10 gün ($p=0.001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.009$), EAC+5-FU 100 mg/kg 10 gün ($p=0.020$) gruplarında EAC kontrol grubuna göre anlamlı azalış gözlemlendi. Öte yandan EAC+5-FU 21 gün grubunda saptanan ağırlık azalışı EAC+5-FU 10 gün ($p=0.014$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarına göre anlamlı bulundu.

Fare dekapitasyonundan 1 gün önce 21.günde EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.030$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.017$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.003$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.011$) gruplarında Sham kontrol grubuna göre fare vücut ağırlığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Buna karşılık EAC kontrol grubuna göre EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21gün ($p=0.001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında meydana gelen ağırlık azalışı anlamlı olarak belirlendi.

Ayrıca EAC+5-FU 21 gün grubunda ölçülen ağırlık azalışı EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.003$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.001$) gruplarına göre anlamlı bulundu.



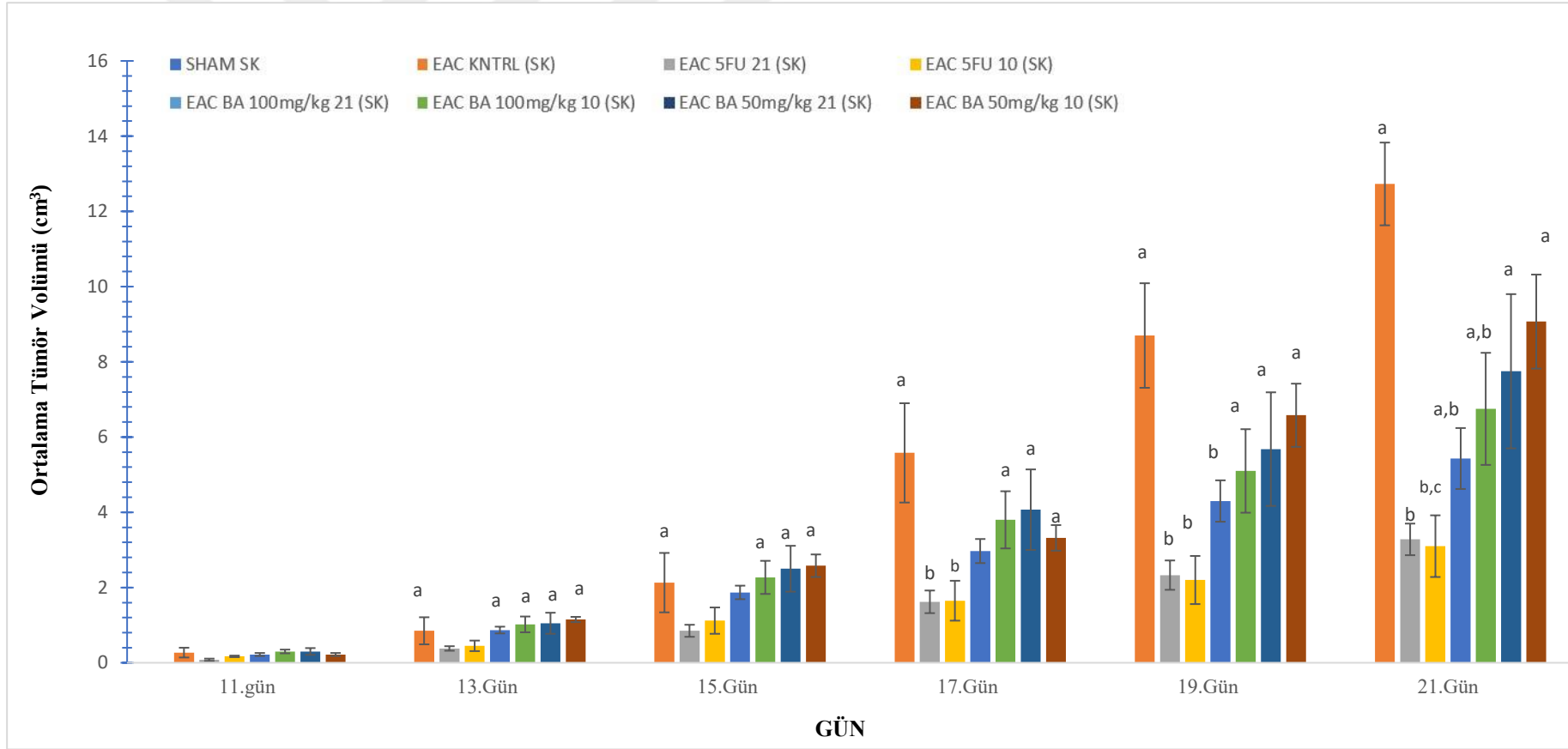
Şekil 11. Bornil asetatın i.p. uygulandığı deney gruplarında günlere göre ortalama vücut ağırlığı değişim grafiği (n=10). Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre c: Diğer deney gruplarına göre anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). (Sham:Negatif Kontrol; EAC Kontrol : 0,5 mL EAC hücresi s.k. enjekte edildi; EAC+5-FU 21 gün: 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz 5-FU 50 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+5-FU 10 gün: 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz 5-FU 50 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 100 mg/kg 21 gün: 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz BA 100 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 100 mg/kg 10 gün: 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz BA 100 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 50 mg/kg 21 gün: 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz BA 50 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 50 mg/kg 10 gün: 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz BA 50 mg/kg i.p. enjeksiyon.)

Ehrlich assit hücrelerinin inokülasyonundan sonra 10.günden itibaren tümör doku gelişimi gözlemlendi (Şekil 12). Deneyin 13. ve 15. günlerinde Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.043$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.046$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.011$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.008$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün gruplarında tümör doku büyümesi anlamlı bulundu.

Deney süresinin 17.gününde tümör doku artışı Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.011$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.005$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.039$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Aynı zamanda EAC+5-FU 21 gün ($p=0.007$) ve EAC+5-FU 10 gün ($p=0.008$) gruplarında belirlenen tümör doku gerilemesi de EAC Kontrol grubuna göre anlamlı olarak değerlendirildi.

Tümör doku gelişiminin 19.günüde EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.014$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.004$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.001$) gruplarında Sham kontrol grubuna göre tümör dokusunda anlamlı artış gözlenirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.045$) gruplarında EAC kontrol grubuna göre tümör doku gerilemesi anlamlı olarak ifade edildi.

Deneyin sonlandırıldığı 22.günde tümör doku gelişimleri Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.037$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.004$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.002$) ve EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.016$) gruplarında tümör doku küçülmesi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ayrıca EAC+5-FU 10 gün grubunda gelişen tümör dokunun EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.016$) grubuna göre gerilemesi de anlamlı olarak belirlendi.



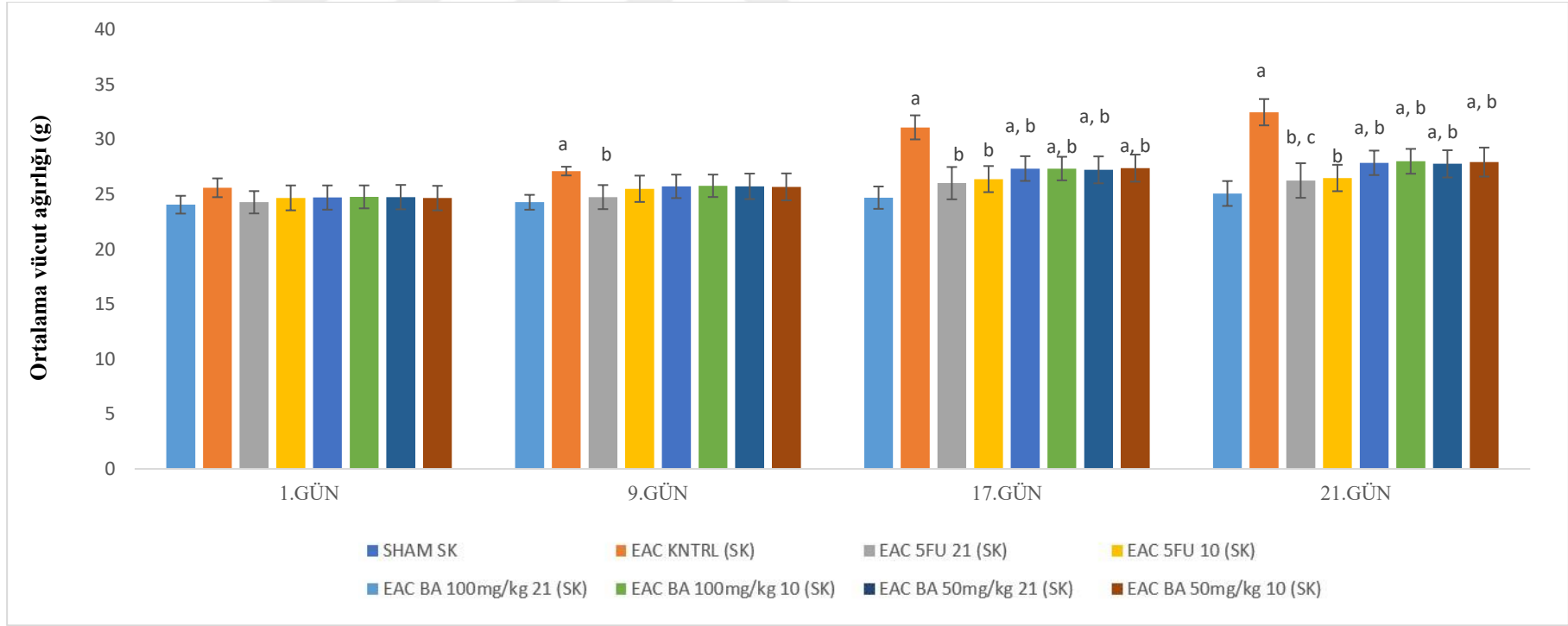
Şekil 12. Bornil asetatın i.p. uygulandığı deney gruplarında günlere göre ortalama tümör volümü değişim grafiği (n=10). Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre c: Diğer deney gruplarına göre anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). (Sham:Negatif Kontrol; EAC : 0,5 mL EAC hücresi s.k. enjekte edildi; EAC+5-FU 21 gün: 1.günden itibaren 21.gün boyu gün aşırı 10 doz 5-FU 50 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+5-FU 10 gün: 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz 5-FU 50 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 100 mg/kg 21 gün: 1.günden itibaren 21.gün boyu gün aşırı 10 doz BA 100 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 100 mg/kg 10 gün: 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz BA 100 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 50 mg/kg 21 gün: 1.günden itibaren 21.gün boyu gün aşırı 10 doz BA 50 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 50 mg/kg 10 gün: 1.günden itibaren 21.gün boyu gün aşırı 5 doz BA 50 mg/kg i.p. enjeksiyon.)

Tümör hücrelerinin s.k. enjeksiyonuyla birlikte 10.günden itibaren gelişmeye başlayan tümör doku ağırlığı fare ağırlıklarına yansımıştır (Şekil 13). Deney süresinin 9.gününde Sham kontrol grubuna göre artış gösteren EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda anlamlı artış belirlendi. Buna karşılık EAC+5-FU 21gün ($p=0.003$) grubunda belirlenen ağırlık kaybı EAC kontrol grubuna göre anlamlı bulundu. EAC+5-FU 10 gün, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün, EAC+BA 100 mg/kg 10 gün, EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün gruplarına karşılık EAC+5-FU 21 gün grubunda gözlenen ağırlık azalışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.005$).

Deneyin 17.gününde Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.003$), EAC+5-FU 100 mg/kg 10 gün ($p=0.002$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.004$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.003$) gruplarında belirlenen artış anlamlı bulundu. Aynı zamanda EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında ortalama vücut ağırlığı azalışı EAC kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

21.güne gelindiğinde Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.002$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.001$) gruplarında fare vücut ağırlıkları anlamlı artış gösterirken, EAC kontrol grubuna göre EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21gün($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında ağırlık azalışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

4.1.2. Bornil Asetatın Subkutan Uygulamalarında Gruplar Arası Hayvan Ağırlıklarının ve Tümör Volümünün Değerlendirilmesi



Şekil 13. Bornil asetatin s.k. uygulandığı deney gruplarında günlere göre ortalama vücut ağırlığı değişim grafiği (n=10). Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.005$).

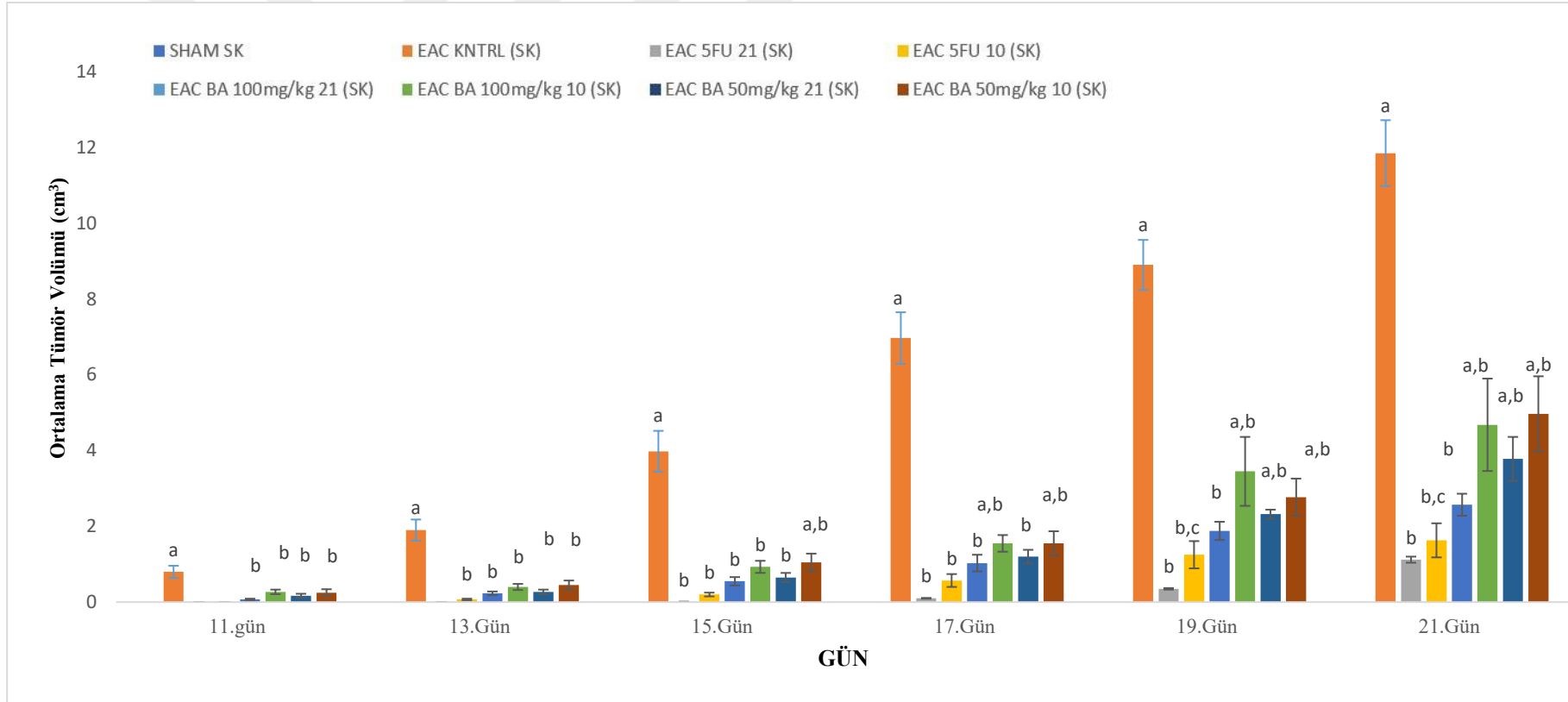
(Sham:Negatif Kontrol; **EAC Kontrol:** 0,5 mL EAC hücresi s.k. enjekte edildi; **EAC+5-FU 21 gün:** 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz 5-FU 50 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+5-FU 10 gün:** 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz 5-FU 50 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+BA 100 mg/kg 21 gün:** 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz BA 100 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+BA 100 mg/kg 10 gün:** 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz BA 100 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+BA 50 mg/kg 21 gün:** 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz BA 50 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+BA 50 mg/kg 10 gün:** 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 5 doz BA 50 mg/kg s.k. enjeksiyon.)

Ehrlich assit hücrelerinin inokülasyonundan sonra 10.günden itibaren tümör doku gelişimi gözlemlendi (Şekil 14). Deneyin 11 ve 13. günlerinde Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda tümör doku artışı anlamlı bulunurken, EAC kontrol grubuna göre EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$) EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında tümör doku küçülmesi anlamlı bulundu.

Deney süresinin 15. gününde tümör doku artışı Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.037$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında hesaplanan tümör doku küçülmesi ise EAC kontrol grubuna göre anlamlı olarak değerlendirildi.

Deney süresinin 17. gününde tümör doku artışı Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.016$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.016$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Öte yandan EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında belirlenen tümör doku gerilemesi EAC kontrol grubuna göre anlamlı olarak değerlendirildi.

Tümör doku gelişiminin 19.ve 21. günlerinde EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50mg/kg 21 gün ($p<0.005$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p<0.005$) gruplarında Sham kontrol grubuna göre tümör dokusunda anlamlı artış gözlenirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında EAC kontrol grubuna göre tümör doku gerilemesi istatistiksel olarak anlam ifade etmektedir.



Şekil 14. Bornil asetatın s.k. uygulandığı deney gruplarında günlere göre ortalama tümör volümü değişim grafiği (n=10). Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). (**Sham:**Negatif Kontrol; **EAC Kontrol:** 0,5 mL EAC hücresi s.k. enjekte edildi; **EAC+5-FU 21 gün:** 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz 5-FU 50 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+5-FU 10 gün:** 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz 5-FU 50 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+BA 100 mg/kg 21gün:** 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz BA 100 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+BA 100 mg/kg 10 gün:** 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz BA 100 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+BA 50 mg/kg 21 gün:** 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz BA 50 mg/kg s.k. enjeksiyon; **EAC+BA 50 mg/kg 10 gün:** 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 5 doz BA 50 mg/kg s.k. enjeksiyon.)

4.2. Serum Biyokimya Parametrelerinin İntraperitonel ve Subkutan Gruplar Arası Değerlendirilmesi

4.2.1. İntraperitonel Gruplar Arası Biyokimya Parametrelerinin Karşılaştırılması

Çalışmada 5-FU ve BA'nın i.p. olarak uygulandığı gruplarda, serum ALT ve AST karaciğer fonksiyonunun, BUN ise karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla incelendi (Tablo 12). AST düzeyi Sham kontrol grubuna göre EAC ($p=0.0001$), EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında anlamlı olarak yüksek bulundu. Ayrıca AST düzeyi EAC Kontrol grubuna göre EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.015$) grubunda belirlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. EAC+5-FU 10 gün ($p=0.001$) grubunda AST düzeyinin EAC+BA 100 mg/kg 10 gün grubuna göre anlamlı azalış gösterdiği belirlendi.

Serum ALT düzeyi EAC kontrol grubuna göre EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.029$) grubunda anlamlı yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi.

Çalışmada yer alan i.p. gruplar arasında serum BUN seviyelerinde anlamlı farklılık bulunamadı.

Tablo 12. İ.p. gruplara ait serum biyokimya sonuçları (n=10)

	SHAM	EAC	EAC+5-FU 21 gün	EAC+5-FU 10 gün	EAC+BA 100 mg/kg 21 gün	EAC+BA 100 mg/kg 10 gün	EAC+BA 50 mg/kg 21 gün	EAC+BA 50 mg/kg 10 gün
ALT (U/L)	37.3±12.4	33.3±9.9	37.2±9.9	44.5±8.8	42.8±6.5	52.2±10.7 ^b	49.2±1.9	46.3±11.8
AST (U/L)	28.8±6.1	68.7±6.3 ^a	79.5±9.4 ^a	62.5±6.3 ^{a,c}	88.5±23.7 ^a	96.0±16.2 ^{a,b}	78.0±10.8 ^a	83.5±13.5 ^a
BUN (mg/dL)	20.8±4.6	26.8±3.1	41.5±20.4 ^a	26.8±15.4	19.8±3.0	20.3±2.8	20.3±1.4	17.5±0.5

Sonuçlar ortalama $\pm$ SD şeklinde verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre, c: EAC BA 100 mg/kg 10 gün grubuna göre fark bulundu $p<0.05$.

4.2.2. Subkutan Gruplar Arası Biyokimya Parametrelerinin Karşılaştırılması

5-Fluorourasil ve BA'nın uygulamalarının s.k. olarak gerçekleştirildiği gruplar arasında karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi serum AST, ALT ve BUN seviyelerine göre yapıldı (Tablo 13).

Aspartat aminotransferaz düzeyi Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında anlamlı olarak yüksek bulundu. Aynı zamanda EAC kontrol grubuna göre EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.001$) ve EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında da anlamlı artış gösterdi. Ayrıca EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ve EAC+BA 100 mg/kg 10 gün gruplarına göre sırasıyla EAC+5-FU 21 gün ($p=0.02$) ve EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü.

Gruplar arası serum ALT düzeylerinde istatistiksel anlamlı fark bulunmazken, serum BUN seviyeleri EAC kontrol ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün gruplarına göre EAC+5-FU 10 gün (sırasıyla $p=0.034$ ve $p=0.037$) grubunda anlamlı yüksek bulundu.

Tablo 13. S.k. gruplara ait serum biyokimya sonuçları (n=10)

	SHAM	EAC	EAC+5-FU 21 gün	EAC+5-FU 10 gün	EAC+BA 100 mg/kg 21 gün	EAC+BA 100 mg/kg 10 gün	EAC+BA 50 mg/kg 21 gün	EAC+BA 50 mg/kg 10 gün
ALT (U/L)	35.8±13.2	36.5±13.8	35.8±7.0	39.7±9.9	42.2±10.1	52.0±7.6	44.5±5.5	51.5±7.3
AST (U/L)	27.7±4.8	66.8±6.2 ^a	77.8±10.1 ^{a,c}	72.3±6.8 ^{a,d}	106.5±26.6 ^{a,b}	108.7±12.2 ^{a,b}	91.0±17.9 ^a	81.8±14.3 ^a
BUN (mg/dL)	20.2±2.7	18.5±2.3	25.2±6.6	35.2±21.7 ^{b,c}	18.0±2.7	19.7±1.9	24.8±7.4	18.7±1.1

Sonuçlar ortalama $\pm$ SD şeklinde verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre , b: EAC Kontrol grubuna göre, c: EAC BA 100mg/kg 21 gün grubuna göre ve d: EAC BA 100 mg/kg 10 gün grubuna göre anlamlı fark bulundu $p<0.05$.

4.3. Tümör Doku Numunelerinde Oksidatif Stres Parametrelerinin İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Değerlendirilmesi

Çalışmada bornil asetatın i.p. ve s.k. uygulanmasının Ehrlich solid tümör doku numunelerinde oksidatif stres parametreleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi. Örneklerde oksidatif hasar; MDA, TOS ve TAS ölçümleri spektrofotometrik olarak belirlenirken, GPx, eNOS, NOX-I seviyeleri ELISA tekniğine dayalı kitlerle gerçekleştirildi.

4.3.1. İntraperitoneal Gruplar Arası Oksidatif Stres Parametrelerin Karşılaştırılması

Analiz sonuçlarına göre i.p. gruplar arası MDA, TOS, TAS, OSI, GPx, eNOS, NOX-I protein ekspresyonları karşılaştırmalı olarak Tablo 14’de ayrı ayrı verildi.

Tablo 14. İ.p. gruplara ait oksidatif stres belirteçlerinin sonuçları (n=10)

İntraperitoneal Uygulama	Sham	EAC	EAC+5-FU 21 gün	EAC+5-FU 10 gün	EAC+BA 100 mg/kg 21 gün	EAC+BA 100 mg/kg 10 gün	EAC+BA 50 mg/kg 21 gün	EAC+BA 50 mg/kg 10 gün
MDA (nmol/mg protein)	27.9±9.1	62.3±9.9 ^a	31.7±13.0 ^b	31.8±8.8 ^b	23.3±5.9 ^b	22.6±2.3 ^b	30.9±5.6 ^b	25.6±4.1 ^b
TOS (µmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L)	32.8±15.8	129.2±21.5 ^a	73.9±12.9 ^b	71.7±24.0 ^b	50.0±21.0 ^b	68.4±20.4 ^b	79.9±16.6 ^{a,b}	85.5±26.0 ^{a,b}
TAS (mmol troloks eşdeğeri/L)	0.73±0.04	0.44±0.12 ^a	0.75±0.04 ^b	0.60±0.06 ^{b,c,d}	0.83±0.06 ^b	0.88±0.06 ^b	0.79±0.10 ^b	0.78±0.07 ^b
OSI	4.50±2.08	31.3±12.1 ^a	9.80±1.31 ^b	11.78±3.42 ^b	6.02±2.34 ^b	7.70±1.91 ^b	10.08±0.95 ^b	10.72±2.57 ^b
GPx (ng/mg protein)	2.20±0.94	0.80±0.10 ^a	1.65±0.84	1.73±0.31	1.64±0.55	0.92±0.16 ^a	1.13±0.38	1.05±0.09 ^a
eNOS (U/mg protein)	0.34±0.12	0.92±0.11 ^a	0.22±0.06 ^b	0.23±0.07 ^b	0.20±0.05 ^b	0.14±0.02 ^{a,b}	0.21±0.08 ^b	0.18±0.04 ^{a,b}
NOX-1 (ng/mg protein)	0.52±0.10	2.14±0.80 ^a	0.36±0.15 ^b	0.47±0.12 ^b	0.36±0.13 ^b	0.28±0.07 ^b	0.32±0.12 ^b	0.26±0.05 ^b

Sonuçlar ortalama ± SD şeklinde verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC kontrol grubuna göre, c: EAC BA 100 mg/kg 10 gün grubuna göre, d: EAC BA 50 mg/kg 10 gün grubuna göre anlamlı fark bulundu (p<0.05).

(Sham:Negatif Kontrol; EAC Kontrol: 0,5 mL EAC hücresi s.k. enjekte edildi; EAC+5-FU 21 gün: 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz 5-FU 50 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+5-FU 10 gün: 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz 5-FU 50 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 100 mg/kg 21 gün: 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 10 doz BA 100 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 100 mg/kg 10 gün: 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz BA 100 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 50 mg/kg 21 gün: 1.günden itibaren 21.gün boyu gün aşırı 10 doz BA 50 mg/kg i.p. enjeksiyon; EAC+BA 50 mg/kg 10 gün: 1.günden itibaren 21 gün boyu gün aşırı 5 doz BA 50 mg/kg i.p. enjeksiyon)

Tümör doku numunelerinde ilaçların i.p. uygulanmaları sonrasında gruplar arası MDA seviyeleri EAC Kontrol grubunda ($p=0.0001$) Sham kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında EAC kontrol grubuna oranla anlamlı azalış gösterdi (Tablo 14).

Doku örneklerinde gruplar arası TOS seviyeleri Sham kontrol grubuna kıyasla EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda istatistiksel anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.003$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.002$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.011$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.032$) gruplarında EAC kontrol grubuna oranla azaldığı bulundu. Ayrıca EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.017$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0005$) gruplarında Sham kontrol grubuna göre artışları anlamlı bulundu (Tablo 14).

Gruplar arası TAS seviyeleri Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda anlamlı artış gösterdi. Beklenildiği üzere 5-FU ve BA'nın uygulama süresine ve dozuna bağlı olarak EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.039$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında EAC kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. Ayrıca EAC+5-FU 10 gün grubuyla karşılaştırıldığında EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.008$) gruplarında doza bağlı olarak görülen artış anlamlı bulundu (Tablo 14).

Toplam antioksidan ve toplam oksidan seviyelerine göre hesaplanan OSI değeri de gruplar arasında anlamlı farklılıklar gösterdi. Buna göre Sham kontrol grubuyla kıyaslandığında EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda belirlenen artış anlamlı bulunurken, doza ve uygulama süresine göre farklılık gösteren EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) EAC kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı azalış bulundu (Tablo 14).

Tümör doku numunelerinde gruplar arası GPx değerleri Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.004$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.01$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.028$) gruplarında anlamlı azalma gösterirken diğer gruplar arasında anlamlı fark

bulunamadı. Benzer şekilde GST seviyelerinde gruplar arası herhangi bir anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 14).

Tümör doku numunelerinde ilaçların i.p. uygulanmaları sonrasında doz ve uygulanma sürelerine göre gruplar arası eNOS seviyeleri EAC kontrol grubunda ($p=0.0001$) Sham kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında EAC kontrol grubuna oranla anlamlı azalış gösterdi. Aynı zamanda EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.005$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.035$) gruplarında da Sham kontrol grubuna göre belirlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 14).

Doku örneklerinde gruplar arası NOX-1 düzeyleri Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 21gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında EAC kontrol grubuna nazaran azalma anlamlı olarak değerlendirildi (Tablo 14).

4.3.2. Subkutan Gruplar Arası Oksidatif Stres Parametrelerin Karşılaştırılması

Analiz sonuçlarına göre s.k. gruplar arası MDA, TOS, TAS, OSI, GPx, eNOS, NOX-I protein ekspresyonları karşılaştırmalı olarak Tablo 15’de ayrı ayrı verildi.

Tablo 15. S.k. gruplara ait oksidatif stres parametre seviyeleri (n=10)

Subkutan Uygulama	Sham	EAC	EAC+5-FU 21 gün	EAC+5-FU 10 gün	EAC+BA 100 mg/kg 21 gün	EAC+BA 100 mg/kg 10 gün	EAC+BA 50 mg/kg 21 gün	EAC+BA 50 mg/kg 10 gün
MDA (nmol/mg protein)	26.8±9.0	65.1±4.7 ^a	33.8±7.6 ^b	32.7±8.0 ^b	24.6±8.0 ^b	25.7±7.3 ^b	20.7±7.5 ^b	28.9±6.6 ^b
TOS (µmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L)	51.0±15.5	139.0±21.3 ^a	66.0±24.0 ^b	68.0±30.2 ^b	68.5±10.4 ^b	75.5±9.4 ^b	69.3±8.3 ^b	84.1±35.6 ^b
TAS (mmol troloks eşdeğeri/L)	0.90±0.03	0.54±0.06 ^a	0.72±0.07 ^b	0.71±0.09 ^a	0.86±0.14 ^{b,c}	0.78±0.12 ^b	0.89±0.03 ^b	0.79±0.07 ^b
OSI	5.72±1.88	25.7±2.60 ^a	9.28±3.63 ^b	10.06±5.29 ^b	7.96±0.53 ^b	9.78±0.95 ^b	7.74±0.69 ^b	10.42±3.75 ^b
GPx (ng/mg protein)	2.29±0.37	0.69±0.06 ^a	3.43±1.04 ^{b,c}	1.83±0.47	2.01±0.89	1.25±0.41	1.75±0.54	1.32±0.33
eNOS (U/mg protein)	0.31±0.03	0.49±0.12 ^a	0.30±0.11 ^b	0.23±0.02 ^b	0.23±0.07 ^{b,c}	0.14±0.02 ^b	0.13±0.05 ^{a,b}	0.23±0.06 ^b
NOX-1 (ng/mg protein)	0.52±0.11	1.93±0.22 ^a	0.65±0.11 ^b	0.61±0.09 ^b	0.37±0.08 ^b	0.22±0.05 ^b	0.27±0.09 ^b	0.34±0.06 ^b

Sonuçlar ortalama ± SD şeklinde verildi. a Sham Kontrol grubuna göre, b EAC Kontrol grubuna göre, c: EAC+BA 100 mg/kg 10 gün grubuna göre, d: EAC+BA 50 mg/kg 10 gün grubuna göre e: EAC+5FU 10 gün grubuna göre anlamlı fark bulundu $p<0.05$.

(Sham:Negatif Kontrol; EAC : 0,5 mL EAC hücresi s.k. enjekte edildi; EAC+5-FU 21 gün: 1.günden itibaren 21.gün boyu gün aşırı 10 doz 5-FU 50 mg/kg s.k. enjeksiyon; EAC+5-FU 10 gün: 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz 5-FU 50 mg/kg s.k. enjeksiyon; EAC+BA 100 mg/kg 21 gün: 1.günden itibaren 21.gün boyu gün aşırı 10 doz BA 100 mg/kg s.k. enjeksiyon; EAC+BA 100 mg/kg 10 gün: 11.günden itibaren 21.güne kadar gün aşırı 5 doz BA 100 mg/kg s.k. enjeksiyon; EAC+BA 50 mg/kg 21 gün: 1.günden itibaren 21.gün boyu gün aşırı 10 doz BA 50 mg/kg s.k. enjeksiyon; EAC+BA 50 mg/kg 10 gün: 1.günden itibaren 21.gün boyu gün aşırı 5 doz BA 50 mg/kg s.k. enjeksiyon)

Tümör doku numunelerinde ilaçların s.k. uygulanmaları sonrasında doz ve uygulanma sürelerine bağlı olarak gruplar arası MDA düzeyleri EAC kontrol grubunda ($p=0.0001$) Sham kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında EAC Kontrol grubuyla kıyaslandığında belirlenen azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 15).

Çalışmada doku örneklerinde uygulanan doz ve süreye göre gruplar arası TOS seviyeleri Sham kontrol grubuna nazaran EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda istatistiksel anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.003$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.002$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.007$) gruplarında EAC kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gerçekleşen azalma anlamlı bulundu (Tablo 15).

Çalışma kapsamında belirlenen gruplar arası TAS seviyeleri Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda anlamlı artış gösterdi. Beklenildiği gibi 5-FU ve BA'nın uygulama süresine ve dozuna bağlı olarak EAC+5-FU 21 gün ($p=0.036$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.038$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.002$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.002$) gruplarında EAC kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi. Ayrıca EAC+BA 100 mg/kg 10 gün grubuyla karşılaştırıldığında EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.048$) grubunda uygulanma süresine bağlı olarak istatistiksel anlamlı artış görüldü (Tablo 15).

Toplam antioksidan ve toplam oksidan seviyelerine göre hesaplanan OSI değeri de gruplar arasında anlamlı fark gösterdi. Buna göre Sham grubuyla kıyaslandığında EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda belirlenen artış anlamlı bulunurken, doza ve uygulama süresine göre farklılık gösteren EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında belirlenen azalma EAC kontrol grubuna nazaran anlamlı olarak değerlendirildi (Tablo 15).

Tümör doku numunelerinde gruplar arası GPx değerleri Sham kontrol grubuna göre EAC Kontrol ($p=0.035$), grubunda anlamlı azalma gösterdi. Ayrıca EAC kontrol ve EAC+BA 50 mg/kg 21 gün gruplarıyla karşılaştırıldığında EAC+5-FU 21 gün (sırasıyla $p=0.0001$ ve $p=0.023$) grubunda belirlenen artış istatistiksel olarak anlamlıyken, EAC+5FU 10 gün, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün, EAC+BA 100 mg/kg 10 gün, EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün grupları arasında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 15).

Tümör doku numunelerinde ilaçların i.p. uygulanmaları sonrasında doz ve uygulanma sürelerine göre gruplar arası eNOS seviyeleri Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol grubunda ($p=0.023$) anlamlı artış gösterirken, EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.036$) grubunda anlamlı azalış gösterdi. Ayrıca EAC kontrol grubuyla karşılaştırıldığında EAC+5-FU 21 gün ($p=0.022$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.01$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.036$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında belirlenen azalma anlamlı kabul edildi. Aynı zamanda uygulanan ilaca göre EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.036$) grubunda EAC+5-FU 21 gün grubuna göre belirlenen azalış anlamlı bulundu (Tablo 15).

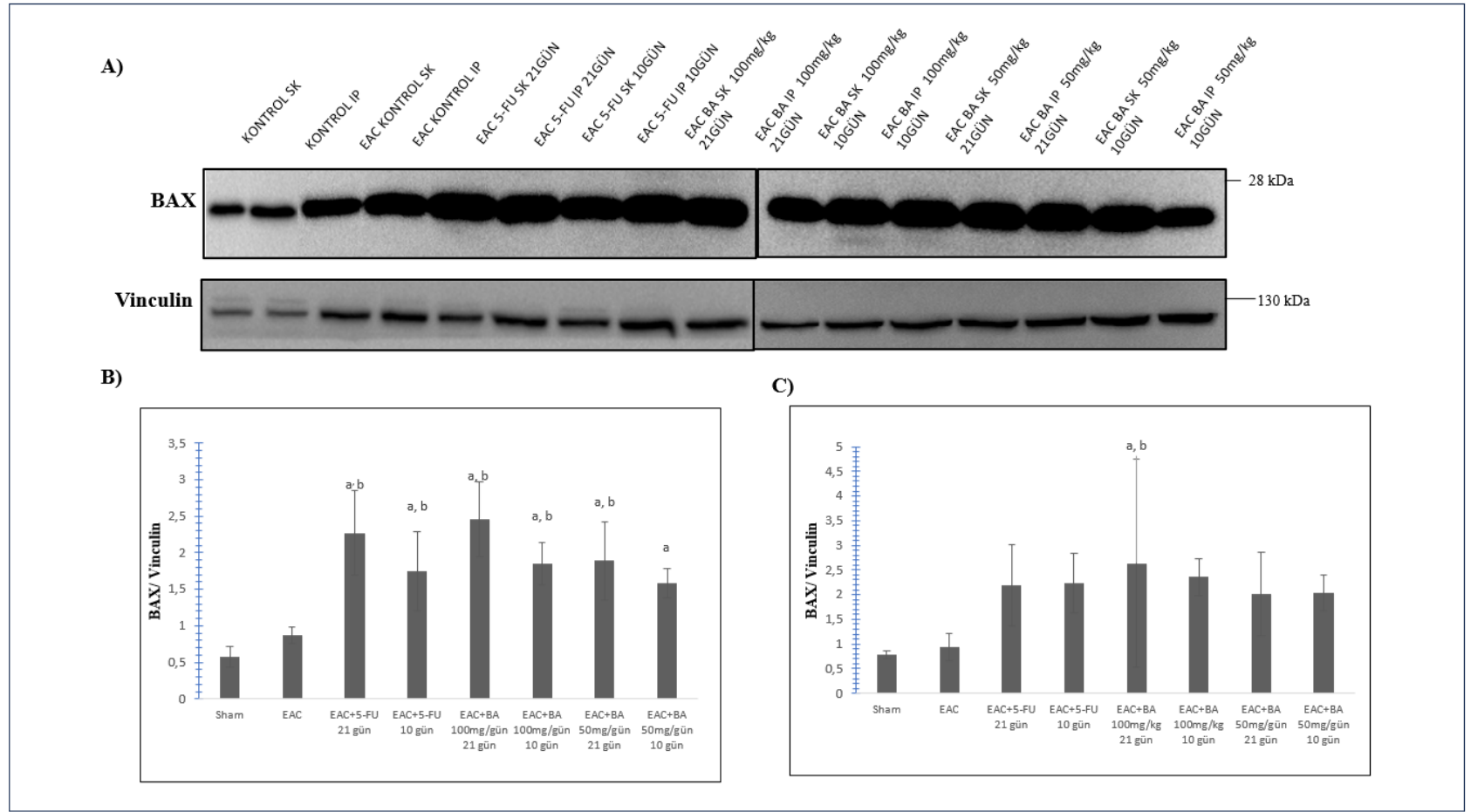
Doku örneklerinde gruplar arası NOX-1 düzeyleri Sham kontrol grubuna göre EAC Kontrol ($p=0.0001$) grubunda anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında EAC Kontrol grubuna nazaran görülen azalma istatistiksel anlamlı olarak değerlendirildi (Tablo 15).

4.4. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitonel ve Subkutan Gruplar Arası Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmada BA'nın i.p. ve s.k. gruplar arası Ehrlich solid tümör doku numuneleri üzerine apoptotik hücre ölümü etkisinin değerlendirilmesi amacıyla western blot analiz yöntemi uygulandı. Bu amaçla Bax, Bcl-2 ve Cas-3 proteinleri kullanıldı. İlgili proteinlere ait membran görüntüleri ve proteinlerin n=6 üzerinden ortalama bant yoğunlukları hesaplanarak hazırlanan grafikler Resim 8-10'da verildi.

Bornil asetat ve 5-FU'nun i.p. uygulanmaları neticesinde gruplar arası Bax protein seviyeleri Sham ve EAC kontrol gruplarına kıyasla EAC+5-FU 21 gün (sırasıyla $p=0.0001$ ve $p=0.0001$) grubunda, EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.013$) grubunda, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.0001$) grubunda, EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.004$) grubunda, EAC+BA 50 mg/kg 21gün ($p=0.0001$ ve $0,002$) grubunda anlamlı artış gösterdi. Ayrıca Sham kontrol grubuna göre EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.003$) grubunda anlamlı yüksek bulundu (Resim 8).

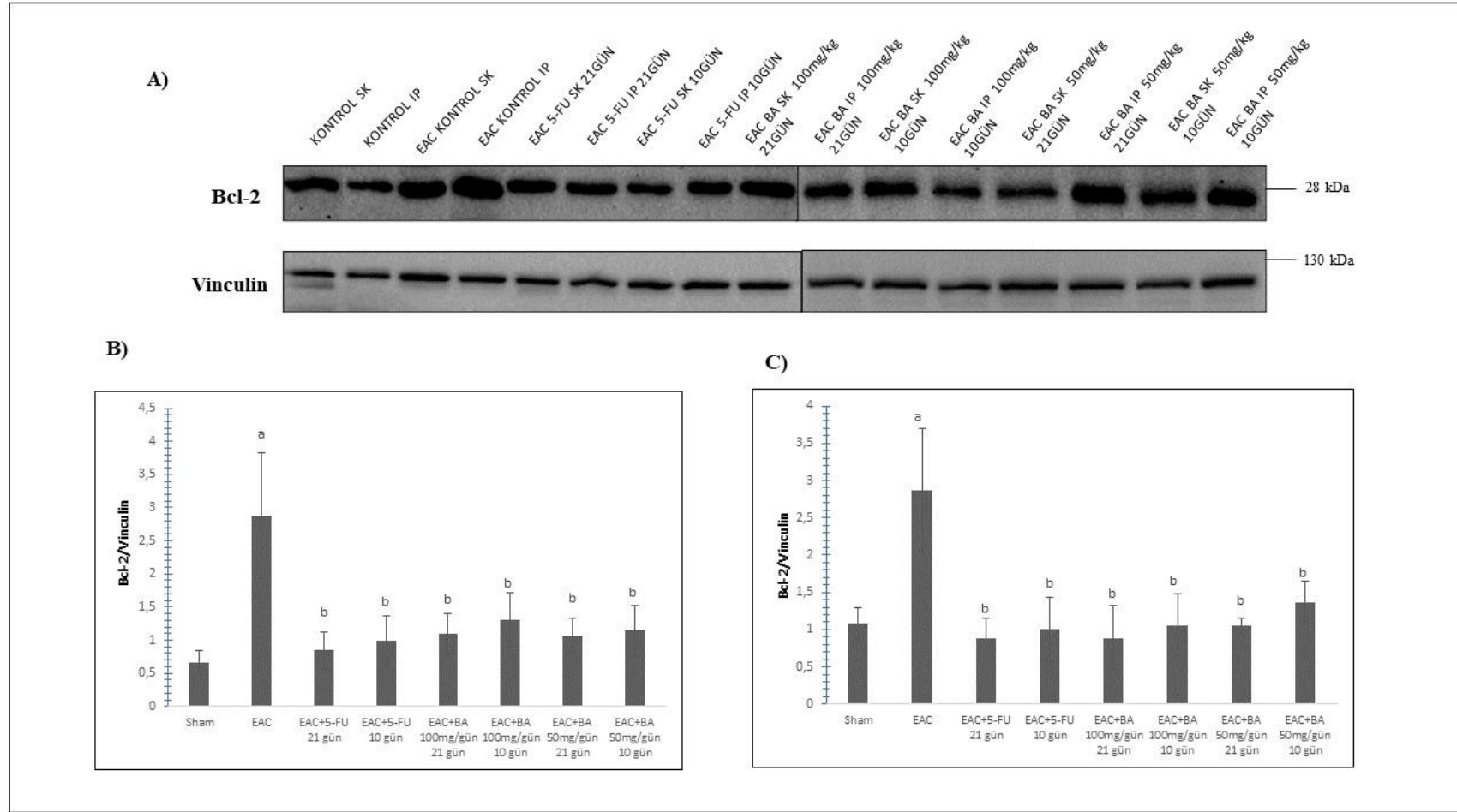
Bax protein ekspresyon düzeyleri s.k. gruplar arası Sham ve EAC kontrol gruplarına kıyasla EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.019$ ve $0,0001$) grubunda anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 10 gün, EAC+BA 100 mg/kg 10 gün, EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün gruplarında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmedi (Resim 8).



Resim 8. İ.p. ve s.k. gruplar arası BAX protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** Bax proteini western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası BAX protein seviyeleri grafiği **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası BAX protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

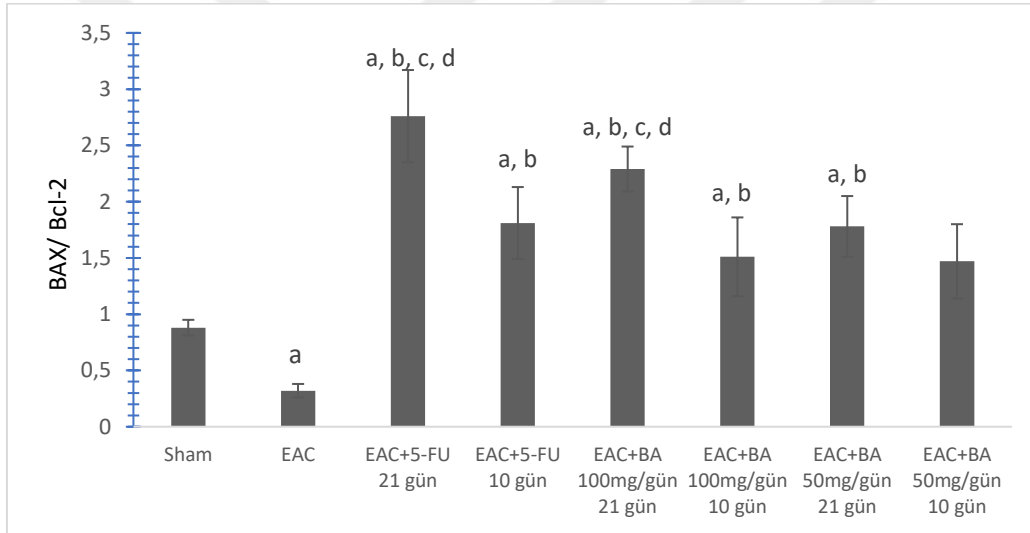
İntraperitoneal gruplar arası Bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri EAC kontrol grubunda ($p=0.0001$) Sham kontrol grubuna göre artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$) grubunun, EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$) grubunun, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) grubunun, EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) grubunun, EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) grubu EAC kontrol grubuna göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Resim 9).

Subkutan gruplar arası Bcl-2 seviyeleri Sham kontrol grubuyla karşılaştırıldığında EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda yüksek bulunurken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) gruplarında da EAC kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Resim 9).



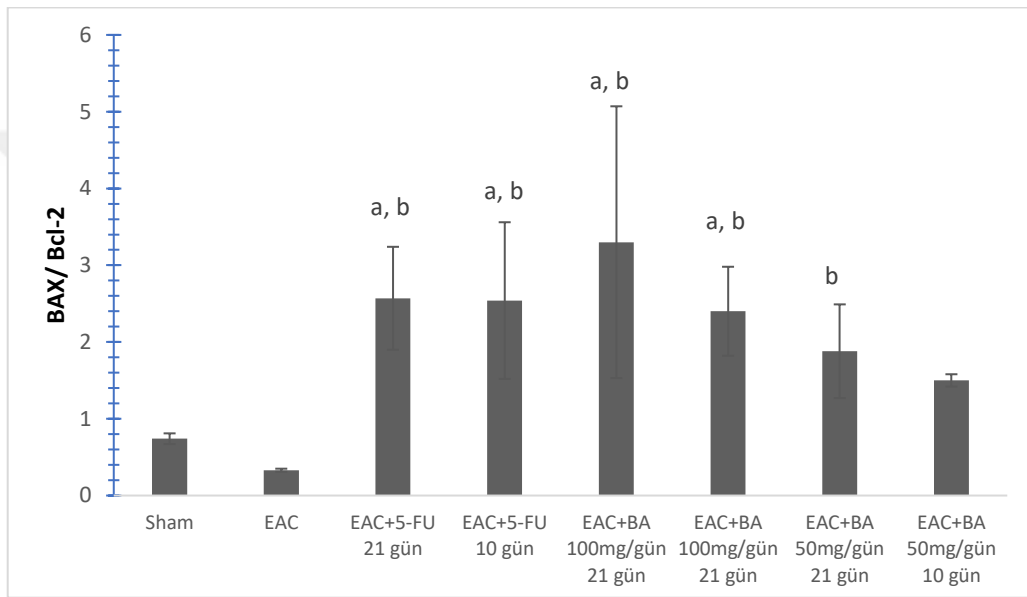
Resim 9. İ.p. ve s.k. gruplar arası Bcl-2 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** Bcl-2 proteini western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası Bcl-2 protein seviyeleri grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası Bcl-2 protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.001$).

Bax ve Bcl-2 protein seviyelerine göre i.p. gruplarda Bax/Bcl-2 oranlaması yapıldığında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. EAC kontrol ($p=0.024$) grubu Sham kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdi. Sham ve EAC kontrol gruplarına göre EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.0001$) grubu, EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.0001$) grubu, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.0001$) grubu, EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.008$ ve $p=0.0001$) grubu ($p=0.0001$ ve 0.0001) grubun, EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.014$ ve $p=0.0001$) grubu anlamlı yüksek bulundu. Ayrıca EAC+5-FU 10 gün ve EAC+BA 50 mg/kg 21 gün gruplarına kıyasla EAC+5-FU 21 gün (sırasıyla $p=0.0001$ ve $p=0.0001$) grubunda Bax/Bcl-2 protein seviyeleri artış gösterdi. Benzer şekilde EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün gruplarına göre EAC+BA 100 mg/kg 21 gün (sırasıyla $p=0.0001$ ve $p=0.0001$) gruplarında yüksek bulundu (Şekil 15).



Şekil 15. Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası BAX/Bcl-2 protein seviyeleri oranı grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

Bax protein seviyelerinin Bcl-2 protein seviyelerine oranına göre de s.k. gruplar arası anlamlı fark bulundu. Buna göre Bax/Bcl-2 düzeyleri Sham ve EAC kontrol gruplarına kıyasla EAC+5-FU 21 gün ($p=0.008$ ve $p=0.001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.001$ ve $p=0.001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0021$ ve $p=0.002$) gruplarında anlamlı artış gösterdi. Ayrıca EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.039$) grubunda Bax/Bcl-2 oranı EAC kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Şekil 16).



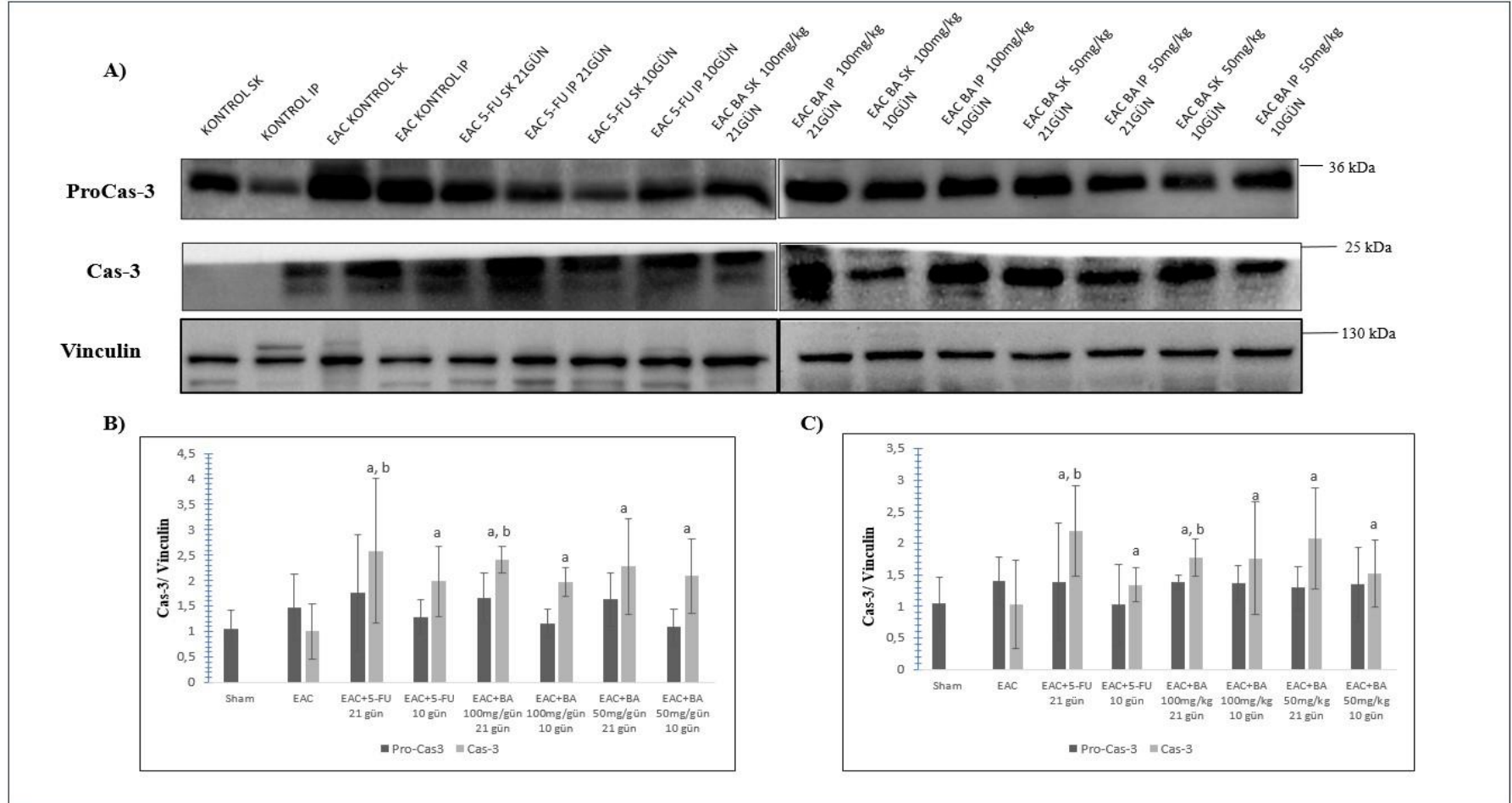
Şekil 16. Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası BAX/Bcl-2 protein seviyeleri oranı grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0.05$).

İntraperitoneal gruplar arası ProCas-3 seviyelerinde istatistiksel fark bulunmazken, aktif cas-3 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Sham ve EAC kontrol gruplarına göre EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.035$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.041$) gruplarında Cas-3 protein ekspresyonlarında artış gözlemlendi. Aynı zamanda EAC+5-FU 10 gün ($p=0.008$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.002$) gruplarında da Sham kontrol grubuna nazaran artış bulundu (Resim 10).

Prokaspas-3 protein ekspresyon seviyelerinde s.k. gruplar arası anlamlı farklılık gözlenmezken, aktif Cas3 protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu. Buna göre Sham ve EAC kontrol gruplarına göre EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.013$)

grubunda, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.039$) grubunda Cas-3 protein seviyeleri yüksek bulundu. Aynı zamanda EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$) grubu, EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.001$) grubu, EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.0001$), EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.0001$) grubu Cas-3 protein seviyeleri Sham grubuna göre anlamlı artış gösterdi (Resim 10).





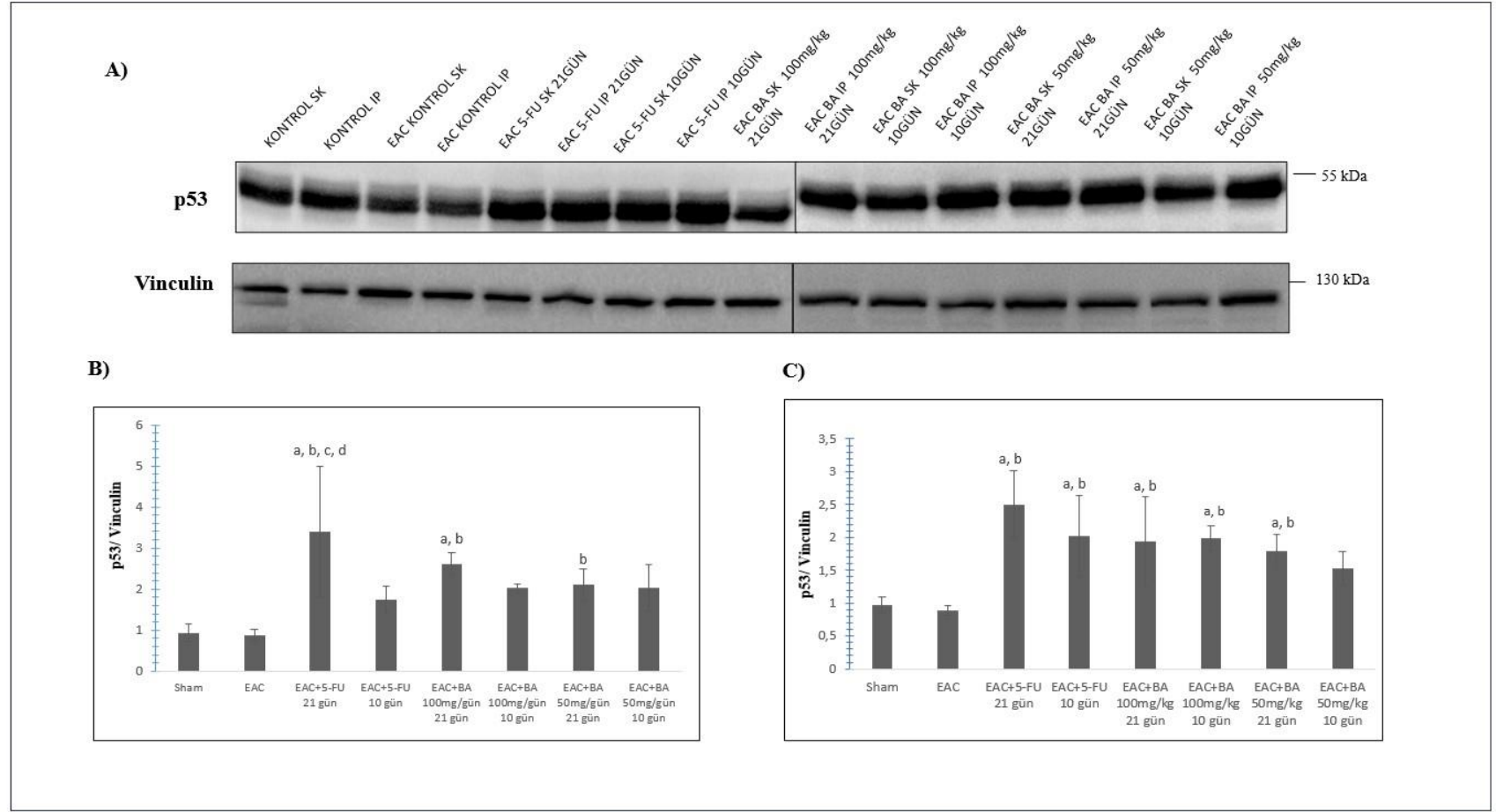
Resim 10. İ.p. ve s.k. gruplar arası ProCas-3 ve Cas-3 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** Cas-3 proteinlerinin western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası ProCas-3/Cas-3 protein seviyeleri grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası ProCas-3/Cas-3 protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

4.5. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitonel ve Subkutan Gruplar Arası Hücre Döngüsü Kontrolünün Değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında Ehrlich solid tümör doku numunelerinde hücre döngüsü kontrolünün değerlendirilmesi amacıyla gruplar arası p53 ve p21 protein ekspresyonları değişimleri western blot yöntemiyle analiz edildi. İlgili proteinlere ait membran görüntüleri ve proteinlerin n=6 üzerinden ortalama bant yoğunlukları hesaplanarak hazırlanan grafikler Resim 11 ve Resim 12 de verildi.

Western blot analizi sonucunda elde edilen bant yoğunluklarına göre 5-FU ve BA'nın i.p. olarak uygulandığı gruplar arasında p53 protein seviyelerinde istatistiksel olarak fark bulundu. Buna göre Sham ve EAC kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.0001$) grubunda, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.001$ ve $p=0.001$) grubunda p53 ekspresyonu anlamlı yüksek bulundu. Ayrıca p53 protein düzeyinin EAC BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.039$) grubunda EAC kontrol grubuna göre artışı, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.001$ ve $p=0.022$) grubunda EAC+5-FU 10 gün ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün gruplarına göre artışı anlamlı bulundu (Resim 11).

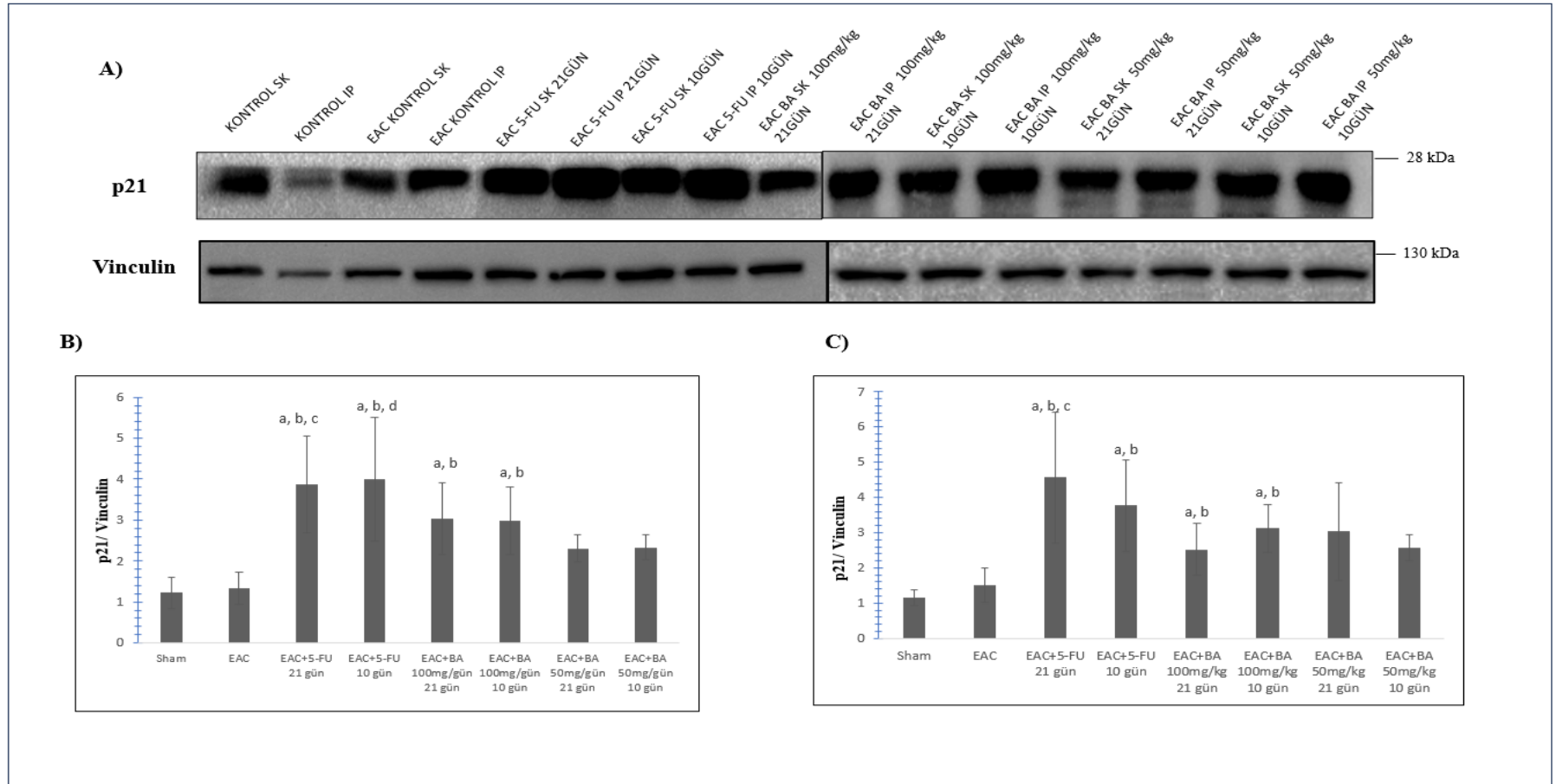
Bornil asetat ve 5-FU'nun s.k. uygulandığı tümör doku numunelerinde p53 protein ekspresyonları Sham ve EAC kontrol gruplarıyla kıyaslandığında EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.001$ ve $p=0.0001$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.003$ ve $p=0.001$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.002$ ve $p=0.001$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.018$ ve $p=0.006$) gruplarında anlamlı olarak yüksek bulundu. (Resim 11).



Resim 11. İ.p. ve s.k. gruplar arası p53 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** p53 proteinlerinin western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası p53 protein seviyeleri grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası p53 protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre, c: EAC+5-FU 10 gün grubuna göre, d: EAC+BA 50mg/kg 21gün grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

İntraperitoneal BA ve 5-FU uygulanan gruplar arası p21 protein ekspresyon düzeylerinde Sham ve EAC kontrol gruplarına kıyasla EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.0001$) grubunda, EAC+5-FU 10 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.001$) grubunda, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.011$ ve $p=0.02$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.015$ ve $p=0.027$) grubunda artış gözlemlendi. Aynı zamanda EAC+5-FU 21 gün ($p=0.045$) grubu EAC+BA 50 mg/kg 21 gün grubuyla karşılaştırıldığında ve EAC+5-FU 10 gün ($p=0.024$) grubu EAC+BA 50 mg/kg 10 gün grubuyla karşılaştırıldığında p21 protein düzeyleri anlamlı artış gösterdi (Resim 12).

Subkutan gruplar arası p21 protein ekspresyon düzeyleri EAC+5-FU 21 gün ($p=0.0001$ ve $p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.002$ ve $p=0.014$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.041$ ve $p=0.039$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.037$ ve $p=0.037$) gruplarında sırasıyla Sham ve EAC kontrol gruplarına göre anlamlı yüksek bulundu (Resim 12).



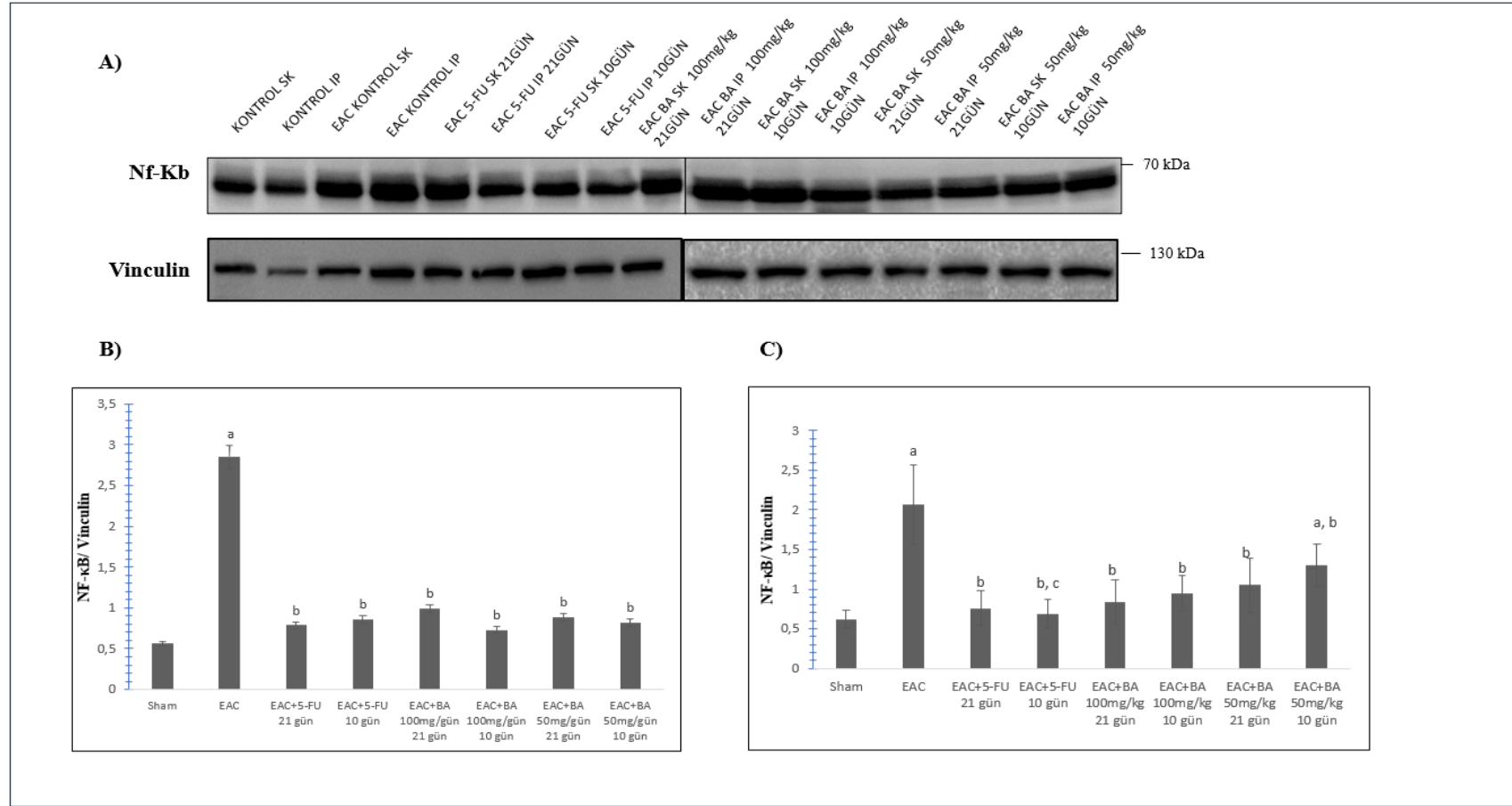
Resim 12. İ.p. ve s.k. gruplar arası p21 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** p53 proteinlerinin western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası p21 protein seviyeleri grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası p21 protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre, c: EAC+BA 50 mg/kg 21 gün grubuna göre, d: EAC+BA 50 mg/kg 10 gün grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

4.6. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitonel ve Subkutan Gruplar Arası İnflamasyonun Değerlendirilmesi

Tamamlanan tez çalışmasında EAC solid tümör modelinde 5-FU ve BA'nın i.p. ve s.k. uygulamalarının inflamasyon üzerine etkisinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla NF- κ B protein ekspresyon analizi n=6 üzerinden western blot yöntemiyle gerçekleştirildi. Elde edilen verilerine göre i.p. ve s.k. gruplar arası NF- κ B protein ekspresyon görüntüleri ve western blot bant yoğunluklarına göre oluşturulan bar grafiği Resim 13'de verildi.

İntraperitonel uygulanan NF- κ B protein ekspresyon seviyeleri Sham kontrol grubuna göre EAC+5-FU 21 gün (p=0.0001) grubunda anlamlı artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün (p=0.0001), EAC+5-FU 10 gün (p=0.0001), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün (p=0.0001), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün (p=0.0001), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün (p=0.0001) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün (p=0.0001) gruplarında EAC kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Resim 13).

Bornil asetat ve karşılaştırmalı olarak 5-FU'nun s.k. olarak uygulandığı gruplar arasında EAC Kontrol (p=0.0001) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün (p=0.04) gruplarında NF- κ B protein ekspresyon düzeyleri Sham grubuna göre anlamlı artış gösterdi. Ayrıca EAC Kontrol grubuyla kıyaslandığında EAC+5-FU 21 gün (p=0.0001), EAC+5-FU 10 gün (p=0.0001), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün (p=0.0001), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün (p=0.0001), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün (p=0.0001) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün (p=0.001) gruplarında da anlamlı artış bulundu (Resim 13).



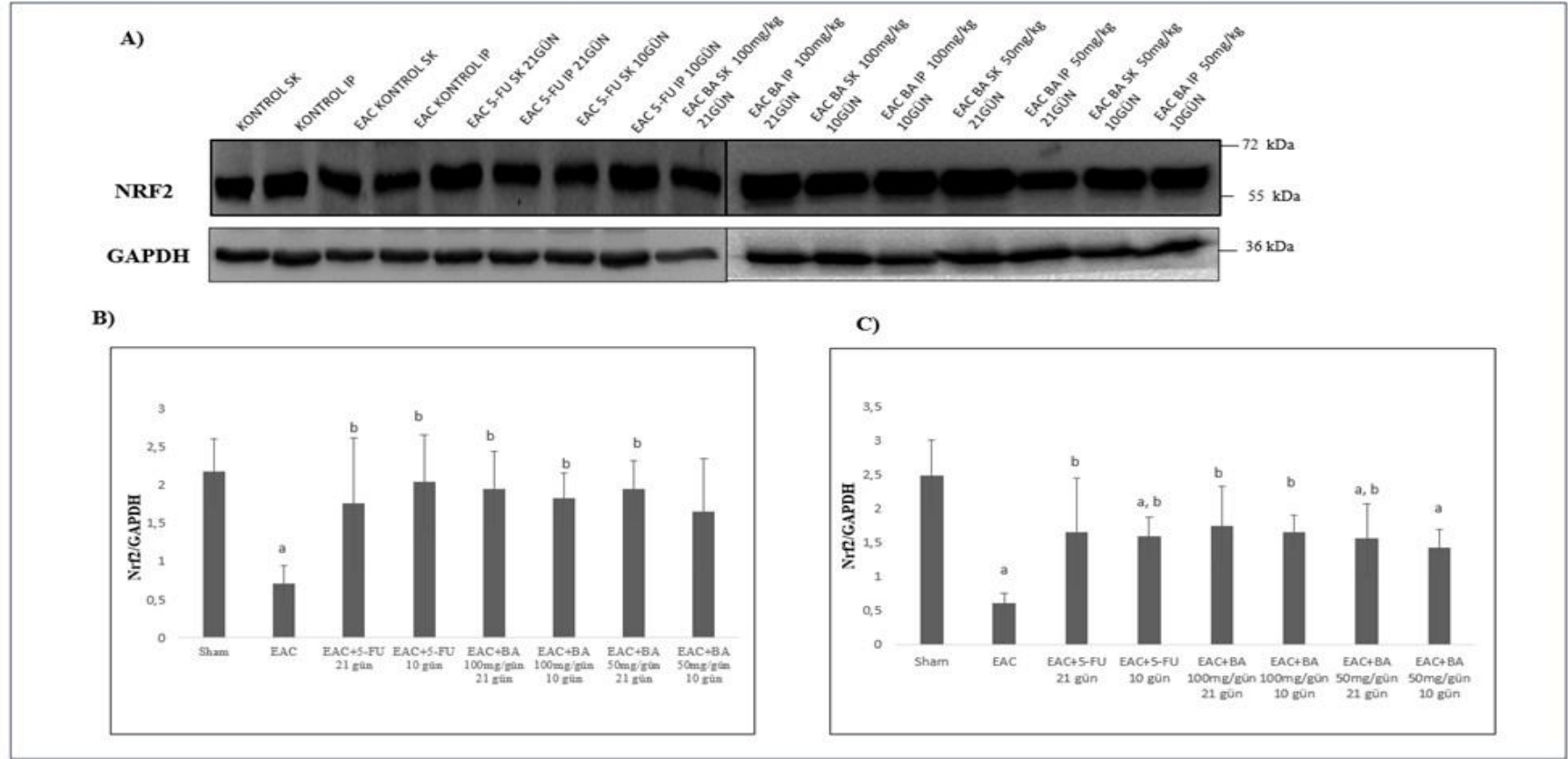
Resim 13. İ.p. ve s.k. gruplar arası NF-κB protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** NF-κB proteinlerinin western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası NF-κB protein seviyeleri grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası NF-κB protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama ± SD olarak verildi a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre, c: EAC+BA 50 mg/kg 10 gün grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

4.7. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Antioksidan Kapasitenin Değerlendirilmesi

Çalışmada EAC tümör modelinde BA'nın ve karşılaştırmalı olarak 5-FU'nun i.p. ve s.k. gruplar arası antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla Nrf2 protein seviyeleri n=6 üzerinden western blot yöntemiyle tayin edildi. İlgili grupların bant görüntüleri ve bant yoğunluklarına göre elde edilen bar grafikleri Resim 14'de verildi.

Gruplar arası i.p. uygulanma yoluna ve süresine göre Nrf2 protein ekspresyon seviyeleri EAC Kontrol ($p=0.0001$) grubunda Sham kontrol grubuna göre yüksek bulunurken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.032$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.003$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.006$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.019$) ve EAC BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.006$) gruplarında EAC kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek bulundu (Resim 14).

Subkutan gruplar arası Nrf2 protein ekspresyon düzeyleri Sham kontrol grubuna kıyasla EAC kontrol ($p=0.0001$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.041$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.027$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.008$) gruplarında anlamlı artış gösterdi. Aynı zamanda EAC+5-FU 21 gün ($p=0.007$), EAC+5-FU 10 gün ($p=0.014$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.003$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.008$) ve EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.021$) gruplarında Nrf2 protein seviyeleri EAC kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (Resim 14).



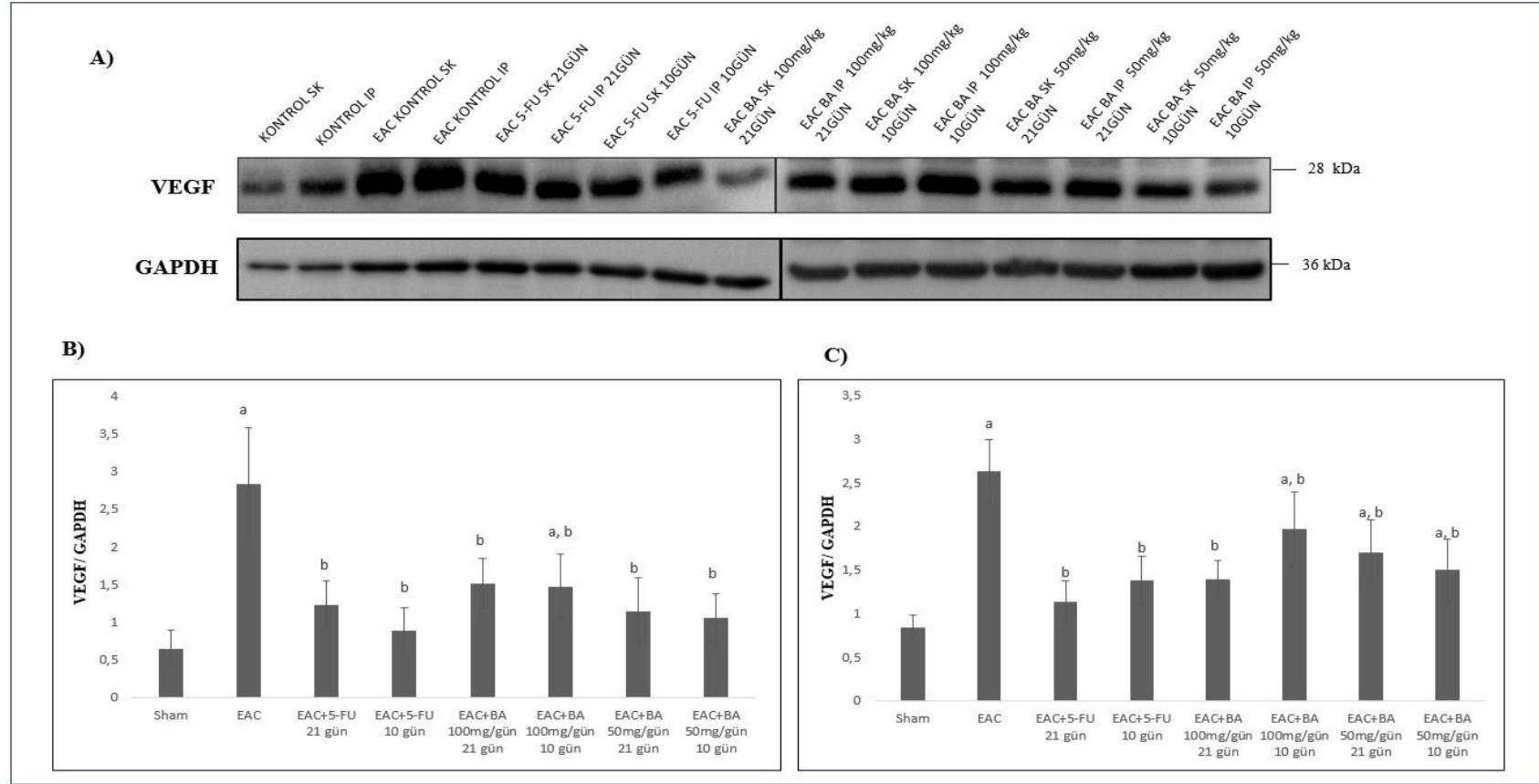
Resim 14. İ.p. ve s.k. gruplar arası Nrf2 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** Nrf2 proteinlerinin western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası NF- κ B protein seviyeleri grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası Nrf2 protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre, c: EAC+BA 50 mg/kg 10 gün grubuna göre anlamlı farkı gösterir ($p<0.05$).

4.8. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitonel ve Subkutan Gruplar Arası Anjiyogenezin Değerlendirilmesi

Bornil asetat ve 5-FU'nun i.p. ve s.k. olarak uygulandığı gruplar arasında EAC tümör modelinde anjiyogenezin belirlenmesi amacıyla VEGF ve MMP-9 protein ekspresyonları n=6 üzerinden western blot yöntemiyle ölçüldü. Bant yoğunluklarına göre elde edilen bar grafiği ve bant görüntüleri ise Resim 15 ve Resim 16'da verildi.

Borni asetat ve 5-FU'nun gruplar arası i.p. uygulanma yollarına göre VEGF protein ekspresyonu EAC kontrol (p=0.0001) ve EAC+BA 100 mg/kg 10 gün (p=0.003) gruplarında Sham grubuna kıyasla artış gösterirken, EAC+5-FU 21 gün (p=0.0001) ve EAC+5-FU 10 gün (p=0.0001), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün (p=0.0001), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün (p=0.0001), EAC BA 50 mg/kg 21 gün (p=0.0001) ve EAC BA 50 mg/kg 10 gün (p=0.0001) gruplarında EAC kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi (Resim 15).

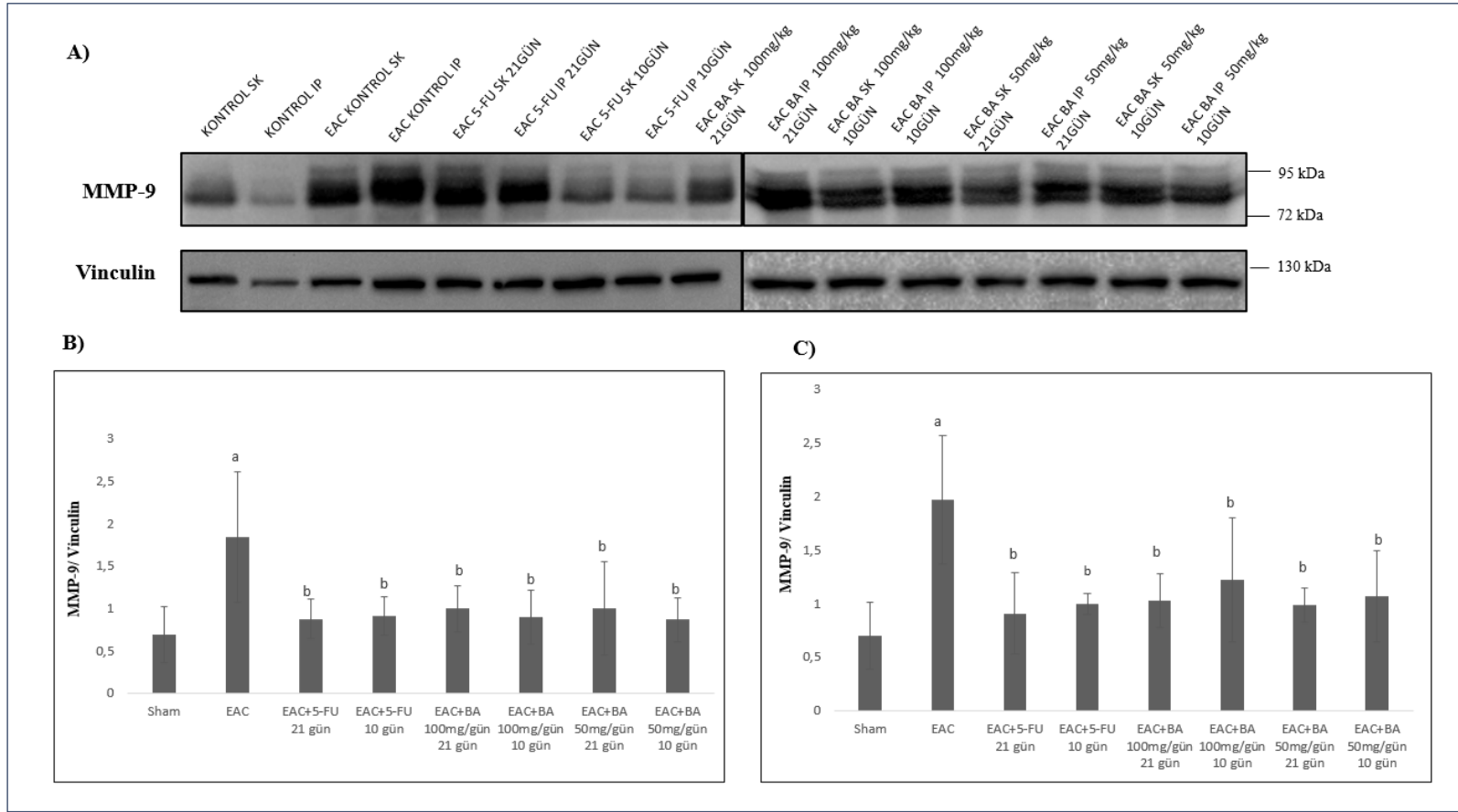
Subkutan gruplar arası VEGF protein düzeyleri Sham kontrol grubuyla karşılaştırıldığında EAC kontrol (p=0.0001), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün (p=0.0001), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün (p=0.0001) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün (p=0.013) gruplarında anlamlı artış görülürken, EAC+5FU 21 gün (p=0.0001), EAC+5FU 10 gün (p=0.0001), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün (p=0.0001), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün (p=0.015), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün (p=0.0001) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün (p=0.001) gruplarında da EAC kontrol grubuna göre anlamlı artış bulundu (Resim 15).



Resim 15. İ.p. ve s.k. gruplar arası VEGF protein seviyelerinin western blot analizi sonuçları (n=6). **A)** VEGF proteinlerinin western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası NF- κ B protein seviyeleri grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası VEGF protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

Matriks metalloproteinaz-9 protein düzeyleri i.p. gruplar arasında Sham grubuyla karşılaştırıldığında EAC kontrol ($p=0.002$) grubunda yüksek bulunurken, EAC+5-FU 21 gün ($p=0.016$) ve EAC+5-FU 10 gün ($p=0.021$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.042$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.019$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.046$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.015$) gruplarında EAC kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Resim 16).

Gruplar arası MMP-9 protein ekspresyonları s.k. Sham grubuna göre EAC kontrol ($p=0.0001$) grubunda anlamlı yüksek bulundu. Ayrıca EAC+5FU 21 gün ($p=0.001$), EAC+5FU 10 gün ($p=0.002$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ($p=0.003$), EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.032$), EAC+BA 50 mg/kg 21 gün ($p=0.002$) ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün ($p=0.006$) gruplarında da EAC kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterdi (Resim 16).

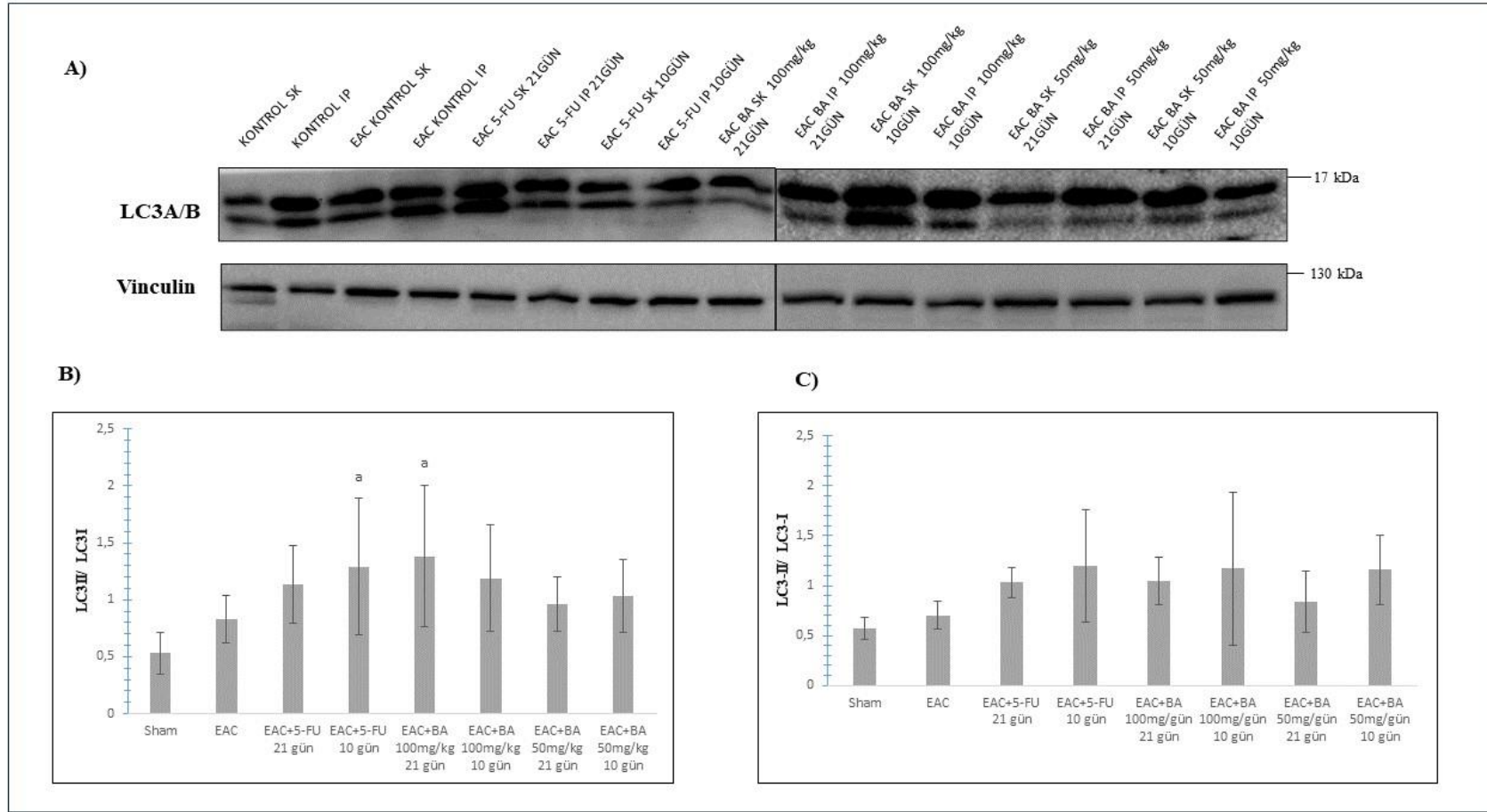


Resim 16. İ.p. ve s.k. gruplar arası MMP-9 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** MMP-9 proteinlerinin western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası MMP-9 protein seviyeleri grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası MMP-9 protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre, b: EAC Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

4.9. Tumor Doku Numunelerinde Bornil Asetatın i.p. ve s.k. Gruplar Arası Otofajinin Değerlendirilmesi

Bornil asetat ve 5-FU'nun i.p. ve s.k. olarak uygulandığı gruplar arasında EAC tumor modelinde otofaji seviyelerinin belirlenmesi amacıyla LC3II/I ve Beclin-1 protein ekspresyonları n=6 üzerinden western blot yöntemiyle ölçüldü. Bant yoğunluklarına göre elde edilen bar grafikleri ve bant görüntüleri Resim 17 ve Resim 18'de verildi.



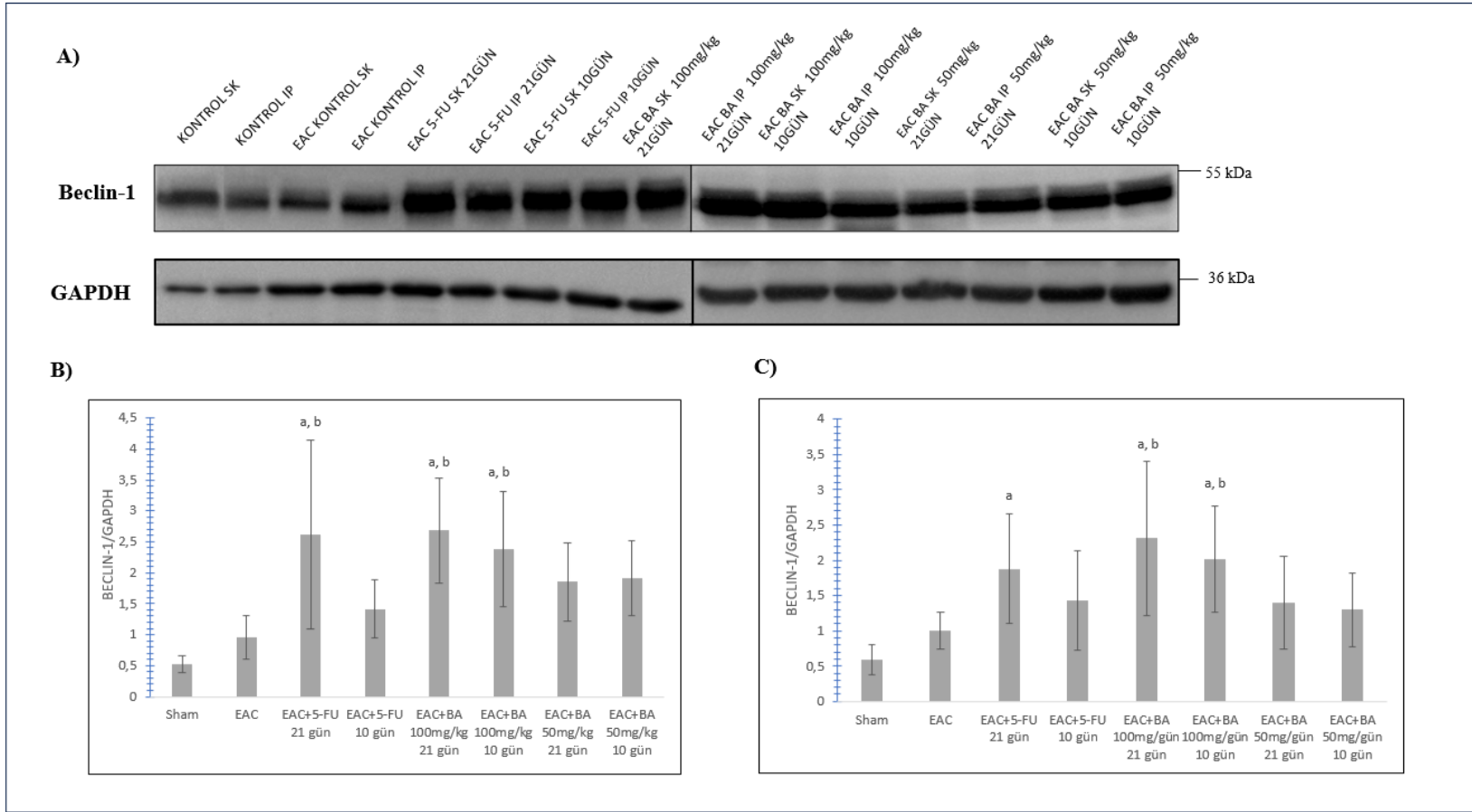


Resim 17. İ.p. ve s.k. gruplar arası LC3II/LC3I protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** LC3II/LC3I proteinlerinin western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası LC3II/LC3I protein seviyeleri oranı grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası LC3II/LC3I protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

Beclin-1 protein düzeyleri i.p. gruplar arasında Sham ve EAC Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında EAC+5-FU 21 gün (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.016$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.012$) ve EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.005$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (Resim 17).

İntraperitoneal uygulamalı gruplar arası BECLIN-1 ekspresyonunun Sham ve EAC Kontrol gruplarına göre EAC+5-FU 21 gün (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.035$), EAC+BA 100 mg/kg 21 gün (sırasıyla $p=0.002$ ve $p=0.035$) ve EAC+BA 100 mg/kg 10 gün ($p=0.016$) gruplarında hesaplanan artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Resim 17).

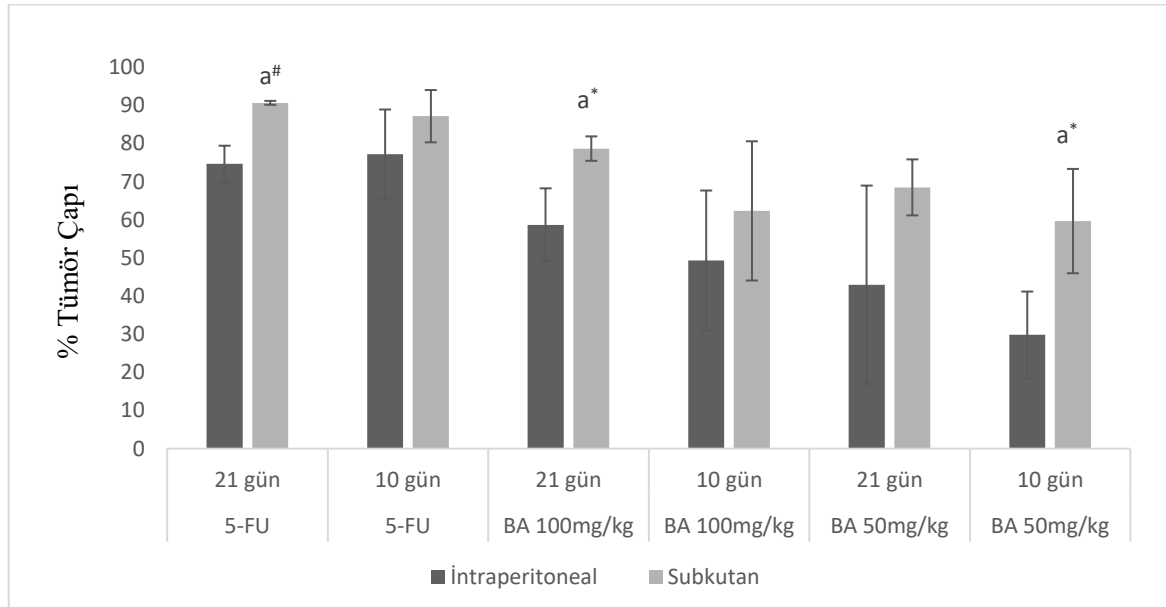




Resim 18. i.p. ve s.k. gruplar arası Beclin-1 protein seviyelerinin western blot analiz sonuçları (n=6). **A)** Beclin-1 proteinlerinin western blot bantları. **B)** Western blot bant yoğunluklarına göre i.p. gruplar arası BECLIN-1 protein seviyeleri grafiği. **C)** Western blot bant yoğunluklarına göre s.k. gruplar arası BECLIN-1 protein seviyeleri grafiği. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Sham Kontrol grubuna göre anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

4.10. İntraperitoneal ve Subkutan İlaç Uygulama Yollarına Bağlı Olarak Tümör Çapı Değerlendirilmesi

Çalışmada BA ve 5-FU s.k. ve i.p. olmak üzere 2 farklı yolla tümör hedefli olarak uygulanmıştır. Bu bağlamda tümör çapı yüzde azalma değerleri karşılaştırıldığında s.k. olarak uygulanan EAC+5-FU 21 gün, EAC+BA 100 mg/kg 21 gün ve EAC+BA 50 mg/kg 10 gün gruplarının i.p. uygulanan eş değer gruplarında belirlenen azalma anlamlı bulundu ($p<0.005$) (Şekil 17).



Şekil 17. BA ve 5-FU uygulamalarının i.p. ve s.k. gruplar arası % tümör volümü sonuçları. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. a: Aynı ilacın İntraperitoneal İntraperitoneal uygulamasına göre anlamlı fark bulundu (* $p<0.005$; # $p<0.001$).

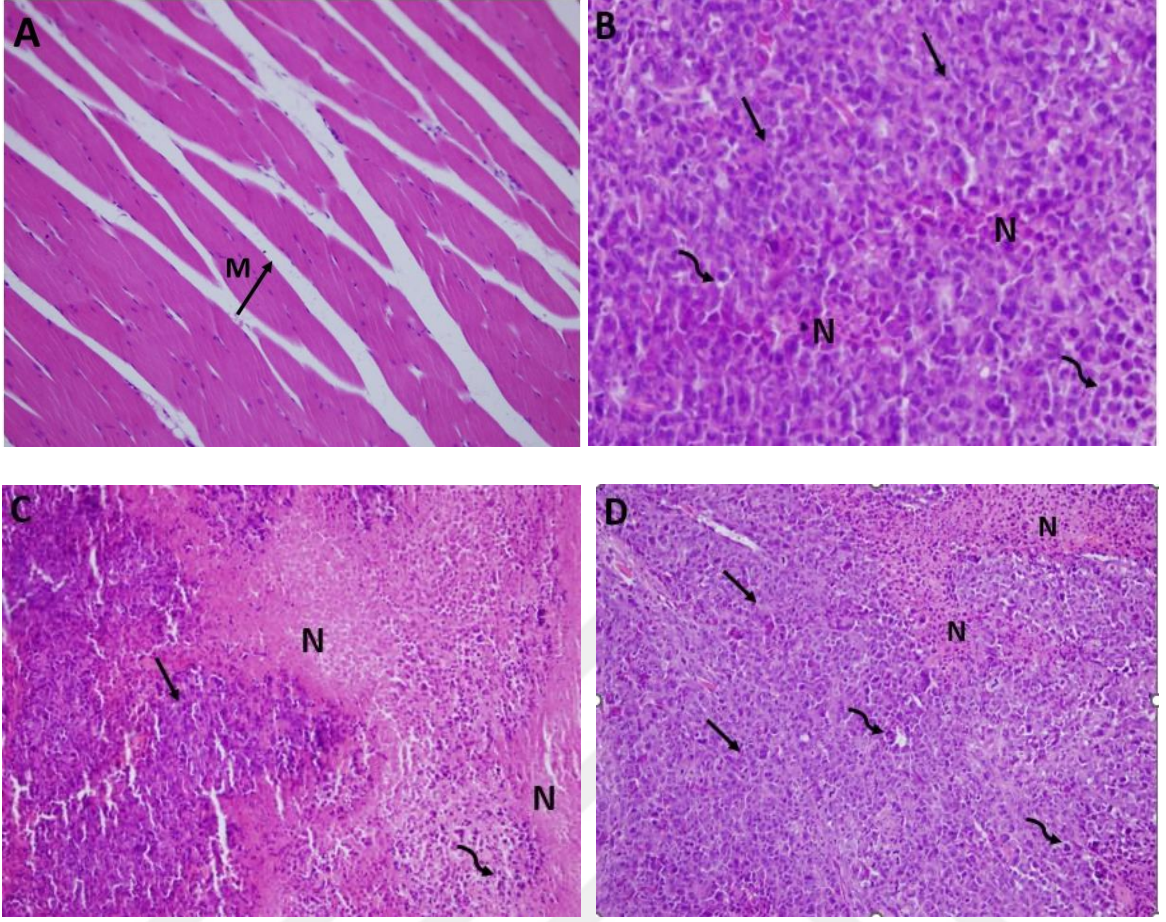
4.11. Histopatolojik Değerlendirme

4.11.1. Tümör Doku Numunelerinde Bornil Asetatın İntraperitoneal ve Subkutan Gruplar Arası Histopatolojik Değerlendirilmesi

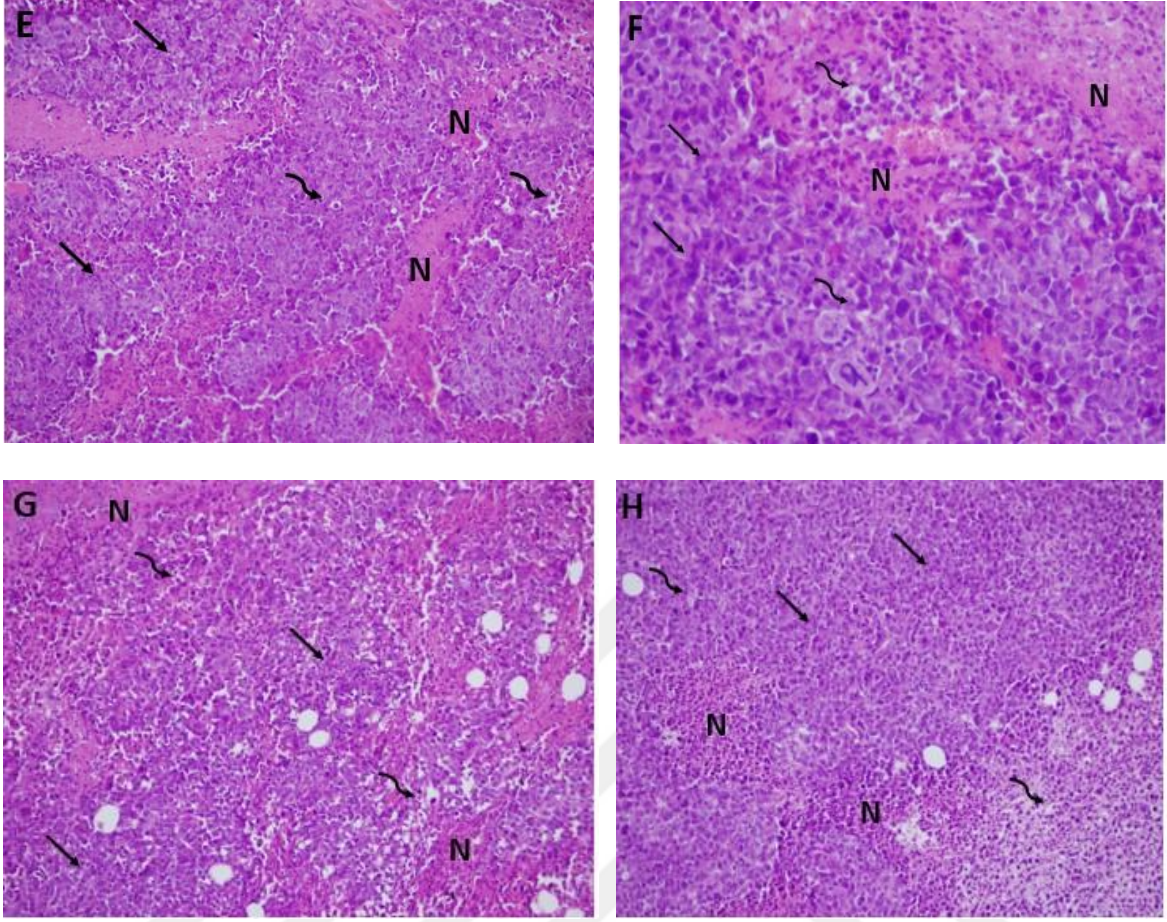
Bornil asetatın i.p. ve s.k. olarak uygulandığı gruplarda kas ve tümör dokularının histolojik incelemesinde, sağlıklı Sham kontrol gruplarında (i.p. ve s.k.) iskelet kaslarında belirgin sınırlı normal kas lifleri ve periferik yerleşimli çekirdekler görüldü. Aksine, EAC tümör kontrol gruplarında (i.p. ve s.k) iskelet kasları, birkaç dağınık apoptotik hücre ve küçük nekroz alanları ile tahrip edilmiş kas lifleri arasına sızan belirgin derecede canlı ve nodüllerden oluşan infiltrat tümör hücrelerinden oluşan tabakalar görüldü. Hem i.p. hem de

s.k. uygulamalarda 21 gün deney süresince iki günde bir toplam 10 doz 5-FU 50 mg/kg enjekte edilen farelerin iskelet kaslarında belirgin biçimde hasar görmüş, düzensiz, belirsiz hücre sınırları, apoptotik hücreler ve belirgin derecede nekrotik alanlar tespit edildi. Benzer şekilde tümör hücre inokülasyonundan sonra 10.gün itibariyle 2 günde bir toplam 5 doz uygulanan 5-FU 50 mg/kg gruplarında EAC+5-FU 21 gün gruplarına nazaran daha az nekrotik alan ve azalmış apoptotik hücreler belirlendi. BA'nın 21 gün süresince 100 mg/kg konsantrasyon ile toplamda 10 doz uygulandığı gruplarımızda belirgin nekrotik alanlar, dağınık apoptotik canlı tümör hücreleri ve daha belirgin hücre sınırlarına sahip doku alanları görüldü. BA'nın tümör inokülasyonundan sonra 10.gün itibariyle toplamda 5 doz olarak uygulandığı gruplarımızda EAC+BA 100mg/kg 21 gün gruplarımıza benzer şekilde belirginleşmiş sınırlara sahip hücre sınırlarına sahip doku alanları, dağınık apoptotik tümör hücreleri ve azalmış nekrotik alanlar bulundu. BA'nın 50 mg/kg olarak 21 gün ve 10 gün uygulandığı gruplarda 5-FU ve BA 21 gün/10 gün uygulamalarına nazaran daha küçük nekrotik alanlar, yoğun canlı ve sınırları net olmayan, infiltre tümör hücre tabakaları görüldü (Şekil 18- Şekil 21).

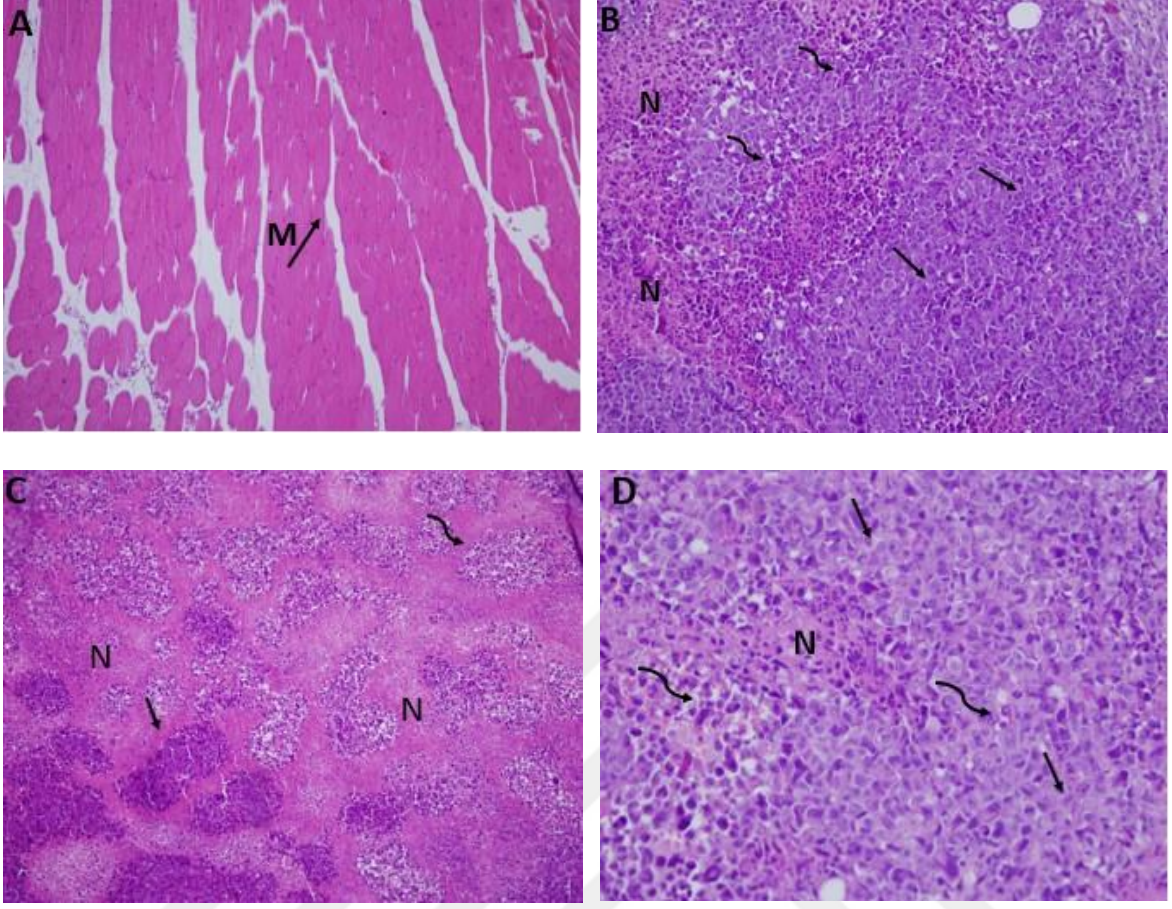
Bornil asetat ve 5-FU'nun s.k. ve i.p. olarak uygulandığı gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında ise BA ve 5-FU'nun s.k. uygulandığı grupların i.p. uygulama gruplarına göre daha başarılı etki görülmüştür.



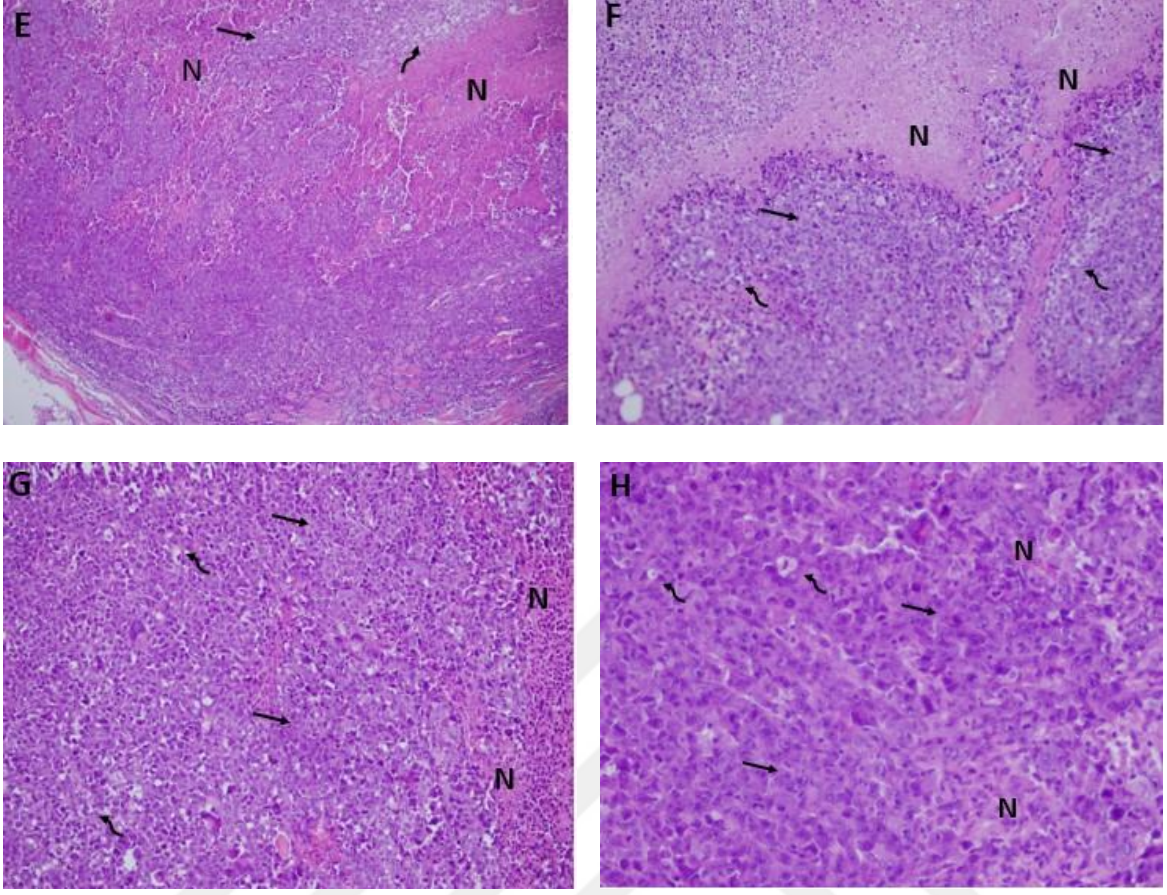
Şekil 18. Bornil Asetat ve 5-FU'nun i.p. uygulamalarının Ehrlich Tümör Hücreleri üzerine etkilerinin histopatolojik görüntüleri. Nekrotik alan (N), Tümör hücreleri (Düz Ok), Apoptotik Hücre (Eğri Ok). **A:** Sham Kontrol (**x20**), **B:** EAC Kontrol (**x40**), **C:** EAC+5-FU 21 gün (**x10**), **D:** EAC+5-FU 10 gün (**x20**)



Şekil 19. Bornil Asetat ve 5-FU'nun i.p. uygulamalarının Ehrlich Tümör Hücreleri üzerine etkilerinin histopatolojik görüntüleri. Nekrotik alan (N), Tümör hücreleri (Düz Ok), Apoptotik Hücre (Eğri Ok). **E:** EAC+BA 100mg/kg 21 gün (**x20**), **F:** EAC+BA 100mg/kg 10 gün (**x40**), **G:** EAC+BA 50mg/kg 21 gün (**x20**), **H:** EAC+BA 50mg/kg 10 gün (**x20**)



Şekil 20. Bornil Asetat ve 5-FU'nun s.k. uygulamalarının Ehrlich Tümör Hücreleri üzerine etkilerinin histopatolojik görüntüleri. Nekrotik alan (N), Tümör hücreleri (Düz Ok), Apoptotik Hücre (Eğri Ok). **A:** Sham Kontrol (**x20**), **B:** EAC Kontrol (**x20**), **C:** EAC+5-FU 21 gün (**x10**), **D:** EAC+5-FU 10 gün (**x40**)



Şekil 21. Bornil Asetat ve 5-FU'nun s.k. uygulamalarında Ehrlich Tümör Hücrelerinin histopatolojik görüntüleri. Nekrotik alan (N), Tümör hücreleri (Düz Ok), Apoptotik Hücre (Eğri Ok). **E:** EAC+BA 100mg/kg 21 gün (**x10**), **F:** EAC+BA 100mg/kg 10 gün (**x10**), **G:** EAC+BA 50mg/kg 21 gün (**x20**), **H:** EAC+BA 50mg/kg 10 gün (**x40**)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre kansere vakaları ve kansere bağlı ölüm oranları giderek artmaktadır ve bu nedenle Akademik araştırmaların ana odak noktası olan kanserin ortaya çıkış ve gelişim mekanizmalarının derinlemesine araştırılması, tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır (1, 25).

Tıpta geleneksel kanser tedavisinde cerrahi girişim, kemoterapi, radyoterapi, hormon replasmanı ve immunoterapi temel tedavi yöntemleridir (5). Fizyolojik dengeyi bozan kemoterapötik tedavi süresince birçok organ olumsuz etkilenir (8, 151). Son zamanlarda hedefe yönelik terapiler, akıllı kemoterapötikler ve immünoterapiler gibi yeni terapötik yöntemler, geleneksel terapilerle kıyaslandığında, kanser hastalarının sağ kalım oranlarını kayda değer ölçüde artırmaktadır (7).

Klinik uygulamada kemoterapi protokolü; yaygın olarak oral kemoterapi ve intravenöz kemoterapi şeklinde uygulanmaktadır. İntravenöz kemoterapinin uygulanma süresinin uzun olması, kemoterapötüğün etkinliğini arttırmak amaçlı doz artışlarının metabolik olarak tolere edilememesiyle yoğun yan etkilerin görülmesi, çevre doku ve organlarda hasarlara neden olmaları, hastanın günlük yaşantısını olumsuz yönde etkilemeleri nedenleriyle yeni arayışlara eğilim artmıştır (152). Literatürde önemli bir yere sahip, hedef özgüllüğü ve potansiyeli yüksek etkili terapötikler olan biyoterapötikler genellikle intravenöz, intramüsküler, intraperitonel veya subkutan enjeksiyonu aracılı hastaya verilirken, *in vivo* çalışmalarda doğal ürünlerin oral ve intraperitonel yolla, kemoterapötiklerin intraperitonel ve intravenöz yollarla uygulamalarına sıkça rastlanılmaktadır (12, 13). Deneysel solid tümör modellerinde doğal ürünlerin ve kemoterapötiklerin doğrudan tümör etkileşimini amaçlayan s.k. enjeksiyona ait çalışmalar ise sınırlıdır (15, 16, 153).

Kırk yılı aşkın bir süreden bu yana meme kanserinin de dahil olduğu pek çok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan en etkin kemoterapötik ajanlardan biri olan 5-FU, Timidilat sentaz enziminin inhibisyonu üzerinden hücre siklus arrestini uyaran ve hücreyi apoptozise yönlendiren kemoterapötik bir ajandır (18, 154). Literatürde 5-FU'nun biyoyararlanımını ve tümör hücrelerindeki etkinlik süresini arttırmak, oluşabilecek yan etkilerini de azaltmak amaçlı doğal ürünlerle kombine tedavilere ait araştırmaların yanı sıra, alternatif doğal ürün arayışları da ayrıca geniş yer tutmaktadır (155). Çalışmamızda başarılı

bir kemoterapötik ajan olmasından dolayı 5-FU'yu, hedef molekülümüz BA'nın antikanser etkinliğinin ortaya konmasında pozitif kontrol olarak seçtik.

Doğal kaynaklardan türetilen bileşikler olarak tanımlanan doğal ürünler, pek çok hastalığın tedavisinde terapötik fayda sağlayabilecek farmakolojik ve biyolojik aktivitelere sahip olmaları nedeniyle yeni ilaçların gelişiminde potansiyel oluşturmaktadırlar (17).

Farklı kültür ve geleneklerin kavşağında yer alan Anadolu'da yapılan flora çalışmalarında, Kelkit ve çevresinde 1010 çeşit bitkinin yetiştiği ve bunlardan 137 bitkinin endemik tür olduğu belirtilmiştir. Halk arasında 'yayla çiçeği- altın otu- ölmez çiçek' isimleriyle bilinen *Helichrysum armenium* endemik türler arasında yer almaktadır. Bitkinin çiçek ve yaprak kısımlarının kromatografik esansiyel yağ analizleri sonucunda limonen, α -cadinol, borneol, δ -cadinen, bornil asetat ana bileşenlerinin varlığı gösterilmiştir (156). Bir monoterpen olan ve anti-inflamatuar özelliğiyle de literatürde geniş yer tutan BA'nın, antitümöral etkinliğini gösteren *in vivo* bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Buradan hareketle çalışmamızda Ehrlich asit hücreleri ile oluşturulan solid tümör modelinde BA'nın pozitif kontrol olarak belirlediğimiz 5-FU ile karşılaştırmalı olarak uygulanma dozuna (50 mg/kg ve 100 mg/kg), uygulanma süresine (21 gün ve 10 gün) ve uygulanma yoluna (s.k. ve i.p.) bağlı olarak antikanserojen etkisi incelendi.

Kanser araştırmalarında büyük öneme sahip olan deneysel tümör modelleri; allograft modelleme, knockout fare modelleri, karsinojen uyarımlı modelleme, hasta kökenli xenograft modelleme olarak sınıflandırılmaktadır (157). Allograft modelleme sınıfında yer alan EAC bu alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk kez dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkan tümörün, Ehrlich ve Apolant tarafından tümör parçalarının fareden fareye transplante edilmesiyle deneysel tümör oluşturulduğu ve hayvan sağ kalım sürelerinin ise ortalama 21 ila 28 gün arasında değişkenlik gösterebildiği bilinmektedir (8). EAC tümör hücre süspansiyonunun s.k. olarak Balb-c farelere uygulanmasıyla oluşturulan solid tümörün karakterize özelliklerinin başında tümör ağırlığıyla fare vücut ağırlığı arasındaki pozitif korelasyon gelmektedir (10). Böylece tümör volümü değişimleri göreceli olarak kolayca belirlenebilmektedir.

Çalışmamızda tümör hücre inokülasyonundan sonra 10.gün itibarıyla 21.güne dek gözlemlenebilen ortalama solid tümör volümüyle, ortalama fare vücut ağırlıkları arası değişim, i.p. ve s.k. uygulanma yollarına göre pozitif kontrol 5-FU ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. İlaçların hem i.p. hem de s.k. uygulanmalarında kemoterapötik ajan 5-FU

uygulanan gruplar hariç, diğer tüm gruplarda Sham kontrol grubuna göre ortalama fare vücut ağırlığındaki artış, tümör volümü artışına paralel, istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Öte yandan yaygın kullanımlı kemoterapötik ajan olan 5-FU'nun s.k. ve i.p. uygulamalarında fare vücut ağırlıklarının, BA'nın uygulandığı tüm gruplarla karşılaştırıldığında, EAC kontrol gruplarına göre daha düşük olması, pozitif kontrol olarak seçilen 5-FU için zaten beklenen bir durumdu. Hassona ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada EAC solid tümör oluşturulan farelerde sentetik bir bileşik olan Paladyum II $[PdLCl].H_2O$ kompleks bileşiğinin antitümöral özelliği Sisplatinle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızla doğrusal olarak EAC tümör gelişimiyle artan fare vücut ağırlığının, $[PdLCl].H_2O$ 'nun i.p. aracılı uygulanan dozuna bağlı olarak azaldığı belirtilmiştir (158). Ellethy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada anti-inflamatuar ilaçların antikanserojen etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla oluşturduğu EAC solid tümör modelinde celecoxibi (Cxb) kullanmıştır. EAC solid tümör oluşumuna bağlı olarak artan ortalama fare vücut ağırlıklarının anti-inflamatuar Cxb'nin 10 gün süresince i.p. olarak enjekte edilmesiyle beraber anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir (159).

Ehrlich assit karsinom solid tümörün subkutan bir tümör modeli olması nedeniyle fare vücut ağırlıklarıyla tümör volümleri arasındaki pozitif korelasyon bilinmektedir. Literatürde yapılan çalışmalara göre tedavi edilen gruplarda gözlenen ağırlık azalışı, tümör volüm azalışıyla paralellik göstermektedir. Gaballah ve arkadaşları oluşturdukları EAC solid tümör modelinde 5-FU (20 mg/kg) ile karşılaştırmalı olarak apigeninin antitümöral etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışma verilerimizle orantılı olarak EAC kontrol grubuna göre Apigenin, 5-FU ve Apigenin + 5-FU kombinasyonlarının i.p. uygulamalarında tümör volümünün anlamlı derecede azaldığını bildirmişlerdir (160). Benzer şekilde Amer ve çalışma grubu EAC solid tümör modeli üzerine silibininin antikanser etkisini herhangi bir kemoterapötik ajanla karşılaştırmaksızın belirlemeyi amaçlamışlar ve EAC kontrol grubuna göre silibininin tümör volümünü anlamlı derecede baskıladığını göstermişlerdir (161). Literatür verileriyle uyumlu olarak çalışmamızda, EAC kontrol gruplarımızda 10.gün itibariyle gelişen tümörle birlikte Sham kontrol grubuna göre ortalama fare vücut ağırlığı artış gösterirken, 5-FU ve BA'nın i.p./s.k. uygulandığı tedavi gruplarında tümör volümünün azalmasıyla ortalama fare vücut ağırlığı da azalış göstermiştir.

Literatürde hem EAC hücrelerinin hem de tedavi amaçlı kullanılan bileşiklerin deney gruplarında karaciğer ve böbrek dokuları üzerine genel etkilerinin değerlendirilmesi

amacıyla serum ALT, AST ve BUN düzeylerinin ölçüldüğü çalışmalar geniş yer tutmaktadır. Çalışmamızda i.p. ve s.k. ilaç uygulamaları neticesinde AST düzeyleri Sham kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda artış gösterirken, ALT ve BUN seviyelerinde Sham kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim görülmemiştir. Sonuçlarımızla farklılık gösterecek şekilde; daha önce Adami ve arkadaşlarının çalıştıkları deneysel modelde EAC solid tümör üzerine *Capsicum annuum*'un (CAP) antineoplastik etkisi metotreksat ile göreceli olarak değerlendirilmiştir. Deney grupları arası AST düzeylerinde Sham kontrol grubuna göre belirlenen artış anlamlı kabul edilirken, ALT seviyelerinde sadece CAP 100 mg/kg ve 150 mg/kg gruplarında Sham kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir (146). Ayrıca Alharbi ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği başka bir çalışmada EAC tümör modeli üzerine oral yolla verilen zencefil yağının antiproliferatif etkisi belirlenmiştir. AST, ALT ve BUN seviyeleri Sham kontrol gruplarına göre artış gösterirken, zencefil yağı uygulanan gruplarda anlamlı fark belirlenmemiştir (162). Çalışmamızda önceki literatürlerden farklı olarak ALT serum düzeylerinden bağımsız olarak gözlenen AST yüksekliği farenin uyluk bölgesinde tutulum yapan s.k. EAC solid tümörünün neden olduğu muhtemel kas doku hasarıyla ilişkilendirilebilir.

Redoks dengesinin oksidanlar lehine kayması olarak tanımlanan oksidatif stresin belirlenmesinde kullanılan biyobelirteçler önem arz etmektedir. EAC hücreleriyle oluşturulan deneysel tümör modellerinde oksidatif stresin ölçülebilmesi amacıyla biyobelirteç olarak MDA, GPx, NOX-1 ve eNOS seviyeleri ölçüldü.

Malondialdehit, TOS, TAS ve OSI seviyeleri, tümör proliferasyonunda oksidatif stresin ve antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde etkin biyobelirteçler olarak bilinmektedirler (163). Çalışmamızda EAC solid tümör modelinde EAC kontrol gruplarında artan MDA seviyeleri, uygulanma yollarına (i.p. ve s.k.), uygulanan doza (50 ve 100 mg/kg) ve sürelerine (21 gün ve 10 gün) göre ayrılan tedavi gruplarında anlamlı düzeyde azalış göstermiştir. Ancak MDA düzeylerindeki azalış baz alındığında, tedavi grupları arasında anlamlı farklılıklar bulunamadı. Literatürde EAC deneysel tümör modeli üzerinde farklı bileşiklerin anti-oksidan, antikanserojen, antiproliferatif özelliklerinin belirlenmesi amacıyla MDA'nın hedef alındığı pek çok çalışma yer almaktadır (164- 167). Mevcut çalışmalar bir bütün olarak ele alındığında bizim çalışmamızla uyumlu olarak, EAC kontrol gruplarında anlamlı olarak yüksek bulunan MDA konsantrasyonlarının tedavi amaçlı farklı bileşiklerin (flavonoidler, sentetik bileşikler, kemoterapötik ajanlar gibi) uygulanmasıyla önemli

seviyelerde azaldığı görülmektedir. Öte yandan EAC kontrol grubunda tümör proliferasyonuna bağlı olarak artan oksidatif stres, TOS ve OSI seviyelerinin yükselmesine neden olurken, TAS seviyelerinin azalmasına neden olmuştur. BA'nın hem i.p hem de s.k. uygulandığı tedavi gruplarında ise TOS seviyelerinin azalırken, TAS seviyelerinin arttığı ortaya konmuştur. Hem pozitif kontrol 5-FU'nun hem de terapötik etkinliği araştırılan BA'nın uygulanma yollarına göre gruplar arası herhangi bir fark bulunamadı. Araştırmamızı destekler nitelikte Meral ve çalışma grubu da EAC tümör modelinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında EAC kontrol grubunda artan TOS, OSI değerlerinin tedavi grubunda azaldığını belirtirken, kontrol grubunda azalan TAS seviyelerinin ise tedavi grubunda arttığını bildirmişlerdir (168). Sekonder metabolitlerinin oksidatif stresi azaltma kabiliyetleri radikal temizleme, metal iyonlarını şelatlama ve antioksidan sistemi aktive edebilme potansiyellerine atfedilmektedir (169). Çalışmamız kapsamında EAC solid tümör modelinde pozitif kontrol olarak 5-FU ve tedavi amaçlı BA'nın uygulanma dozlarına, yollarına ve sürelerine bağlı olarak Nrf2 gen aktivasyonu üzerinden GPx gibi antioksidan enzim kapasitelerini arttırarak tümör proliferasyonu ile yükselen MDA düzeylerini azalttıkları düşünülmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu baskılayan GPx, enzimatik antioksidan savunma sistemleri arasında yer almaktadır (129). Mevcut araştırmada literatüre benzer olarak Sham kontrol grubuna göre EAC kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalan GPx antioksidan enzim seviyelerinin, pozitif kontrol 5-FU ve terapötik aday BA'nın i.p. ve s.k. uygulandığı tedavi gruplarında artış belirlendi. Ancak i.p. ve s.k. ilaç uygulanma yollarına, dozuna ve süresine bağlı olarak tedavi gruplarında EAC kontrol gruplarına göre GPx enzim konsantrasyonlarında göreceli olarak artış saptansa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Öte yandan s.k. olarak uygulanan 5-FU (50 mg/kg) 21 gün grubunda EAC kontrol grubuna göre GPx enzim konsantrasyonları da istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Bu konu ile ilgili araştırmaların ortak yönü EAC kontrol gruplarında azalan GPx enzim konsantrasyonlarının, deney gruplarına tedavi hedefli bileşiklerin uygulanmasıyla GPx konsantrasyonlarının artmasıdır (165, 170, 171). Başarılı antineoplastik etkisiyle kullanışlı bir kemoterapötik ajan olan 5-FU'nun GPx seviyelerinde artış göstermesi beklenen bir durumken, s.k. uygulanma yoluna göre GPx enzim seviyelerinin belirlenen anlamlı artışı; tümör hedefli s.k. enjeksiyon yolunun sistemik etki gösteren i.p. uygulama yoluna göre daha etkin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca hücrel GSH kullanarak ortamdaki H_2O_2 'yi suya indirgeyen GPx, EAC proliferasyonunun

artmasını takiben mevcut glutatyonun tükenmesine ve substratının (GSH) azalması hasebiyle de kendi enzim konsantrasyonunun azalışına neden olabilmektedir. (165, 167, 172). Öte yandan EAC kontrol gruplarında belirlenen GPx antioksidan enzim seviyesindeki düşüş, tümör büyümesine paralel olarak tümör hücrelerinin GPx aktivitelerini inhibe etmesiyle de ilişkilendirilebilmektedir (166).

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidazlar aracılı türetilen ROS, hücresel bölünme, farklılaşma, anjiyogenez ve hücre göçünü de kapsayan birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Literatürde tedavi edilemeyen insan karsinoma hücre serilerinde NOX izoformlarının konsantrasyonlarının artışına ait çalışmalara sıkça rastlanmaktadır (173-175). Kaynaklar ayrıntılı incelendiğinde kolorektal, mide kanserleri ve bazı adenokarsinom formlarında yüksek NOX-1 ekspresyonu gözlemlenirken (136, 173, 176, 177), yumurtalık kanseri, glioblastoma, melanom ve böbrek karsinomlarında yüksek NOX-4 ekspresyonu gözlemlenmektedir (136, 175). Bu nedenle, NOX' lar kanser tedavisinde potansiyel bir hedef olarak belirlenmiştir (178, 179). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak tedavi edilmeyen EAC kontrol gruplarında artan NOX-1 seviyelerinin tedavi gruplarında anlamlı seviyelerde gözlenen azalışı; i.p. ve s.k. aracılı uygulanan 5-FU ve BA'nın tümör proliferasyonu ile artan oksidatif stresi baskılayabilme kapasiteleriyle ilişkilendirilmektedir. Öte yandan 5-FU ve BA'nın i.p. olarak uygulandığı gruplarda, s.k. olarak uygulandığı gruplara nazaran NOX-1 seviyelerinin kıyaslamalı olarak daha yüksek oranda baskılandığı tespit edilmiştir. Bu durumun i.p. uygulamanın s.k. ilaç uygulama yoluna göre sistemik emilim oranının ve hızının çok daha yüksek olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Böylece pozitif kontrol 5-FU ve terapötik aday BA'nın tedavi gruplarına i.p. aracılı verilmesi ile tümör gelişimine bağlı olarak artan metabolik ROS seviyeleri, s.k. uygulamaya göre daha etkin konsantrasyonlarda baskılanmış olabilir.

Nitrik oksit sentazlar aracılı sentezlenen NO, kanser hücre fenotipinin şekillenmesinde hücre içi konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Hücrede NO derişiminin azalışı (180, 181), tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazını destekleyen anjiyogenezisi uyarak prokanserojen etkiye neden olabileceği gibi yüksek konsantrasyonda NO varlığının ise apoptozu, nekrozu uyarak tümör hücre ölümüne ya da anjiyogenezisin inhibisyonuna neden olan antikanserojen etkiyi uyatabilmektedir (182, 183). Bu sebeple NO sentezinden sorumlu olan NOS izoformları tümör gelişiminde önemli biyobelirteçler olarak kabul görmektedirler (137). Kilany ve arkadaşları meme kanseri

hastalarından topladıkları biyopsi örneklerinde eNOS konsantrasyonlarının normal doku örneklerine göre yüksek seviyelerde olduğunu belirtmişlerdir. eNOS aracılı artan NO aracılığıyla da meme tümör proliferasyonunun, anjiyogenezisin ve metastazının arttığının bildirmişlerdir (184). Benzer şekilde Sayed-Ahmad'ın ekibiyle murin tümör modeli üzerinde NOS inhibitörleri hedefli yaptıkları çalışmada, tedavi uygulanmayan tümör kontrol grubunda artan eNOS enzim konsantrasyonu ile NO konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon gözlenmiş ve artan tümör volümü; eNOS-NO arası ilişkiye bağlı olarak gelişen yüksek ROS seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir. Mevcut veriyi doğrular şekilde NOS inhibitörlerinin kullanıldığı gruplarda ise tümör volümünün azaldığını bildirmişlerdir (185). Çalışmamızda EAC kontrol gruplarında gözlemlediğimiz eNOS seviyelerindeki artış, i.p. ve s.k. ilaç uygulamalarının gerçekleştirildiği gruplar arasında anlamlı olarak azalış gösterdi. Eldeki verilerle uyumlu olan bulgularımız neticesinde tedavi uygulanmayan EAC kontrol gruplarında artan tümör volümü ve proliferasyonuna, eNOS aracılı arttığı bilinen NO'nun pozitif katkı sağladığı düşünülmektedir.

Tümör gelişiminde ana yollardan biri olan apoptotik hücre ölümünden kaçış kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarıyla tümör proliferasyonuna, metastazına ve ilaç direncine hizmet etmektedir. Bu nedende apoptoz indüksiyonu ve seviyesinin artırılması hedefli yeni antikanser ajanların keşfi çalışmalarına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (170, 186). Hem *in vitro* insan karsinomlarında (187- 189) hem de *in vivo* deneysel tümör modellerinde (190, 191) tedavi edilmeyen karsinom kontrol gruplarında apoptotik hücre ölümünün baskılandığı, uygulanan deneysel bileşiklerle (kemoterapötik ajan, doğal ürünler, sentetik moleküller) apoptoz indüksiyonunun ve seviyesinin arttığı yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. Mevcut literatürle uyumlu olarak EAC tümör modelimizde i.p. ve s.k. ilaç uygulamalarına, sürelerine ve dozlarına bağlı olarak oluşturulan tedavi gruplarımızda EAC kontrol gruplarımıza göre western blot bant yoğunluklarında pro-apoptotik Bax ve Cas-3 seviyelerinde artış gözlenirken anti- apoptotik protein Bcl-2 konsantrasyonlarında anlamlı azalış gözlemlendi. 5-FU ve BA'nın hem i.p. hem s.k. uygulamalarında uygulama dozu ve süresi kapsamında sadece EAC kontrol gruplarına göre belirlenen azalış, BA'nın pro- apoptotik etkinliğinin göstergesi olarak değerlendirildi. Anti-proliferatif etkinliğiyle bilinen kemoterapötik ajan 5-FU'nun kaspaz bağımlı pro-apoptotik özelliği de daha önce gerçekleştirilen karsinom çalışmalarıyla paralellik göstermektedir (154,155,158,192). İlaçların i.p. uygulamalarının gerçekleştirildiği tüm gruplarda pro-apoptotik Bax protein bant yoğunlukları EAC kontrol ve Sham kontrol gruplarına göre anlamlı artış gösterirken, s.k.

uygulamalarının gerçekleştirildiği gruplarda sadece EAC+BA 100mg/kg 21 gün grubunda Sham ve EAC kontrol gruplarına göre belirlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Literatürde Bax ve Bcl-2 konsantrasyonlarının modülasyonu hedefli hücre ölüm indikatörü olarak Bax/Bcl-2 oranlamasına da sıkça rastlanılmaktadır (193- 195). Buradan hareketle EAC ve Sham kontrol gruplarına göre i.p. ve s.k. ilaç uygulamalarının gerçekleştirildiği gruplarda Bax/Bcl-2 oranındaki artışa paralel olarak tümör hücreleri üzerinde BA'nın uygulama süresine, yoluna ve dozuna bağlı olarak pro-apoptotik etki gösterdiği düşünülmektedir.

Hücrel strese p53, hedef genleri uyararak DNA hasar onarımı, hücre büyümesinin inhibisyonu ve apoptoz uyarımını kontro eden önemli bir moleküldür. Söz konusu tümör baskılama genin, apoptoz uyarım fonksiyonu Bax gibi pro-apoptotik proteinleri indüklemesine dayandırılırken, hücre döngüsünün düzenleyici elemanı olarak hücre büyümesinin inhibisyonu görevi ise p21 proteinine atfedilmektedir (196). Literatürde *in vitro* ve *in vivo* tümör modelleri üzerinde antikanserojen etkisi araştırılan moleküllerin, p53 protein ekspresyonunu arttırarak pro-apoptotik Bax proteininin aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümü aracılı tümör gerilemesini başatabildiklerine dair pek çok çalışma ile karşılaşılmaktadır (191, 197- 199). Çalışmamızda elde edilen veriler incelendiğinde EAC kontrol gruplarına göre i.p. ve s.k. tedavi gruplarında artan Bax/Bcl-2 oranı, Cas-3 ve p53 proteinlerinin ekspresyonları p53-apoptoz arası ilişkiyi ortaya koyan daha önceki araştırmaları destekler niteliktedir. Öte yandan tedavi grupları için pozitif kontrol olarak ele aldığımız 5-FU'nun da elde edilen apoptotik uyarım başarısı, kemoterapötiklerin antitümöral etkilerini Bax, Bcl-2, p53 ve kaspaz proteinlerinin düzenlenmesini hedef alarak gerçekleştirdiklerinin göstergesi olarak kabul edilebilir (191, 200). p53 tümör proliferasyonuna karşı hücre döngüsü düzenlenmesindeki rolünü bilhassa G1 kontrol noktası ve CDKs inhibisyonu aracılığıyla göstermektedir (201- 203). Bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olarak keşfedilen p21 proteini hücre döngüsü kontrolünde önemli bir araçtır (204). p21 aynı zamanda p53'ün hücre döngüsü kontrol noktalarına müdahalesinde de yardımcı eleman rolündedir. p21'in p53 aracılı indüklenerek eş zamanlı CDKs inhibisyonunu uyarmaları, p21'in tümör supresör rolü için ayrı bir önem teşkil etmektedir (34, 204). Literatürde *in vitro* insan kolon (205), ovaryum (206) ve meme (207) kanseri çalışmalarında p53'ün p21 proteininin ekspresyonunu arttırarak hücre döngüsü CDK'ların eş zamanlı inhibisyonları ile tümör hücre proliferasyonunun durdurularak tümör genesi baskılayabileceklerini bildirmektedirler. Çalışmamızda EAC kontrol gruplarında azalan p21

ve p53 bant yoğunluklarının birbirlerine paralel olarak, i.p./s.k. tedavi gruplarında anlamlı derecede arttığı bulundu. Tedavi edilmeyen EAC kontrol grupları tümör volümlerinin, pozitif kontrol 5-FU ve terapötik aday BA'nın i.p./ s.k. aracılı uygulamaları gerçekleştirilen tedavi gruplarının tümör volümlerine oranla çok daha büyük olmaları, p53 ve p21'in hücre büyümesi inhibisyonu fonksiyonlarının kanıtı olarak değerlendirilebilir. Bilhassa doğrudan tümörün hedef alındığı s.k. tedavi gruplarında doza ve uygulama süresine göre elde edilen başarı p53' ün tümör dokuda i.p. ilaç uygulamasına nazaran hızlı bir şekilde hücre döngüsünü durdurarak tümör proliferasyonunu baskıladığı ve apoptotik hücre ölümü uyarımıyla da tümör gelişimini durdurduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular 5-FU ile karşılaştırmalı olarak BA'nın tümör büyümesinin baskılanmasında bir tümör supresör olarak anti-kanserojen etki gösterebileceğinin kanıtı olabilir.

Tümör doku proliferasyon hızlarındaki artış, yüksek enerji ihtiyacının karşılanması zorunluluğuna neden olarak tümör dokularını anjiyogeneze yönlendirirler (Jiang ve ark., 2020). Anjiyogenetik sürecin indükleyicileri olarak VEGF (A-B-C-D) ve MMP'ler (MMP1-MMP28) literatürde önemli yer tutmaktadırlar. In vitro kanser araştırmalarında (208- 210) ve in vivo EAC deneysel tümör modellerinde (161, 210, 211) tedavi edilmeyen kanser hücrelerinde VEGF ekspresyonunun arttığını, anti-oksidan/antikanserojen moleküllerle muamele edilen hücrelerde ise VEGF ekspresyonunun baskılanmasıyla anti-anjiyogenik etki gösterilmiştir. Tümör mikroçevresinde kanser hücre proliferasyonu ile artan ROS konsantrasyonu ve gelişen inflamasyonun anjiyogeneze katkı sağladığı bildirilmektedir (212, 213). Dahası Naglaa ve arkadaşları EAC solid tümör modelinde uyguladıkları deneyde, elde ettikleri VEGF ve p53'ün negatif korelasyon gösteren sonuçlarını, literatürde daha önce bildirilen '*artan p53 ekspresyonunun VEGF ekspresyonunu baskılayarak anti-anjiyogenik fonksiyon gösterebileceği*' hipotezine dayandırmaktadırlar (165, 214). Verileri destekler nitelikte çalışmamızda EAC kontrol gruplarında artan VEGF ekspresyonlarının hem i.p. hem de s.k. tedavi gruplarında anlamlı seviyelerde azaldığını gösterdik. Ayrıca EAC kontrol gruplarında azalan p53 protein ekspresyonlarına karşılık VEGF protein ekspresyonlarının artması, tedavi gruplarında ise azalan VEGF ekspresyonlarına karşı artan p53 protein ekspresyon seviyeleri, p53'ün anti-anjiyogenik faktör olma hipotezini de doğrulamaktadır. Öte yandan VEGF protein seviyelerinin tedavi edilen ve edilmeyen gruplar arasındaki değişiminin oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla kullandığımız MDA, TOS ve OSI konsantrasyonlarıyla da pozitif korelasyon göstermesi, ROS seviyelerinin anjiyogeneze katkı sağladığının göstergesi olabilir.

Malign tümörlerde önemli bir metalloproteinaz olan MMP-9, kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yetenekleriyle doğrudan ilişkilidir (215). Ayrıca ilgili enzimin tümör metastazının yanı sıra inflamasyon, anjiyogenez ve hücre proliferasyonu gibi kanser gelişimi için önemli olan çeşitli patolojik süreçlere de dahil olduğu bilinmektedir (216, 217). Literatürde *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılan kanser çalışmalarında MMP-9 protein seviyelerinin pozitif karsinom gruplarında artarak metastazı teşvik ettiğini göstermektedirler (218- 222). Yapılan kanser çalışmalarında VEGF proteininde de olduğu gibi MMP-9 protein ekspresyonlarının, tedavi edilmeyen gruplarda yüksek seviyelerde görülmesi, tümör proliferasyonuna paralel olarak artan oksidatif stres, inflamasyon ve ROS konsantrasyonu ile ilişkilendirilmektedir (222- 224). Mevcut çalışmada elde ettiğimiz veriler literatürü destekler mahiyettedir. Buna göre MMP-9, VEGF protein seviyeleriyle korele biçimde, EAC kontrol gruplarında, pozitif kontrol 5-FU ve antikanserojen etkisi araştırılan BA'nın hem i.p. hem de s.k. olarak uygulandığı tedavi gruplarına nazaran yüksek protein ekspresyonları göstermiştir. Pozitif tümör kontrol gruplarımızdaki MMP-9 protein aktivasyonu, oksidatif stres biyobelirteçlerimiz NOX-1, MDA, TOS ve OSI'nin artan protein konsantrasyonlarıyla paralellik göstermekte olup, bu durum literatürde yer alan MMP-9 ve VEGF aktivasyonunun artan oksidatif stres ve ROS konsantrasyonlarıyla ilişkilendirilmesini desteklemektedir.

Proliferasyon, apoptoz ve sağ kalım gibi hücresel süreçlerin araştırılmasını amaçlayan kanser çalışmalarında NF- κ B yolu önemli bir terapötik hedef olarak kabul görmektedir (166). Kanser ve inflamasyon arası ilişkinin hedef alındığı çalışmalarda merkezde rol alan NF- κ B protein düzeylerinin tedavi edilmeyen kanser hücrelerinde yüksek seviyelerde bulunduğu belirtilmektedir (51, 225, 226). EAC solid tümör modeli üzerinde BA'nın antikanserojen etkisini değerlendirmek amaçlı gerçekleştirmiş bulunduğumuz çalışmada, bahsi geçen verilerle uyumlu şekilde, EAC kontrol gruplarımızda 5-FU ile karşılaştırmalı olarak BA'nın i.p. ve s.k. uygulandığı tedavi gruplarımıza nazaran NF- κ B proteininin artmış bant yoğunlukları tespit edildi. Öte yandan EAC kontrol gruplarımıza göre i.p. ve s.k. tedavi grupları arasında birbirlerine göre anlamlı farklılık bulunmasa da s.k. EAC+BA 100 mg/kg 21 gün grubunda hesaplanan azalma, doza ve uygulanma süresine bağlı olarak EAC+BA 50 mg/kg 10 gün grubuna göre anlamlı bulundu. Hassan ve ekibi EAC deneysel tümörüyle yaptıkları çalışmada NF- κ B'nin baskılanmasıyla tümör hücre proliferasyonu, invazyon, anjiyogenez ve metastaz süreçlerinin kontrol edilebileceğini ortaya koymuşlardır (227). Benzer şekilde literatürde kanser hücrelerinde yüksek ROS konsantrasyonu, fizyolojik sınırın üzerine çıkan oksidatif stres ve hipoksi ile gelişen

inflamasyonla beraber aktive olan NF- κ B'nin VEGF, MMP-9 ve anti-apoptotik protein Bcl-2 seviyelerini arttırıp, p53 tümör supresör protein aktivasyonunu azaltarak; anjiyogenezi ve metastatik süreci uyarıp, apoptotik hücre ölümünü baskıladığına dair çalışmalar ayrı bir yer tutmaktadır (161, 212, 226, 228). Literatürü destekler nitelikte EAC kontrol gruplarımızda NF- κ B protein seviyelerinin BA ile tedavileri hedeflenen gruplarımıza nazaran artan bant yoğunlukları, VEGF, MMP-9, Bcl-2 bant yoğunlukları ve MDA, TOS, OSI, NOX-1 biyobelirteç konsantrasyonlarıyla pozitif yönde paralellik gösterirken, p53 protein ekspresyonlarıyla negatif yönde paralellik göstermektedir.

Antioksidan tepkinin önemli bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2, iyi bir hücrel redoks durum sensörüdür. Bu sebeple Nrf2'nin aktivasyonu, normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşümünün önlenmesinde gereklidir. Öte yandan paradoksal olarak Nrf2, tümör hücrelerinde "iki ucu keskin" bir bıçak gibi davranabilmektedir. Meme, kolon, rektum ve akciğer karsinomları dahil olmak üzere birçok kanser türünde Nrf2'nin aşırı ekspresyonunun kanser hücrelerini oksidatif hasardan koruyarak proliferasyonlarına, metastatik ilerleyişlerine katkı sağladığı rapor edilirken (229-232), bazı kanser türlerinde ise Nrf2'nin ekspresyonunun ve hedef antioksidan genlerinin ifadesinin azalmasıyla tümör proliferasyonu arası pozitif korelasyon gösterilmiştir (130, 233, 234). Bu nedenle tümör tedavisinde Nrf2'yi hedeflemek önemli stratejiler arasında yer almaktadır. Literatürde EAC hücreleriyle oluşturulan tümör modellerinde EAC kontrol gruplarında baskılanmış Nrf2 seviyeleri ve azalan anti-oksidan enzim konsantrasyonları paralellik göstermektedir (130, 235, 236). Hajira ve ark. yaptıkları çalışmada Nrf2' nin bu davranışını açıklamak adına Nrf2 ile NF- κ B arası ilişkiye dikkatleri çekmiştir. Bilindiği üzere fizyolojik koşullar altında NF- κ B molekülü sitozolde I κ B α alt birimiyle kompleks oluşturarak inaktif durumda yer almaktadır. Hücre içi artan I kappa B kinase kompleks (IKK) aracılı fosforile olan bu alt birim NF- κ B'nin serbestleşmesini sağlar. Sitozolde serbest kalan NF- κ B, çekirdeğe transloke olarak aktive olur. Çalışmada Nrf2' nin sadece oksidatif strese karşı değil hücre içi artan inflamasyona karşı da savunma oluşturduğunu belirten araştırma ekibi, ekspresyonu artan Nrf2'nin I κ B α 'nın fosforilasyonunu engelleyerek NF- κ B yolağını etkisizleştirebileceğini belirtmişlerdir (237, 238). Benzer şekilde Abouzed ve ekibi yaptıkları çalışmada EAC kontrol grubunda azalan Nrf2 konsantrasyonlarının aksine artan NF- κ B protein seviyelerini göstermişlerdir. Tümör hücrelerinde artan oksidatif stres ve inflamasyona cevapsız kalan Nrf2 ve hedef antioksidan genleri baskılanmaktadır. Bu durumda artan inflamasyonun yol açtığı aşırı NF- κ B protein ekspresyonu da tümör hücre

proliferasiyonuna katkı sağlamaktadır (235). Çalışmamızda BA'nın anti-oksidan kapasitesini de değerlendirmek amacıyla western blot yöntemiyle analiz ettiğimiz Nrf2 protein bant yoğunluklarının doza, süreye ve uygulama yoluna göre i.p./s.k. BA uygulanan gruplara nazaran EAC kontrol gruplarında daha az olduğunu, bu verilerle paralel olarak Nrf2 hedefi olan GPx konsantrasyonunun da daha düşük olduğunu gördük. Ayrıca Nrf2 protein ekspresyonlarının EAC kontrol gruplarında baskılanmış olmalarına karşın, NF- κ B seviyelerinin tedavi edilen gruplara göre çok daha yüksek olarak belirlenmesi Nrf2 ile NF- κ B arasındaki çapraz ilişkiyi destekler niteliktedir.

Biyolojik bir süreç olan otofaji, tümör proliferasyonu ve baskılanmasında iki farklı role sahiptir (81). Tümör proliferasyonunun erken evresinde kusurlu hücreleri ortadan kaldırarak antitümöral etki gösterirken, tümör proliferasyonunun ilerlemiş dönemlerinde kanser hücrelerinin biyokimyasal ve enerji üretim ihtiyaçlarını karşılayarak, yerleşik malign hücreleri korumaktadır. Bundan ötürü geç evre kanser hastalarında otofajinin hedeflenmesi umut verici bir tedavi seçeneği haline gelmiştir (239, 240). Tümör supresör gen olan Beclin-1, otofajik hücre ölüm yolağının belirteci olarak literatürde geniş yer tutmaktadır. Çalışmamızda otofajik akışın başlangıcının bir göstergesi olarak ele aldığımız Beclin-1 proteinini, sürecin devamında otofagozom oluşumunun göstergesi olan LC3-II/LC3-I proteini ile destekledik. Oluşturduğumuz tümör modelinde EAC kontrol gruplarında baskılanan Beclin-1 ve LC3-II protein ekspresyonlarının, i.p./s.k uygulama yollarıyla BA verilerek tedavileri amaçlanan gruplarda, istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmadı. Bununla birlikte Beclin-1 seviyelerinin EAC kontrol gruplarına göre hem i.p. hem de s.k. EAC+5-FU 21 gün ve EAC+BA 100 mg/kg 21 gün gruplarındaki artışının istatistiksel olarak anlamlı oluşu, otofajinin terapötik aday BA'nın uygulama dozuna ve süresine bağlı olarak düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Aly ve çalışma ekibi yapmış oldukları araştırmada tümör modelinde tedavi edilmeyen grupta konsantrasyonu azalan Beclin-1 protein seviyelerinin *Salmonella typhimurium* ile tedavi edilen gruplarda artarak otofajiyi arttırdığını ve tümör proliferasyonunu azalttıklarını bildirmişlerdir (241). Benzer şekilde Hassan ve arkadaşları oluşturdukları EAC modelinde tedavi edilmeyen gruplarda Beclin-1, LC3-II seviyelerinin azalan ekspresyonlarına karşı, tedavi gruplarında Beclin-1 ve LC3-II protein konsantrasyonlarının arttığını belirtmişlerdir (227). Tez çalışmamız kapsamında LC3-II seviyelerinin i.p. ve s.k. tedavi gruplarında EAC kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, gözlemlenen matematiksel artışı istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bununla birlikte bahsi geçen durum, tümöral doku da otofaji defektini akla getirirse de

literatürdeki çalışmalar bu durumun tersini ifade etmektedir. Şöyle ki; Mizushima ve çalışma arkadaşı LC3-II/LC3-I seviyelerine ait western blot yöntemiyle gerçekleştirdikleri kendi araştırmalarında yüksek bozunma kapasitesine sahip hassas yapılı LC3-II'nin, dönüşüm esnasında hızlı bir şekilde yıkıma uğrayarak yanlış otofajik defekt kanısına sebep olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca doğal otofajik yolun bloke edilmesi üzerine otofajinin ektopik membranlarda gerçekleşebilme durumuna karşı otofajik marker olarak özellikle otofaji ilişkili genlerin (Atg5/7/8/12 gibi) de LC3-II ve Beclin-1 ile beraber analiz edilmesini önermektedirler (242). Benzer şekilde yapılan başka çalışmalarda da LC3-I'den LC3-II'ye dönüşümün otofaji için gerekli ancak yeterli olmadığını, otofaji lizozomal proteaz inhibitörleri (3-MA) ve Atg ailesi üyelerinin de eş zamanlı değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (243, 244).

Histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre EAC kontrol grubuna nazaran hem i.p. hem de s.k. terapötik aday BA ve pozitif kontrol 5-FU gruplarında tümörün baskılanması anlamında başarıya ulaşılmıştır. Özellikle 5-FU ve BA'nın 100 mg/kg konsantrasyon uygulamalarında artmış nekrotik alanlar, apoptotik hücreler ve sınırları belirginleşmiş hücrelerin oluşturduğu dokular dikkat çekmektedir. BA'nın 50 mg/kg konsantrasyonda 10 doz ve 5 doz olarak gerçekleştirilen uygulamalarının, 5-FU 50 mg/kg ve BA'nın 100 mg/kg uygulamalarına göre anti-tümöral etki bakımından geri de kalmış olsa da EAC kontrol gruplarına nazaran kısmi artan nekrotik alanlar, dağınık apoptotik hücreler ve belirgin hücre sınırları tespit edildi. Elde edilen veriler literatürde daha önce oluşturulan EAC solid tümör modellerinde antitümöral etkileri için ele alınan moleküllerin/fenolik bileşiklerin/kemoterapötik adayların, histopatolojik analizleriyle uyum göstermektedir (165, 245) Amer ve arkadaşları silibininin EAC tümör modeli üzerine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, EAC kontrol grubuyla kıyaslandığında, silibinin uygulanan grupta artan nekrotik alan, apoptotik tümör hücreleri ve sınırları belirgin hücre topluluklarının varlığını göstermişlerdir (161). Doksorubisinin (DOX) pozitif kontrol olarak ele alındığı benzer bir çalışmada ise EAC solid tümör üzerine DOX ile karşılaştırmalı olarak seçtikleri doğal ürün nar çiçeği yağını denemişler ve DOX a karşı kendi moleküllerinin de tümör baskılayıcı etki gösterdiğini, histopatolojik olarak nar çiçeği yağının uygulanan doz artışına paralel olarak nekrotik alanlarda ve apoptotik hücre dağılımlarında artış gösterdiğini belirtmişlerdir (221).

Çalışmamız kapsamında BA'nın ve pozitif kontrol 5-FU'nun doğrudan tümör hedefli s.k. ve i.p. uygulama yolları baz alınarak, doza ve uygulama süresine bağlı olarak tümör

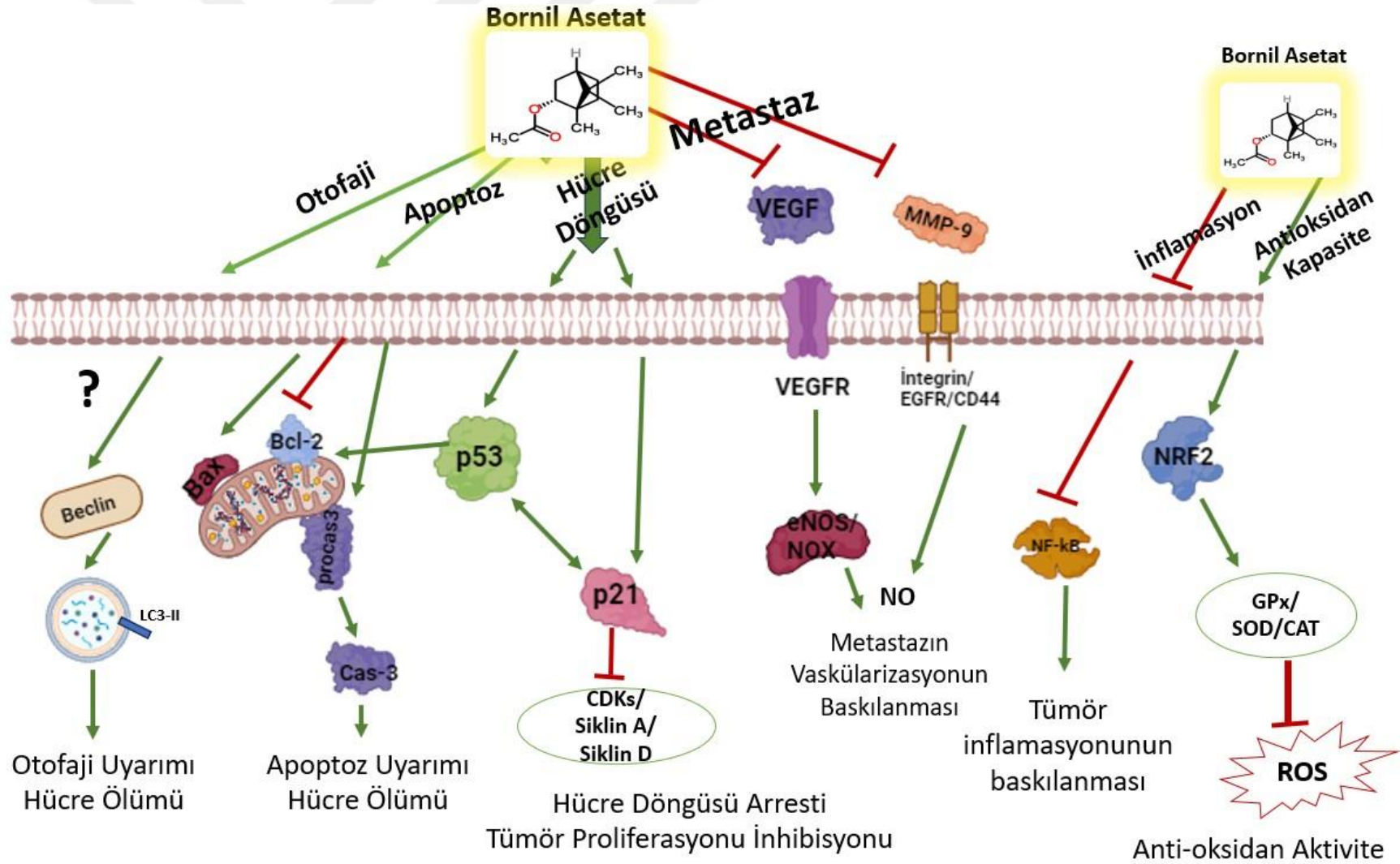
volümü üzerine etkisi ilk kez araştırılmıştır. Çalışma neticesinde BA'nın s.k. olarak 100 mg/kg dozda 21 gün süreyle uygulandığı grupta, i.p. eşdeğer grubuna nazaran tümör volümünü azaltmada %78'lik bir başarı gözlenirken, pozitif kontrol 5-FU nun 21 gün uygulandığı s.k grupta i.p muadil grubuna göre bu başarı %90 a yükselmiştir. 5-FU ve BA'nın 10 gün süreyle uygulandığı s.k. gruplardaki tümör volümü küçültme başarısı eş değer i.p. grupların başarısına göre sırasıyla %87 ve %60 oranlarında artmış olarak ortaya kondu. Buradan hareketle erken dönemde tümör hedef alınarak gerçekleştirilen s.k. uygulamanın doza ve süreye bağlı olarak i.p. uygulamaya göre tümör proliferasyonunu baskılamada da çok daha etkin olduğu gösterildi. Bununla birlikte BA'nın uygulanma süresine ve uygulanan doza bağlı olarak hem antitümöral etkisi üzerine beklenen artış gözlenebilmesi, hem tümör volümü üzerinde s.k. uygulamanın yakaladığı başarının biyokimyasal parametreler üzerine yansıtılabilmesi hem de gelişebilecek muhtemel toksisitenin de değerlendirilmesi amacıyla uzun süreli deneysel tümör modellerinde ve yüksek konsantrasyon hedefli çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Söz konusu çalışmaların devam ettirilmesiyle sağlanacak bulguların da dikkate alınmasıyla BA, muhtemel toksisiteyi, hasta yaşam kalitesini düşüren yan etkileri ve gelişen ilaç direncine karşı tümör proliferasyonunun baskılanmasında yetersiz kalan kemoterapötiklerin alternatifi ya da kemoterapötik etkinliğinin artırılması amacıyla kombine tedavilerde aracı olabilir. Öte yandan gerçekleştirilen çalışmanın, acı hissinin az olması, yüksek doz uygulamaya rağmen muhtemel sistemik yan etkinin göz ardı edilebilmesi, emilim ve etki gösterme hızının yüksek olması avantajları nedeniyle tercih edilebilen s.k. terapötik uygulamalarının hedef alındığı çalışmalara da katkı sağlaması öngörülmektedir. Ve yine ülkemizde halk arasında iltihap söktürücü etkileriyle yaygın olarak çayı tüketilen endemik *Helichrysum armenium*'un uçucu monoterpen içeriğini oluşturan BA'nın antikanserojen etkinliğinin de ortaya konmasıyla ekonomik katma değer oluşturabileceği de beklenmektedir.

Çalışmamızda elde edilen veriler literatürle karşılaştırıldığında; BA'nın *in vivo* deneysel tümör modeli üzerinde apoptoz, otofaji, antioksidan enzim aktivasyonunun ve hücre döngüsü kontrolünün pozitif uyarıcı, anjiyogenez, metastaz, inflamasyon ve oksidatif stres parametrelerinin ise negatif uyarıcı olabilecek potansiyelde bir molekül olduğu ilk kez ortaya konmuştur. Çalışmamızın BA'nın anti-oksidan, anti-inflamatuar özelliklerinin yanı sıra tümör hücrelerinde, hücre ölümünü uyaran ve anjiyogenezisi baskılayarak muhtemel bir antimetastatik ajan olabilme potansiyeline dair yeni ve kapsamlı çalışmalara yol gösterici olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca BA'nın ve 5-FU'nun uygulama dozuna ve süresine

bağlı olarak, tümör hedefli s.k. uygulamanın, i.p. uygulamalarına oranla daha etkin olduğunu belirlediğimiz çalışmamızda, kemoterapötiklerin ve aday biyoterap tiklerin s.k. uygulamalarına bağlı etkinliklerini hedefleyen çalışmalarda yer bulabileceği   ng r lmektedir.

Uygulanan tümör modelinde deney sürelerinin değişimi, mevcut kemoterapötiklerin ya da BA gibi moleküllerin farklı konsantrasyonlarda kullanımı ve çalışmamızın hedef sinyal yolaklarını teşkil eden apoptoz, otofaji, anjiyogenez, inflamasyon ve oksidatif stresin düzenlenmesinde görevli farklı ve yeni proteinlerin de ele alınması, tümör hedefli terapötik araştırmaların geliştirilmesi ve kliniğe uygulanabilirliği açısından ayrıca önem taşımaktadır.





Resim 19. Bornil asetatın Ehrlich assit solid tümör modelinde antikanser etkisi (biorender.com üzerinde oluşturulmuştur.)

6. KAYNAKLAR

1. Zhou Y, Xia J, Xu S, She T, Zhang Y, Sun Y, Wen M, Jiang T, Xiong Y, Lei J (2023). Experimental mouse models for translational human cancer research. *Front Immunol* 14(1): 1095388.
2. Arneth B (2019). Tumor microenvironment. *Medicina (Kaunas)* 56(1): 15.
3. Hanahan D (2022). Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov* 12(1): 31-46.
4. Nalbant A (2018). Tümör İmmünite. İçinde: Baran Y, ed. *Kanser Moleküler Biyolojisi*. 1. Baskı: Ankara: Kısayol Yayıncılık; 255- 261.
5. Salem MM, Donia T, Abu-Khudir R, Ramadan H, Ali EMM, Mohammed TM (2019). Propolis potentiates methotrexate anticancer mechanism and reduces its toxic effects. *Nutr Cancer* 72(3): 460-480.
6. Soini Y, Paakkö P, Letho UP (1998). Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 153(1): 1041-1053.
7. Ilghami R, Bazzegari A, Mashayekhi MR, Letourneur D, Crepin M, Pavon-Djavid G (2020). The conundrum of dietary antioxidants in cancer chemotherapy. *Nutr Rev* 78(1): 65-76.
8. Ozaslan M, Karagoz ID, Kiliç IH, Guldur ME (2011). Ehrlich ascites carcinoma. *Afr J Biotechnol* 10(13): 2375- 2378.
9. Loewenthal H, Jahn G (1932). Übertragung-Suersuche Mit Carcinomatöser Mause-Asciteslussigkeit Und hr Verhalten Gegen Physikalische Und Chemische Einwirkungen. *Z Krebsforsch* 37: 439- 447.
10. Sugiura K (1953). Effect of various compounds on the ehrlich ascites carcinoma. *AACR* 13: 431- 441.
11. Chen YP, Zhang JL, Zou Y, Wu YL (2019). Recent advances on polymeric beads or hydrogels as embolization agents for improved transcatheter arterial chemoembolization (TACE). *Front Chem* 5(7): 408.
12. Sequeira JAD, Santos AC, Serra J, Esteves C, Seiça R, Veiga F, Ribeiro AJ, Joana A (2019). Subcutaneous delivery of biotherapeutics: challenges at the injection site. *Expert Opin Drug Deliv* 16(2): 143-151.
13. Bittner B, Richter W, J Schmidt (2018). Subcutaneous administration of biotherapeutics: an overview of current challenges and opportunities. *BioDrugs* 32(5): 425-440.
14. Bittner B, Schmidt J (2024). Advancing subcutaneous dosing regimens for biotherapeutics: clinical strategies for expedited market access. *BioDrugs* 38: 23-46.

15. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, Kurimoto M, Mito K (1998). Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis *Cancer Detect Prev* 22(6): 506-515.
16. Suzuki I, Hayashi I, Takaki T, Groveman DS, Fujimiya Y (2002). Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biother Radiopharm* 17(5): 553-562.
17. Xie T, Song S, Liu S, Ouyang L, Xia L, Huang J (2015). Review of natural product databases. *Cell Prolif* 48(4): 398-404.
18. Zhang QY, Wang FX, Jia K, Kong LD (2018). Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. *Front Pharmacol* 9: 1253.
19. Garneau FX, Collin G, Gagnon H, Pichette A (2012). Chemical composition of the hydrosol and the essential oil of three different species of the pinaceae family: *Picea glauca*(Moench) Voss., *Picea mariana*(Mill.) B.S.P. and *Abies balsamea*(L.) Mill. *J. Essent Oil-Bear Plants* 15(2): 227-231.
20. Matsubara E, Fukagawa M, Okamoto T, Ohnuki K, Shimizu K, Kondo R (2011). (-)-Bornyl acetate induces autonomic relaxation and reduces arousal level after visual display terminal work without any influences of task performance in lowdose condition. *Biomed Res* 32(2): 151-157.
21. Tung YT, Chua MT, Wang SY, Chang ST (2008). Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresour Technol* 99(9): 3908-3913.
22. Vaghari-Tabari M, Majidinia M, Moein S, Qujeq D, Asemi Z, Alemi F, Mohamadzadeh R, Targhazeh N, Safa A, Yousefi B (2020). MicroRNAs and colorectal cancer chemoresistance: New solution for old problem. *Life Sci* 259: 118255.
23. Yin W, Wang J, Jiang L, Kang YJ (2021). Cancer and stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 246(16): 1791-1801.
24. Wu F, Yang J, Liu J, Wang Y, Mu J, Zeng Q, Deng S, Zhou H (2021). Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. *Signal Transduct Target Ther* 6(1): 218.
25. Budhwani KI, Patel ZH, Guenter RE, Charania AA (2022). A hitchhiker's guide to cancer models. *Trends Biotechnol* 40(11): 1361-1373.
26. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2020). Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70(1): 7-30.

27. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68(6): 394-424.
28. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM (2022). Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23(1): 74-88.
29. Rubin SM, Sage J, Skotheim JM (2020). Integrating old and new paradigms of G₁/S control. *Mol Cell* 80(2): 183-192.
30. Wang Z (2022). Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Methods Mol Biol* 2579: 3- 23.
31. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
32. Wertz IE, Dixit VM (2010). Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ* 17(1): 14-24.
33. Reyna-Jeldes M, Díaz-Muñoz M, Madariaga JA, Coddou C, Vázquez-Cuevas FG (2021). Autocrine and paracrine purinergic signaling in the most lethal types of cancer. *Purinergic Signal* 17(3): 345-370.
34. Engeland K (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* 29(5): 946-960.
35. Burkhardt DL, Sage J (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 8: 671-678.
36. Xiao Q, Werner J, Venkatachalam N, Boonekamp KE, Ebert MP, Zhan T (2022). Cross-talk between p53 and Wnt signaling in cancer. *Biomolecules* 12(3): 453.
37. Deans C, Maggert KA (2015). What Do You Mean, “Epigenetic”? *Genetics* 199(4): 887-896.
38. Darwiche N (2020). Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. *Am J Cancer Res* 10(7): 1954-1978.
39. Sasahira T, Kirita T (2018). Hallmarks of cancer-related newly prognostic factors of oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 19(8): 2413.
40. Bitman-Lotan E, Orian A. Nuclear organization and regulation of the differentiated state. *Cell Mol Life Sci* 78(7): 3141-3158.
41. Blasco M. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6(8): 611-622.
42. Schafer KA (1998). The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35(6): 461-478.

43. Dalton S (2015). Linking the cell cycle to cell fate decisions. *Trends Cell Biol* 25(10): 592-600.
44. Ligasová A, Frydrych I, Koberna K (2023). Basic methods of cell cycle analysis. *Int J Mol Sci* 24(4): 3674.
45. Ghafouri-Fard, Khoshbakht T, Hussen BM, Dong P, Gassler N, Taheri M, Baniahmad A, Dilmaghani NA (2022). A review on the role of cyclin dependent kinases in cancers. *Cancer Cell Int* 22(325): 1-69.
46. Loftus LV, Amend S, Pienta KJ (2022). Interplay between cell death and cell proliferation reveals new strategies for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 23(9): 4723.
47. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Mojzych M, Kontek R (2022). Cyclin-dependent kinases in DNA damage response. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1877(3): 188716.
48. Zhang C, Liu J, Xu D, Zhang T, Hu W, Feng Z (2020). Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. *J Mol Cell Biol* 12(9): 674-687.
49. Hu J, Cao J, Topatana W, Juengpanich S, Li S, Zhang B, Shen J, Cai L, Cai X, Chen M (2021). Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *J Hematol Oncol* 14(157): 1-15.
50. Kim U, Kim KS, Park JS, Um HD (2022). Involvement of the p53/p21 complex in p53-dependent gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 621: 151-156.
51. Liu L, Wang A, Liu X, Han S, Sun Y, Zhang J, Guo L, Zhang Y (2022). Blocking TIGIT/CD155 signalling reverses CD8⁺ T cell exhaustion and enhances the antitumor activity in cervical cancer. *J Transl Med* 20(1): 280.
52. Abbas T, Dutta T (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9(6): 400-414.
53. Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374(6520): 386-388.
54. Shamloo B, Usluer S (2019). p21 in cancer research. *Cancers* 11(8): 1178.
55. Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM (2017). p21: A two-faced genome guardian. *Trends Mol Med* 23(4): 310-319.
56. Kim C, Kim B (2018). Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A Review. *Nutrients* 10(8): 1021.
57. Gökhan A, KD Kılıç, Gülle K, Uyanıkgil Y, Çavuşoğlu T (2020). Apoptotik yollar ve hedefe yönelik tedaviler. *Med J SDU* 27(4): 565-573.

58. Eskandari E, Eaves CJ (2022) Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol* 221(6): e202201159.
59. Abu-Hamad S, Arbel N, Calo D, Arzoine L, Israelson A, Keinan N, Ben-Romano R, Friedman O, Shoshan-Barmatz V (2009). The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J Cell Sci* 122(Pt 11): 1906-1916.
60. Coşkun G, Özgür H (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arch Med Res* 20(3): 145-158.
61. Guerin MB, McKernan DP, O'Brien CJ, Cotter TG (2006). Retinal ganglion cells: dying to survive. *Int J Dev Biol* 50(8): 665-674.
62. Kocaturk NM, Akkoc Y, Kig N, Bayraktard O, Gozuacik D, Kutlua O (2019). Autophagy as a molecular target for cancer treatment. *Eur J Pharm Sci* 134: 116-137.
63. Kroemer G, Mariño G, Levine B (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40(2): 280-293.
64. Feng Y, Backues SK, Baba M, Heo J, Harper JH, Klionsky DJ (2016). Phosphorylation of Atg9 regulates movement to the phagophore assembly site and the rate of autophagosome formation. *Autophagy* 12(4): 648-658.
65. Park JM, Jung CH, Seo M, Otto NM, Grunwal D, Kim KH, Moriarity B, Kim YM, Starker C, Nho RS, Voytas, D, Kim DH (2016). The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating Atg14. *Autophagy* 12(3): 547-564.
66. Glick D, Barth S, Macleod KF (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *Pathol* 221(1): 3-12.
67. D'Arcy MS (2022). A review of biologically active flavonoids as inducers of autophagy and apoptosis in neoplastic cells and as cytoprotective agents in non-neoplastic cells. *Cell Biol Int* 46(8): 1179-1195.
68. Kriegenburg F, Ungermann C, Reggiori F 2018. Coordination of autophagosome-lysosome fusion by Atg8 family members. *Curr Biol* 28: R512–R518.
69. Nakamura S, Yori T (2017). New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci* 130(7): 1209-1216.
70. Kenific CM, Debnath J (2015). Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. *Trends Cell Biol* 25(1): 37-45.

71. Panda S, Kumar Padhiary 2, Routray S (2016). Chemokines accentuating protumoral activities in oral cancer microenvironment possess an imperious stratagem for therapeutic resolutions. *Oral Oncol* 60: 8-17.
72. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* 77(9): 1745-1770.
73. Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Zhang S, Gong Z, Li X, Cao K, Deng H, He Y, Liao Q, Xiang Bo, Zhou M, Guo C, Zeng z, Li G, Li X, Xiong W (2020). The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 39(1): 204.
74. Baeriswyl V, Christofori G (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 19(5): 329-337.
75. Xiao Y, Yu D (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther* 221: 107753.
76. Wu T, Dai Y (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett* 387: 61-68.
77. Zhao Y, Guo S, Deng J, Shen J, Du F, Wu X, Chen Y, Li M, Chen M, Li X, Li W, Gu L, Sun Y, Wen Q, Li J, Xiao Z (2022). VEGF/VEGFR-targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: Targeting the tumor microenvironment. *Int J Biol Sci* 18(9): 3845-3858.
78. Zhang Y, Brekken RA (2022). Direct and indirect regulation of the tumor immune microenvironment by VEGF. *J Leukoc Biol* 111(6): 1269-1286.
79. Niland S, Riscanevo AX, Eble JA (2022). Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression. *Int J Mol Sci* 23(1): 146.
80. Mondal S, Adhikari N, Banerjee S, Amin SA, Jha T (2020). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *Eur J Med Chem* 194: 112260.
81. Huang H (2018). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel)* 18(10): 3249.
82. Owyong M, Chou J, van den Bijgaart RJ, Kong N, Efe G, Maynard C, Talmi-Frank D, Solomonov I, Koopman C, Hadler-Olsen E, Headley M, Lin C, Wang CY, Sagi I, Werb Z, Plaks V (2019). MMP9 modulates the metastatic cascade and immune landscape for breast cancer anti-metastatic therapy. *Life Sci Alliance* 2(6): e201800226.
83. Lusby R, Dunne P, Tiwari VK (2022). Tumour invasion and dissemination. *Biochem Soc Trans* 50(3): 1245-1257.

84. Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10(1): 51-57.
85. Evan GI d'Adda di Fagagna F (2009). Cellular senescence: hot or what? *Curr Opin Genet Dev* 19(1): 25-31.
86. Sasahira T, Kuniyasu H (2015). Molecular biology of the oral cancer in oral cancer diagnosis and therapy; Kirita, T., Omura, K., Eds.; Springer: Tokyo, Japan; pp. 63-82.
87. Park JH, Pyun WY, Park HW (2020). Cancer metabolism: phenotype, signaling and therapeutic targets. *Cells* 9: 2308.
88. Semenza GL (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29(5): 625-634.
89. StineZE, Schug ZT, Salvino JM, Dang CV (2022). Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nat Rev Drug Discov* 21: 141-162.
90. Martínez-Reyes I, Chande NS (2021). Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer* 21(10): 669-680.
91. Baggiolini A, Callahan SJ, Montal E, Weiss JM, Trieu T, Tagore MM, Tischfield SE, Walsh RM, Suresh S, Fan Y, Campbell NR, Perlee SC, Saurat N, Hunter MV, Simon-Vermot T, Huang TH, Ma Y, Hollmann T, Tickoo SK, Taylor BS, Khurana E, Koche RP, Studer L, White RM (2021). Developmental chromatin programs determine oncogenic competence in melanoma. *Science* 373(6559): eabc1048.
92. Torborg SR, Li Z, Chan JE, Tammela T (2022). Cellular and molecular mechanisms of plasticity in cancer. *Trends Cancer* 8(9): 735-746.
93. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, Kumar SS (2016). Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 5276130.
94. Cao J, Yan Q (2020). Cancer epigenetics, tumor immunity, and immunotherapy. *Trends Cancer* 6(7): 580-592.
95. Starzer AM, Preusser M, Berghoff AS (2022). Immune escape mechanisms and therapeutic approaches in cancer: the cancer-immunity cycle. *Ther Adv Med Oncol* 14: 17588359221096219
96. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB (2019). Inflammation and cancer. *Ann Afr Med* 18(3): 121-126.
97. Hoesel B, Schmid JA (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 12(86): 1-15.

98. Mirzaei S, Saghari S, Bassiri F, Raesi R, Zarrabi A, Hushmandi K, Sethi G, Tergaonkar V (2022). NF- κ B as a regulator of cancer metastasis and therapy response: A focus on epithelial–mesenchymal transition. *J Cell Physiol* 237(7): 2770-2795.
99. Yu J, Li M, Zhan D, Shi C, Fang Le, Ban C, Zheng W, Veeraraghavan VP, Mohan SK, and Tang X (2020). Inhibitory effects of triterpenoid betulin on inflammatory mediators inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and proliferating cell nuclear antigen in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinome. *Pharmacogn Mag* 16(72): 836-842.
100. Taniguchi K, Karin M (2018). NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 18(5): 309-324.
101. Capece D, Verzella D, Flati I, Arboreto P, Cornice J, Franzoso G (2022). NF- κ B: blending metabolism, immunity, and inflammation. *Trends Immunol* 43(9): 757-775.
102. Gurib-Fakim A (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27(1): 1-93.
103. Karan T, Yildiz I, Aydin A, Erenler R (2018). Inhibition of various cancer cells proliferation of bornyl acetate and essential oil from *Inula graveolens* (Linnaeus) Desf *Rec Nat Prod* 12: 273-283.
104. Jemia MB, Chaabane S, Senatore F, Bruno M, Kchouk ME (2013). Studies on the antioxidant activity of the essential oil and extract of Tunisian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. (Cupressaceae). *Nat Prod Res* 27(16): 1419-1430.
105. Khatib S, Mahdi I, Drissi B, Fahsi N, Bouissane L, Sobeh M (2022). *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.: Volatile constituents, antioxidant, antidiabetic and wound healing activities of its essential oil. *Heliyon* 10(3): e24563.
106. Adams TB, Hallagan JB, Putnam JM, Gierke TL, Doull J, Munro IC, Newberne P, Portoghese PS, Smith RL, Wagner BM, Weil CS, Woods LA, Ford RA (1996). The FEMA GRAS assessment of alicyclic substances used as flavour ingredients. *Food Chem Toxicol* 34(9): 763-828.
107. Zhao ZJ, Sun YL, Ruan XF (2023). Bornyl acetate: A promising agent in phytomedicine for inflammation and immune modulation. *Phytomedicine* 114: 154781.
108. Lee J, Choi JH, Kwon TW, Jo HS, Kim DG, Ko SG, Song GJ, Cho IH (2023). Neuroprotective effects of bornyl acetate on experimental autoimmune

encephalomyelitis via anti-inflammatory effects and maintaining blood-brain-barrier integrity. *Phytomedicine* 112: 154569.

109. Cho WI, Cheigh CI, Hwang HJ, Chung MS (2015). Sporicidal activities of various surfactant components against bacillus subtilis spores. *J Food Prot* 78(6): 1221-1225.
110. Wu X, Li X, Xiao F, Zhang Z, Xu Z, Wang H (2004). Studies on the analgesic and anti-inflammatory effect of bornyl acetate in volatile oil from *Amomum villosum*. *J Chin Med Mater* 27(6): 438-439.
111. Zhang QL, Fu BM, Zhang ZJ (2017). Borneol, a novel agent that improves central nervous system drug delivery by enhancing blood-brain barrier permeability. *Drug Deliv* 24(1): 1037-1044.
112. Chen N, Sun G, Yuan X, Hou J, Wu Q, Soromou LW, Feng H (2014). Inhibition of lung inflammatory responses by bornyl acetate is correlated with regulation of myeloperoxidase activity. *J Surg Res* 186(1): 436-445.
113. Wu X, Li X, Xiao F, Zhang Z, Xu Z, Wang H (2004). Studies on the analgesic and anti-inflammatory effect of bornyl acetate in volatile oil from *Amomum villosum*. *Zhong Yao Cai* 27(6): 438- 9.
114. Yang L, Liu J, Li Y, Qi G (2018). Bornyl acetate suppresses ox-LDL-induced attachment of THP-1 monocytes to endothelial cell. *Biomed Pharmacother* 103: 234-239.
115. Lee J, Choi JH, Kwon TW, Jo HS, Kim DG, Ko SG, Song GJ, Cho IH (2023). Neuroprotective effects of bornyl acetate on experimental autoimmune encephalomyelitis via anti-inflammatory effects and maintaining blood-brain-barrier integrity. *Phytomedicine* 112: 154569.
116. Abbasjahromi A, Hojati H, Nikooei S, Jahromi HK, Dowlatkhah HR, Zarean, V, Farzaneh M, Kalavani A (2020). Compare the effect of aromatherapy using lavender and Damask rose essential oils on the level of anxiety and severity of pain following C-section: a double-blinded randomized clinical trial. *J Complement Integr Med* 17(3).
117. Domínguez-Solís E, Lima-Serrano M, Lima-Rodríguez JS (2021). Non-pharmacological interventions to reduce anxiety in pregnancy, labour and postpartum: a systematic review. *Midwifery* 102: 103126.
118. Matsubara E, Fukagawa M, Okamoto T, Ohnuki K, Shimizu K, Kondo R (2011). (-)-Bornyl acetate induces autonomic relaxation and reduces arousal level after visual

display terminal work without any influences of task performance in low-dose condition. *Biomed Res* 32(2): 151-157.

119. Jiang Y, Song J, Xu Y, Liu C, Qian W, Bai T, Hou X (2021). Piezo1 regulates intestinal epithelial function by affecting the tight junction protein claudin-1 via the ROCK pathway. *Life Sci* 275: 119254.
120. Buriani A, Fortinguerra S, Sorrenti V, Dall'Acqua S, Innocenti G, Montopoli M, Gabbia D, Carrara M (2017). Human adenocarcinoma cell line sensitivity to essential oil phytocomplexes from pistacia species: A multivariate approach. *Molecules* 22(8): 1336.
121. Shahwar D, Ullah S, Khan MA, Ahmad N, Afifa Saeed I, Ullah S. Anticancer activity of Cinnamon tamala leaf constituents towards human ovarian cancer cells. *Pak J Pharm Sci* 28(3): 969-972.
122. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 94(3): 909-950.
123. Moloney JN, Cotter TG (2017). ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 80: 50-64.
124. Akki R, Siracusa R, Cordaro M, Remigante A, Morabito R, Errami M, Marino A (2022). Adaptation to oxidative stress at cellular and tissue level. *Arch Physiol Biochem* 128(2): 521-531.
125. Marrocco I, Altieri F, Peluso I (2017). Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 6501046.
126. Weydert CJ, Joseph JC (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 5(1): 51-66.
127. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Gasparovic AC, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HHHW, Ghezzi P. (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *ARS* 23(14): 1144-1170.
128. Khan MA, Tania M, Zhang DZ, Chen HC (2010). Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese J Cancer Res* 22: 87-92.
129. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, Savran Eş, Yılmaz B (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *Med J SDU* 26(3): 362-369.

130. Alghamdi MA, Khalifah TA, Alhawati HS, Ruzayq M, Alrakaf A, Khodier A, Al-Gayyar MM (2023). Antitumor activity of ferulic acid against Ehrlich solid carcinoma in rats via affecting hypoxia, oxidative stress and cell proliferation. *Cureus* 15(7): e41985.
131. Wang L, Zhang X, Xiong X, Zhu H, Chen R, Zhang S, Chen G, Jian Z (2022). Nrf2 regulates oxidative stress and its role in cerebral ischemic stroke. *Antioxidants (Basel)* 11(12): 2377.
132. Tusat M, Mentese A, Demir S, Alver A, İmamoğlu M (2017). Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. *Int Braz J Urol* 43(6): 1160-1166.
133. Ostaszewska-Bugajska M, Podgórska A, Szal B (2022). Markers for mitochondrial ROS status. *Methods Mol Biol* 2363: 199-213.
134. Tüközkán N, Erdamar H, Seven I (2006). Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay. *Fırat Tıp Dergisi* 11(2): 88-92.
135. Kılıç E, Toprak AE, Ayhan SK, Baş A, Duruye S (2015). Oxidative stress in the attack and remission periods of schizophrenic patients. *Gazi Osmanpaşa Tıp Dergisi* 7(4): 286-298.
136. Teixeira G, Szyndralewicz C, Molango S, Carnesecchi S, Heitz F, Wiesel P, Wood JM (2017). Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors. *Br J Pharmacol* 174(12): 1647-1669.
137. Sahebnaasagh A, Saghaei F, Negintaji S, Hu T, Shabani-Borujeni M, Safdari M, Ghaleno HR, Miao L, Qi Y, Wang M, Liao P, Sureda A, Simal-Gándara J, Nabavi SM, Xiao J (2022). Nitric oxide and immune responses in cancer: searching for new therapeutic strategies. *Curr Med Chem* 29(9): 1561-1595.
138. Gao L, Loveless L, Shay C, Teng Y (2020). Targeting ROS-mediated crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. *Adv Exp Med Biol* 1260: 1-12.
139. Slika H, Mansour H, Wehbe N, Nasser SA, Iratni R, Nasrallah G, Shaito A, Ghaddar T, Kobeissy F, Eid AH (2022). Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomed Pharmacother* 146: 112442.
140. Sabaa M, ELFayoumi HM, Elshazly S, Youns M, Barakat W (2017). Anticancer activity of salicin and fenofibrate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 390: 1061-1071.

141. Kim B (2017). Western blot technique. *Methods Mol Biol* 1606: 133-139.
142. Hnasko TS, Hnasko RM (2015). The Western blot. *Methods Mol Biol* 1318: 87-96.
143. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
144. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan İ, Misir S, Mentese A, Ozer SY, Akbulut K, Kilinc K, Deger O (2015). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutr Cancer* 68(1): 165-172.
145. Elsherbiny NM, Younis NN, Shaheen MA, Elseweidy MM (2016). The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. *Pathol Res Pract* 212: 767-777.
146. Adami ER, Corso CR, Turin-Oliveira NM, Galindo CM, Milani L, Stipp MC, Do Nascimento GE, Chequin A, da Silva LM, de Andrade SF, Dittrich LR, Queiroz-Telles JE, Klassen G, Ramos EAS, Cordeiro LMC, Aco A (2018). Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from green sweet pepper (*Capsicum annuum*) on mammary tumor cells *in vivo* and *in vitro*. *Carbohydr Polym* 201: 280-292.
147. Abd-Eldaim MAA, Tousson E, El-Sayed IET, Abd El-Aleim H, Elsharkawy HN (2019). Grape seeds proanthocyanidin extract ameliorates Ehrlich solid tumor induced renal tissue and DNA damage in mice. *Biomed Pharmacother* 115: 1-10.
148. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86(1): 271-278.
149. Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38(12): 1103-1111.
150. Campion EM, Loughran ST, Walls D (2017). Protein quantitation and analysis of purity. *Methods Mol Biol* 2011(681): 229-258.
151. Demir S, Mentese A, Kucuk H, Yulug E, Turkmen Alemdar N, Ayazoglu Demir E, Aliyazicioglu Y (2024). Ethyl pyruvate attenuates cisplatin-induced ovarian injury in rats via activating Nrf2 pathway. *Drug Chem Toxicol* 47(2): 218-226.
152. Patil V, Noronha V, Dhumal SB, Joshi A, Menon N, Bhattacharjee A, Kulkarni S, Ankathi SK, Mahajan A, Sable N, Nawale K, Bhelekar A, Mukadam S, Chandrasekharan A, Das S, Vallathol D, D'Souza H, Kumar A, Agrawal A, Khaddar S, Rathnasamy N, Shenoy R, Kashyap L, Rai RK, Abraham G, Saha S, Majumdar S, Karuvandan N, Simha V, Babu V, Elamarthi P, Rajpurohit A, Kumar KAP, Srikanth A, Ravind R, Banavali S, Prabhash K (2020). Low-cost oral metronomic chemotherapy

versus intravenous cisplatin in patients with recurrent, metastatic, inoperable head and neck carcinoma: an open-label, parallel group, non inferiority, randomised, phase 3 trial. *Lancet Glob Health* 8(9): e1213-e1222.

153. More NB, Sharma N, Pulivendala G, Bale S, Godugu C (2021). Natural product topical therapy in mitigating imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation-underscoring the antipsoriatic potential of Nimbolide. *Indian J Pharmacol* 53(4): 278-285.
154. Azimi S, Lashgarian HE, Ghorbanzadeh V, Moradipour A, Pirzeh L, Dariushnejad H (2022). 5-FU and the dietary flavonoid carvacrol: a synergistic combination that induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Med Oncol* 39(12): 253.
155. Gardouha AR, Barakatb BM, Qushawyd KEM, El-kazzazf AY, Samig MM, Zaitoneh SA (2018). Antitumor activity of a molecularly imprinted nanopreparation of 5-fluorouracil against Ehrlich's carcinoma solid tumors grown in mice: Comparison to free 5-fluorouracil. *Chem Biol Interact* 295(1): 52-63.
156. Oji KA, Shafaghat A (2012). Constituents and antimicrobial activity of the essential oils from flower, leaf and stem of *Helichrysum armenium*. *Nat Prod Commun* 7(5): 671-674.
157. Chulpanova DS, Kitaeva KV, Rutland CS, Rizvanov AA, Solovyeva VV (2020). Mouse tumor models for advanced cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci* 21(11): 4118.
158. Hassona SM, Saad EA, Kiwan HA, Hassanien MM (2022). Palladium(II) Schiff base complex arrests cell cycle at early stages, induces apoptosis, and reduces Ehrlich solid tumor burden: a new candidate for tumor therapy. *Invest New Drugs* 40(4): 681-689.
159. Ellethy AT (2019). Potential antitumor activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs against Ehrlich ascites carcinoma in experimental animal. *Int J Health Sci (Qassim)* 13(5): 11-17.
160. Gaballah HH, Gaber RA, Mohamed DA (2017). Apigenin potentiates the antitumor activity of 5-FU on solid Ehrlich carcinoma: Crosstalk between apoptotic and JNK-mediated autophagic cell death platforms. *Toxicol Appl Pharmacol* 316: 27-35.
161. Amer ME, Amer MA, Othman AI, Elsayed DA, El-Missiry MA, Ammar OA (2022). Silymarin inhibits the progression of Ehrlich solid tumor via targeting molecular pathways of cell death, proliferation, angiogenesis, and metastasis in female mice. *Mol Biol Rep* 49(6): 4659-4671.

162. Alharbi DS, Albalawi SF, Alghrid ST, Alhwity BS, Qushawy M, Mortagi Y, El-Sherbiny M, Prabakar K, Elsherbiny N (2023). Ginger oil nanoemulsion formulation augments its antiproliferative effect in Ehrlich solid tumor model. *Foods* 12(22): 4139.
163. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek* 57(9-10): 453-455.
164. Amin AH, El-Missiry MA, Othman AI, Doaa AA, Gouda MS, Ismail AH (2019). Ameliorative effects of melatonin against solid Ehrlich carcinoma progression in female mice. *J Pineal Res* 67(2): e12585.
165. El-Lakkany NM, Elkattan HH, Elsis AE (2021). The ponatinib/gossypol novel combination provides enhanced anticancer activity against murine solid Ehrlich carcinoma via triggering apoptosis and inhibiting proliferation/angiogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 432: 115767.
166. Aldubayan MA, Elgharabawy RM, Ahmed AS, Tousson E (2019). Antineoplastic activity and curative role of avenanthramides against the growth of Ehrlich solid tumors in mice. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 5162687.
167. Utkusavas A, Gurevin EG, Yilmazer YN, Uvez A, Oztay F, Bulut H, Ustunova S, Esener OBB, Sonmez K, Kutucu DE, Meral I, Dimas K, Armutak EI (2022). Effects of combined administration of doxorubicin and chloroquine on lung pathology in mice with solid Ehrlich ascites carcinoma. *Biotech Histochem* 97(8): 555-566.
168. Meral I, Pala M, Akbas F, Ustunova S, Yildiz C, Demirel MH (2018). Effects of thymoquinone on liver miRNAs and oxidative stress in Ehrlich acid mouse solid tumor model. *Biotech Histochem* 93(4): 301-308.
169. Nisari M, Alpa S, Yilmaz S, Inanc N (2020). Effects of fenugreek extract on total antioxidant/oxidant status at Ehrlich ascites tumor bearing mice. *EJMI* 4(1): 116-122.
170. Albalawi AE, Althobaiti NA, Alrdahe SS, Alhasani RH, Alaryani FS, BinMowyna MN (2022). Antitumor activity of royal jelly and its cellular mechanisms against Ehrlich solid tumor in mice. *Biomed Res Int* 2022: 7233997.
171. Galindo CM, Milani L, Lima LTF, Adami ER, Go S, Noronha L, Beltrame OC, Klassen G, Ramos EAS, Elferink RPJO, Acco A (2024). 4-Nitrochalcone as a potential drug in non-clinical breast cancer studies. *Chem Biol Interact* 387: 110790.
172. Kumar M, Potkule J, Patil S, Saxena S, Patil PG, Mageshwaran V, Punia S, Varghese E, Mahapatra A, Ashtaputre N, Souza CD, Kennedy JF (2021). Extraction of ultra-low

- gossypol protein from cottonseed: characterization based on antioxidant activity, structural morphology and functional group analysis. *LWT* 140: 110692.
173. Oshima N, Yamada Y, Nagayama S, Kawada K, Hasegawa S, Okabe H, Sakai Y, Aoi T (2014). Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PLoS One* 9(7): e101735.
 174. Roy K, Wu Y, Meitzler JL, Juhasz A, Liu H, Jiang G, Lu J, Antony S, Doroshow JH (2015). NADPH oxidases and cancer. *Clin Sci* 128(12): 863-875.
 175. Sarhan MO, Haffez H, Elsayed NA, El-Haggag RS, Zagahary WA (2023). New phenothiazine conjugates as apoptosis inducing agents: Design, synthesis, In-vitro anti-cancer screening and ¹³¹I-radiolabeling for in-vivo evaluation. *Bioorg Chem* 141: 106924.
 176. Tominaga K, Kawahara T, Sano T, Toida K, Kuwano Y, Sasaki H, Kawai T, Teshima-Kondo S, Rokutan K (2007). Evidence for cancer-associated expression of NADPH oxidase 1 (Nox1)-based oxidase system in the human stomach. *Free Radic Biol Med* 43(12): 1627-1638.
 177. Fukuyama M, Rokutan K, Sano T, Miyake H, Shimada M, Tashiro S (2005). Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. *Cancer Lett* 221(1): 97-104.
 178. Chocry M, Leloup L (2020). The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Antioxid Redox Signal* 33(5): 332-353.
 179. Zhang J, Duan D, Song ZL, Liu T, Hou Y, Fang J (2021). Small molecules regulating reactive oxygen species homeostasis for cancer therapy. *Med Res Rev* 41(1): 342- 394.
 180. Vannini F, Kashfi K, Nath N (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol* 6: 334-343.
 181. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V (2013). Nitric oxide and cancer: a review. *J Surg Oncol* 11(118): 1-11.
 182. Zafirellis K, Zachaki A, Agrogiannis G, Gravani K (2010). Inducible nitric oxide synthase expression and its prognostic significance in colorectal cancer. *APMIS* 118(2): 115-124.
 183. Derici MK, Demir-Yılmaz E (2017). Nitrik oksitin kanser gelişimi ve metastaz üzerine etkileri. *THDBD* 74(2): 161-174.

184. Kilany FHE, Youness RA, Assal RA, Gad MZ (2021). miR-744/eNOS/NO axis: A novel target to halt triple negative breast cancer progression. *Breast Dis* 40(3): 161-169.
185. Sayed-Ahmad MM, Mohamad MA (2002). Contribution of nitric oxide and epidermal growth factor receptor in anti-metastatic potential of paclitaxel in human liver cancer cell (HebG2). *J Egypt Natl Canc Inst* 17(1): 35-41.
186. Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q (2017). Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *Cell Physiol* 232(11): 2977-2984.
187. Wang X, Tian J, Jiao X, Geng J, Wang R, Liu N, Gao X, Griffin N, Gao Y, Shan F (2018). The novel mechanism of anticancer effect on gastric cancer through inducing G0/G1 cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis *in vitro* and *in vivo* by methionine enkephalin. *Cancer Manag Res* 10: 4773-4787.
188. Li CL, Han XC, Zhang H, Wu JS, Li B (2015). Effect of scopoletin on apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer cells *in vitro*. *Trop J Pharm Res* 14 (4): 611-617.
189. De La Chapa J, Singha PK, Lee DR, Gonzales CB (2018). Thymol inhibits oral squamous cell carcinoma growth via mitochondria-mediated apoptosis. *J Oral Pathol Med* 47(7): 674-682.
190. WalyEldeen AA, El-Shorbagy HM, Hassaneen HM, Abdelhamid IA, Sabet S, Ibrahim SA (2022). [1,2,4] Triazolo [3,4-a]isoquinoline chalcone derivative exhibits anticancer activity via induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in Ehrlich solid carcinoma-bearing mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 395(10): 1225-1238.
191. Shehatta NH, Okda TM, Omran GA, Abd-Alhaseeb MM (2021). Baicalin; a promising chemopreventive agent, enhances the antitumor effect of 5-FU against breast cancer and inhibits tumor growth and angiogenesis in Ehrlich solid tumor. *Biomed Pharmacother* 146: 112599.
192. Pan SL, Deng YY, Fu J, Zhang YH, Zhang ZJ, Qin XJ (2022). ARHGAP17 enhances 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colon cancer cells by suppressing Rac1. *Neoplasia* 69(3): 640-647.
193. Oraby MA, Elazazy O, Karam HM, Fadaly DS, Ibrahim AA (2023). MitoQ combats tumor cell progression in Ehrlich ascites carcinoma mice: A crosstalk between

mitochondrial oxidative status, mitophagy, and NF- κ B signaling. *Life Sciences* 331: 122063.

194. Yazgan B, Mesci S, Akşahin M, Ayar A, Gül M, Yıldırım T (2021). PhTAD-substituted dihydropyrrole compounds regulate apoptotic cell death in MCF-7 cells. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 14(2): 737-750.
195. Estaphan S, Abdel-Malek R, Rashed L, Mohamed EA (2020). Cimetidine a promising radioprotective agent through modulating Bax/Bcl2 ratio: An *in vivo* study in male rats. *J Cell Physiol* 235(11): 8495-8506.
196. Proto MC, Fiore D, Forte G, Cuozzo P, Ramunno A, Fattorusso C, Gazzarro P, Pascale M, Franceschelli S (2020). Tetra-substituted pyrrole derivatives act as potent activators of p53 in melanoma cells. *Invest New Drugs* 38(3): 634-649.
197. WalyEldeen AA, El-Shorbagy HM, Hassaneen HM, Abdelhamid IA, Sabet S, Ibrahim SA (2022). [1,2,4] Triazolo [3,4-a]isoquinoline chalcone derivative exhibits anticancer activity via induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in Ehrlich solid carcinoma-bearing mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 395(10): 1225-1238.
198. Cabral BLS, da Silva ACG, de Ávila RI, Cortez AP, Luzin RM, Lião LM, de Souza Gil E, Sanz G, Vaz BG, Sabino JR, Menegatti R, Valadares MC (2017). A novel chalcone derivative, LQFM064, induces breast cancer cells death via p53, p21, KIT and PDGFRA. *Eur J Pharm Sci* 107: 1-15.
199. Wang H, Li H, Chen F, Luo J, Gu J, Wang H, Wu H, Xu Y (2017). Baicalin extracted from Huangqin (*Radix Scutellariae Baicalensis*) induces apoptosis in gastric cancer cells by regulating B cell lymphoma (Bcl-2)/Bcl-2-associated X protein and activating caspase-3 and caspase-9. *J Tradit Chin Med* 37(2): 229-235.
200. Marei HE, Althani A, Afifi N, Hasan A, Caceci T, Pozzoli T, Morrione A, Giordano A, C Carlo (2021). p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int* 21(1): 703.
201. Chen J (2016). The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(3): a026104.
202. Hager KM, Gu W (2014). Understanding the non-canonical pathways involved in p53-mediated tumor suppression. *Carcinogenesis* 35(4): 740-746.
203. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(4): 199-210.

204. Warfel NA, El-Deiry WS (2013). p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol* 25(1): 52-58.
205. Yuan J, Li X, Zhang G, Cheng W, Wang W, Lei Y, Ma Q, Song G (2021). USP39 mediates p21-dependent proliferation and neoplasia of colon cancer cells by regulating the p53/p21/CDC2/cyclin B1 axis. *Mol Carcinog* 60(4): 265-278.
206. Yan C, Yuan J, Xu J, Zhang G, Li X, Zhang B, Hu T, Huang X, Mao Y, Song G (2019). Ubiquitin-specific peptidase 39 regulates the process of proliferation and migration of human ovarian cancer via p53/p21 pathway and EMT. *Med Oncol* 36(11): 95.
207. Wang J, Yang F, Zhuang J, Huo Q, Li J, Xie N (2022). TRIM58 inactivates p53/p21 to promote chemoresistance via ubiquitination of DDX3 in breast cancer. *J Biochem Cell Biol* 143: 106140.
208. Deep G, Gangar SC, Rajamanickam S, Raina K, Gu M, Agarwal C, Oberlies NH, Agarwal R (2012). Angiopreventive efficacy of pure flavonolignans from milk thistle extract against prostate cancer: targeting VEGF-VEGFR signaling. *PLoS One* 7(4): e34630.
209. Hosseinabadi T, Lorigooini Z, Tabarzad M, Salehi B, Rodrigues CF, Martins N, Sharifi-Rad N (2019). Silymarin antiproliferative and apoptotic effects: Insights into its clinical impact in various types of cancer. *Phytother Res* 33(11): 2849-2861.
210. Dakowicz D, Zajkowska M, Mroczko B (2022). Relationship between VEGF family members, their receptors and cell death in the neoplastic transformation of colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 23(6): 3375.
211. Alfair BM, Jabarti AA, Albalawi SS, Khodir AE, Al-Gayyar MM (2023). Arctiin inhibits inflammation, fibrosis, and tumor cell migration in rats with Ehrlich solid carcinoma. *Cureus* 15(9): e44987.
212. Abd El-Salam MA, El-Tanbouly GS, Bastos JK, Metwaly HA (2022). Novel antitumor activity of the combined treatment of galloylquinic acid compounds with doxorubicin in solid Ehrlich carcinoma model via the Notch signaling pathway modulation. *Life Sci* 299: 120497.
213. Caliceti C, Zamboni L, Rizzo B, Fiorentini D, Segal FVD, Hrelia S, Prata C (2014). Role of plasma membrane caveolae/lipid rafts in VEGF-induced redox signaling in human leukemia cells. *Biomed Res Int* 2014: 857504.
214. Chen JY, Lai YS, Chu PY, Chan SH, Wang LH, Hung W (2019). Cancer-derived VEGF-C increases chemokine production in lymphatic endothelial cells to promote

- CXCR2-dependent cancer invasion and MDSC recruitment. *Cancers (Basel)* 11(8): 1120.
215. Othman AM, Abdel-Rahman N, Denewer M, Eissa LA (2023). Sinapic acid and 3,3'-diindolylmethane potentiate cyclophosphamide antitumor activity through induction of apoptosis and inhibition of metastasis. *Int Immunopharmacol* 118: 110074.
 216. Martins JMA, Rabelo-Santos MSH, Westin MCA, Zeferino LC (2020). Tumoral and stromal expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and VEGF-A in cervical cancer patient survival: a competing risk analysis. *BMC Cancer* 20(1): 660.
 217. Dofara SG, Chang SL, Diorio C (2020). Gene polymorphisms and circulating levels of MMP-2 and MMP-9: a review of their role in breast cancer risk. *Anticancer Res* 40(7): 3619-3631.
 218. Eroğlu C, Avcı E, Vural H, Kura E (2018). Anticancer mechanism of sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. *Gene* 671: 127-134.
 219. Cao LL, Pei XF, Qiao X, Yu J, Ye H, Xi CL, Wang PY, Gong ZL (2018). SERPINA3 silencing inhibits the migration, invasion, and liver metastasis of colon cancer cells. *Dig Dis Sci* 63(9): 2309-2319.
 220. Wang HH, McIntosh AR, Hasinoff BB, Rector ES, Ahmed N, Nance DM, Orr FW (2000). B16 melanoma cell arrest in the mouse liver induces nitric oxide release and sinusoidal cytotoxicity: A natural hepatic defense against metastasis. *Cancer Res* 60(20): 5862-5869.
 221. Mohamed HR, Amer M, Faky ASAE (2020). Growth retardation and apoptotic death of tumor cells by *Artemisia herba-alba* oral administration in Ehrlich solid carcinoma bearing mice. *Rev Bras* 29: 763-772.
 222. El-Banna MA, Hendawy OM, El-Nekeety AA, Abdel-Wahhab MA (2022). Efficacy of ginsenoside Rg3 nanoparticles against Ehrlich solid tumor growth in mice. *Environ Sci Pollut Res Int* 29(29): 43814-43825.
 223. Tsuruhisa S, Matsui T, Koga Y, Sotokawauchi A, Yagi M, Yamagishi SI (2021). Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-induced proliferation, VEGF and MMP-9 expression in breast cancer cells via interaction with laminin receptor. *Oncol Lett* 22(2): 629.
 224. Gutsche K, Randi EB, Blank V, Fink D, Wenger RH, Leo C, Scholz CC (2016). Intermittent hypoxia confers pro-metastatic gene expression selectively through NF- κ B in inflammatory breast cancer cells. *Free Radic Biol Med* 101: 129-142.

225. Alshehri A, Albuhayri A, Alanazi M, Althubaiti MA, Aljehani RF, Alsharif F, Alatawi TM, Albalawi SS, Khodir AE, Al-Gayyar MM (2023). Effects of echinacoside on Ehrlich carcinoma in rats by targeting proliferation, hypoxia and inflammation. *Cureus* 15(10): e46800.
226. Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH (2000). Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404(6780): 892-897.
227. Hassan BA, Hiesinger PR (2023). Autophagy in synapse formation and brain wiring. *Autophagy* 19(10): 2814-2816.
228. Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee S, Kwon KA, Lee JH, Choi HJ, Park KJ, Lee HS, Roh MS, Kim HJ (2010). Clinicopathological significance of nuclear factor-kappa B, HIF-1 alpha, and vascular endothelial growth factor expression in stage III colorectal cancer. *Cancer Sci* 101(6): 1557-1561.
229. Fang J, Huang Q, Shi C, Gai L, Wang X, Yan B (2023). Songorine inhibits oxidative stress-related inflammation through PI3K/AKT/NRF2 signaling pathway to alleviate lipopolysaccharide-induced septic acute lung injury. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 17: 1-9.
230. Bovilla VR, Kuruburu MG, Bettada VG, Krishnamurthy J, Sukocheva OA, Thimmulappa RA, Shivananju NS, Balakrishna JP, Madhunapantula SV (2021). Targeted inhibition of anti-inflammatory regulator Nrf2 results in breast cancer retardation *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicines* 9(9): 1119.
231. Sadhukhan P, Saha S, Dutta S, Sil PC (2018). Mangiferin ameliorates cisplatin induced acute kidney injury by upregulating Nrf-2 via the activation of PI3K and exhibits synergistic anticancer activity with cisplatin. *Front Pharmacol* 9: 638.
232. Saeidi S, Kim SJ, Han HJ, Kim SH, Zheng J, Lee HB, Han W, Noh DY, Na HK, Surh YJ (2020). H-Ras induces Nrf2-Pin1 interaction: Implications for breast cancer progression. *Toxicol Appl Pharmacol* 402: 115121.
233. Liu M, Yao XD, Li W, Geng J, Yan Y, Che JP, Xu YF, Zheng JF (2015). Nrf2 sensitizes prostate cancer cells to radiation via decreasing basal ROS levels. *Biofactors* 41(1): 52-57.
234. Johnson GS, Li J, Beaver LM, Dashwood WM, Sun D, Rajendran P, Williams DE, Ho E, Dashwood RH (2017). A functional pseudogene, NMRAL2P, is regulated by Nrf2 and serves as a coactivator of NQO1 in sulforaphane-treated colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 61(4): 10.

235. Abouzed TK, Beltagy EER, Kahilo KA, Ibrahim WM (2021). Molecular changes associated with the anticancer effect of sulforaphane against Ehrlich solid tumour in mice. *J Biochem Mol Toxicol* 35(2): e22655.
236. Attia AA, Salama AF, Eldiasty JG, Mosallam SAR, El-Naggar SA, El-Magd MA, Nasser HM, Elmetwalli A (2022). Amygdalin potentiates the anti-cancer effect of Sorafenib on Ehrlich ascites carcinoma and ameliorates the associated liver damage. *Sci Rep* 12(1): 6494.
237. Hajra S, Patra AR, Basu A, Saha P, Bhattacharya S (2018). Indole-3-Carbinol (I3C) enhances the sensitivity of murine breast adenocarcinoma cells to doxorubicin (DOX) through inhibition of NF- κ B, blocking angiogenesis and regulation of mitochondrial apoptotic pathway. *Chem Biol Interact* 290(25): 19-36.
238. Khurana N, Sikka SC (2018). Targeting crosstalk between Nrf-2, NF- κ B and androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancers (Basel)* 10(10): 352.
239. Sheng Y, Song Y, Li Z, Wang Y, Lin H, Cheng H, Zhou R (2013). RAB37 interacts directly with Atg5 and promotes autophagosome formation via regulating Atg5-12-16 complex assembly. *Cell Death Differ* 25(5): 918-934.
240. Piffoux M, Eriau E, Cassier PA (2021). Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 124(2): 333-344.
241. Aly RG, El-Enbaawy MI, El-Rahman SSA, Ata NS (2021). Antineoplastic activity of Salmonella Typhimurium outer membrane nanovesicles. *Exp Cell Res* 399(1): 112423.
242. Mizushima N, Yoshimori T (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3(6): 542-545.
243. Giménez-Xavier P, Francisco R, Platini F, Pérez R, Ambrosio S (2008). LC3-I conversion to LC3-II does not necessarily result in complete autophagy. *Int J Mol Med* 22(6): 781-785.
244. Mondaca-Ruff D, Quiroga C, Norambuena-Soto I, Riquelme JA, Martin AS, Bustamante M, Lavandero S, Chiongcorresponding M (2020). Regulation of total LC3 levels by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med* 26(5): 1710-1713.
245. Imbaby S, Elkholy SE, Faisal S, Abdelmaogood AKK, Mehana AE, Mansour BSA, Abd El-Moneam SM, Elaidy SM (2023). The GSTP1/MAPKs/BIM/SMAC modulatory actions of nitazoxanide: Bioinformatics and experimental evidence in subcutaneous solid Ehrlich carcinoma-inoculated mice. *Life Sci* 319: 121496.



EKLER

4. Mentese A, **Turkmen Alemdar N**, Livaoglu A, Ayazoglu Demir E, Aliyazicioglu Y, Demir S (2022). Suppression of cisplatin-induced ovarian injury in rats by chrysin: an experimental study. *J Obstet Gynaecol* 42(8): 3584- 3590.
5. Mentese A, Demir S, Kazaz IO, Yulug E, **Turkmen Alemdar N**, Ayazoglu Demir E, Kartal MB, Durmus TB, Aliyazicioglu Y (2022). Vanillic acid attenuates testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *BJBAS* 11(155): 1- 6.
6. Ayazoglu Demir E, Mentese A, Sagnak Yilmaz Z, **Turkmen Alemdar N**, Demir S, Aliyazicioglu Y (2023). Evaluation of the therapeutic effects of arbutin on cisplatin-induced ovarian toxicity in rats through endoplasmic reticulum stress and Nrf2 pathway. *Reprod Biol* 23(4): 100824.
7. Demir S, Kazaz İO, Sağnak Yılmaz Z, **Turkmen Alemdar N**, Ayazoğlu Demir E, Tepe RS, Mentese A (2023). Alleviating effect of alpha-pinene on testicular torsion and detorsion injury in rats. *J Urol Surg* 10(3): 253- 258.
8. Ayazoglu Demir E, Mentese A, Kucuk H, **Turkmen Alemdar N**, Demir S (2023). The therapeutic effect of silibinin against 5-fluorouracil-induced ovarian toxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 37(9): e23408.
9. Turan I, Canbolat D, Demir S, Kerimoglu G, Colak F, **Turkmen Alemdar N**, Mentese A, Aliyazicioglu Y (2023). The ameliorative effect of *Primula vulgaris* on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats and quantification of its phenolic components using LC-ESI-MS/MS. *Saudi Pharm J* 31(9): 101730.
10. Kerimoğlu G, Arıcı T, Bıyık AF, Kulaber A, **Türkmen Alemdar N**, Demir S, Aliyazıcıoğlu Y, Yenilmez E (2023). Protective potential of pterostilbene against cyclophosphamide-induced nephrotoxicity and cystitis in rats. *Int Urol Nephrol* 55(12): 3077- 3087.
11. Mentese A, Demir S, Küçük H, Yuluğ E, **Turkmen Alemdar N**, Ayazoğlu Demir E, Aliyazıcıoğlu Y (2023). Vanillic acid abrogates cisplatin-induced ovotoxicity through activating Nrf2 pathway. *Tissue & cell* 84: 102161.
12. Ayazoglu Demir E, Demir S, Kazaz IO, Kucuk H, **Turkmen Alemdar N**, Buyuk A, Mentese A, Aliyazicioglu Y (2023). Arbutin abrogates testicular ischemia/reperfusion injury in rats through repression of inflammation and ER stress. *Tissue & Cell* 82: 102056.
13. Ayazoglu Demir E, Demir S, Kazaz IO, Kucuk H, **Turkmen Alemdar N**, Gecici OF, Mentese A, Aliyazicioglu Y (2023). Syringic acid ameliorates ischemia/reperfusion-

induced testicular injury in rats via suppressing of HMGB1/NF- κ B axis and endoplasmic reticulum stress. *Eur J Trauma Emerg Surg* 49(3): 1595- 1602.

14. Ayazoglu Demir E, Mentese A, Livaoglu A, **Turkmen Alemdar N**, Demir S (2023). Ameliorative effect of gallic acid on cisplatin-induced ovarian toxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 46(1): 97- 103.
15. Turan I, Canbolat D, Demir S, Kerimoglu G, Colak F, **Turkmen Alemdar N**, Mentese A, Aliyazicioglu Y (2023). An investigation of the protective effect of rhododendron luteum extract on cisplatin-induced dna damage and nephrotoxicity and biochemical parameters in rats. *Pak Vet J* 43(3): 442- 448.
16. Demir S, Mentese A, Kucuk H, Yulug E, **Turkmen Alemdar N**, Ayazoglu Demir E, Aliyazicioglu Y (2024). Ethyl pyruvate attenuates cisplatin-induced ovarian injury in rats via activating Nrf2 pathway. *Drug Chem Toxicol* 47(2): 218- 226.
17. Ayazoglu Demir E, Mentese A, Livaoglu A, **Turkmen Alemdar N**, Aliyazicioglu Y, Demir S (2024). Chlorogenic acid attenuates cisplatin-induced ovarian injury in rats. *Drug Chem Toxicol* 47(2): 213-217.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Demir EA, Demir S, **Türkmen N**, Turan İ (2021). Rosa pimpinellifolia ekstraktının insan tümör hücrelerinin çoğalmasına etkisi. *KSÜ Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi* 24(6): 1170- 1176.
2. Demir S, Mentese A, Ayazoğlu Demir E, **Turkmen Alemdar N**, Aliyazıcıoğlu Y (2022). Sıçan yumurtalık dokusunda 5-florourasil ile uyarılan oksidatif stres ve inflamasyona karşı sinapik asitin terapötik etkisi: deneysel bir yaklaşım. *Farabi Tıp Dergisi* 2(2): 1- 7.
3. Ayazoğlu Demir E, Mentese A, Demir S, **Türkmen Alemdar N**, Aliyazıcıoğlu Y (2022). Sıçanlarda 5-florourasil kaynaklı yumurtalık hasarına karşı krisinin terapötik etkisinin değerlendirilmesi. *Farabi Tıp Dergisi* 1(2): 1- 7.
4. Mentese A, Demir S, **Turkmen Alemdar N**, Aliyazıcıoğlu Y, Değer O (2022). Klorojenik asidin sıçan yumurtalık dokusunda 5-florourasil ile indüklenen oksidatif hasar üzerine etkisi. *Farabi Tıp Dergisi* 1(1): 1- 7.
5. Kerimoğlu G, Bilgin G, Kerimoğlu S, **Turkmen Alemdar N**, Demir S, Aliyazıcıoğlu Y (2023). The ameliorating effects of bılberry on methotrexate-induced intestinal injury. *KÜTFD* 25(3): 455- 462.

6. Kerimoğlu G, Bilgin G, Kerimoğlu S, **Türkmen Alemdar N**, Demir S, Aliyazıcıoğlu Y (2023). Yaban mersini ekstresinin metotreksat kaynaklı hepatotoksisite üzerine etkilerinin araştırılması. Harran Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi 20(3): 519- 524.
7. Ayazoğlu Demir E, Menteşe A, Kucuk H., **Turkmen Alemdar N**, Demir S, Aliyazıcıoğlu Y (2023). N-acetylcysteine ameliorates 5-fluorouracil-induced ovarian injury in rats. Clin Exp Health Sci 13: 776- 781.
8. Demir S, Menteşe A , Livaoğlu A, Ayazoğlu Demir E, **Turkmen Alemdar N**, Aliyazıcıoğlu Y (2023). Therapeutic effect of sinapic acid against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammation in rat ovarium: an experimental approach. Farabi Tıp Dergisi 2(2): 1- 7.
9. Ayazoğlu Demir E, Menteşe A, Kucuk H., **Turkmen Alemdar N**, Demir S, Aliyazıcıoğlu Y (2023). Evaluation of therapeutic effect of chrysin against 5-fluorouracil-induced ovarian damage in rats. Farabi Tıp Dergisi 2(1): 1- 7.