

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE *Clitocybe nebularis*'in HÜCRE
DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİSİ

Okan ONAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE *Clitocybe nebularis*'in HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİSİ

Okan ONAR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Eş-Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pelin TELKOPARAN AKILLILAR

Kolorektal kanser, insidansı ve mortalitesi dünya genelinde en yüksek beş kanser türü arasındadır. Cerrahi, kemoterapi ve bunların kombinasyonu halen hastalığın tedavisi için kullanılan ana seçeneklerdir. 5-Fluorourasil (5-FU), kolorektal kanserin tedavisi için önemli bir antikanser ajan olmasına rağmen, ilaç direnci ve doza bağlı yan etkileri tedavinin etkinliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle, 5-FU'nun etkinliğini artırmak için etkili ve düşük toksisiteye sahip yeni farmasötiklerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Günümüzde kemoterapötik ajanları destekleyebilecek etkili ve toksik olmayan doğal bileşiklere yönelik artan bir ilgi vardır. Bu nedenle doğal ürünlerden yeni öncü bileşiklerin keşfi için birçok çalışma yapılmaktadır. Bu bağlamda mevcut çalışma ile, *Clitocybe nebularis* mantarından (CN) elde edilen etanolik özütün HT-29 insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi ve potansiyel moleküler etki mekanizmaları *in vitro* ortamda detaylı olarak incelenmiştir. Ayrıca CN özütünün kolon kanseri tedavisinde kullanılan antimetabolit kemoterapötik ajan 5-FU'nun anti-kanser etkinliğini artırma yeteneği ve olası etki mekanizması da araştırılmıştır. Sonuçlarımız, CN özütünün kolon kanseri hücreleri üzerinde seçici sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. CN ve 5-FU kombinasyonu ile HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri, tek başına kullanımlarına göre önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca CN ve 5-FU kombinasyonu, S fazında hücre döngüsünün durdurulması aracılığıyla da sinerjik antikanser etkinlik göstermiştir. Bulgularımız, CN özütünün hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve S fazında hücre döngüsü durmasını indükleyerek 5-FU ile sinerjistik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Sonuçlar ayrıca CN özütü uygulaması sonucunda p21, p27 ve p53 ekspresyon seviyelerinin arttığını da göstermektedir. Bu nedenle mevcut çalışma CN özütünün kolorektal kanser tedavisinde tamamlayıcı bir tedavi seçeneği olabileceği konusunda umut verici kanıtlar sağlamaktadır.

Ocak 2022, 101 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Clitocybe nebularis*, kolon kanseri, hücre döngüsü, qRT-PCR (Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR), mRNA

ABSTRACT

PhD Thesis

EFFECT OF *Clitocybe nebularis* ON THE CELL CYCLE IN HUMAN COLON
CANCER CELLS

Okan ONAR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Pelin TELKOPARAN AKILLILAR

Colorectal cancer (CRC) incidence and mortality rates are among the five highest of all cancer types worldwide. Although 5-Fluorouracil (5-FU) is an important anticancer agent for the treatment of CRC, drug resistance and side effects limit the effectiveness of the treatment. Therefore, it's important to develop new effective and low-toxic pharmaceuticals to increase the efficacy of 5-FU. Today, there is a growing interest in effective and low-toxic natural compounds to support chemotherapeutic agents. For this reason, many studies are carried out for the discovery of new precursor compounds from natural products. In this study, the cytotoxic activity of the ethanolic extract obtained from the *Clitocybe nebularis* mushroom (CN) on HT-29 cells and its potential molecular mechanisms of action were investigated in detailed *in vitro*. In addition, the ability of CN to increase the anti-cancer activity of the antimetabolite chemotherapeutic agent 5-FU used in the treatment of CRC, and its possible mechanism of action were also investigated. Our results showed that CN extract has selective cytotoxic activity on colon cancer cells. With the combination of CN and 5-FU, their cytotoxic activity on HT-29 cells was significantly increased compared to their use alone. Our findings displayed that CN has a synergistic effect with 5-FU by inhibiting cell proliferation and inducing cell cycle arrest in the S phase. In addition, p21, p27, and p53 expression levels were significantly increased after CN treatment. Therefore, the current study provides promising evidence that CN extract may be a complementary therapy in the treatment of CRC.

January 2022, 101 pages

Key Words: *Clitocybe nebularis*, colon cancer, cell cycle, qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR), mRNA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana hep yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, akademik hayatımın şekillenmesinde çok büyük rolü olan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, benim için bir danışmandan fazlası olan, değerli danışmanım ve hocam Sayın Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Tez çalışmalarımın bütün aşamalarında bana her türlü desteği veren, değerli bilgilerini ve vaktini benden esirgemeyen, bilimsel gelişimimde çok değerli katkıları bulunan kıymetli eş danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pelin TELKOPARAN AKILLILAR'a (Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı),

Çok değerli katkılarından dolayı TİK üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ'a (Gazi Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı),

Doktora sürecim boyunca ihtiyaç duyduğum her alanda desteklerini, akademik tecrübelerini ve laboratuvar altyapılarını benden esirgemeyen Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalından değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a, Sayın Doç. Dr. Fadime KIRAN'a, Sayın Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e ve Sayın Araş. Gör. Dr. Başar KARACA'ya,

Başta Sayın Dr. Öğr. Üyesi Naz DİZECİ (Ankara Medipol Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında beraber çalıştığım tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, sonsuz desteklerini gördüğüm sevgili annem Figen ONAR, kardeşim Volkan ONAR ve adını zikredemediğim tüm dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tezi, Ankara Üniversitesi ve YÖK 100/2000 Projesi tarafından desteklenmiş olup, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve Yükseköğretim Kurulu'na en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Okan ONAR
Ankara, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1 Kanser	5
2.2 Kolorektal kanser.....	9
2.2.1 Kolorektal kanserin evreleri	12
2.2.2 Kolorektal kanserde tedavi yaklaşımları	16
2.2.2.1 5-Florourasil	20
2.3 <i>Clitocybe nebularis</i>	26
2.4 Aktif Mantar Bileşenleri.....	28
2.4.1 Kanser tedavisinde doğal bileşikler	29
2.5 Hücre Döngüsü	31
2.5.1 Hücre Döngüsünün Kontrolü	34
2.5.2 Hücre Döngüsü ve Kanser	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1 Materyal	42
3.2 Yöntem	42
3.2.1 Mantar örneğinin toplanması, saklanması ve tür teşhisi	42
3.2.2 Mantar örneklerinin ekstraksiyon için hazırlanması	43
3.2.3 Hücre kültürü	43
3.2.4 Sitotoksik etkinin araştırılması.....	44
3.2.5 İlaç kombinasyonu etkinliğinin değerlendirilmesi.....	45
3.2.6 Morfolojik analizler	47

3.2.7 Kristal viyole deneyi.....	47
3.2.8 Koloni Oluşumu Deneyi.....	48
3.2.9 Hücre göçü analizleri	49
3.2.10 Hücre döngüsü analizi	49
3.2.11 Gen ifade analizleri	50
3.2.12 İstatistiksel analizler	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	54
4.1 Sitotoksik etkinin araştırılması.....	54
4.2 İlaç kombinasyonu etkinliğinin değerlendirilmesi.....	58
4.3 Morfolojik analizler	61
4.4 Kristal viyole deneyi.....	62
4.5 Koloni oluşumu deneyi	64
4.6 Hücre göçü analizleri	65
4.7 Hücre döngüsü analizi	67
4.8 Gen ifade analizleri	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	74
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ.....	99

SİMGELER DİZİNİ

β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Celcius derece
dH_2O	Distile su
EtOH	Etanol
gr	Gram
IC_{50}	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
kDa	Kilodalton
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
mBar	Milibar

Kısaltmalar

AJCC	Amerikan Ortak Kanser Komitesi
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ACS	Amerikan Kanser Topluluğu
APC	Adenomatosis Poliposis Koli
Caco-2	Kolorektal adenokarsinoma hücre hattı
CAPOX	Kapesitabin/oksalipatin
CDK	Siklin bağımlı kinaz
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CD	Sitozin deaminaz
CN	<i>Clitocybe nebularis</i>
CN+5-FU	<i>Clitocybe nebularis</i> /5- Florourasil kombinasyonu
CI	Kombinasyon indeksi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DRI	Doz azaltma indeksi
DPD	Dihidropirimidin dehidrojenaz
DHFU	Dihidroflorourasil
EC	Enzim kominyonu numarası
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FOLFOX	5-FU/folinik asit/oksalipatin
FOLFIRI	5-FU/folinik asit/irinotekan
FOLFOXIRI	5-FU/folinik asit/oksalipatin/irinotekan

HEK-293	Böbrek epitel hücre hattı
HT-29	Kolorektal adenokarsinoma hücre hattı
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
mRNA	Mesajcı RNA
MTT	3-(4,5-dimetilltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NIH	ABD Ulusal sağlık enstitüleri
OD	Optik dansite
KKH	Kanser Kök Hücresi
KRK	Kolorektal kanser
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI	Propidyum iyodür
PSK	Polisakkarit K
THSK	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
TK	Timidin kinaz
TP	Timidin fosforilaz
TS	Timidilat sentaz
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UFT	Tegafur/urasil
UP	Üridin fosforilaz
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
5-FU	5- Florourasil
5-FC	5-Florositozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 2020 yılında Türkiye ve Dünya'daki yeni kanser vakaları	5
Şekil 2.2 Kanser ayırt edici özellikleri	7
Şekil 2.3 Tümör oluşum sürecinde mutasyonların etkisi	8
Şekil 2.4 Kolorektal kanser için risk faktörleri	10
Şekil 2.5 Kolorektal kanser gelişim yolları	12
Şekil 2.6 Kalın bağırsak dokusunun katmanları	13
Şekil 2.7 Kolon kanserinin evreleri	16
Şekil 2.8 Kanser hücrelerinde ilaç direnci gelişim mekanizmaları	20
Şekil 2.9 Urasil ve 5-Fluorouracil yapıları	21
Şekil 2.10 5-Fluorouracil metabolizması ve etki mekanizması	23
Şekil 2.11 Kapesitabin metabolizması ve etki mekanizması	24
Şekil 2.12 5-Fluorouracil aracılığıyla p53 aktivasyonu	25
Şekil 2.13 5-Fluorouracilin 5-Fluorouracile dönüştürülmesi	26
Şekil 2.14 Clitocybe nebularis (Batsch) P. Kumm	27
Şekil 2.15 Hücre döngüsünün aşamaları	32
Şekil 2.16 Hücre döngüsü kontrol noktaları	34
Şekil 2.17 Hücre döngüsü kontrol noktaları ve hücre döngüsü fazlarına göre siklinlerin ifade edilmesi	35
Şekil 2.18 Hücre döngüsünün düzenlenmesi	37
Şekil 4.1 CN özütünün HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi	55
Şekil 4.2 5-FU'nun HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi	55
Şekil 4.3 CN özütünün Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi	56
Şekil 4.4 5-FU'nun Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi	56
Şekil 4.5 CN özütünün HEK-293 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi	57
Şekil 4.6 CN + 5-FU kombinasyonu için kombinasyon indeksi (CI) grafiği	59
Şekil 4.7 CN + 5-FU kombinasyonunun HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi	60
Şekil 4.8 HT-29 hücrelerinde CN + 5-FU kombinasyonu için doz azaltım grafiği	61
Şekil 4.9 HT-29 hücrelerinin morfolojij analizleri (10x)	61
Şekil 4.10 HT-29 hücrelerinin kristal viyole ile boyanması (10x)	63
Şekil 4.11 Kristal viyole boyanması sonuçları	63

Şekil 4.12 Koloni oluşumu deneyi sonuçları (10x inverted).....	64
Şekil 4.13 Koloni oluşumu deneyi sonuçları	65
Şekil 4.14 Hücre göçü analiz sonuçları (4x)	66
Şekil 4.15 Hücre göçü analiz sonuçları.....	67
Şekil 4.16 Akış sitometrisi analizi sonucunda elde edilen hücre döngüsü dağılımları.....	67
Şekil 4.17 Akış sitometrisi analizi sonucunda elde edilen hücre döngüsü dağılımları.....	68
Şekil 4.18 Siklin A2 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler	70
Şekil 4.19 Cdk2 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler.....	70
Şekil 4.20 Cdk1 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler.....	71
Şekil 4.21 p53 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler	72
Şekil 4.22 p21 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler	72
Şekil 4.23 p27 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler	73
Şekil 5.1 CN özütünün p53 aracılığıyla hücre döngüsü inhibisyonu.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kolorektal kanserin evreleri.....	14
Çizelge 2.2 Siklin bağımlı kinazlar ve düzenleyici siklinleri	35
Çizelge 2.3 Hücre döngüsü hedefli terapötik ajanlar	38
Çizelge 3.1 Kombinasyon analizi için kullanılan IC50 konsantrasyonları	46
Çizelge 3.2 Kombinasyon indeksi (CI) analiz parametreleri	46
Çizelge 3.3 cDNA Sentez protokolü.....	51
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan primerlerin listesi	52
Çizelge 3.5 qRT-PCR reaksiyon karışımı.....	52
Çizelge 3.6 qRT-PCR reaksiyon koşulları	53
Çizelge 4.1 CN ve 5-FU için hesaplanan IC50 konsantrasyonları.....	57
Çizelge 4.2 Kombinasyon çalışmasından elde edilen CI değerleri.....	59

1. GİRİŞ

Kanser günümüzde dünya genelinde ölümlerin başlıca sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Küresel kanser yükü geçtiğimiz otuz yılda iki katından daha fazla artmıştır, 2018 yılında dünya genelinde 9.6 milyon insan kanserden hayatını kaybederken, bu sayı küresel çapta tüm insan ölümlerinin yaklaşık olarak altıda biridir (WHO 2018). Kanser, bir doku veya organdaki hücrelerin kontrolsüz ve istilacı bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen bir hastalıktır. Vücut hücreleri sağlıklı dönemlerinde sınırlı ve kontrollü biçimde bölünebilme yeteneğine sahiptir. Ölen hücrelerin yenilenmesi, yaralanan ve yaşlanan hücrelerin onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar, buna paralel olarak vücutta işlevler normal bir şekilde yürütülür. Kanserli hücrelerde çoğalmayı düzenleyici mekanizmaların bozulması söz konusudur. Bu mekanizmalar ortadan kalktığında, hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalırlar. Kanser gelişiminde, çoğalmayı denetleyen mekanizmaların ortadan kalkması, birçok mutasyonlar ve kromozomal anomalinin hücrelerde birikmesi sonucu ortaya çıkar. Yayılma ve metastaz kanser hücrelerinin tanımlayıcı özellikleridir. Genetik mutasyon aracılığıyla normal hücreden malign hücreye dönüşümünden sonra kanser hücresi; hızla çoğalır, çevresindeki dokuları işgal eder, ana yumrudan koparak kan ya da lenf sistemi ile göç ederek uzak bölgelerde kanser büyümesi için ikincil odaklar kurabilir (Fidler 2003). Bu şekilde tümörler bulundukları doku ve organlar dışında başka doku ve organlara da yayılabilirler. Metastaz, kanser kaynaklı ölümlerin %90'ından sorumludur (Patel ve Chen 2012).

Kolorektal kanser, Uluslararası Kanser Ajansı tarafından 2018 yılında yayımlanan verilere göre kadınlarda ikinci, erkeklerdeyse üçüncü en sık görülen kanser türüdür (IARC 2018). 2018 yılında 1.8 milyon kolorektal kanser vakası teşhis edilmiş ve buna bağlı olarak 881.000 ölüm meydana gelmiştir. Bu rakam yaklaşık olarak tüm kanser ölümlerinin % 10'unu oluşturmaktadır (Bray vd. 2018). Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun 2018 yılında yayınladığı rapora göre kolorektal kanser, ülkemizde erkekler ve kadınlarda en sık görülen üçüncü kanser türü olarak bildirilmiştir (THSK 2018). Epidemiyolojik çalışmalara göre, kolorektal kanser vakalarının 2030 yılına gelindiğinde

%60 artarak 2.2 milyon yeni vaka sayısına ve 1.1 milyon ölüm sayısına ulaşması beklenmektedir (Arnold vd. 2017).

Cerrahi operasyon, kemoterapi ve bunların kombinasyonu kolorektal kanserin tedavisi için halen kullanılan ana seçeneklerdir. Birçok erken evre kolorektal kanser için tek başına cerrahi rezeksiyonla tedavi uygulansa da çoğu zaman cerrahi, adjuvan kemoterapi ile birleştirilmektedir (Wang vd. 2007). Bununla beraber, hastaların yaklaşık olarak %40-50'si nüks, metastaz ve ilaç direnci nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Bray vd. 2018). Kemoterapötik ajanların oluşturduğu toksisite tedavinin etkinliğini de sınırlamaktadır. İlaçların oluşturduğu ciddi yan etkiler sadece hastaların yaşam kalitesini kötüleştirmekle kalmayıp, aynı zamanda birçok hastanın tedaviyi bırakmasına da yol açmaktadır (Schnell 2003). Son dönemdeki terapötik ilerlemelere rağmen, 5-Fluorourasil (5-FU) halen ileri evre ve metastatik kolorektal kanserin tedavisinde en yaygın kullanılan ilk seçenek kemoterapi ilacıdır (Webber vd. 2015). 5-FU, kanser hücrelerinin büyümesini engelleyen bir kemoterapötik ajandır. Antimetabolit bir primidin analogu olan 5-FU, anti-neoplastik etkisini timin bazının *de novo* sentezini katalize etmek için anahtar bir enzim olan timidilat sentazın inhibisyonu yoluyla göstermektedir (Parker ve Cheng 1990). 5-FU, nükleozid metabolizmasına müdahale eder, RNA ve DNA yapısına dahil olarak hücre sitotoksitesi ve ölümüne yol açmaktadır (Noordhuis vd. 2004). Kolon kanseri tedavisinde 5-FU; tek başına veya oksaliplatin, irinotekan veya folinik asit gibi diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte kombine olarak kullanılmaktadır (Gramont vd. 2000, Benson vd. 2021). Bununla birlikte, kolon kanserinin tedavisinde ilaç direnci, 5-FU ve/veya adjuvan kullanımlarının etkinliğini sınırlandıran önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Tek başına 5-FU'nun ilerlemiş kolorektal kanser için genel yanıt oranı %10-15 iken, 5-FU'nun diğer anti-tümör ilaçlarla kombinasyonu hücresel yanıt oranlarını yalnızca %40-50'ye yükseltmektedir (Giacchetti vd. 2000, Douillard vd. 2000, Gu vd. 2019). Bu ilacın ayrıca mide bulantısı, yorgunluk ve yüksek dozlarda kan hücrelerinin sayısında azalma gibi hastaların yaşam kalitesini ciddi anlamda olumsuz etkileyen yan etkileri de bulunmaktadır (Delval ve Klastersky 2002, Benson vd. 2021). Bu nedenle, kolorektal kanser tedavisinde 5-FU'nun etkinliğini artırmak ve ilaç direncinin üstesinden gelebilmek adına yeni ve etkili stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Son yıllarda yeni ilaç ve öncül bileşiklerin keşfi için doğal bileşiklerden elde edilen, biyolojik olarak aktif moleküllere karşı oldukça artan bir ilgi vardır. Doğal ürünler, ister saf bileşenler ister standardize ham özütler halinde olsun yeni nesil ilaçlar için sınırsız bir fırsat sunmaktadır. Günümüzde kullanılmakta olan modern terapötik ilaçların yarısından fazlasının doğal ürün kökenli olması da bu ilgiyi doğrulamaktadır (Clardy ve Walsh 2004). Kemoterapötik ajanların doğal bileşiklerle birlikte kullanılmasının, hem bu ajanların anti-kanser aktivitesini artırabileceği ve hem de sebep oldukları yan etkileri azaltabileceği son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Yu vd. 2014, Lin vd. 2019). Bu nedenle, düşük toksisiteye sahip etkili doğal bileşikler, kolorektal kanserin tedavisi için yeni bileşikler veya stratejiler bulunmasına yardımcı olabilecektir.

Mantarlar, günümüzde bilim dünyası için bu doğal bileşenlerin en önemli kaynaklarından birisidir. Mantarlar farklı besin değerlerine sahip çok sayıdaki yenilebilir türleriyle, binlerce yıldır tüm dünyada önemli bir besin kaynağıdır. Bununla beraber, tıbbi mantarlar olarak da adlandırılan bazı türler özellikle uzak doğuda yaygın bir şekilde tıbbi amaçla da kullanılmaktadır (Wasser 2002, Dai vd. 2009, Patel ve Goyal 2012). İçerdikleri lektinler, terpenoidler, steroidler, polifenoller ve polisakkaritler gibi çok çeşitli biyoaktif bileşikler nedeniyle son yıllarda terapötik potansiyelleri de büyük ilgi görmektedir (Song vd. 2013, Valverde vd. 2015). Mantarların biyolojik aktiviteleri yapılan kapsamlı çalışmalarla doğrulanmıştır; anti-kanser, antioksidan ve anti-enflamatuar etkileriyle potansiyel vaat etmektedirler (Zaidman vd. 2005). Mantar özütlerinin, mide-bağırsak ve meme kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin önlenmesi ve tedavisi için kullanıldığı bildirilmiştir (Fontana vd. 2014, Lee vd. 2015). Bu nedenle tıbbi mantarlar ve sentetik türevlerinin, insan kanserlerinin önlenmesi için yenilikçi ajanların geliştirilmesinde önemli bir rol oynaması beklenmektedir. Aktif mantar bileşenleri için önemli bir olumsuz etki bildirilmemiştir, aksine vücudun çeşitli biyolojik ve çevresel streslere uyum sağlamasına yardımcı oldukları gösterilmiştir (Jiang vd. 2010).

Ülkemiz oldukça zengin bir makrofungus çeşitliliğine sahiptir, yaklaşık olarak 2500 makrofungus türü bulunmaktadır ve bunların yaklaşık 300 tanesi besin kaynağı olarak tüketilmektedir (Sesli ve Denchev 2014). Bununla birlikte birçoğunun potansiyel

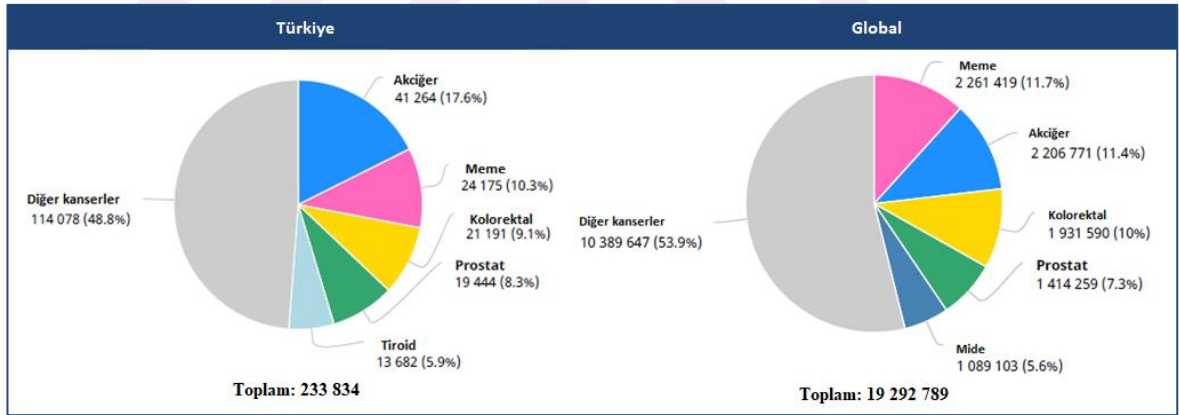
biyolojik özellikleri henüz keşfedilmemiştir. Besin olarak tüketilen doğal ürünlerin insan sağlığı üzerine olası etkilerinin incelenmesi ve bu etkilerin özellikle moleküler düzeyde aydınlatılması günümüzde büyük bir önem arz etmektedir. *Clitocybe nebularis* ülkemizde Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren, *Tricholomataceae* familyasına ait yenebilir bir türdür (Dizeci vd. 2021). *Clitocybe nebularis*'de dahil olmak üzere *Clitocybe* türleri genel olarak tıbbi mantarlar olarak sınıflandırılmamasına rağmen, yapılan çeşitli çalışmalarla sahip oldukları farmasötik potansiyeller açıkça gösterilmiştir. Ribonükleositler, lektinler, polisakkaritler ve fenolik bileşikler gibi önemli biyoaktif moleküller *Clitocybe* türlerinde tespit edilmiş olup, antioksidan, anti-proliferatif ve anti-viral etkilerle ilişkilendirilmiştir (Pohleven vd. 2016, Dizeci vd. 2021).

Yukarıda sözü edilen bilgiler ışığında planlanan bu tez çalışması kapsamında, *Clitocybe nebularis* mantarından elde edilmiş etanolik özütün, HT-29 insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif aktivitesi ve potansiyel moleküler etki mekanizmaları *in vitro* ortamda detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Ayrıca mevcut çalışma ile *C. nebularis* özütünün, kolon kanseri tedavisinde kullanılan antimetabolit bir kemoterapötik ajan 5-FU'in anti-kanser etkinliğini artırma yeteneğini test etmek de amaçlanmıştır. Yapılan bu çalışma, *C. nebularis*'in anti-kanser potansiyelinin ve etki mekanizmasının detaylı bir şekilde incelendiği ilk çalışmadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi, metastaz ve invazyon ile karakterize edilmektedir. İnsan vücudunu etkileyen 100'den fazla türü sınıflandırılmış, insidans ve mortalite oranları günümüzde hızla artmakta olan bir hastalıktır (Pavlopoulou vd. 2015). Dünya popülasyonunun hızlı bir şekilde artan ve yaşlanan nüfusu, kanserin görülme sıklığının da artmasına neden olmaktadır. Kanser, günümüzde hem ülkemiz hem de Dünya'da kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıradaki ölüm nedenidir (TÜİK 2018). Küresel olarak yaklaşık her 6 ölümden birine, ülkemizdeyse her 5 ölümden birine sebep olmaktadır (TÜİK 2018, WHO 2018). 2020 yılında ülkemizde; 233 bin yeni kanser vakası ve kansere bağlı 126 bin ölüm, dünya çapında ise 19.3 milyon yeni kanser vakası ve 9.9 milyon ölüm meydana gelmiştir (Şekil 2.1) (Sung vd. 2021).



Şekil 2.1 2020 yılında Türkiye ve Dünya'daki yeni kanser vakaları (Sung vd. 2021)

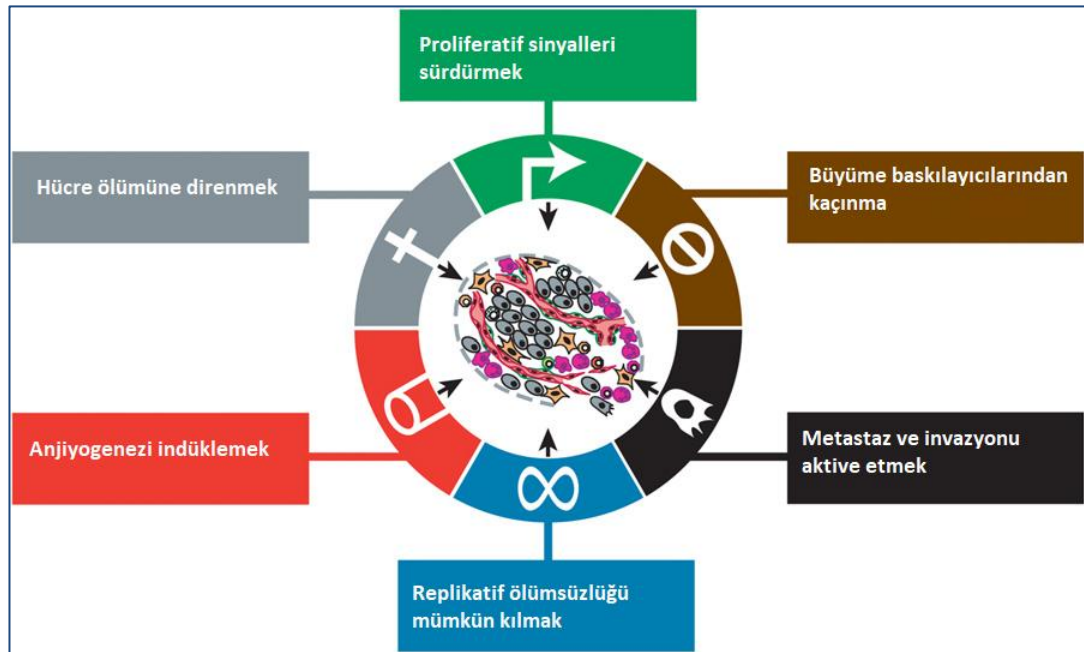
Hücrelerin kontrolsüz bölünmesi sonucunda ortaya çıkan hücre topluluğu tümör olarak adlandırılmaktadır. Tümörleşen hücrelerin istilacı bir şekilde büyümesi ve köken aldığı dokudan başka yerlerde de istilacı bir şekilde yayılabilmesi, iyi ve kötü huylu tümör kavramları arasındaki ayrıma yol açmaktadır. İyi huylu bir tümör, tek başına kanserin göstergesi değildir. İyi huylu tümörler vücuda yayılarak metastaz yapmazlar, köken aldıkları bölgede lokalize olarak kalırlar, malign tümörlerle kıyasla çok daha yavaş

büyürler ve genellikle bir kapsül ile çevrili olduklarından komşu dokularla etkileşimleri sınırlıdır (Cooper 2000). Bununla beraber, malign yani kötü huylu tümörler ise daha hızlı büyürler ve bulundukları yer ile sınırlı kalmayarak, hücre içi çeşitli moleküler mekanizmaları yeniden düzenleyerek/ değiştirerek invazyon ve metastaz özellikleri kazanarak farklı doku ve organlara yayılırlar (Welch ve Hurst 2019). Kanser hücrelerinin kendine özgü özelliklerinden birisi, belirli organ(lar)a metastaz yapma eğilimleridir (Fidler 2003). Örneğin, prostat ve kolon kanseri sırasıyla kemiklere ve karaciğere metastaz yaparken; akciğer kanseri hücreleri adrenal bezlere, karaciğere, beyne ve kemiklere yayılırken, meme kanseri hücreleri akciğerlere ve kemiklere metastaz yapmaktadırlar (Deep ve Agarwal 2010, Welch ve Hurst 2019).

Köken aldıkları doku, kanserin ayırt edici özelliklerini de vermektedir. Vücutta bulunan farklı hücrelerde meydana gelmeleri sebebiyle, oluşum yerleri ve süreçleri farklılık göstermektedir (Cooper 2000). İnsan kanserlerinin yaklaşık % 90'ı epitel hücrelerinin maligniteleridir ve *karsinoma* olarak sınıflandırılmaktadır (Cooper 2000). Mezoderm hücrelerinden (kemik, kas) türeyen kanserler *sarkoma* olarak bilinirken, meme dokusu gibi glandüler doku kanserleri ise *adenokarsinoma* olarak adlandırılmaktadır (AJCC 2018). Farklı kökene sahip kanser türlerinin farklı özellikleri vardır. Bununla birlikte, temelde yatan hücresel ve moleküler yollar farklı olsa bile, tüm kanser türlerinde gözlemlenen sonuç aynıdır (Pecorino 2016).

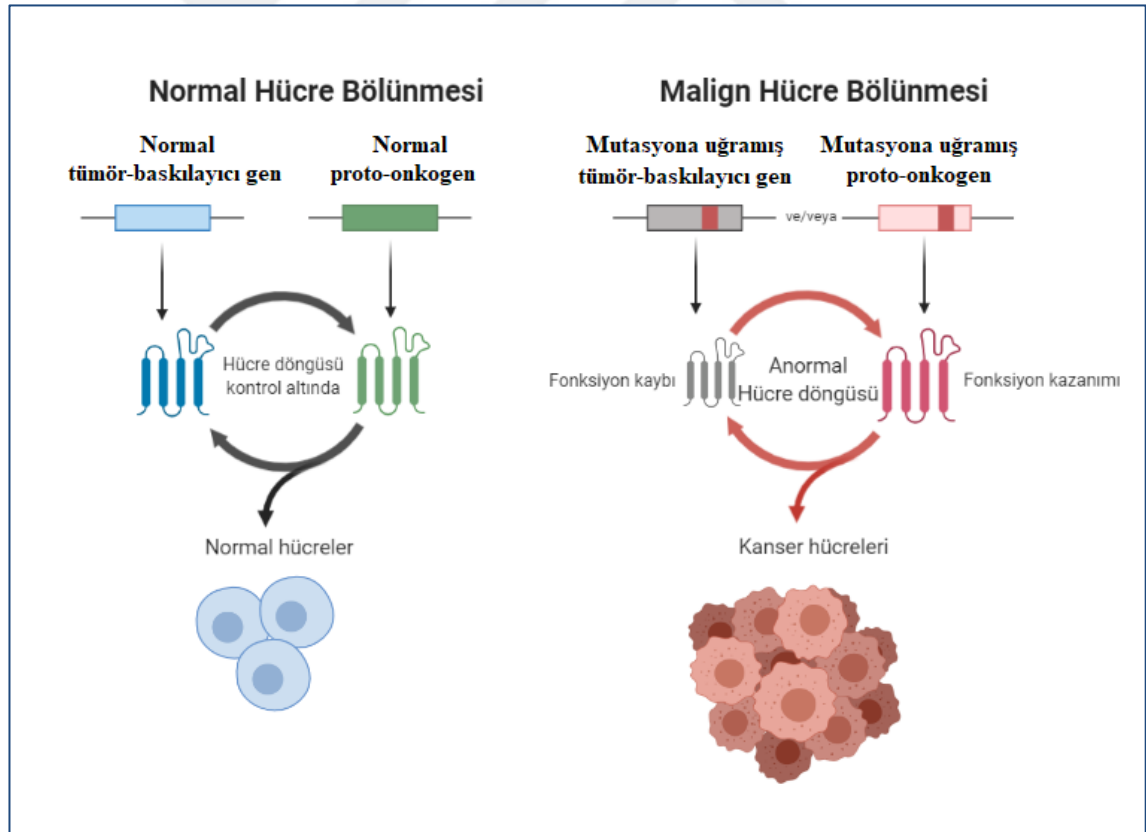
Kanser, hücresel düzeyde çeşitli genomik modifikasyonlarına bağlı olarak DNA'daki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Yapılmış çok sayıda çalışma sonucunda tümör hücrelerinin DNA'sının, nokta mutasyonları gibi tek bir baz çiftindeki değişikliklerden, delesyonlar ve kromozomal translokasyonlar gibi büyük kromozomal anormalliklere kadar birçok değişiklik içerdiğini göstermektedir (Pecorino 2016). Genetik materyalde meydana gelen mutasyonlar sonucunda kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak düzenli bir şekilde büyüme ve çoğalmayı kontrol altında tutan mekanizmalardan kaçarak, kendilerine özgü hayatta kalma sistemlerini oluşturabilme yetenekleri kazanmışlardır (Kiraz ve Baran 2018). Onkogenez veya karsinogenez olarak adlandırılan bu süreç, normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi ve kontrolsüz bir şekilde çoğalarak bulunduğu doku veya organda tümör kitlesi oluşturması sürecidir. Bu

süreç; hücresel, genetik ve epigenetik düzeylerdeki değişiklikler ve anormal hücre bölünmesi ile karakterize edilmektedir (Pitot 1993). Karsinogenez sonucunda kanser hücreleri normal sağlıklı hücrelerden farklı bazı özellikler kazanarak, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasını ve büyüme potansiyelini tümörün primer olarak bulunduğu alandan daha farklı yerlerde de göstermesine sebep olmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000). Kanserın ayırt edici özellikleri olarak da bilinen, büyüme faktörlerine ihtiyaç duymamak ve sınırsız bölünme potansiyeli kazanımı, apoptotik sinyallerden kaçabilme, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçabilme, anjiyogenez, invazyon ve metastaz özelliklerinin kazanımı, bağışıklık sisteminden kaçabilme ve enerji metabolizmasını değiştirebilme gibi özellikler tümör hücrelerinin çok aşamalı gelişimi sırasında kazandıkları ve onları sağlıklı hücrelerden ayıran temel özelliklerdir (Şekil 2.2) (Hanahan ve Weinberg 2011). Bu özellikler kanser hücrelerinin hayatta kalmasına, çoğalmasına ve yayılmasına olanak sağlayan, çeşitli faktörlerin etkisiyle karsinogenez sürecinde kazanılmış işlevsel yeteneklerdir. Genomik veya genomik olmayan çeşitli faktörlerin, tümörleşen hücrelerinin bu özellikleri edinme süreçlerine yardımcı oldukları günümüzde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hanahan ve Weinberg 2011). Bunlardan en önemlisi genomik kararsızlığın gelişmesi ve bunun sonucunda meydana gelen mutasyonlardır.



Şekil 2.2 Kanserın ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011)

Mutasyonlar sonucunda tümör mikroçevresindeki diğer hücrelere karşı avantaj sağlayabilecek mutant genotipe sahip hücreler büyüyerek ortamda baskın hale gelirler. Bununla birlikte, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi bazı moleküler değişikliklerin ortaya çıkması; mutasyon kaynaklı olmayan, kalıtsal fenotipler tarafından da tetiklenebilmektedir (Jones ve Baylin 2007, Berdasco ve Esteller 2010). Başta p53 olmak üzere, genom koruma sistemlerinin DNA'daki hataları tespit etme ve düzeltme konusundaki yeteneği, hücre bölünmesi sırasında spontan mutasyon oranlarının genellikle çok düşük olmasını sağlamaktadır. Hücre döngüsünü düzenleyen transkripsiyon faktörleri, organizmalarda tümör oluşumunu baskılamak için oldukça kritik öneme sahiptir (Şekil 2.3). Tümör oluşumu sürecinde, kanser hücreleri bu koruma sistemlerini devre dışı bırakarak mutasyon oranlarını arttırmakta ve mutant genotipin ilerlemesini sağlamaktadır (Negrini vd. 2010).



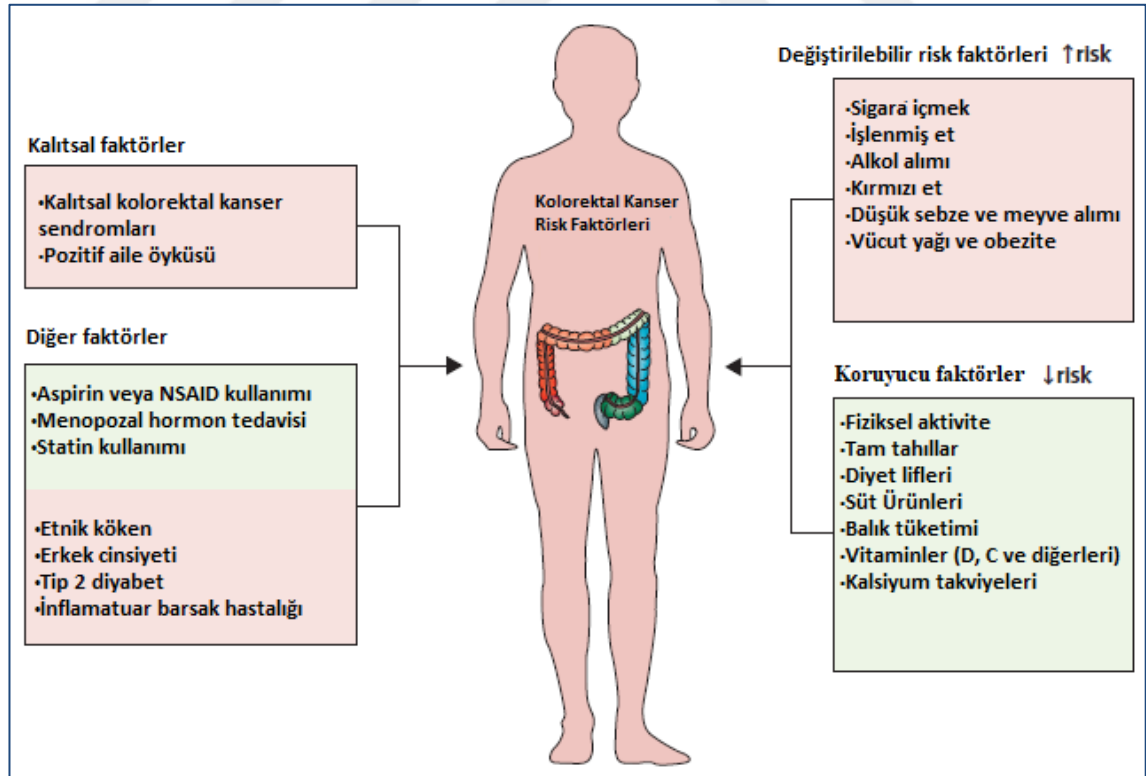
Şekil 2.3 Tümör oluşum sürecinde mutasyonların etkisi

Kanser hücreleri, kanserin genetik bir hastalık olarak tanımlanmasını sağlayan onkojenik ve tümör baskılayıcı mutasyonları taşıyarak tümör oluşumunu başlatır ve tümörün ilerlemesine neden olurlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarla; tümör mikroçevresinde hastalığın başlangıcı ile ilişkili yeni bir neoplastik hücre alt sınıfı tespit edilmiştir (Albini vd. 2015). Tümörün yayılmasından sorumlu olan ve tümör dokusunda bulunan birçok farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan bu hücreler, kanser kök hücreleri (KKH) olarak da adlandırılmaktadır (Puglisi vd. 2013). Bu hücrelerin temel özellikleri; normal kök hücrelere benzer olarak, kendilerini yenileyebilmeleri ve sınırsız bölünme yeteneğine sahip olmalarıdır. Bu hücreler konak hücrelere aşılandığında, yeni tümörleri verimli bir şekilde oluşturabilme yetenekleriyle tanımlanmaktadır (Lobo vd. 2007). Bu nedenle KKH'leri, kanseri başlatan hücre olarak da adlandırılmaktadır (Cho ve Clarke 2008). Yapılan çalışmalarla birçok farklı kanser türünde KKH'lerin olduğu, kanser oluşumundaki fonksiyonları ve dokuya özgü belirteçleri ortaya konulmuştur (Shimokawa vd. 2017). Bu nedenle, kanser tedavisi için KKH'leri hedef alan tedavi stratejilerine yönelik çalışmalar da gerçekleştirilmektedir.

2.2 Kolorektal kanser

Kolorektal kanser, gastrointestinal sistemde en sık görülen kanser türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya çapında her yıl teşhis edilen tüm kanserlerin ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık olarak %10'unu kolorektal kanserler oluşturmaktadır (Bray vd. 2018). Cinsiyet ayrımı olmaksızın kansere bağlı ölümler arasında %55 sağkalım oranı ile ikinci sıradadır (Bray vd. 2018). Kadınlarda en sık teşhis edilen ikinci, erkeklerde ise üçüncü kanser türü iken, kadınlardaki insidans ve ölüm oranı erkeklere göre yaklaşık %25 daha düşüktür (IACR 2018). Ülkemizde hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen üçüncü kanser türüdür (Sung vd. 2021). Dünya çapında kolorektal kanser insidansının 2035 yılında 2.5 milyon yeni vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir (Arnold vd. 2017). Hastalığın insidansındaki dengeleyici ve azalan eğilimler günümüzde yalnızca çok gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Bu eğilimler öncelikle ülke çapında tarama programları ve kolonoskopi taramasının artmasıyla ilişkilendirilmiş olmasına rağmen yaşam tarzı ve diyet değişiklikleri de buna katkıda bulunabilmektedir (Ait Ouakrim vd. 2015). Kolorektal kanserler sıklıkla 50 yaşın üzerindeki kişilerde

görülmesine rağmen, kolorektal kanser teşhisi konulan 50 yaşın altındaki hastaların sayısında, özellikle rektal kanser ve sol taraflı kolon kanserinde endişe verici bir artış gözlenmektedir (Kasi vd. 2019). Çeşitli genetik ve çevresel faktörler bu artış ile ilişkilendirilmiş olsa da, bu artışın kesin nedenleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Dekker vd. 2019). Epidemiyolojik çalışmalar erkek cinsiyeti ve artan yaşın, hastalığın insidansı ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (Şekil 2.4). Pozitif aile öyküsünün tüm kolorektal kanserli hastaların yaklaşık % 10-20'sinde hastalığın ortaya çıkmasında önemli bir role sahip olduğu görülmektedir (Henrikson vd. 2015). Yapılan çeşitli genom temelli ilişki çalışmalarının sonucunda, kolorektal kanser riski ile ilişkilendirilmiş çeşitli kansere yatkınlık genleri (ortak tek nükleotid polimorfizmleri) tanımlanmış olsa da, kalıtıma neden olan faktörlerin çoğu hala belirsizliğini korumaktadır (Jiao vd. 2014). Büyük ölçüde değiştirilebilir olan sigara, aşırı alkol tüketimi, vücut ağırlığının artması, kırmızı ve işlenmiş et tüketimi gibi çevresel risk faktörlerinin kolorektal kansere yakalanma riskini arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Botteri vd. 2008, Chan vd. 2011, Cai vd. 2014, Kyrgiou vd. 2017).

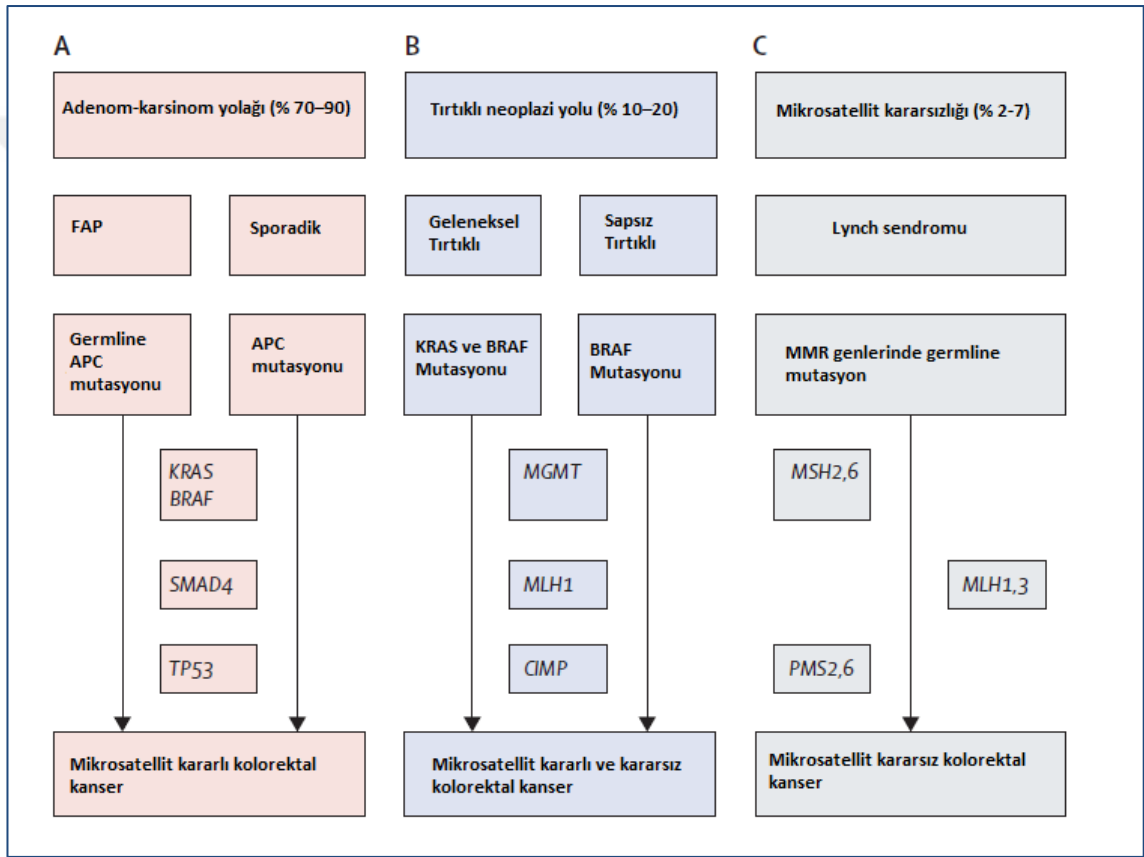


Şekil 2.4 Kolorektal kanser için risk faktörleri (Dekker vd. 2019)

Birçok kanser türünün oluşumu poliplerden kaynaklanmaktadır. Kolorektal adenokarsinoma gelişimi sırasında, gastrointestinal özelliğe sahip epitel hücreleri, spesifik onkogenlerde ve/veya tümör baskılayıcı genlerde sıralı genetik ve epigenetik mutasyonlar edinerek onlara proliferasyon ve kendini yenileme konusunda seçici bir avantaj sağlamaktadır. Kolorektal kanserlerde bu süreç, neoplastik bir öncü lezyona (bir polip) dönüşen ve sonunda yaklaşık 10-15 yıllık bir süreç içerisinde kolorektal kansere doğru ilerleyen anormal bir kript ile başlamaktadır (Dekker vd. 2019). Kolon iç epitelinde başlayan bu süreç, sonrasında diğer doku ve organlara metastaz yapmaktadır. Kolorektal kanserlerin çoğunun köken aldığı hücrenin, kök hücre veya kanser kök hücresi olarak adlandırılan hücre olduğu varsayılmaktadır (Medema 2013, Nassar ve Blanpain 2016). Kanser kök hücreleri olarak adlandırılan bu hücreler, tümör baskılayıcı genleri inaktive ederken onkogenleri aktive edebilen, genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerleyen birikiminin sonucunda oluşmaktadır (Dekker vd. 2019). Kanser kök hücreleri, kolonik kriptlerin tabanında bulunur ve bir tümörün başlatılması ve sürdürülmesi için gereklidir (Medema 2013, Nassar ve Blanpain 2016). Kanser kök hücrelerinin büyümesini kontrol eden düzenleyici mekanizmaların araştırılması, olası terapötik ajanlar ve önleyici tedavi için günümüzde oldukça önemli ve potansiyel vadeden bir çalışma alanıdır (Shimokawa vd. 2017).

Kolorektal kanser gelişimi için genel olarak iki farklı ana öncü lezyon yolu vardır (Şekil 2.5); kolorektal kanserlerin %70-90'ına yol açan geleneksel adenom-karsinom yolu (kromozomal instabilite dizisi olarak da adlandırılmaktadır) ve tırtıklı neoplazi yolu (kolorektal kanserlerin %10-20'sine yol açmaktadır). Bu yollar birbirini takip eden birçok genetik ve epigenetik olayları kapsamaktadır (Cancer Genom Atlas Network 2012). Adenom-karsinom yolunda; kromozomal kararsızlık fenotipleri genellikle bir Adenomatosis Poliposis Koli (APC) mutasyonu ile başlatılan bir seri genomik olaydan sonra gelişmektedir, ardından RAS aktivasyonu veya TP53 fonksiyon kaybı meydana gelmektedir. Tırtıklı neoplazi yolu ise; RAS ve RAF mutasyonları ve epigenetik instabilite ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanında CpG adası metilasyon fenotipi ile karakterize edilir ve mikrosatellit kararlı ve kararsız kolorektal kanserlere yol açmaktadır (Dekker vd. 2019). Bu sebeple proksimal ve distal kolon kanserleri

karşılaştırıldığında moleküler açıdan farklılıklar gösterdikleri görülmektedir. Moleküler farklılıkların yanı sıra, sol taraflı ve sağ taraflı kolorektal kanserler arasında embriyolojik, biyolojik ve anatomik farklılıklar da bulunmaktadır (Venook vd. 2016). Hastalığın bulunduğu pozisyon, metastatik etkide ve izlenecek tedavinin seçiminde oldukça önemli bir role sahiptir ve kanser gelişimini baskılayan anti-EGFR ilaçlara verilecek yanıtın bir belirteci olarak kabul edilmektedir (Venook vd. 2016, Loree vd. 2018).

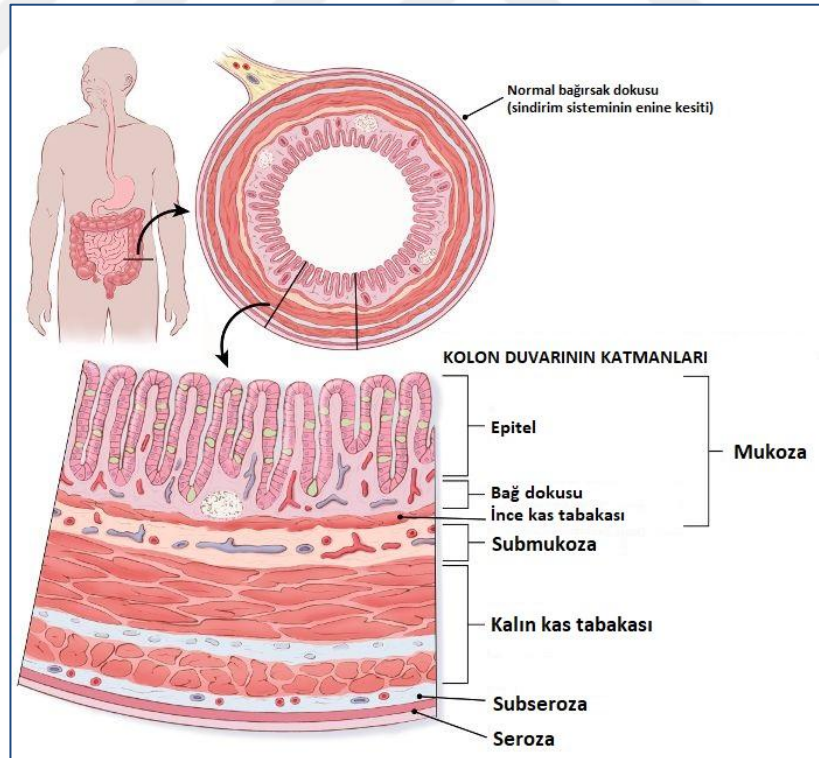


Şekil 2.5 Kolorektal kanser gelişim yolları (Dekker vd. 2019)

2.2.1 Kolorektal kanserin evreleri

Hastaya kolorektal kanser teşhisi konulduktan sonra, hastalığın yayılıp yayılmadığı ve yayıldıysa ne kadar uzağa yayıldığı evreleme süreci ile belirlenmektedir. Hastaya doğru bir tedavi stratejisi sağlamak için uygun tanı ve evreleme oldukça önemlidir. Evreleme

süreci sonunda temel olarak vücuttaki kanser yoğunluğu tanımlanmaktadır (AJCC 2018). Bu süreç ile birlikte hastalığın durumu, hastalığa karşı uygulanacak tedavi stratejileri ve sağkalım oranları belirlenmektedir. Kolon ve rektum, kalın bağırsağın iki ana bileşenidir. Bağırsak duvarı, mukoza, submukoza, kas katmanı ve seroza katmanlarından oluşmaktadır (Şekil 2.6). Kolorektal kanserlerin evreleri, kanser hücrelerinin kolon veya rektumda nasıl ilerlediğini ve yakın veya uzak organlara nasıl yayıldığını yansıtmaktadır. Kolorektal kanserler için en sık kullanılan evreleme sistemi, Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) tarafından belirlenmiş 3 temel unsura dayanan TNM sistemidir: T (tümör); tümörün boyutunu, N (düğüm); kanserin yakınlardaki lenf düğümlerinde mevcut olup olmadığını, M (metastaz); kanserin vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmadığını ifade eder (Çizelge 2.1) (AJCC 2018). Amerikan Ortak Kanser Komitesi, hastalığın ilerleyişi ve yayılışına göre kolorektal kanserleri beş evrede sınıflandırmaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.6 Kalın bağırsak dokusunun katmanları (ACS 2020)

Çizelge 2.1 Kolorektal kanserin evreleri (AJCC 2018)

Evre	TNM	Tümör invazyon derecesi	Duke
0	Tis N0 M0	Tümör mukoza ile sınırlı	-
I	T1 N0 M0	Tümör mukozaya invaze	A
I	T2 N0 M0	Tümör muskularis propriaya invaze	A
IIA	T3 N0 M0	Tümör subserozaya invaze	B
IIB	T4 N0 M0	Tümör komşu organlara invaze	B
IIIA	T1-2 N1 M0	1-3 bölgesel lenf noduna metastaz	C
IIIB	T3-4 N1 M0	Subseroza veya komşu organlara invazyon ve 1-3 bölgesel lenf noduna metastaz	C
IIIC	T1-4 N2 M0	4 veya daha fazla lenf noduna metastaz	C
IV	T1-4 N1-3 M1	Uzak organlara metastaz	-

Evre 0: En erken evredeki kolorektal kanserler, evre 0 olarak adlandırılmaktadır. Bu evrede tespit edilen hücreler kanserli veya kanser öncesi olabilmektedir. Kolon mukozasında anormal hücrelerin veya poliplerin bulunduğu, *in situ* karsinoma olarak da adlandırılan, kolorektal kanserin başlangıç evresidir. Bu evrede hücreler oluşum gösterdikleri yerleriyle sınırlıdır ve kolon, rektum, lenf düğümlerine yayıldıklarına veya diğer organlara metastaz yaptıklarına dair hiçbir kanıt yoktur. Teşhis sonrasında cerrahi operasyonla uzaklaştırılarak kanser oluşumu kolaylıkla engellenebilmektedir (Brenner vd. 2014).

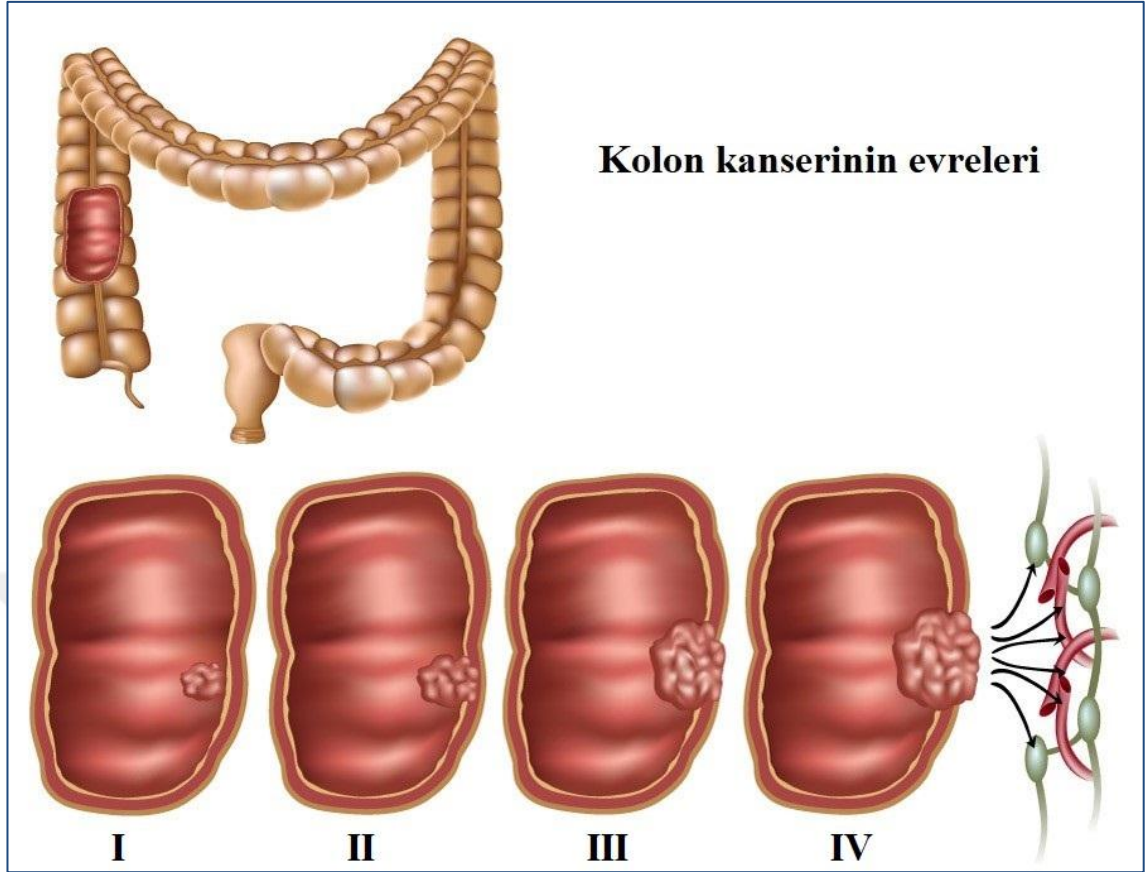
Evre I: Bu evrede kanserli hücreler bağırsak duvarına ve submukozaya doğru büyümüş ve kasa girmiş olabilmektedir. Kanser, yakındaki lenf düğümlerine veya uzak bölgelere henüz yayılmamıştır. Bu evrede teşhis konulan hastalarda kanserli doku cerrahi operasyonla uzaklaştırılır ve sağkalım oranı %90 civarındadır (Dekker vd. 2019).

Evre II: Bu evre, kanserli hücrelerin kolonun farklı katmanlarına, kas dokusuna veya kolonun tüm katmanlarına büyümüş olmasına göre iki evrede sınıflandırılmaktadır (IIA,

IIB). Hastalık bu evrede yakınlardaki lenf düğümlerine veya organlara henüz yayılmamıştır. Cerrahi rezeksiyonu takiben kemoterapi uygulaması ile birlikte teşhis konulan hastalarda %80'e varan sağkalım oranları yakalanmaktadır.

Evre III: Bu evre itibari ile kanserli hücreler bütün kolon duvarı boyunca yayılmış durumdadır. Yakın bölgedeki lenf düğümlerine ve organlara yayılmasına göre IIIA, IIIB ve IIIC şeklinde alt sınıflara ayrılmaktadır. IIIA ve IIIB'de kanser, birincil tümörün bulunduğu yere yakın üç lenf düğümüne kadar yayılmıştır. IIIC'de ise birincil bölgenin yakınındaki dört veya daha fazla lenf düğümüne ve aynı zamanda yakındaki organlara da yayılmış olabilmektedir. Sağkalım oranları alt evrelere bağlı olarak %30-60 aralığında değişmektedir, teşhis sonrasında tedavi için cerrahi operasyon ile birlikte adjuvan kemoterapide uygulanmaktadır (Brenner vd. 2014).

Evre IV: Kolorektal kanserin en ileri aşamasıdır. Eğer bu evrede hastaya kolorektal kanser tanısı konulduysa, kanserin karaciğer veya akciğerler gibi uzak bölgelere de metastaz yaptığı anlamına gelmektedir. Evre IV kolorektal kanser, metastazın birden fazla organı etkileyip etkilemediğine bağlı olarak iki alt kategoriye ayrılır. Kanser bir farklı organa metastaz yapmışsa evre IVA olarak kabul edilirken, birden fazla organa metastaz yaptıysa evre IVB olarak sınıflandırılmaktadır. Cerrahi operasyon ile tümörlerin uzaklaştırılmasından sonra kemoterapi uygulanmasına rağmen bu evrede teşhis konulan hastalarda sağkalım oranı %6'ya kadar düşmektedir (Edge vd. 2018).



Şekil 2.7 Kolon kanserinin evreleri (ACS 2020)

2.2.2 Kolorektal kanserde tedavi yaklaşımları

Kolorektal kanserlerin tedavisi ve yönetimi hastalığın teşhisi sonrasında, tümörün evresi, yeri ve hasta özelliklerine bağlı olarak değişmekle birlikte mevcut tedavi stratejisi cerrahi yaklaşımlar ve kemoterapiye dayanmaktadır. Erken evre kolorektal kanser lezyonları için, polipektomi gibi lokal tedaviden, tümörün lokasyonuna ve hastalık invazyonuna bağlı olarak transabdominal rezeksiyon ve anastomoz gibi daha invaziv prosedürlere kadar cerrahi yaklaşımlar kullanılmaktadır (Labianca vd. 2013). Tedavide uygulanacak strateji hastalığın tespit edildiği evreye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Tedaviye başlanılan evre, kolorektal kanserli hastalarda sağkalımı etkileyen oldukça önemli bir faktördür. İleri evrelerde tanı koyulan hastalarda sağkalım oranı %6'ya kadar düşmektedir (Edge vd. 2010). Hastalığın başlangıç evrelerinde tespit edilmiş birçok kolorektal kanser tek başına cerrahi rezeksiyonla tedavi edilebilmektedir.

Erken evrelerde cerrahi, hastalığın durumuna göre ameliyat öncesi veya sonrası adjuvan kemoterapi ile birleştirilmektedir (Wang vd. 2007).

Çoğu kolorektal kanserlerin teşhisi, tümör hücresi yayılımı gerçekleştiğinde ileri bir aşamadayken konulmaktadır. Bununla beraber hastalığın teşhisinde kullanılan spesifik semptomların eksikliği ve kolonoskopi taramalarının yaygın olmaması hastalığın erken evrede tespiti için zorluklar yaratmaktadır. Alt karın semptomları fazlasıyla yaygındır ve çoğunlukla kolorektal kanserler ile değil neoplastik olmayan hastalıklarla ilgilidir. Sonuç olarak hastalığın tanı ve tedavi sırasındaki evresi, sağkalımın en önemli faktörü olarak kabul edilmektedir. Kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler, ileri evredeki hastalar için genel sağkalımda yalnızca sınırlı bir artış sağlamaktadır. Adjuvan tedavisi olarak floropirimidin bazlı kemoterapiklerin cerrahi operasyon sonrası kullanımı evre II ve III'de sağkalımı arttırabilmektedir (Dekker vd. 2019).

İlerlemiş veya metastatik kanser için, cerrahi rezeksiyon tek başına küratif tedavi sunma konusunda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle kemoterapötik ajanlar hastalara sırasıyla ameliyattan önce tümörü küçültmek ve ameliyattan sonra tümörün nüksetmesini önlemek için neoadjuvan veya adjuvan tedavi olarak sunulmaktadır (Benson vd. 2018). Kolorektal kanser tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlar; platin türevleri (oksaliplatin), antimetabolitler (kapesitabin, 5-FU), topoizomera inhibitörleri (irinotekan) ve tegafur/urasildir (UFT) (Rejhová vd. 2018). Antimetabolit floropirimidinler (5-Flourourasil ve kapesitabin), metastatik kolorektal kanserler için birinci basamak kemoterapötik ajanlardır ve genellikle gelişmiş yanıt oranı ve progresyonsuz hücre sağkalım avantajları nedeniyle diğer sitotoksik ajanlarla (irinotekan, oksaliplatin gibi) birlikte kombinasyon halinde uygulanır (Labianca vd. 2013). Kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılan yaygın kemoterapi uygulamaları; FOLFOX (5-FU/folinik asit/oksaliplatin), FOLFIRI (5-FU/folinik asit/irinotekan), CAPOX (kapesitabin/oksaliplatin) ve FOLFOXIRI (5-FU/folinik asit/oksaliplatin/irinotekan) şeklindedir (Benson vd. 2006). Kemoterapötik ajanların sitotoksik etkiye katkıda bulunan kesin mekanizmaları, kullanılan kemoterapötik ajana göre farklılık göstermelerine rağmen genel olarak; DNA replikasyonunu, transkripsiyonunu ve onarımını bozacak şekilde etki ederek hücre ölümünü teşvik ederler (Hammond vd.

2016). Kemoterapötik ajanlar etki mekanizmalarına göre genel olarak mitoz inhibitörleri, DNA replikasyon inhibitörleri ve diğer sitotoksik ajanlar şeklinde sınıflandırılabilir.

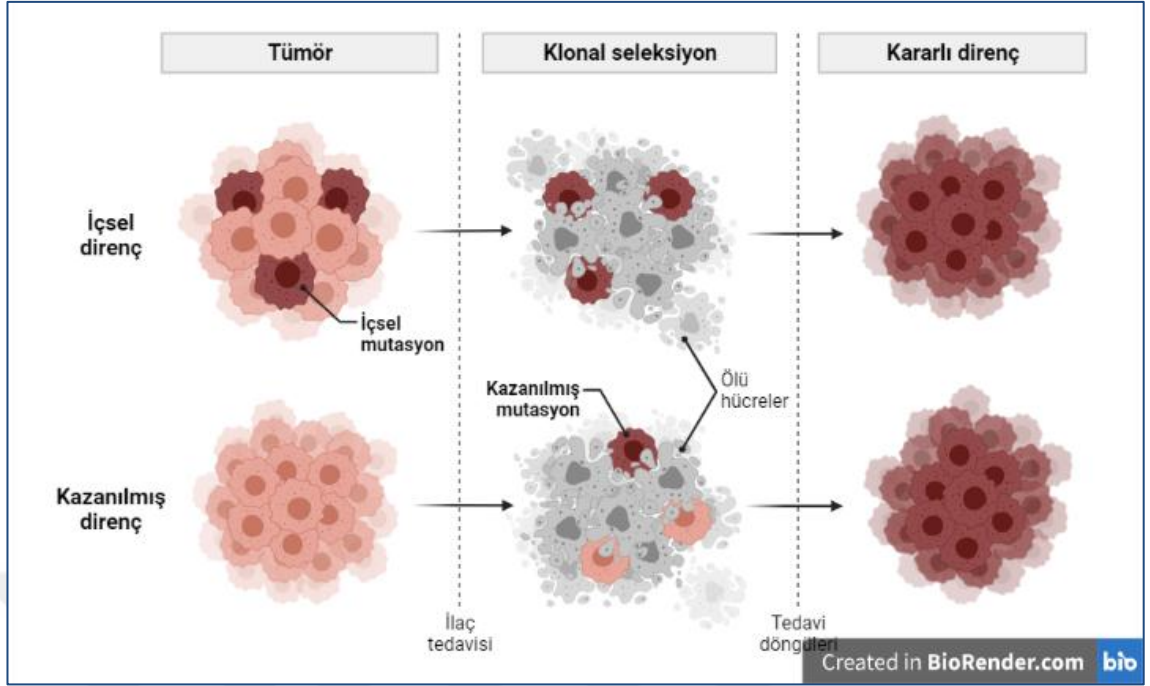
Gelişmiş kolorektal kanserde birinci basamak kemoterapi, tek başına veya oksaliplatin ile kombinasyon halinde lökovorin (folinik asit) ile 5-FU'ya dayanır (Gramont vd. 2000). Metastatik kolorektal kanserde ise tedavi 5-FU veya irinotekanın kombinasyonundan oluşmaktadır (Douillard vd. 2000). Gelişmiş KKR'de 5-FU monoterapisine genel yanıt oranı % 10-15 ile sınırlıdır (Giacchetti vd. 2000). Bu nedenle kombinasyonlar veya çok bileşenli tedavi, kemoterapötiklerin yanıt oranını arttırmak için ilerlemiş kolorektal kanser tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. 5-FU'nun diğer sitotoksik ilaçlarla kombine edilmesi yalnızca yanıt oranlarını iyileştirmekle kalmayıp, aynı zamanda bu ilaçların istenmeyen yan etkilerini de azaltmaktadır (Bastos vd. 2010). Bununla beraber, toksisite ve ilaç direnci konvansiyonel tedavilerin etkinliğini sınırlayan önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaya devam etmektedir. Kemoterapötiklerin spesifik olmayan etki mekanizması sonucunda, sadece tümör hücrelerini değil aynı zamanda malign olmayan hücreleri de etkilemesi birçok yan etki ile doğrudan bağlantılıdır. Tedavinin oluşturduğu yan etkiler, kullanılan kemoterapinin türüne bağlı olarak hastalar arasında farklılık göstermektedir.

Sitotoksik kemoterapötiklere ek olarak özellikle metastatik kolorektal kanser tedavisinde kullanılacak yeni ajanlara yönelik çalışmalar devam etmektedir. 2000'lerin başından beri moleküler hedefli tedavi yöntemleri, metastatik kolorektal kanser tedavisi için giderek önem kazanmıştır. Yaygın olarak kullanılan hedefe yönelik tedaviler, epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) ve/veya vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) hedefleyen monoklonal antikorlardır. EGFR'nin aşırı ekspresyonu, % 65-70 KKR tümörlerinde gözlenir ve hastalığın ilerlemesi, kötü prognoz ve daha kısa sağ kalım ile ilişkilidir (Ng ve Zhu 2008). Setuksimab ve panitumumab FDA onaylı EGFR monoklonal antikorlarıdır ve Ras/Raf/MEK/ERK yolunu inhibe ederek kanser proliferasyonunu geciktirirler (Pabla vd. 2015). Her iki ajan da monoterapi olarak veya diğer kemoterapötiklerle birlikte kombinasyon halinde uygulanabilmektedir. Etkili bir

şekilde, tek başına kemoterapi ile kıyaslandığında hayatta kalma ve progresyonsuz sağkalım risk oranında yarar sağladıkları görülmektedir.

Son yıllarda ortaya çıkan bir diğer tedavi yöntemi de immünoterapidir. Çeşitli kanser türlerinde dikkate değer klinik aktivite gösteren immün kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımı, mikro uydu dengesizliği yüksek tümörleri olan kolorektal kanser hastalarında ümit vadeden etkinlik göstermiştir (Hurwitz vd. 2004, Van Cutsem vd. 2012, Tabernero vd. 2015, Kalyan vd. 2018). Bu moleküller, T hücresi aktivasyonunu geri kazanımını sağlayarak üzerlerinde tümörle ilişkili antijeni taşıyan hücreleri öldüren anti-tümör immün yanıtını uyarırlar (Kalyan vd. 2018).

Mevcut çok çeşitli tedavi seçenekleri olmasına rağmen, ilaç direnci sorunu kemoteröpatik ajanlar ile gerçekleştirilen kanser tedavi yöntemlerinin önünde önemli bir engel olmaya devam etmektedir. Hastaların büyük bir kısmı ya bir tedavi stratejisine yanıt vermez ya da başlangıçta yanıt vermesine rağmen, sırasıyla birincil veya edinilmiş ilaç direnci nedeniyle belirli bir süre sonra nüks ederek hastalık ilerlemesine sebep olmaktadır (Şekil 2.8) (Hammond vd. 2016). Sonuç olarak ilaç direnci tedavinin başarısızlığına yol açmaktadır ve bu nedenle uygulanan tedavi stratejilerinin değiştirilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle, özellikle ileri evre kolorektal kanserde ilaç direncinin üstesinden gelmek için günümüzde alternatif terapötik stratejilere acil ihtiyaç bulunmaktadır. Doğal bileşikler geçmişten günümüze modern farmakoloji için önemli bir kaynak olmuştur. Bu nedenle geleneksel kemoterapötik ajanların etkili ve toksik olmayan doğal bileşiklerle birlikte kullanılmasıyla, tedavinin yanıt oranını ve hastanın yaşam kalitesini arttırmaya katkıda bulunabileceğini varsayan çalışmalar günümüzde giderek artmaktadır (Singh vd. 2017, Rejhová vd. 2018, Lee vd. 2021).

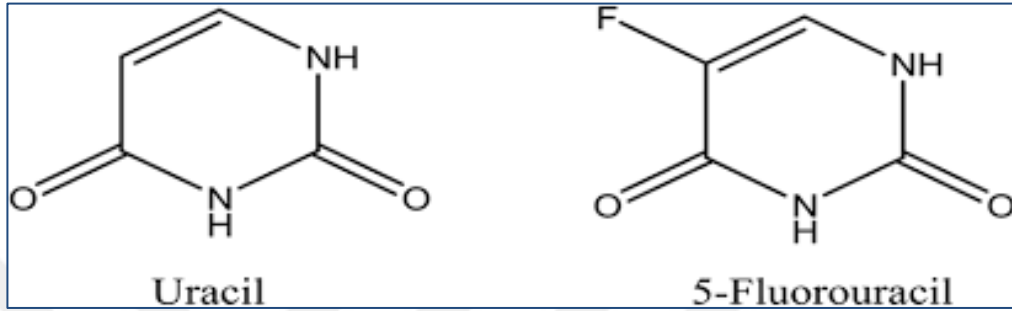


Şekil 2.8 Kanser hücrelerinde ilaç direnci gelişim mekanizmaları

2.2.2.1 5-Florourasil

5-Florourasil (5-FU) kanser tedavisinde, özellikle kolorektal kanserde yaygın olarak kullanılan antimetabolit sınıfı bir ilaçtır. Urasil analogu olan 5-FU (Şekil 2.9), mide-bağırsak kanserleri, meme, jinekolojik ve baş ve boyun tümörlerinin tedavisi için de sıklıkla kullanılmaktadır. Antimetabolit ajanlar, temel biyosentetik süreçleri inhibe eder veya DNA ve RNA gibi önemli makromoleküllerin yapısına dahil olarak bu moleküllerin normal işlevlerini inhibe ederek etkinliklerini gösterirler. Urasilin florlu bir türevi olan 5-FU, her iki işlevi de gerçekleştirerek anti-kanser etkisini göstermektedir (Longley vd. 2003). 5-FU, hidrojen yerine C-5 konumunda bir flor atomuna sahip bir urasil analogudur (Şekil 2.9). 5-FU'nun öncül ilacı olan kapesitabinde; oral olarak uygulanmasından sonra üç ardışık reaksiyonla 5-FU'ya dönüştürülerek aynı mekanizma aracılığıyla etki göstermektedir (Şekil 2.11). 5-FU, urasil ile aynı kolaylaştırılmış taşıma mekanizmasını kullanarak hücre içerisine hızla girmektedir (Wohlhueter vd. 1980). 5-FU hücre içerisinde aktif birkaç metabolite dönüştürülür; florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiüridin trifosfat (FdUTP) ve florouridin trifosfat (FUTP) (Şekil 2.10), bu aktif metabolitler RNA

sentezini ve timidilat sentaz'ın (TS) etkisini bozar. Hücre içi anabolizma için 5-FU mevcudiyeti esas olarak doku ilaç katabolizmasına bağlıdır. 5-FU katabolizmasındaki hız sınırlayıcı enzim, 5-FU'yu dihidroflorourasil'e (DHFU) dönüştüren dihidropirimidin dehidrojenazdır (DPD). Uygulanan 5-FU'nun %80'den fazlası, DPD'nin bol miktarda ifade edildiği karaciğerde katabolize edilir (Casale vd. 2004).



Şekil 2.9 Urasil ve 5-Fluouracil yapıları

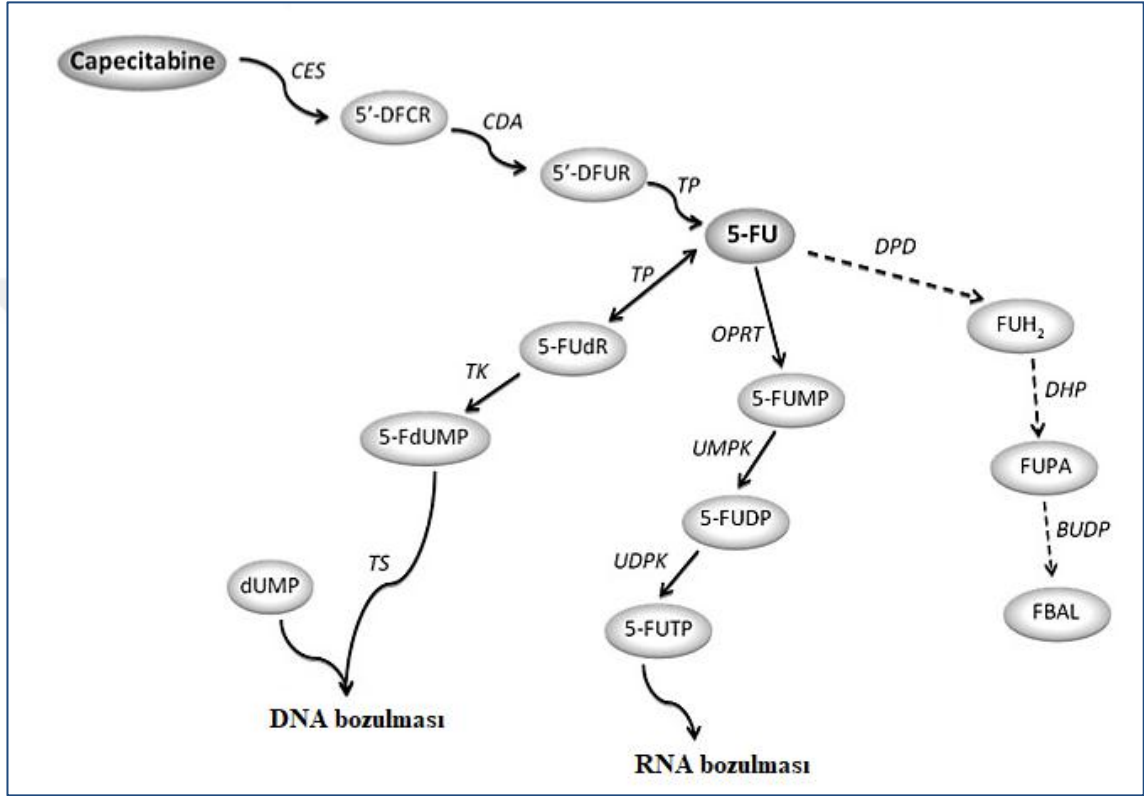
5-FU uygulanması hücrelerde DNA hasarına neden olarak hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını etkiler. 5-FU'nun sitotoksik etki mekanizması, floronükleotidlerin RNA ve DNA'ya dahil edilmesine ve nükleotid sentezinde görev alan enzim olan TS'nin inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir. 5-FU, hücre döngüsünün S fazı sırasında, timidilat mevcudiyetini kısıtlayarak DNA sentezini inhibe ederek sitotoksik etkisini gösterir (Focaccetti vd. 2015). TS, metil donörü olarak 5,10-metilentetrahidrofolat (CH_2THF) ile deoksiüridin monofosfatın (dUMP) deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüşümünü katalize eder. Bu reaksiyon, DNA replikasyonu ve onarımı için gerekli olan timidilatın tek *de novo* kaynağını sağlamaktadır (Longley vd. 2003). 5-FU aktif metaboliti florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), TS'nin nükleotid bağlama bölgesine bağlanır ve TS ve CH_2THF ile stabil bir üçlü kompleks oluşturarak dUMP'nin nükleotid bağlama bölgesine erişimini bloke eder ve dTMP sentezini inhibe ederek DNA iplikçiklerinin kopmasına ve hücre ölümüne yol açar (Houghton vd. 1995, Longley vd. 2003). dUTP'nin neden olduğu DNA hasarının boyutu, pirofosfataz dUTPaz ve urasil-DNA glikozilaz (UDG) seviyelerine bağlıdır. dTMP, timidin kinazın (TK) etkisiyle timidinden kurtarılabilir, böylece TS eksikliğinin etkileri hafifletilebilir. Bu kurtarma

yolu, aynı zamanda 5-FU'ya karşı potansiyel bir direnç mekanizmasını da temsil etmektedir (Grem ve Fischer 1989).

5-FU'nun bir diğer sitotoksik etki mekanizması ise RNA yanlış bağlanması üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 2.10). 5-FU metaboliti FUTP, normal RNA işlemlerini ve işlevini bozarak RNA'ya kapsamlı bir şekilde dahil edilir. 5-FU'nun RNA'ya yanlış bağlanması ile kolon kanseri hücrelerinde klonojenik potansiyelin kaybı arasında önemli bağlantılar olduğu gösterilmiştir (Glazer vd. 1982). 5-FU'nun RNA'ya yanlış bağlanması, çeşitli seviyelerde toksisite ile sonuçlanabilmektedir. Sadece pre-rRNA'nın olgun rRNA'ya işlenmesini engellemekle kalmaz, aynı zamanda tRNA'ların transkripsiyon sonrası modifikasyonunu ve snRNA/protein komplekslerinin montajını ve aktivitesini bozar, böylece pre-mRNA'nın eklenmesini inhibe eder (Kanamaru vd. 1986, Patton 1993, Ghoshal vd. 1994). Ek olarak, rRNA, tRNA ve snRNA'nın tümü modifiye baz psödoüridin içerir ve 5-FU'nun bu RNA türlerinde üridinin psödoüridine transkripsiyon sonrası dönüşümünü engellediği gösterilmiştir (Samuelsson vd. 1991). Bu çalışmalar, 5-FU'nun RNA işlemlerinin birçok yönünü potansiyel olarak bozabileceğini ve hücrel metabolizma ve canlılık üzerinde derin etkilere yol açabileceğini göstermektedir (Longley vd. 2003).

5-FU, meme, baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığında yanıt oranlarını ve sağkalımı iyileştirmesine rağmen, en efektif etkiyi kolorektal kanserde göstermektedir (Sethy ve Kundu 2021). 5-FU temelli kemoterapi, rezeke edilen evre III kolorektal kanserli hastaların genel ve hastalıksız sağkalımını iyileştirmektedir (IMPACT 1995). Bununla birlikte, ileri evre kolorektal kanser için birinci basamak tedavi olarak 5-FU bazlı kemoterapi için yanıt oranları sadece %10-15'tir (Johnston ve Kaye 2001). Bu nedenle, 5-FU'nun anti-kanser etkinliğini arttırmak ve ilaç direncinin üstesinden gelmek için önemli modülasyon stratejileri geliştirilmiştir. 5-FU'nun irinotekan ve oksaliptatin gibi daha yeni ajanlar ile birlikte kullanılması, ilerlemiş kolorektal kanser için yanıt oranlarını %40-50'ye yükseltmiştir (Gu vd. 2019). Sonuç olarak, 5-FU hem ileri hem de erken evre kolorektal kanserin tedavisinde ana ajan olarak kullanılmaya devam etmektedir.

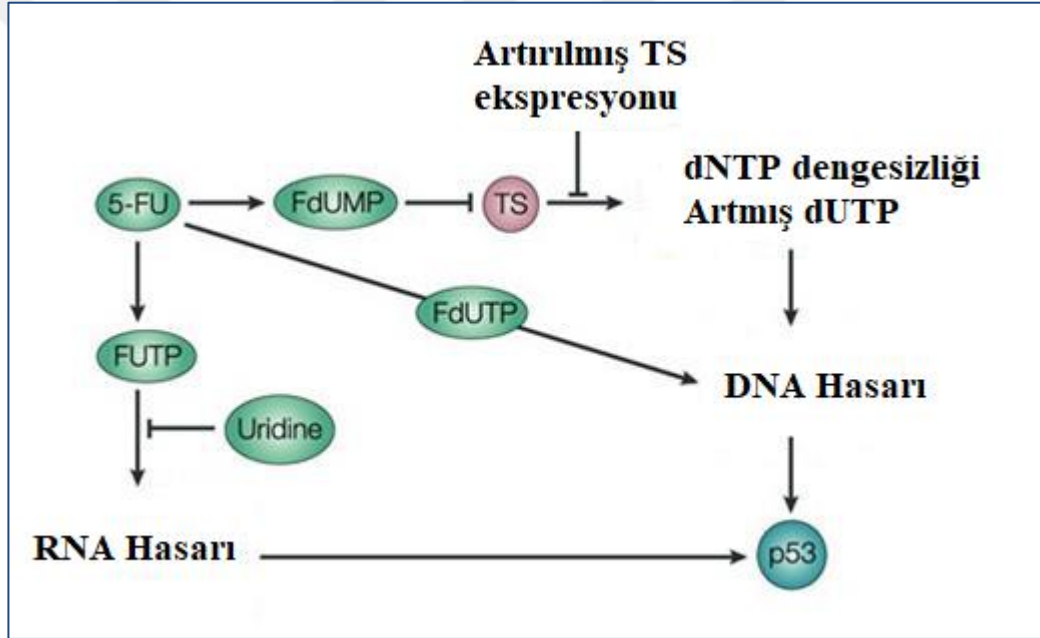
dönüştürülen bir oral floropirimidindir (Şekil 2.11). 5'DFUR daha sonra timidin fosforilaz (TP) ve/veya üridin fosforilaz (UP) tarafından 5-FU'ya dönüştürülür ve bunların her ikisinin de tümör dokusunda normal dokuya göre önemli ölçüde daha aktif olduğu rapor edilmiştir (Schüller vd. 2000, Johnston ve Kaye 2001).



Şekil 2.11 Kapesitabin metabolizması ve ekti mekanizması (Focaccetti vd. 2015)

Tümörlerin ilaca dirençli hale geldiği mekanizmaları anlamak, bu direnci tahmin etmek veya üstesinden gelmek için oldukça önemlidir. Anti-kanser ilaç direnci; ilaç giriş ve çıkışının değiştirilmesi, ilaç inaktivasyonunun arttırılması ve ilaç hedefinin mutasyonu gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanmaktadır (Longley ve Johnston 2005). Direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılması sonucunda; yeni ve etkili ajanların geliştirilmesinin yanı sıra, mevcut kemoterapötiklerin etkinliğini arttırmaya yönelik çalışmalar da beraberinde yürütülebilmektedir. TS'nin yüksek düzeyde ekspresyonu ve deoksiüridin trifosfataz aktivitesinin artmasının 5-FU direncine yol açtığı rapor edilmiştir (Şekil 2.12). TS'ye yönelik sitotoksiste, artan TS ekspresyonu ile ortadan

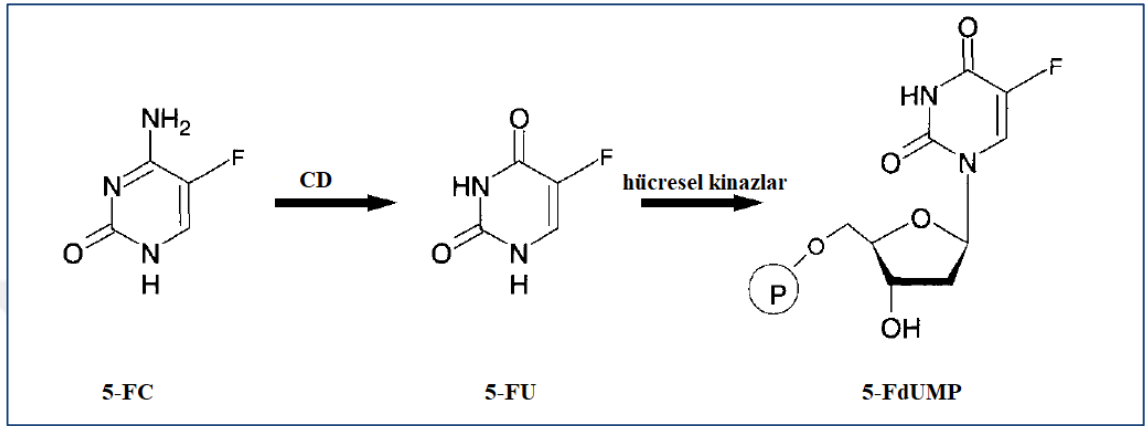
kaldırılırken, RNA'ya yönelik sitotoksosite, üridinin hücre içi seviyelerinin artırılmasıyla ortadan kaldırılabilir (Van Triest vd. 1999, Violette vd. 2002, Grem 2005). Bu nedenle, ilaç direnci mekanizmalarını geri çevirmek için yeni terapötik stratejilere yönelik araştırmalar da gerçekleştirilmektedir. Kemoterapötik ilaçlara karşı oluşan çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek için tasarlanan çeşitli ajanlar tedavide mevcut ajanlarla birlikte adjuvan olarak kullanılmaktadır. 5-FU ve türevleri önemli anti-kanser ajanları olmasına ve hastalarda yaygın olarak uygulanmasına rağmen, tek başına 5-FU'nun genel yanıt oranı hala düşüktür (Johnston ve Kaye 2001). Bu nedenle, daha iyi terapötik stratejiler aramak, 5-FU duyarlılığını artırmak ve ilaç direncini tersine çevirmek gelecekteki çalışmalar açısından oldukça önemlidir.



Şekil 2.12 5-Fluorourasil aracılığıyla p53 aktivasyonu (Longley vd. 2003)

Bu kapsamda enzim/ön ilaç sistemlerinin kullanıldığı gen tedavisi, kolon kanseri tedavisi için güçlü bir strateji olma potansiyeline sahiptir. İntihar gen tedavisi olarak da adlandırılan bu yaklaşım, ilaç metabolize eden enzim genlerini hedef alarak toksik olmayan bir bileşiğin kanser hücrelerinde sitotoksik bir ilaca dönüştürülmesini amaçlamaktadır. Sitozin deaminaz (CD) ve 5-Florositozinin (5-FC) birlikte kullanımı en yaygın olarak araştırılan ön ilaç/enzim sistemlerinden birisidir. Bu sistemde; 5-FC, CD

aktivitesi sonucunda aktif formu olan 5-FU'ya dönüştürülen toksik olmayan bir ön ilaçtır (Şekil 2.13) (Huber vd. 1993). Dolayısıyla enzim/ön ilaç sistemlerinin kullanımı, geleneksel kemoterapötiklerin etkinliğini ve güvenliğini artırmaya yardımcı olabileceği için de oldukça önemlidir.



Şekil 2.13 5-Florositozinin 5-Fluorourasile dönüştürülmesi (Huber vd. 1993)

CD (EC 3.5.4.1) memeli hücrelerinde bulunmayan, bakteri ve mantarlar tarafından eksprese edilen bir enzimdir. Bu protein memeli hücrelerinde eksprese edildiğinde, toksik olmayan antifungal bir ajan olan 5-FC'yi yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajan 5-FU'ya dönüştür ve CD geninin kanser hücrelerinde ekspresyonu tümör hedefli kemoterapi ile sonuçlanır (Negroni vd. 2007). Bu nedenle, enzim/ön ilaç sistemlerinin kullanıldığı gen tedavisi yaklaşımı kanser tedavisi için güçlü bir alternatif yöntem olma potansiyeline sahiptir.

2.3 *Clitocybe nebularis*

Clitocybe nebularis (Batsch) P. Kumm. bulutlu huni olarak da bilinen, hem kozalaklı hem de geniş yapraklı ormanlarda bulunan, *Tricholomataceae* familyasına ait saprotrofik bir mantar türüdür (Knudsen vd. 2012). Avrupa ve Kuzey Amerika genelinde yaygın olan *C. nebularis* (syn.: *Lepista nebularis* (Fr.) Harmaja) genellikle çürümüş bitki kalıntılarında kümeler halinde halkalar oluşturarak gelişim göstermektedir. Ülkemizde ağırlıklı olarak Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren *C. nebularis*, halk arasında "Kara Malgadin" olarak da bilinmektedir (Şekil 2.14).

Yenilebilir olarak kabul edilen meyve veren gövdelerini, yaz sonu ve sonbahar başında oluşturmaktadır. *Clitocybe* genusu içerisinde yaklaşık 300 tür olduğu tahmin edilmektedir ve bunların birkaç tanesi yenilebilir olarak kabul edilir, diğerleri muskarin toksini içermesi nedeniyle zehirli olarak sınıflandırılmaktadır.

Kingdom: *Fungi*

Division: *Basidiomycota*

Class: *Agaricomycetes*

Order: *Agaricales*

Family: *Tricholomataceae*

Genus: *Clitocybe*

Species: *Clitocybe nebularis*



Şekil 2.14 *Clitocybe nebularis* (Batsch) P. Kumm. (Akata 2021)

C. nebularis de dahil olmak üzere *Clitocybe* türleri genel olarak tıbbi mantarlar olarak sınıflandırılmamasına rağmen, yapılan çok çeşitli araştırmalar sahip oldukları farmasötik potansiyellerini desteklemektedir. *Clitocybe* türlerinden elde edilen çeşitli özütlerin sahip olduğu antioksidan, anti-tümör, anti-viral ve anti-mikrobiyal aktiviteler yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Pohleven vd. 2016). Ayrıca biyolojik olarak aktif birçok molekül bu türlerde tanımlanmış, izole edilmiş ve çeşitli aktivitelerle ilişkilendirilmiştir.

Purin ribonükleosit yapısındaki bir molekül olan Nebularin, ilk kez *C. nebularis* mantarından izole edilmiştir. Nebularin antibiyotik özelliklere sahiptir ve ayrıca doğada keşfedilen ilk pürin yapısıdır (Lofgren ve Luning 1953). *C. nebularis*'den elde edilen çeşitli özütlerle yapılan çalışmalarla, anti-fungal ve anti-mikrobiyal etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Kim vd. 2008, Venturini vd. 2008, Dizeci vd. 2021). Sistein proteinaz inhibitörü olan Clitocypin, *C. nebularis* mantarında tanımlanmış ve önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Brizin vd. 2000). *C. nebularis* meyve organlarından izole edilen birçok molekül, çok çeşitli biyolojik süreçlerde önemli metabolik ve düzenleyici fonksiyonlar göstermektedir. Bu nedenle kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara karşı terapötik bir rol oynayabilir (Avanzo vd. 2009; Renko vd. 2010).

2.4 Aktif Mantar Bileşenleri

İnsanlık ve mantarlar arasındaki ilişki neredeyse antik çağlardan günümüze kadar uzanmaktadır. Mantarlar binlerce yıldır, insanlık tarafından yenilebilir ve tıbbi bir kaynak olarak değerlendirilmiştir. Batı dünyasında ağırlıklı olarak besin kaynağı olarak kullanılmasına rağmen, özellikle uzak doğuda mantarların tıbbi amaçla kullanımı da fazlasıyla göze çarpmaktadır. Doğu kültüründe mantarlar oldukça önemli bir yere sahiptir. Tıbbi mantarlar olarak da adlandırılan bu türler, insanlık tarihi boyunca çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Wasser 2002). Mantarların geleneksel tedavide kullanımından yola çıkılarak gerçekleştirilen bilimsel çalışmalar sonucunda, birçok mantar türünün önemli biyolojik özelliklere sahip yüzlerce yeni bileşen üreten minyatür ilaç fabrikaları olduğu keşfedilmiştir (Patel ve Goyal 2012). Bu nedenle

günümüzde mantar türlerinin sahip oldukları biyolojik aktiviteleri ve içerdikleri biyoaktif bileşiklerin kimyasal yapısını ortaya çıkarmaya yönelik detaylı çalışmalar yürütülmektedir.

Mantarlardan elde edilen bileşiklerin sahip oldukları biyolojik aktiviteler, yapılmış çeşitli çalışmalarla doğrulanmıştır. Anti-kanser aktivite gösteren bileşikler de dahil olmak üzere birçok biyoaktif molekül mantar türlerinde tanımlanmıştır. Polisakkaritler, anti-tümör ve immünomodülatör özelliklere sahip en iyi bilinen ve en güçlü mantar türevli maddelerdir (Wasser ve Weis 1999, Wasser 2002). Günümüzde, mantarlardan türetilen öncü bileşiklere ve ikincil metabolitlere yönelik artan bir ilgi vardır. Dolayısıyla mantarlardan elde edilmiş çeşitli bileşiklerin farmasötik uygulamaları sıklıkça görülmektedir. Bu nedenle, polifenoller, polisakkaritler, proteinler, lektinler gibi biyolojik olarak aktif birçok molekül mantarlardan izole edilmiştir. Bu bileşikler, doğal antioksidan, antitümör, antiviral, antimikrobiyal ve immünomodülatör ajanların popüler kaynakları haline gelmiştir (Zaidman vd. 2005, Chang ve Wasser 2012). Başta polisakkaritler olmak üzere, mantarlardan elde edilen aktif bileşikler için önemli bir olumsuz etki bildirilmeyip, aksine hücrelerin çeşitli biyolojik ve çevresel streslere uyum sağlamasına yardımcı olabilecekleri gösterilmiştir (Jiang vd. 2010).

Başta polisakkaritler olmak üzere, Basidiomycota bölümündeki mantarlar tarafından doğal olarak üretilen birçok molekül, ABD Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından anti-tümör kimyasal olarak sınıflandırılmıştır (Jong ve Donovick 1989, Chang ve Wasser 2012). Yapılarında bulundurdıkları bu aktif moleküller, gösterdikleri önemli biyolojik aktivitelerle potansiyel vaat etmektedir. Bu nedenle, mantarlardan elde edilecek aktif ajanlar veya sentetik türevlerin, yenilikçi ve toksik olmayan öncül bileşikler geliştirilmesinde önemli rol oynaması beklenmektedir.

2.4.1 Kanser tedavisinde doğal bileşikler

Doğal bileşikler, uzun zamandan beri ilaç araştırmaları için önemli bir kaynak olmuştur. Çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyerek yeni ilaçların keşfi için çok sayıda etkili öncü bileşik seçeneği sunmuşlardır. Başta penisilin olmak üzere, doğal ürün türevli ilaçların

uygulanması, insan sağığına muazzam faydalar sağılamıştır (Huang vd. 2019). Günümüzde kullanılmakta olan modern farmasötiklerin birçoğunun doğıal ürün türevli olması da bunu doğırulamaktadır. Doğıal ürünler, başta kanser araştırmaları olmak üzere halen birçok hastalık için başlıca yenilikçi terapötik ajan kaynaklarıdır (Clardy ve Walsh 2004, Patel ve Goyal 2012, Rejhová vd. 2018). Şu anda kullanımda olan anti-kanser ilaçlarının yaklaşık %50'si doğrudan veya dolaylı olarak doğıal bileşiklerden elde edilmiştir (Huang vd. 2019). Bu bileşikler; alkaloidler, polisakkaritler, polifenoller, terpenoidler ve doymamış yağ asitleri gibi çok çeşitli kimyasal yapılara sahiptir (Newman ve Cragg 2016). Bu bileşiklerin devam eden keşfi, kanserlerin önlenmesi ve tedavisi için yeni bir yol açmıştır. Mantar kökenli bileşiklerin, özellikle sağılıklı dokular üzerinde zararlı olmayan hedefe yönelik kanser tedavisi için potansiyel yenilikçi ilaçlar geliştirebilmek adına geniş bir kaynak sağılayacağı düşünülmektedir (Blagodatski vd. 2018).

Ağırlıklı olarak konvansiyonel kemoterapötik ajanların kullanıldığı kolorektal kanser tedavisi, yanıt oranının düşük olmasının yanı sıra yüksek toksisite nedeniyle de hastalarda önemli bir yük oluşturmaktadır. Toksisite, ilaç direnci ve advers reaksiyonların etkileri kemoterapi süreci ile ilişkili ana problemlerdir. Günümüzde artan sayıda birçok çalışma, doğıal ürünlerin etkili anti-kanser etkinliğine sahip olduğunu ve doğıal ürün türevli ilaçların kolorektal kanser tedavisi için alternatif veya tamamlayıcı kemoterapi ajanları olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Benarba vd. 2018). Bununla beraber, mantar özütleri veya mantarlardan türetilmiş sentetik bileşiklerin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılmasıyla; mide bulantısı, kemik iliğı baskılanması, anemi gibi konvansiyonel kemoterapotiklerin yan etkilerini azaltabilecekleri de gösterilmiştir (Patel ve Goyal 2012). Böylece, hastaların daha iyi tedavi sonuçları elde etmelerine ve yaşam kalitelerini iyileştirmelerine yardımcı olacaklardır. Bu nedenle mantarlar ve onların sentetik türevlerinin kanser oluşumu/gelişimin önlenmesi için yenilikçi maddeler geliştirilmesinde önemli rol oynaması beklenmektedir (Song vd. 2013).

Kanser tedavisinde mantar özütleri veya mantarlardan türetilmiş sentetik bileşiklerin kullanımını değıerlendirmek için çok sayıda farmakolojik ve klinik çalışma yapılmıştır.

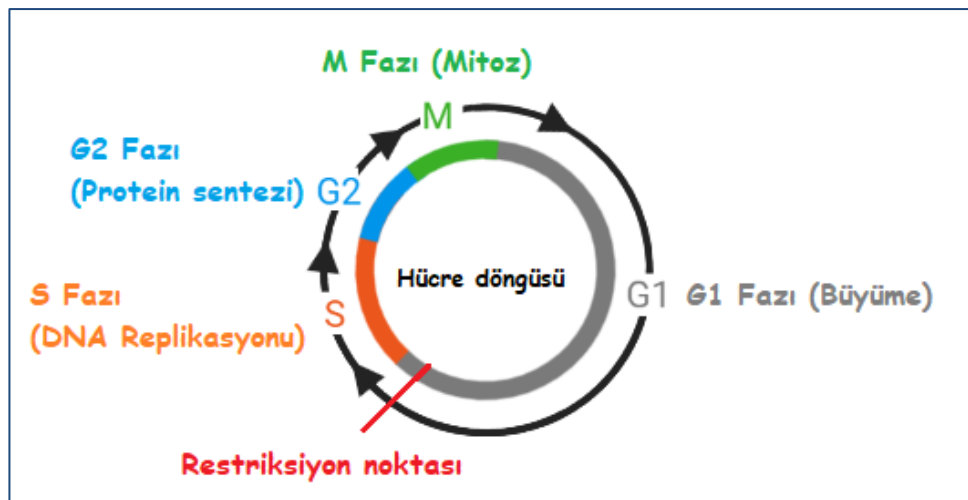
Mantar bileşiklerinin sağladığı avantajlar ve kanser tedavisi için sahip oldukları potansiyel ortaya konulmuş, anti-tümör etkiye sahip birçok bileşik izole edilmiş ve bazıları ticari olarak geliştirilmiştir. Krestin, Lentinan ve Schizophyllan bunların en bilinenleridir (Wasser 2002). Polisakkarit-K (PSK; Krestin), *Coriolus versicolor* mantarından izole edilmiştir. 40 yılı aşkın bir süredir Asya'da kanser tedavisinde kemoimmünoterapi ajanı olarak kullanılan, proteine bağlı benzersiz bir polisakkarittir (Maehara vd. 2012). PSK anti-kanser etkinliğini; bağışıklık yanıtlarını ve apoptozu indükleyerek, metastazı inhibe ederek ve kemoterapi etkinliğini artırma gibi çeşitli yollar aracılığıyla göstermektedir (Maehara vd. 2012). Lentinan, *Lentinula edodes*'den ekstrakte edilen polisakkarit yapısında bir moleküldür. β -Glukanlar, immün sistemi uyarıcı etkiye sahip lentinan'daki ana biyoaktif bileşendir. Lentinan'ın anti-kanser özelliği 1960'larda rapor edilmiştir ve immünolojik yanıtı aktive eden biyolojik yanıt düzenleyiciler olarak kabul edilmektedir (Wasser ve Weis 1999). Schizophyllan, *Schizophyllum commune* mantarı tarafından üretilen bir polisakkarittir. Kanser tedavisi de dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik amaçlara yönelik ticari olarak üretilmektedir (Wasser 1999). Mantarlardan elde edilen bileşenlerin kemoterapi ajanları ile birlikte klinik kullanımında da faydalı oldukları gösterilmiştir (Rejhová vd. 2018). Başta polisakkaritler olmak üzere aktif mantar bileşikleri; onkogenezi önler, çeşitli allojenik ve singeneik tümörlere karşı doğrudan antitümör aktivite gösterir ve tümör metastazını önler (Wasser 2002). *Phellinus linteus*'dan izole edilmiş polifenol yapısında aktif bir bileşik olan Hispolonun, güçlü anti-neoplastik özelliklere sahip olduğu ve çeşitli kemoterapötik ajanların sitotoksik aktivitesini güçlendirdiği gösterilmiştir (Sarfraz vd. 2020). Benzer iddiaları destekleyecek bilimsel araştırmaların sayısı son yıllarda oldukça hız kazanmıştır. Elde edilen sonuçlar bazı mantarlardan elde edilen aktif bileşiklerin mevcut sitotoksik ajanlar ile birlikte kullanıldığında, özellikle ilaca dirençli kanserleri tedavi etmek için sinerjistik etkili olacak şekilde çalıştığını göstermektedir (Patel ve Goyal 2012).

2.5 Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücrelerin kontrollü bir şekilde bölünmesini ve çoğalmasını sağlayan çeşitli olayların bütünüdür. Hücre döngüsünün gerçekleşmesi; hücre dışı büyüme

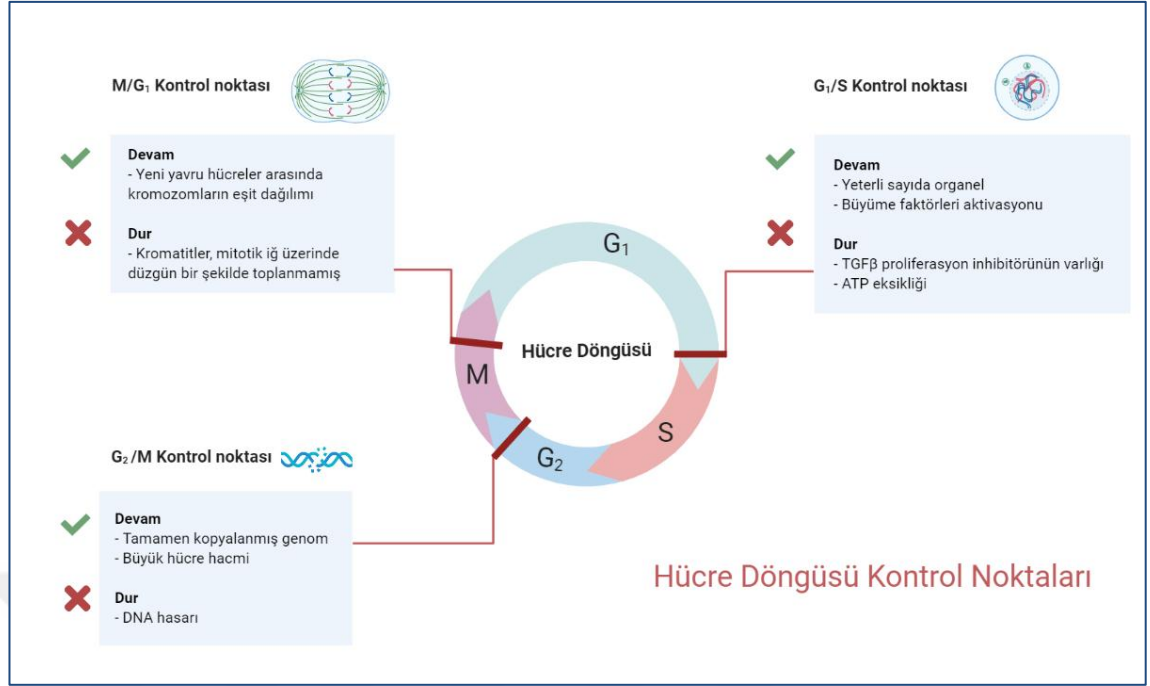
sinyallerini, hücre boyutunu ve DNA bütünlüğünü değerlendiren çoklu kontrol noktalarını içeren oldukça düzenli ve sıkı şekilde düzenlenmiş karmaşık bir süreçtir (Park ve Lee 2003). Somatik hücre döngüsünün dört ardışık aşaması vardır; G1, S, G2 ve M olacak şekilde birbirini takip eden dört fazdan oluşmaktadır (Şekil 2.15). Bu aşamaların ikisi sırasında hücreler, kromozomlardaki DNA kopyasının oluşturulması ve tüm hücresel bileşenlerin iki özdeş hücreye doğru bir şekilde aktarılması gibi hücre bölünmesindeki temel olayları gerçekleştirirler. Kromozom kopyasının oluşturulması, sentez fazı olarak da adlandırılan S fazında gerçekleşmektedir. Memeli hücrelerinde S fazı yaklaşık 12 saat sürmekte ve bu faz döngünün neredeyse yarısını oluşturmaktadır. S fazını takiben, kromozom ayrılması ve hücre bölünmesi M fazında gerçekleşmektedir. M fazı memeli hücrelerinde yaklaşık 1 saatte tamamlanmaktadır. Kopyalanan kromozomların özdeş hücrelere eşit olarak aktarıldığı mitoz (çekirdek bölünmesi) ve sitoplazmanın ikiye bölündüğü sitokinez (sitoplazmik bölünme) aşamalarından oluşmaktadır (Morgan 2007). Hücre döngüsünün diğer iki aşamasıysa, hücrelerin sırasıyla S ve M döngülerinin başarıyla tamamlanması için ihtiyaç duydukları ara faz olarak da adlandırılan (G1 ve G2) süreyi temsil etmektedir.

G1 fazı mitozdan sonra gelir ve hücrenin büyüme sinyal ağlarından gelen pozitif ve negatif sinyallere duyarlı olduğu zamandır. G2, hücrenin mitozla girmeye hazırlandığı S fazından sonraki zaman dilimidir (Williams ve Stober 2012). G1 fazı sırasında hücre büyümekte olup, metabolik olarak oldukça aktiftir.



Şekil 2.15 Hücre döngüsünün aşamaları

G1 fazının tamamlanmasının ardından S fazı ile birlikte DNA sentezi başlar. DNA sentezinin başarılı bir şekilde tamamlanmasının ardından, hücrenin artık bölünmeye hazırlandığı G2 fazı başlamaktadır. Birbirini takip eden G1, S ve G2 fazları interfaz olarak da adlandırılmaktadır (Abreu ve Howard 2015). Hücreler, spesifik antimitojenik sinyaller veya uygun mitojenik sinyallerin olmaması nedeniyle çoğalmayı durdurduğunda, G1 fazında döngüden çıkarlar ve G0 olarak bilinen bölünmeyen, hareketsiz evreye girerler. G0, hücrelerin yüksek hücre yoğunluğuna veya mitojen sinyallerin yoksunluğuna yanıt olarak hücre bölünme döngüsünden geri dönüşümlü olarak durdurulduğu durumu temsil etmektedir (Zetterberg ve Larsson 1985). G0 evresinde, hücreler canlı ve metabolik açıdan aktiflerdir, ancak bölünmezler. Hücre bölünmesi için gerekli iç ve dış koşulların kontrol edildiği G1 fazı bu ne nedenle oldukça önemlidir. Koşullar uygun hale gelip, büyüme ve bölünme için uygun sinyaller alındığında; G0 veya erken G1 fazındaki hücreler, restriksiyon noktasına (memeli hücrelerinde G1 fazının sonlarına yakın bir bölgede bulunur) ilerlerler (Yandım ve Demir 2018). Restriksiyon noktası geçildikten sonra, hücre büyümesini ve bölünmeyi tetikleyen dış sinyaller ortadan kalksa bile, DNA replikasyonu gerçekleşir (Vermeulen vd. 2003). G1 fazında bulunan restriksiyon noktasına ek olarak hücre döngüsü, hücre boyutunu, hücre dışı büyüme sinyallerini ve DNA bütünlüğünü değerlendiren diğer fazlardaki kontrol noktalarında da durdurulabilir (Şekil 2.16) (Park ve Lee 2003).



Şekil 2.16 Hücre döngüsü kontrol noktaları

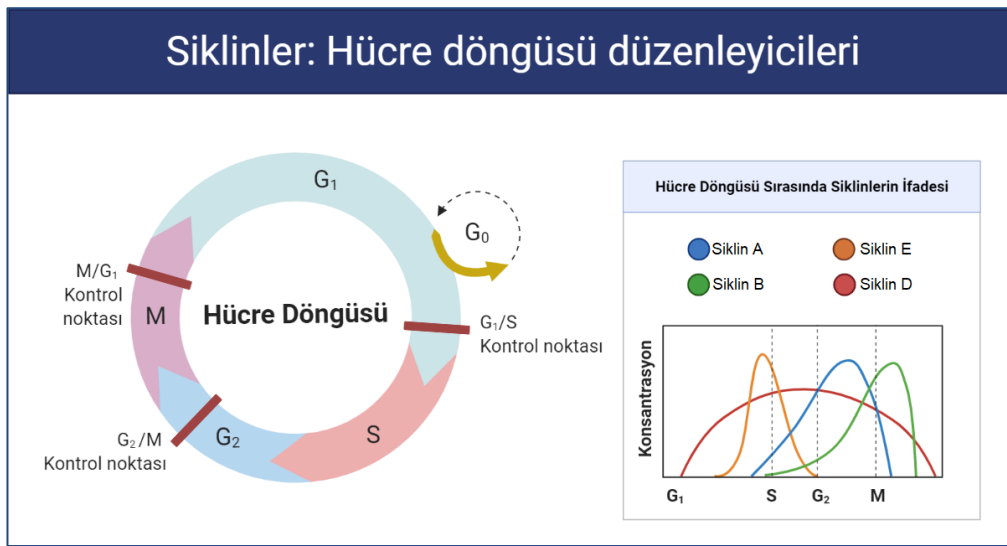
2.5.1 Hücre Döngüsünün Kontrolü

Hücre döngüsünü kontrol eden mekanizmalar, evrimsel süreçte bütün canlı organizmalarda oldukça iyi korunmuş süreçlerdir. Ökaryotik hücreler, benzer hücre döngüsü aşamalarını ve moleküler kontrol mekanizmalarını (G₁'den M'ye ilerlemedeki çeşitli aşamaları kontrol eden faktörler) kullanmaktadır (Şekil 2.16). Hücre döngüsü boyunca ilerleme, serin/treonin kinazların sikline bağımlı kinaz (CDK) ailesi ve bunların düzenleyici ortakları olan siklinler tarafından yönlendirilir (Malumbres ve Barbacid 2006). CDK'ların aktif formları bir kinaz ve bir siklinden oluşan bir kompleksdir (Çizelge 2.2). Siklin ve CDK'ların oluşturdukları kompleks döngünün ana kontrol mekanizmasıdır. Bu kompleksler, hücre döngüsü ilerlerken kinaz ve siklin bileşenlerinde değişikliklere uğrar. Siklinler ve CDK'lar arasındaki dinamik ilişki döngünün kontrolünden sorumludur. Hücre döngüsü, CDK'lerin aktivitesinin bir sonucu olarak, fosforilasyon ile aktive edilen veya inaktive edilen proteinler tarafından belirlenir (Morgan 2007).

Maya hücrelerinde bir CDK molekülü (Cdk1), tüm siklinlere bağlanarak hücre döngüsünün tamamını düzenleyebilir. Gelişmiş organizmalardaysa döngünün kontrolünden sorumlu birden fazla siklin ve CDK'lar bulunmaktadır (Williams ve Stober 2012). Her bir siklin farklı bir CDK ile kompleks oluşturarak hücre döngüsünü düzenlemektedir. Memeli hücrelerinde, hücreler G₁'den mitoze doğru ilerlerken hücre döngüsünün farklı kontrol noktalarının düzenlenmesinden sorumlu dört farklı CDK molekülü bulunmaktadır. CDK moleküllerinin aktivasyonunda görev alan dört siklin molekülü ile birlikte döngünün düzenlenmesinde görev alırlar. Hücre döngüsü ilerledikçe, bir dizi kinaz alt birimi (CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6), bir dizi siklin (siklin D, E, A ve B) ile birlikte ifade edilir (Park ve Lee 2003). Siklin – CDK kompleksleri hücre fazına göre farklı kombinasyonlarla ifade edilerek düzenleyici aktivitelerini gösterirler (Şekil 2.17). Farklı siklin-CDK kompleksleri döngünün farklı olaylarının düzenlenmesinden sorumludur (Çizelge 2.2).

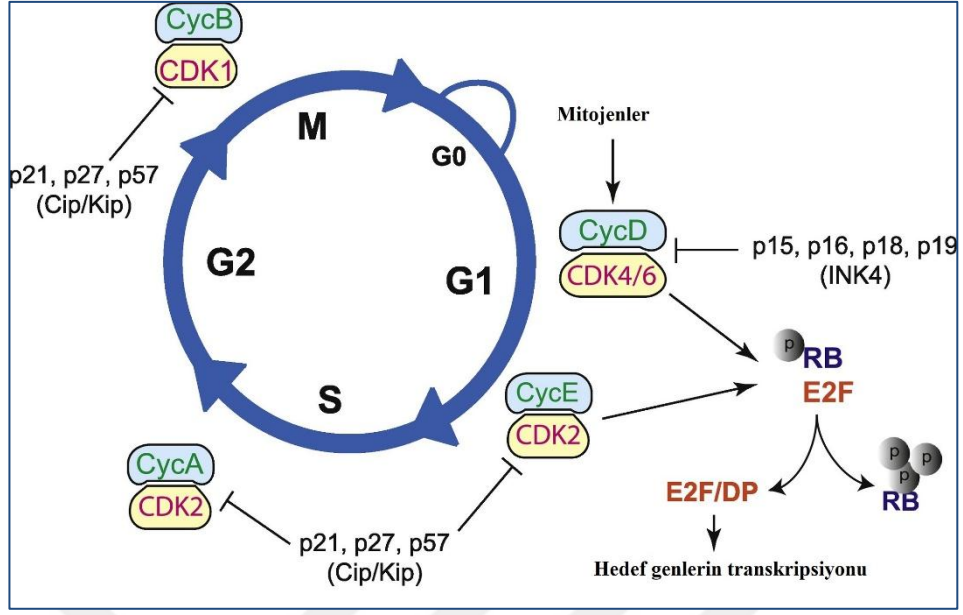
Çizelge 2.2 Siklin bağımlı kinazlar ve düzenleyici siklinleri (Albert vd. 2002)

Siklin CDK Karmaşımı	Siklin	CDK Eşi
G ₁ -Cdk	Siklin D	Cdk4, Cdk6
G ₁ /S-Cdk	Siklin E	Cdk2
S-Cdk	Siklin A	Cdk2, Cdk1
M-Cdk	Siklin B	Cdk1



Şekil 2.17 Hücre döngüsü kontrol noktaları ve hücre döngüsü fazlarına göre siklinlerin ifade edilmesi

Siklin D-CDK4/CDK6 ve siklin E-CDK2, hücrenin döngüyü tamamlamasını sağlayan restriksiyon noktasını geçip G1 boyunca ilerlemesini yürütür (Planas-Silva ve Weinberg 1997). S fazı, siklin A-CDK2 tarafından başlatılır ve siklin B-CDK1, G2 boyunca ilerlemeyi ve mitozaya girişi düzenler (Nigg 2001). Döngünün her aşaması boyunca ilerleme ve bir aşamadan diğerine geçiş, kontrol noktaları olarak adlandırılan bölgelerdeki sensör mekanizmalar tarafından izlenir. Sensör mekanizmalar tarafından anormal veya eksik hücre döngüsü olayları (örneğin DNA hasarı) tespit edilirse; kontrol noktası yolları sorun çözülene kadar hücre döngüsünün durmasını tetikleyebilecek sinyali efektörlere taşır (Bartek vd. 2004). Efektör proteinler, hücre döngüsünün ilerlemesini tersine çevrilebilir şekilde durdurabilen CDK inhibitörleridir. Ink4 ailesinin [INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) ve INK4D (p19)] etkisiyle hücre döngüsünün G1 fazında durdurulması veya Cip/Kip inhibitörleri ailesinin (p21, p27, p57) CDK2 aktivitesini baskılaması efektör proteinlerin etkilerine örnek olarak verilebilir (Şekil 2.18) (Hanahan ve Weinberg 2011). Hücre döngüsünün düzenlenmesinde ana rol oynayan kontrol noktalarında meydana gelen bozukluklar, malign fenotipi karakterize eden kontrolsüz hücre proliferasyonunun temelini oluşturmaktadır (Park ve Lee 2003). p15, p16 ve p27 gibi CDK inhibitörlerini kodlayan tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu da çeşitli tümör tiplerinde oldukça yaygın olaylardır (Williams ve Stober 2012). Bu gibi inaktivasyonlar, hücre döngüsü ilerlemesini kontrol altında tutan sistemleri serbest bırakır ve kontrol noktası mekanizmalarının da kaldırılması sonucunda tümör evrimini yönlendiren genomik kararsızlığın edinilmesine yol açar (Malumbres ve Barbacid 2006).



Şekil 2.18 Hücre döngüsünün düzenlenmesi (Leal-Esteban ve Fajas 2020)

2.5.2 Hücre Döngüsü ve Kanser

Hücre döngüsünün deregülasyonu, kanseri karakterize eden anormal hücre proliferasyonunun temelini oluşturur ve genomik kararsızlığı teşvik eder (Williams ve Stoeber 2012). Kanser, genellikle hücre döngüsünün bir hastalığı olarak da kabul edilmektedir, bu nedenle hücre döngüsünün bozulmasının tümör gelişimi sırasında en sık görülen değişikliklerden biri olması şaşırtıcı değildir (Park ve Lee 2003). Normal koşullar altında büyümeyi kontrol eden mekanizmalar homeostazı sağlamayı amaçlamaktadır. Sağlıklı somatik hücreler, sadece gerekli büyüme sinyallerini aldıklarında çoğalırken, kanser hücreleri bu sinyallere gereksinim duymadan kontrolsüz bir şekilde çoğalabilmektedir. Kontrolsüz hücre bölünmesi ile karakterize edilmiş kanser hücrelerinde ise meydana gelen mutasyonlar veya mutasyonların sebep olduğu bozukluklar sonucunda kontrolsüz bölünme tetiklenmektedir (Williams ve Stoeber 2012). Hücre döngüsü kontrolünde meydana gelen bu bozukluklar ve tümör oluşumu arasındaki bağlantı, insan tümörlerinin moleküler analizleri sonucunda çok çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Memeli hücrelerinde birçok farklı molekül hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu moleküllerin oluşturduğu kompleksler döngünün başlatılmasını, sürdürülmesini ve sonlanmasını sağlamaktadır (Park ve Lee

2003, Gerald ve Goldbeter 2011). Dolayısıyla hücre döngüsünü kontrol eden molekül ve mekanizmalar tümör oluşumunu doğrudan etkileyebilmektedir.

Hücre döngüsünün düzenlenmesinde ortaya çıkan eksiklikler, olası terapötik müdahaleler için hedefler ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle klinikte mevcut kullanımda olan etkili neoadjuvan ve adjuvan terapötik müdahalelerin çoğu, hücre döngüsüne yönelik ajanlardır (Çizelge 2.3). Hücre döngüsünün temel ve önemli bir bileşeni olan DNA replikasyonun gerçekleştiği S fazı bu nedenle potansiyel bir tedavi hedefidir (Williams ve Stoeber 2007). En etkili kemoterapötik rejimler çoğunlukla S ve M fazına yönelik mekanizmalar ile etkinliklerini göstermektedir. S ve M faz hedefli ajanlar tedavi sürecinde oldukça faydalı olmalarına karşın; normal döngülü hücreleri özellikle de kendi kendini yenileyen dokuların transit-amplifiye bölümlerinde bulunanları da etkileyerek kemik iliği baskılanması (nötropeni), saç dökülmesi ve bağırsak toksisitesi gibi istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır (Williams ve Stober 2012).

Çizelge 2.3 Hücre döngüsü hedefli terapötik ajanlar (Williams ve Stober 2012)

Ajan	Sınıf	Hedef	Etkilenen faz
5-Florourasil	Antimetabolit	Timidilat sentaz	S
Gemsitabin	Antimetabolit	Ribonükleotid redüktaz	S
Metotreksat	Antimetabolit	Dihidrofolat redüktaz	S
İrinotekan	Kamptotesin	Topoizomeraz I	S
Sisplatin	Alkilleyici ajan	DNA zincirler arası çapraz bağlar	S/G2
Dosetaksel	Taksan	Tübülin	M
Paklitaksel	Taksan	Tübülin	M
Vinkristin	Vinka alkaloid	Tübülin	M

Alternatif bir diğer yaklaşım hücre döngüsü ilerlemesinin kontrolünde sahip oldukları merkezi rolleri nedeniyle CDK'leri hedeflemektedir (Williams ve Stober 2012). CDK'ler, proliferasyona yol açan hücre dışı ve hücre içi sinyallere yanıt olarak kritik hücre döngüsü kontrol noktalarını ve buna yanıt olarak anahtar transkripsiyonel olayları

kontrol etmektedir. Bu nedenle doğrudan CDK aktivitesini bloke eden inhibitörlerin tasarlanması gelecek vaat eden stratejilerden bir tanesi olarak karşımıza çıkmaktadır. G1 veya G2/M'deki hücreleri durduran güçlü anti-proliferatif etkiye sahip olmaları, CDK inhibitörlerini önemli anti-tümör ajanlar olarak sınıflandırılmalarını sağlamaktadır (Park ve Lee 2002). CDK inhibitörlerinin sahip oldukları anti-tümör potansiyel yakın zamanda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur ve yakın zamanda FDA tarafından onaylanan CDK4/6 inhibitörleri metastatik kanserlerde önemli klinik aktivite göstermiştir (Sánchez-Martínez vd. 2019). Hücre döngüsü kanseri karakterize eden anormal hücre proliferasyonunun merkezinde yer alması nedeniyle terapötik müdahale için oldukça önemli bir hedeftir. Yakın gelecekte, hücre döngüsünü hedefleyen yeni tedavi yaklaşımları kanser tedavisinde önemli bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Bazı doğal bileşiklerin de, sinyal yollarını modüle etme ve hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan genlerin ekspresyonunu düzenleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Pan vd. 2011). Bu nedenle kombine tedavi olarak adlandırılan, geleneksel bir kemoterapötik ve doğal bileşiğin birlikte uygulandığı eş zamanlı terapi ilgi odağı haline gelmiş bir yaklaşım haline gelmiştir. Diğer kanser türlerinin aksine, kolorektal kanser hücreleri doğrudan bu ajanlara maruz kalmaktadır (Li vd. 2015). Bu nedenle bu ajanların kolorektal kanser tedavisinde özellikle mevcut kemoterapötiklerle birlikte kullanılmasına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Bazı yeni çalışmalar, kombinasyon yaklaşımının önemini vurgulamakta ve bu terapinin geleneksel kemoterapötik ajanların tekil kullanımından daha etkili olabileceğini öne sürmektedir (Singh vd. 2013, Rejhová vd. 2018).

Zerdeçalın (*Curcuma longum*) fenolik asit türevi olan kurkumin bu konuda üzerinde en çok çalışılan doğal bileşiklerden birisidir. Biyotransformasyon enzimlerinin ve hücre döngüsü proteinlerinin (glutasyon-S-transferazlar ve p21) aktivitesini artırarak hücre çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (Ye vd. 2007). Kurkuminin ayrıca geleneksel olarak kullanılan kemoterapötiklerin etkisini de arttırdığı gösterilmiştir. Kurkumin, FOLFOX (5-FU, folinik Asit, oksaliptatin) tedavisi altında HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarında dasatinib ile sinerjistik bir etki göstermiştir (Nautiyal vd. 2011).

Resveratrol, kemoterapötik doğal bileşiklere başka bir örnektir. 5-FU, etoposid, mitomisin ve oksaliptatin gibi kemoterapötiklerle kombinasyon halinde sinerjik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Redondo-Blanco vd. 2017). Resveratrolün dosetaksel ile birlikte kullanıldığında, p53/p21/p27 yolağı üzerinden hücre döngüsü durdurulmasını indüklediği gösterilmiştir (Singh vd. 2017).

Ganoderma lucidum veya Reishi mantarı da benzer çalışmalarda kanser tedavisi için kullanılmıştır. Hücre döngüsü durmasını indüklediği, HT-29 ve SW-480 hücre hatlarında tek başına veya 5-FU ile birlikte uygulandığında mutant p53'ü yeniden aktive ettiği gösterilmiştir (Jiang vd. 2017).

Epigallocateşin, birçok *in vitro*, *in vivo* ve çeşitli klinik deneylerle antitümör etkisi gösterilmiş polifenollerden biridir (Singh vd. 2011). Ayrıca 5-FU ile kombinasyon halinde DLD-1, SW-480, ve COLO-201 kolorektal kanser hücrelerinde sinerjik büyüme inhibisyonu sergilediği de gösterilmiştir (Kumazaki vd. 2013).

Genistein birçok bitkisel gıda kaynağında bulunan izoflavon yapısında bir bileşiktir. Genistein 5-FU'ya dirençli HT-29 kolorektal hücre hattı üzerinde, 5-FU ile birlikte uygulandığında hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmış, p53 ve p21 genlerinin ekspresyonunu artırarak hücre büyümesini inhibe etmiştir (Hwang vd. 2005).

Apigenin en yaygın flavonlardan biridir, *in vitro* ortamda sitostatik özellikler sergileyerek kolorektal kanser hücrelerinin büyüme inhibisyonunu indüklediği ve hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir (Engelmann vd. 2002). Kolorektal kanser hücrelerinde hücre döngüsü inhibitörleri p53 ve p21'in ekspresyonunu *in vivo* ve *in vitro* da arttırdığı ve irinotekanın aktivitesini güçlendirdiği de bulunmuştur (Zhong vd. 2010, Lefort vd. 2011). Başka bir polifenolik flavon krisinin, G2/M geçişinde hücre döngüsü durmasını indüklediği ve fare modelinde *in vivo* olarak hücreleri indüklenmiş sisplatin toksisitesine karşı koruduğu gösterilmiştir (Wang vd. 2004, Khan vd. 2012). Kaempferol, kolorektal kanser hücre hatlarında antitümör aktivite gösteren başka bir flavonoldur. HT-29 hücre hattında, G1 ve G2/M fazında hücre döngüsü durmasını indüklediği ve PI3K/Akt sinyal yolunu düzenleyerek 5-FU ile kolorektal kanser

hücrelerinin büyümesi üzerinde sinerjik etkisi olduğu gösterilmiştir (Cho vd. 2013, Li vd. 2019).

Yukarıda özetlenen literatür çalışmalarında da görüldüğü gibi birçok doğal bileşik, tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstererek, hücre döngüsü durmasını indükleyerek veya tümör büyümesinin inhibisyonu ile sonuçlanan proliferasyonu baskılamak gibi çeşitli etkiler gösterebilmektedir. Geleneksel kemoterapötiklerin doğal bileşiklerle etkileşimi sonucunda çoklu sinyal yollarını hedef alan kombine terapi, kanser araştırma ve tedavisinde yeni bir yön ortaya koymaktadır. Bu şekilde konvansiyonel kemoterapi ile ilişkili olumsuz etkileri en aza indirirken, etkinliklerini arttırmanın umut verici bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir. Mevcut tez çalışmasının hipotezi de bu yaklaşıma dayanmaktadır. *C. nebularis* makrofungusunun tek başına ve 5-FU ile birlikte anti-kanser potansiyeli ve hücre döngüsü üzerindeki etki mekanizmasının araştırıldığı ilk çalışma olması çalışmanın özgünlüğünü göstermektedir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan; L-glutamin, RPMI-1640, Tripsin/EDTA, penisilin/streptomisin, propidium iodide, MTT Sigma-Aldrich, dimetil sülfoksit (DMSO), kristal viyole, etanol, metanol, kloroform Merck, fetal bovin serum (FBS), fosfat tamponlu salin (PBS) Euroclone, nükleaz içermeyen su, cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, K1622), RNase Thermo Fisher, RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit, 11828665001), SYBR Green (LightCycler 480, 04707516001) Roche, falkon tüpleri, mikrofüj tüpleri, pipet uçları, PCR tüpleri, PCR plakaları, hücre kültürü flaskları, serolojik pipetler, hücre kültürü plakaları Nest, Aquaguard-1 Biological Industries, 5-Florourasil Koçak farma, şırınga filtreleri Asimo ve şırıngalar Helmed firmalarından temin edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar; rotari evaporator (Büchi, R-3), liyofilizatör (Edwards, Modulyo), inkübatör (Sanyo), biyogüvenlik kabini (mikrotest), ters mikroskop (Euromex), ışık mikroskopu (Olympus), cerrahi aspiratör (Elmaslar), tek ve çok kanallı otomatik pipetler (Eppendorf), vorteks (Labnet), yüksek devirli soğutmalı santrifüj (Sigma), sıcak su banyosu (Mettler Toledo), hassas terazi (Mettler Toledo), pH metre (Hanna), saf su cihazı (Millipore), mikropilaka okuyucusu (Biotek), akış sitometrisi (Acea), nanodrop (Thermo Fisher), PCR cihazı (Thermo Fisher), RT-PCR cihazı (Bio-Rad) firmalarından temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Mantar örneğinin toplanması, saklanması ve tür teşhisi

Tez çalışması kapsamında kullanılan *Clitocybe nebularis* mantar örneği, 2015 yılı Kasım ayında Bolu ve Kastamonu illerinde kurulan halk pazarlarından temin edilmiştir. Mantar örneğinin tür teşhisi Doç. Dr. Ilgaz AKATA tarafından yapılmıştır. Kullanılan örneğin bir kısmı referans amacıyla, Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Fungarium'unda CN-2015 etiketi ile saklanmaktadır. Teşhis ve etiketleme işleminden

sonra, özütleme aşaması için temizlenen örnekler kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.2.2 Mantar örneklerinin ekstraksiyon için hazırlanması

C. nebularis mantar örneği, etanolik ekstraksiyon ile daha önce optimize edilmiş yöntemle göre ekstrakte edilmiştir (Onar vd. 2016). Bu yöntemde ekstraksiyon için mantar örneğinden 10 gr tartılmış ve sıvı azot yardımıyla havanda öğütülmüştür. Öğütülen mantar örneklerin üzerine ağırlığının 10 katı (100 mL) %99’luk etanol ilave edilerek yaklaşık 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Örnekler karıştırıldıktan sonra 24 saat boyunca +4°C’de tutulmuştur. 24 saatin sonunda ekstraksiyon karışımı, Watmann No.1 filtre kâğıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Filtrasyon işleminden sonra ekstraksiyon karışımında bulunan etanol 54°C’de uygun basınç altında (337 mBar) rotary evaporatör (Büchi, R-3) yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Evaporasyon işlemi sonrasında elde edilen konsantre özüt liyofilizatör (Edwards Modulyo) yardımıyla kurutularak toz haline getirilmiştir. Hazırlanan örnekler çalışmalarda kullanılabilece kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Hücre kültürü

Tez çalışması kapsamında *C. nebularis* özütünün anti-proliferatif etkisinin araştırılması amacıyla insan kolon kanseri hücre hattı olan HT-29 (ATCC HTB-38) hücre hattı kullanılmıştır. HT-29 hücre hattı, farklı gıda bileşiklerinin potansiyel anti-kanser etkisini ve bunların gastrointestinal sindirimlerini değerlendirmek için uygun bir hücre hattıdır (Martínez-Maqueda vd. 2015) ve bu nedenle çalışmamız için model olarak HT-29 hücre hattı seçilmiştir.

HT-29 hücreleri T-25 flasklarda %10 fetalbovine serum (FBS), 20 mM L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 hücre besiyerinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren koşullarda geliştirilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşarak, flask yüzeyini % 80-90 oranında kaplayan hücreler tripsin yardımı ile toplanarak T-75 flasklara transfer edilmiş ve belli yoğunluklarda pasajlanmıştır. Deneyler sırasında hücreler kültür

ortamından %0.05 Tripsin-EDTA uygulaması (inkübatörde 3 dakika bekletilerek) ile toplandıktan sonra, tripan mavisi kullanılarak canlı hücre sayımları gerçekleştirilmiş ve yapılacak çalışmaya göre spesifik miktarlarda, uygun hücre plakalarına ekimleri yapılmıştır. HT-29 hücre hattına ek olarak, Caco-2 (ATCC HTB-37) insan kolon kanseri hücre hattı ve HEK-293 (ATCC CRL-1573) insan böbrek epitel hücre hattı da hücre canlılığı çalışmalarına dahil edilmiştir. Caco-2 hücre hattı; kolon kanseri heterojenitesini yansıtabilmek amacıyla, HEK-293 hücre hattı da *C. nebularis* özütünün olası bir toksik etkisinin tespitine yönelik kontrol amacıyla kullanılmıştır. Caco-2 ve HEK-293 hücreleri, %10 fetalbovine serum (FBS), 20 mM L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM hücre besisi yerinde yukarıda belirtilen uygun şartlar altında geliştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm hücre hatları 10-20 pasaj numarasında olup, mikoplazma kontaminasyonu için negatif olarak test edilmiştir.

3.2.4 Sitotoksik etkinin araştırılması

C. nebularis özütünün tez çalışması kapsamında kullanılan hücre hatları üzerinde olan sitotoksik etkileri 24 saat içerisinde, 7 farklı doz aralığında (7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125, 250, 500 µg/mL) MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kolon kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajan 5-Florourasil (5-FU), 7 farklı doz aralığında (0.0781, 0.1562, 0.3125, 0.6250, 0.1250, 25, 50 µg/mL) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak, DMSO % 0.1 ile muamele edilmiş hücreler her deneye dahil edilmiştir.

Bu metodun içerisinde, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak kullanılan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tetrazolyum tuzu kullanılmıştır. Çalışmanın prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrogenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyum tuzu (sarı renk) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu oluşan rengin 570 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda kolorimetrik olarak takibe alınmasıdır (Berridge vd. 2005).

Bu amaca yönelik *C. nebularis* özütünün sitotoksik etkisinin test edileceği hücreler (HT-29, Caco-2 ve HEK-293), kuyucuk başına 1×10^5 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre plakalarına ekimi yapıp, 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂ koşullarında 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, örnekler üçlü tekrar şeklinde 7 farklı konsantrasyonda hücrelere ilave edilip, 24 saat boyunca inkübasyona devam edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda kültür ortamına PBS ile hazırlanmış 5 mg/mL MTT çözeltisi ilave edilmiş ve hücreler 4 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ koşullarında karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklarda bulunan sıvı karışımı 8 kanallı pipet yardımıyla alınıp, kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında kuyucuklarda oluşan formazan kristalleri 100 µL DMSO ile çözülmüştür. Sonrasında hücre plakalarının 570 nm dalga boyunda mikroparka okuyucusunda (BioTek) absorbans ölçümleri yapılmıştır. Hücre canlılığı, negatif kontrol ile muamele edilmiş hücrelerle karşılaştırılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(OD \text{ kontrol} - OD \text{ örnek}) / OD \text{ kontrol}] \times 100$$

Örneklerin hücre canlılığı üzerine olan etkileri, çizilen doz-yanıt eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve IC₅₀ değeri olarak ifade edilmiştir.

3.2.5 İlaç kombinasyonu etkinliğinin değerlendirilmesi

CN özütünün HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesinin belirlenmesinden sonra, HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerinde 5-FU ile birlikte potansiyel kullanımının etkisini belirlemek için, Chou ve Talalay yöntemi kullanılarak (Chou 2010), CN özütü ve 5-FU arasındaki ilaç-ilaç etkileşimleri araştırılmıştır. CN ve 5-FU için HT-29 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasından sonra; IC₅₀ konsantrasyonları kullanılarak 7 farklı CN + 5-FU kombinasyonu oluşturularak hücre canlılığı deneyleri tekrarlanmıştır (Çizelge 3.1). Kombinasyon çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar, CompuSyn (ComboSyn, ABD) programı kullanılarak her bir kombinasyon uygulaması için, kombinasyon indeksi (CI) ve doz azaltma indeksi (DRI) değerleri hesaplanmıştır. İlaç-ilaç etkileşimi çalışmaları sonucunda elde edilen analiz

sonuçları; $CI < 1$ ise sinerjistik, $CI = 1$ ise aditif ve $CI > 1$ ise antagonist etki şeklinde yorumlanmıştır (Çizelge 3.2). Doz azaltma indeksinin hesaplanmasında ise $DRI > 1$ değeri, tek başına bireysel ilacın konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında, belirli bir etki seviyesi için kombinasyonla ilacın dozunun ne kadar azaltılabileceğinin göstergesidir.

Çizelge 3.1 Kombinasyon analizi için kullanılan IC_{50} konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$)

HT-29	
CN	5-FU
1	1
1	2
2	1
1	3
3	1
1	4
4	1

Çizelge 3.2 Kombinasyon indeksi (CI) analiz parametreleri

CI	Tanım
<0.1	Çok güçlü sinerjizm
0.1-0.3	Güçlü sinerjizm
0.3-0.7	Sinerjizm
0.7-0.85	İlımlı sinerjizm
0.85-0.90	Hafif sinerjizm
0.90-1.10	Aditif
1.10-1.20	Hafif antagonizm
1.20-1.45	İlımlı antagonizm
1.45-3.3	Antagonizm
3.3-10	Güçlü antagonizm
>10	Çok güçlü antagonizm

3.2.6 Morfolojik analizler

C. nebularis mantarından elde edilen özütün, HT-29 kolon kanseri hücre hatları üzerindeki morfolojik etkilerini araştırmak için kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak, MTT deneyi sonucunda belirlenen miktar (IC_{50}) ve zaman aralıkları içerisinde (24 saat) hücre çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkileri mikroskopik olarak araştırılmıştır. Morfolojik analizler için hücreler 6 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 5×10^5 olacak şekilde ekilip $37^{\circ}C$ sıcaklık ve %5 CO_2 koşullarında 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler PBS ile yıkanmış, ışık mikroskobu yardımıyla (Olympus DP74) hücrelerdeki morfolojik değişiklikler incelenerek fotoğraflanmıştır.

3.2.7 Kristal viyole deneyi

C. nebularis mantarından elde edilen özütün, HT-29 kolon kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve morfolojik etkilerini araştırmak için kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak, MTT deneyi sonucunda belirlenen miktar (IC_{50}) ve zaman aralıkları içerisinde (24 saat) hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkisi kristal viyole deneyi kullanılarak araştırılmıştır.

Bu yöntem, hücre kültürü plakalarına yapışan canlı hücrelerin boyanması esasına dayanmaktadır. Deney sırasında hücre ölümünün gerçekleşmesi ile hücreler yapıştıkları hücre plakasından ayrılırlar ve yıkama işlemi sonucunda ortamdan uzaklaştırılırlar. Yapışık kalan canlı hücreler ise kristal viyole ile boyanırlar. Yıkama işleminden sonra, hücrelerin morfolojisi invert mikroskop yardımıyla incelenir ve sonrasında kristal viyole boyası çözündürülerek absorbans ölçümü gerçekleştirilir.

Bu yöntemde hücreler, 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiş ve inkübasyon sonrasında 24 saat boyunca MTT deneyi sonucunda belirlenen IC_{50} değerleri kullanılarak kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak CN, 5-FU ve CN+5-FU şeklinde 24 saat boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, hücreler PBS ile yıkanmış ve kristal viyole (% 0.5 w/v) çözeltisi ile boyanmıştır. Boyama işlemi sonrasında, kuyucuklar PBS ile yıkanarak kristal viyolenin ortamdan

uzaklaştırılmasından sonra, önce invert mikroskop (Olympus IX53) yardımıyla hücre görüntüleri elde edilmiş, sonrasında hücreler kuyucuk başına 200 µL %33 asetik asit çözeltisi ile çözülerek 570 nm’de mikropilaka okuyucusunda absorbans ölçümleri yapılmıştır (Feoktistova vd. 2016).

3.2.8 Koloni Oluşumu Deneyi

Koloni oluşumu deneyi, *C. nebularis* özütünün hücre proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi için gerçekleştirilmiştir. Koloni oluşumu deneyi, tek bir hücrenin bir koloni halinde büyüebilme yeteneğine dayanan bir *in vitro* hücre hayatta kalma deneyidir (Franken vd. 2006). Bu çalışmada hücre kolonisi en az 50 hücreden oluşacak şekilde tanımlanmaktadır. Metot esas olarak popülasyondaki her hücreyi sınırsız bölünme geçirme kabiliyeti açısından test etmektedir. Klonojenik tahlil sonucunda, uygulanan örneğin hücrelerin çoğalma ve koloni oluşturma yeteneği üzerine olan etkileri belirlenmektedir.

Bu çalışma için HT-29 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 1000 hücre/kuyucuk olacak şekilde düşük yoğunlukta ekilmiştir. Hücreler kültür ortamına yapıştıktan sonra, 24 saat boyunca kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak CN, 5-FU ve CN+5-FU ile muamele edilmiştir, sonrasında ortam, ilaçsız besi yerleri ile değiştirilmiştir. Daha sonra hücreler koloni oluşumunu sağlamak için 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. 14. günün sonunda besi yerleri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında oluşan koloniler soğuk saf metanol ile fiks edilmiş ve % 0.5 kristal viyole çözeltisi ile boyandıktan sonra fotoğraflanmıştır. Her bir test grubundaki 50’den fazla hücre içeren koloniler mikroskop altında sayılmış ve sonuçlar kontrol grubuna göre normalize edilerek kuyucuk başına koloni oluşturan hücre sayısı olarak ifade edilmiştir.

3.2.9 Hücre göçü analizleri

C. nebularis özütü ile muamele edilen kanser hücre hatlarının hücre göçü analizleri *in vitro* ortamda hücre göçü analizi ile gerçekleştirilmiştir. HT-29 hücreleri, 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 5×10^5 hücre olacak şekilde yüksek yoğunlukta ekilmiştir. Bu yöntemle birleşik hücre tabakasında yapay yeni bir boşluk oluşturulmasının ardından, yeni oluşturulan hücre boşluğunun kenarı üzerindeki hücrelerin, yeni hücre-hücre kontakları tekrar kuruluncaya kadar boşluğu kapatmak için açıklığa doğru hareketi incelenmiştir. Konfluent hale gelmiş hücreler, düz ve hücre-siz bir çizgi oluşturulması için steril p20 pipet ucu ile kazınmıştır. Kazıntının oluşturulmasından sonra, ortamda oluşan kalıntıların uzaklaştırılması için hücreler PBS ile iyice yıkanıp örnek veya kontrol içeren hücre besisi yeri ile muamele edilmiştir. Oluşturulan boşlukların referans fotoğrafları çekilerek (0. saat) hücreler yeniden inkübasyona alınmış, sonrasında 24 saat sonra yeniden fotoğraflanarak hücre göçü analiz edilmiştir. Çizginin iki kenarı arasındaki mesafeler belirlenen referans noktalarında ölçülerek ImageJ (NIH, ABD) yazılımı yardımıyla analiz edilmiştir (Liang vd. 2007).

3.2.10 Hücre döngüsü analizi

C. nebularis özütünün HT-29 hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan güçlü inhibe edici etkisinin belirlenmesinden sonra, bu etkinin hücre döngüsünün hangi aşamasında etkili olduğu akış sitometrisi analizi ile belirlenmiştir. Bu analiz için hücreler 6 kuyucuklu hücre plakalarına kuyucuk başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Sonrasında hücreler örnek varlığında ve yokluğunda 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler PBS ile yıkanmış, tripsin yardımıyla kültür ortamından toplanmış ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tripsin ortamdan uzaklaştırılarak hücre peleti elde edilmiştir. Elde edilen hücre peletleri, %70'lik soğuk etanol ile 30 dakika boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de fiksasyon edilmiştir. Fiksasyon işleminin tamamlanmasından sonra, etanolün ortamdan uzaklaştırılması için hücreler santrifüj edilmiş, süpernatant ortamdan uzaklaştırılmış, peletler 1x PBS ile muamele edilip santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Daha sonra yalnızca DNA'nın boyandığından emin olmak için hücreler, RNaz (100 $\mu\text{g/mL}$) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında

hücreler, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda propidyum iyodür (40 µg/mL) ile boyanıp, farklı hücre döngüsü fazlarının dağılımı akış sitometri cihazı (Acea NovoCyte) kullanılarak analiz edilmiştir (Krishan 1975).

3.2.11 Gen ifade analizleri

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların potansiyel moleküler etki mekanizmalarının araştırılması için gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir. HT-29 hücreleri üzerinde *Clitocybe nebularis* özütünün oluşturduğu etkinin, hücre döngüsü aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Akış sitometrisi analizleri sonucunda elde edilen bulguları doğrulamak için, mRNA seviyesinde hücre döngüsü ile ilişkili genlerin (Siklin A2, Cdk1, Cdk2, p21, p27, p53) ifade seviyelerindeki değişiklikler kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile araştırılmıştır.

Gen ifade analizleri için öncelikle RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için HT-29 hücreleri, 6 kuyucuklu hücre plakalarına kuyucuk başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Sonrasında hücreler 24 saat boyunca kontrol grubu ve CN, 5-FU ve CN+5-FU ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler PBS ile yıkanmış, tripsin yardımıyla kültür ortamından toplanmış ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tripsin ortamdan uzaklaştırılarak hücre peleti elde edilmiştir. Hücre kültüründen total RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti kullanılarak üreticinin protokollerine uygun olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (High Pure RNA Isolation Kit, Roche). İzole edilen RNA örneklerinin saflık ve miktar ölçümleri gerçekleştirildikten sonra (NanoDrop, Thermo), cDNA sentezi için RNA miktarları 200 ng/µl'ye eşitlenmiştir. Sonrasında her bir örnek için 500 ng total RNA olacak şekilde, cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-Thermo) kullanılarak üreticinin protokollerine göre cDNA (ing. complementary strand of DNA) edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 cDNA Sentez protokolü

RNA	2.5 µl
Mix 1	1µl Random hekzamer primer + 8.5 µl dH ₂ O
65°C 5 Dakika	
5X Reaksiyon Buffer	4 µl
RiboLock RNase İnhibitör	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid Revers Transkriptaz	1 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi 20 µl	
1. Basamak 25°C 5 Dakika	
2. Basamak 42°C 60 Dakika	
3. Basamak 70°C 5 Dakika	

Gen ifade analizleri için primerler ticari olarak (Sentebiolab Biyoteknoloji, Ankara) temin edilmiştir (Çizelge 3.4). Sonrasında cDNA'lar, real time (gerçek zamanlı) PCR ile spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. qRT-PCR için Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master kullanılmıştır. qRT-PCR reaksiyonu üreticinin protokollerine göre hazırlanmıştır (Çizelge 3.5-6). mRNA ifade ölçümü, $\Delta\Delta C_t$ (eşik döngüsü) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve gen ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) transkript seviyelerine göre normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001).

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan primerlerin listesi

GAPDH F	5'-GAA ATC CCA TCA CCA TCT TCC AGG-3'
GAPDH R	5'-GAG CCC CAG CCT TCT CCA TG-3'
Siklin A2 F	5'-AGA CCT ACC TCA AAG CAC CAC AG-3'
Siklin A2 R	5'-GGT TGA GGA GAG AAA CAC CAT GA-3'
Cdk1 F	5'-TGG ATC TGA AGA AAT ACT TGG ATT CTA-3'
Cdk1 R	5'-CAA TCC CCT GTA GGA TTT GG-3'
Cdk2 F	5'-TTC TCA TCG GGT CCT CCA CC-3'
Cdk2 R	5'-TCG GTA CCA CAG GGT CAC CA-3'
p53 F	5'-CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT AGC-3'
p53 R	5'-ACA GGC ACA AAC ACG CAC CTC AAA-3'
p21 F	5'-CGA TGG AAC TTC GAC TTT GTC A-3'
p21 R	5'-GCA CAA GGG TAC AAG ACA GTG-3'
p27 F	5'-GGT TAG CGG AGC AAT GCG-3'
p27 R	5'-TCC ACA GAA CCG GCA TTT G-3'

Çizelge 3.5 qRT-PCR reaksiyon karışımı

cDNA	2 µl
Primer (F) 10mM	1 µl
Primer (R) 10mM	1 µl
dH ₂ O	1 µl
SYBR Green Master Mix	5 µl
Toplam Hacim 10 µl	

Çizelge 3.6 qRT-PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık/Süre/Döngü
Ön Denatürasyon	95°C / 5 dk / 1
Denatürasyon	95°C / 10 sn / 40
Yapışma	52°C - 56°C / 10 sn / 40
Uzama	72°C / 30 dk / 40
Erime eğrisi	95°C / 5 sn / 1
	65°C / 1 dk / 1
Bekleme	40°C / 10 sn / 1

3.2.12 İstatistiksel analizler

Tez çalışması kapsamında istatistiksel analiz ve veri sunumu için SPSS 17.0 ve GraphPad Prism 8 yazılımları kullanılmıştır. Farklı gruplar arasındaki karşılaştırmalar Student's t-tests ve One-way ANOVA kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, tekrarlanan üç deneyin ortalama $\pm$ standart sapması şeklinde ifade edilmiştir. $P < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

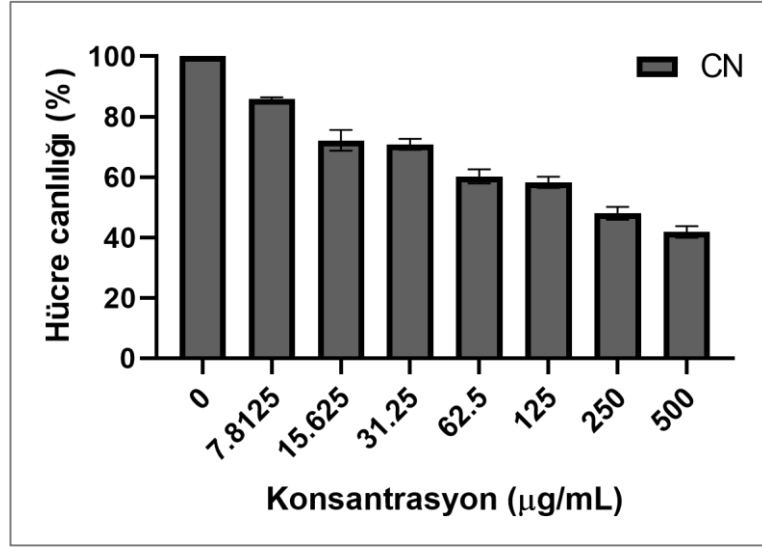
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Sitotoksik etkinin araştırılması

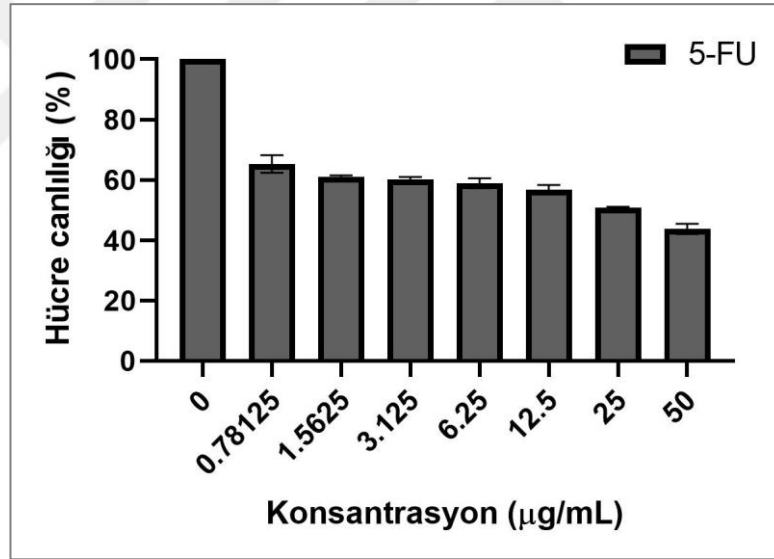
Hücre temelli toksisite çalışmaları, ilaç olması muhtemel ya da sitotoksik etkisi bilinmeyen bir molekülün davranışı hakkında temel bilgiler verdiği için kanser araştırmalarında sıkça tercih edilen bir yöntemdir (Riss ve Moravec 2004). Sitotoksisite, incelenen molekülün konsantrasyonuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücreler üzerinde değişik derecelerde etkiler oluşturan bir süreçtir. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalması sonucunda, apoptoz sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi vd. 2009).

C. nebularis özütünün (CN) sitotoksik etkisi 7 farklı doz kullanılarak (7.81-500 µg/mL) HT-29, Caco-2 ve HEK-293 hücre hatları üzerinde 24 saat boyunca MTT yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Metastatik kolon kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajan 5-Flourourasil, çalışma sırasında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Özütün hücre canlılığı üzerine olan etkisi, her bir hücre hattı için oluşturulan doz-yanıt eğrileri kullanılarak hesaplanmış ve IC₅₀ değeri olarak ifade edilmiştir.

24 saatlik uygulama sonunda HT-29 hücreleri üzerinde CN özütü için 243±17 µg/ml IC₅₀ değeri elde edilmiş ve kullanılan maksimum özüt konsantrasyonunda (500 µg/mL) hücre canlılığını yaklaşık %60 oranında azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.1). CN özütü, 5-FU ile kıyaslandığında, düşük özüt konsantrasyonları dışında oldukça etkili bir sitotoksik aktivite göstererek, HT-29 hücrelerinin çoğalmasını inhibe edici bir etki göstermiştir (Şekil 4.2) (P<0.01). 24 saatlik uygulama sonunda 5-FU içinse HT-29 hücreleri üzerinde 38±1 µg/ml IC₅₀ değeri hesaplanmıştır (P<0.001).



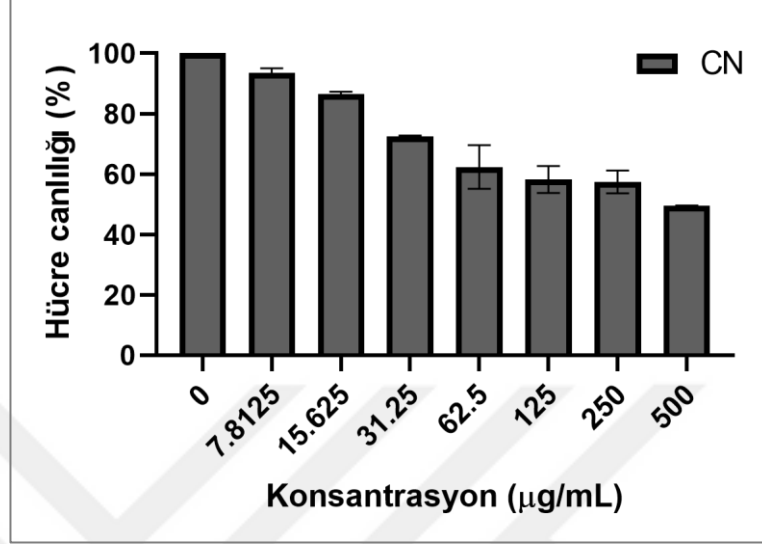
Şekil 4.1 CN özütünün HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi ($P<0.01$)



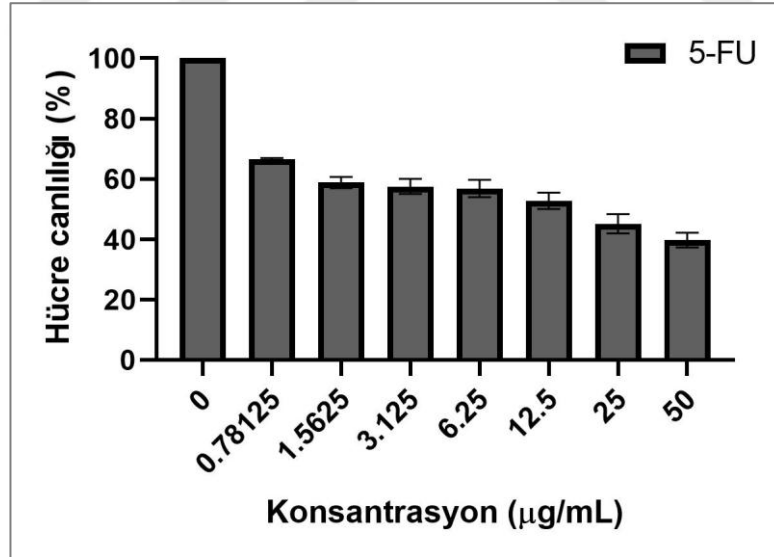
Şekil 4.2 5-FU'nun HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi ($P<0.001$)

CN özütünün HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesinden sonra, kolon kanseri heterojenitesini yansıtabilmek amacıyla aynı konsantrasyon aralığı kullanılarak CN özütünün Caco-2 kolon kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi de araştırılmıştır. 24 saatlik uygulama sonucunda Caco-2 hücreleri üzerinde CN özütü için 298 ± 44 µg/ml IC_{50} değeri elde edilmiş ve kullanılan maksimum konsantrasyonda hücre canlılığını ortalama %50 oranında azalttığı bulunmuştur ($P<0.005$) (Şekil 4.3).

Sonuç olarak CN özütü hem HT-29 hem de Caco-2 kolon kanseri hücreleri üzerinde etkili bir sitotoksik aktivite profili sergileyerek hücre canlılığını azaltmıştır.



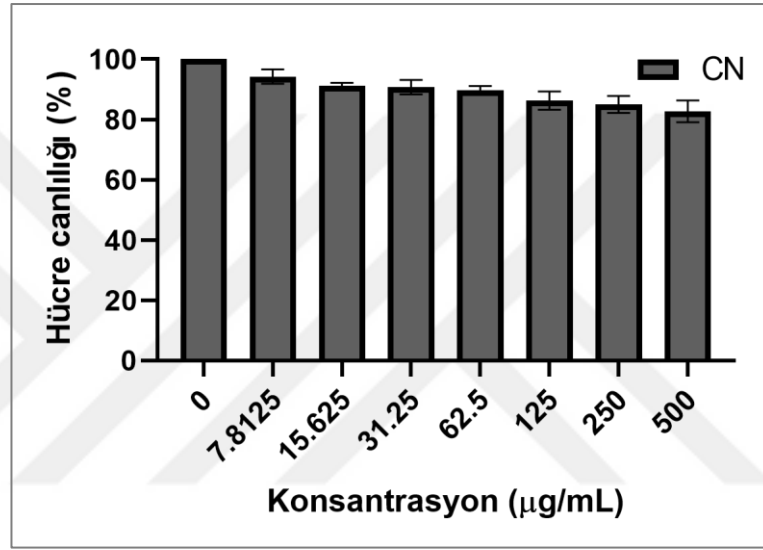
Şekil 4.3 CN özütünün Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi ($P<0.001$)



Şekil 4.4 5-FU'nun Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi ($P<0.001$)

CN özütünün kolon kanseri hücreleri üzerinde sergilediği güçlü sitotoksik aktivitenin belirlenmesinden sonra, normal bir hücre hattı olan HEK-293 böbrek epitel hücreleri kullanılarak CN özütünün sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. HT-29 ve

Caco-2 hücre hatlarında kullanılan konsantrasyon aralığı kullanılarak gerçekleştirilen hücre canlılığı çalışmaları sonucunda, CN özütünün normal hücreler üzerinde önemli bir sitotoksik etkisinin olmadığı bulunmuştur ($P<0.01$) (Şekil 4.5). CN özütünün HEK-293 hücreleri üzerinde uygulandığı konsantrasyonlarda, hiçbir konsantrasyon için hücre canlılığında %50 azalma gözlenemediği için IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Pozitif kontroller de dahil olmak üzere hesaplanan tüm IC_{50} değerleri çizelge 4.1’de paylaşılmıştır.



Şekil 4.5 CN özütünün HEK-293 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi ($P<0.01$)

Çizelge 4.1 CN ve 5-FU için hesaplanan IC_{50} konsantrasyonları

IC_{50} (µg/ml)			
HT-29		Caco-2	
CN	5-FU	CN	5-FU
243±17	38±1	298±44	21±4

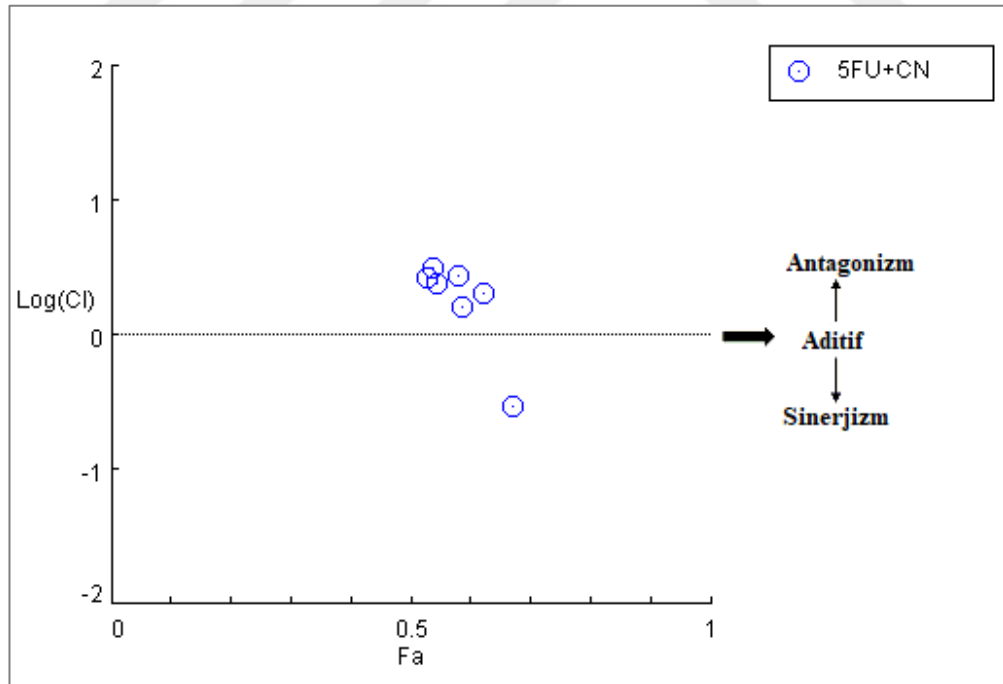
4.2 İlaç kombinasyonu etkinliğinin değerlendirilmesi

CN özütünün HT-29 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif aktivitesinin belirlenmesinden sonra, 5-FU ile birlikte potansiyel kullanımını belirlemek için, Chou ve Talalay yöntemi kullanılarak, CN özütü ve 5-FU arasındaki ilaç-ilâç etkileşimleri araştırılmıştır. CN özütü ve 5-FU'nun birlikte kullanımının, anti-tümör etkinliklerini arttırıp arttırmadığını belirlemek için oluşturulan kombinasyonların etkinlikleri HT-29 hücreleri üzerinde araştırılmıştır. CN özütü ve 5-FU için HT-29 hücreleri üzerindeki IC_{50} değerlerinin hesaplanmasından sonra, 7 farklı CN + 5-FU kombinasyonu oluşturularak hücre canlılığı deneyleri bu kombinasyonlar kullanılarak tekrarlanmıştır. Olası sinerjistik etkinin araştırılması için kullanılan CN + 5-FU kombinasyonları çizelge 4.2'de paylaşılmıştır. Kombinasyon çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar, CompuSyn programı yardımı ile analiz edilerek, her bir kombinasyon uygulaması için kombinasyon indeksi (CI) değerleri hesaplanmıştır. Analiz sonucunda hesaplanan CI değerlerine göre, ilaç/özüt kombinasyonlarının gösterdikleri etki sinerjistik, antagonist veya aditif olarak belirlenmiştir.

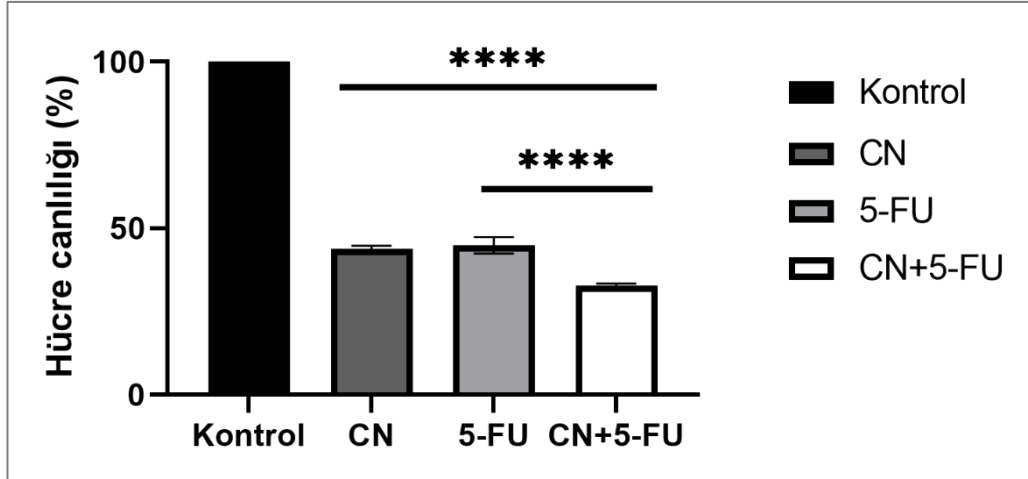
7 farklı CN+5-FU kombinasyonu kullanılarak tekrarlanan hücre canlılığı deneyleri sonucunda yalnızca 1:1 kombinasyon oranında (IC_{50} - IC_{50}) anlamlı bir sinerjistik etki gözlenmiştir (Şekil 4.6). 24 saat boyunca tek başına CN veya 5-FU ile muamele edilen HT-29 hücrelerinin canlılık oranı ile karşılaştırıldığında, CN ile 5-FU kombinasyonu HT-29 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edici etkiyi önemli ölçüde arttırmıştır. Söz konusu kombinasyon birlikte uygulandığında, tekil kullanımlara göre daha etkili ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmiştir ($P<0.0001$). Sinerjist bu kombinasyon için kombinasyon indeksi $CI= 0.21867$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). CN özütü ve 5-FU tek başlarına kullanıldığında hücre canlılığı sırasıyla %42 ve %47 olarak bulunmuşken kombinasyon uygulaması sonucunda hücre canlılığı %30'a kadar düşmüştür (Şekil 4.7). Kombinasyon uygulaması, tek başına 5-FU uygulanması ile kıyaslandığında elde edilen sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.0001$).

Çizelge 4.2 Kombinasyon çalışmasından elde edilen CI değerleri

HT-29		
CN + 5-FU		CI
1	1	0.21867
1	2	2.96587
2	1	1.50970
1	3	1.94315
3	1	2.56553
1	4	2.85315
4	1	2.00585

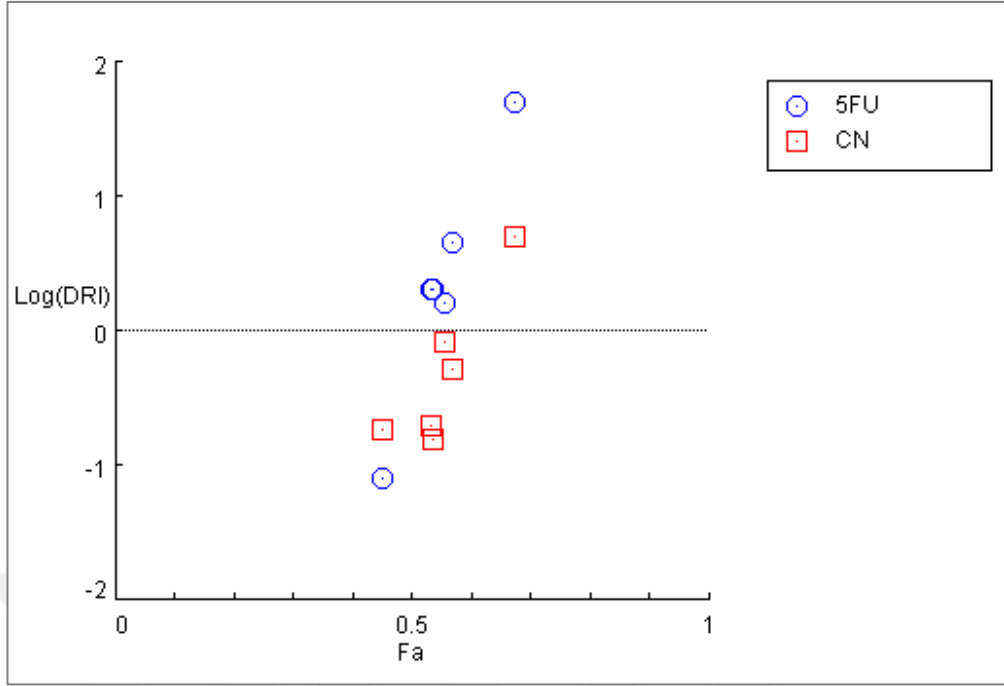


Şekil 4.6 CN + 5-FU kombinasyonu için kombinasyon indeksi (CI) grafiği



Şekil 4.7 CN + 5-FU kombinasyonunun HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi (**** P<0.0001)

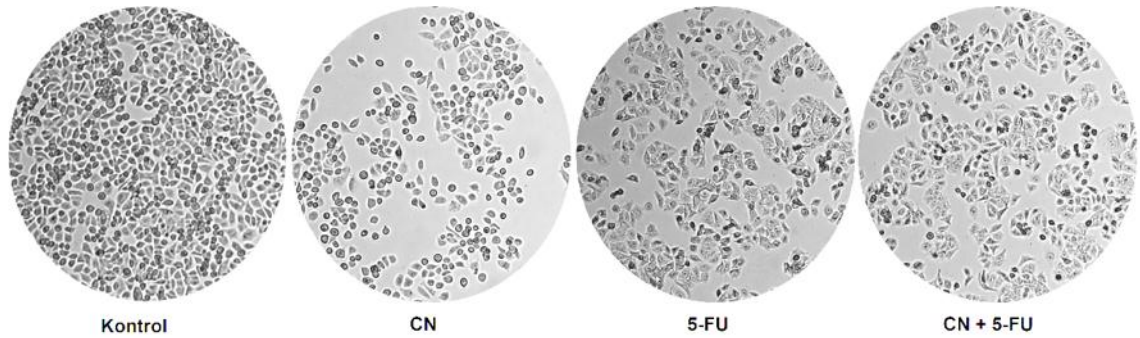
Sinerjistik kombinasyon uygulaması için ayrıca CompuSyn programı ile doz azaltma indeksi (DRI) hesaplanmıştır. DRI, bir kombinasyon ortamında aynı inhibe edici etkiyi elde etmek için belirlenen doz azaltımını temsil etmektedir. DRI >1 değeri, hedeflenen etki seviyesi için kombinasyon bileşenlerinde doz azaltımı yapılabileceğinin göstergesidir. Sinerjistik CN+5-FU kombinasyon uygulaması için doz azaltma indeksi de DRI> 1 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8). Böylece CN özütü ile 5-FU'nun birlikte uygulanmasıyla, aynı inhibe edici etkiyi elde etmek için (%50 inhibisyonu), kombinasyonun bileşenlerinden herhangi birinin kullanım dozunu azaltmak mümkün olabilmektedir, böylece daha az doz ile daha etkili sonuçlar alınabilmesi mümkün olabilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen diğer analizlerde CN özütü ve 5-FU'nun tekil kullanımlarının yanı sıra kombine kullanımlarının etkileri de araştırılmıştır.



Şekil 4.8 HT-29 hücrelerinde CN + 5-FU kombinasyonu için doz azaltım grafiği

4.3 Morfolojik analizler

CN özütünün, HT-29 kolon kanseri hücre hatları üzerindeki morfolojik etkilerini araştırmak için, 24 saat boyunca MTT deneyi sonucu belirlenen IC_{50} değerleri kullanılarak kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak CN, 5-FU ve CN+5-FU şeklinde muamele edilmiştir. İnkübasyon sonrasında özütlerin hücre çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkileri mikroskopik olarak araştırılmıştır. Morfolojik analiz çalışmalarından elde edilen mikroskopik görüntüler şekil 4.9’da sunulmuştur.



Şekil 4.9 HT-29 hücrelerinin morfolojij analizleri (10x)

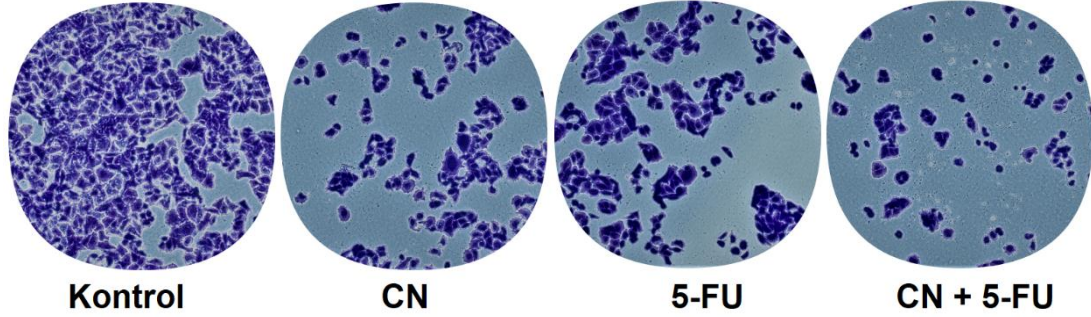
HT-29 hücreleri oldukça hızlı büyüyen ve agresif bir şekilde çoğalan kanser hücreleridir. Genel olarak hücreler birbirleri ile kontak halinde bulunur ve koloniler oluşturarak istilacı bir şekilde büyümektedir. Şekil 4.9'da gösterildiği gibi kontrol grubunda hücreler oldukça yoğun bir şekilde bulunmaktadır ve çoğalmaya devam etmektedir. 243 µg/mL IC₅₀ konsantrasyonunda uygulanan CN özütünün HT-29 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve hücre yoğunluğunu etkili bir şekilde azalttığı gözlenmiştir. CN özütü uygulaması sonrasında hücrelerin küçüldüğü gözlenmiş olmasına rağmen morfolojik olarak önemli bir değişiklik belirlenmemiştir. Bununla beraber, CN özütü etkisiyle büyük hücre kolonilerinin oluşması engellenmiş olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak CN özütü güçlü sitotoksik etkisiyle, canlı hücre miktarında azalmaya neden olmuş, hücrelerin çoğalmasını ve koloni oluşturmalarını etkili bir şekilde engellemiştir. CN özütünden farklı olarak 5-FU ile muamele edilmiş hücrelerde hücre morfolojisi önemli ölçüde değişmiş, canlı kalan hücrelerin yoğunluklarında değişiklik gözlenmektedir. Hücre kolonileri mevcut olsa da hücrelerin canlılığını kaybetmek üzere oldukları gözlenmektedir. Kombinasyon grubunda ise tek başına 5-FU'ya kıyasla hücre kolonilerinde azalma ve ölmekte olan hücre miktarlarında artış gözlenmektedir. Sonuç olarak CN özütü 5-FU ile hücrelere birlikte uygulandıklarında hem hücre yoğunluğunda hem de hücre canlılığında 5-FU'nun tekil kullanımına göre pozitif bir etkisi olduğu da gözlenmiştir.

4.4 Kristal viyole deneyi

CN özütünün ve 5-FU ile kombinasyon uygulamasının HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini araştırmak için ayrıca kristal viyole deneyi yapılmıştır. Kristal viyole boyaması, hücre kültürü plakalarına yapışan canlı hücrelerin boyanması esasına dayanmaktadır. Deney sırasında hücre ölümünün gerçekleşmesi ile hücreler yapıştıkları hücre plakasından ayrılırlar ve yıkama işlemi sonucunda ortamdan uzaklaştırılırlar. Yapışık kalan canlı hücreler ise kristal viyole ile boyanırlar.

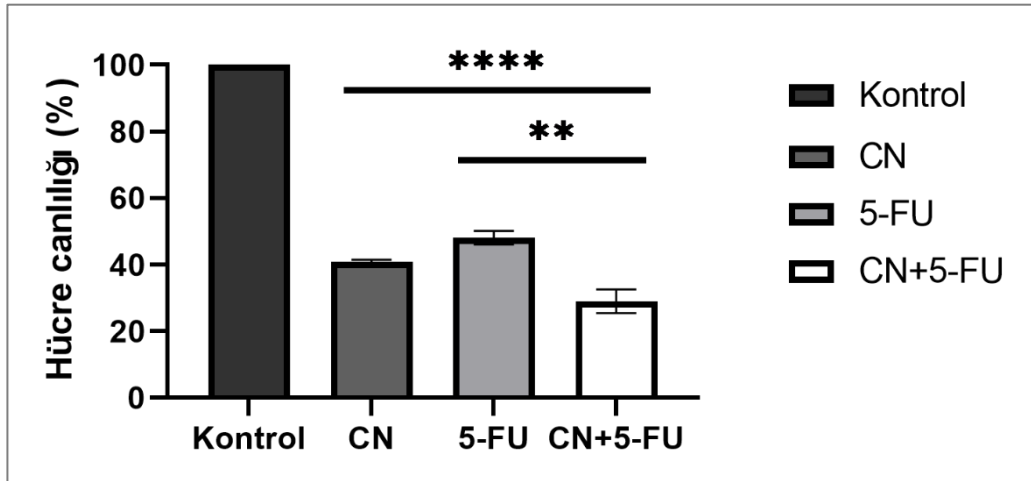
Uyguladığımız bu yöntemde hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve inkübasyon sonrasında 24 saat boyunca MTT deneyi sonucu belirlenen IC₅₀ değerleri kullanılarak

kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak CN, 5-FU ve CN+5-FU şeklinde muamele edilmiştir.



Şekil 4.10 HT-29 hücrelerinin kristal viyole ile boyanması (10x)

Şekil 4.10’da görüldüğü üzere, kültür ortamında bulunan canlı hücreler kristal viyole tarafından boyanarak fotoğraflanmıştır. CN özütü HT-29 hücrelerinin proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe etmiştir ve kontrol grubu ile kıyaslandığında ortamdaki canlı hücre sayısında oldukça yüksek miktarda azalma gözlenmiştir.



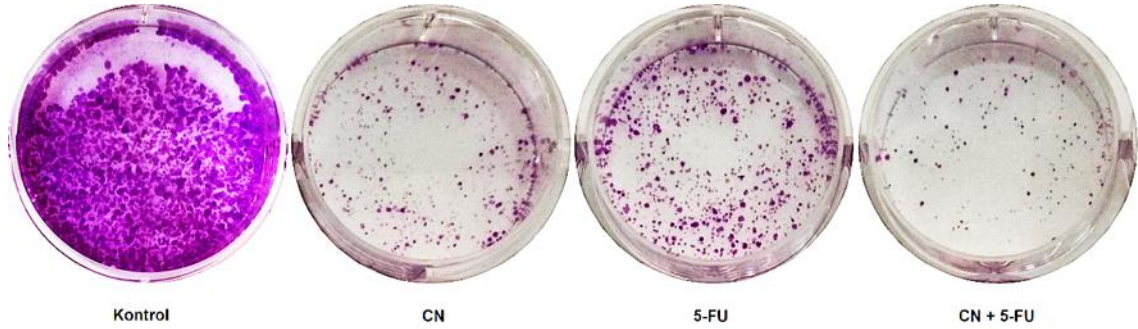
Şekil 4.11 Kristal viyole boyaması sonuçları (** P<0.01, **** P<0.0001)

243 µg/ml IC₅₀ konsantrasyonu ile muamele edilen HT-29 hücrelerinin canlılığının 24 saatin sonunda %40’a kadar düştüğü gözlenmiştir (P<0.0001). CN özütü hücelere 5-FU ile birlikte uygulandığında, 5-FU’nun tekil uygulanmasına göre daha etkili sonuç

elde edilmiştir ve kültür ortamında kristal viyole tarafından boyanabilen canlı hücre sayısında azalmaya yol açmıştır ve hücre canlılığı %29'a kadar gerilemiştir (Şekil 4.11). Kombinasyon ile gözlemlenen etki, 5-FU ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında gözlenen azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($P < 0.01$). Sonuç olarak CN özütünün ve 5-FU ile kombinasyonunun HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerinde olan inhibitör etkisi MTT yöntemine ek olarak kristal viyole boyaması ile gösterilmiştir.

4.5 Koloni oluşumu deneyi

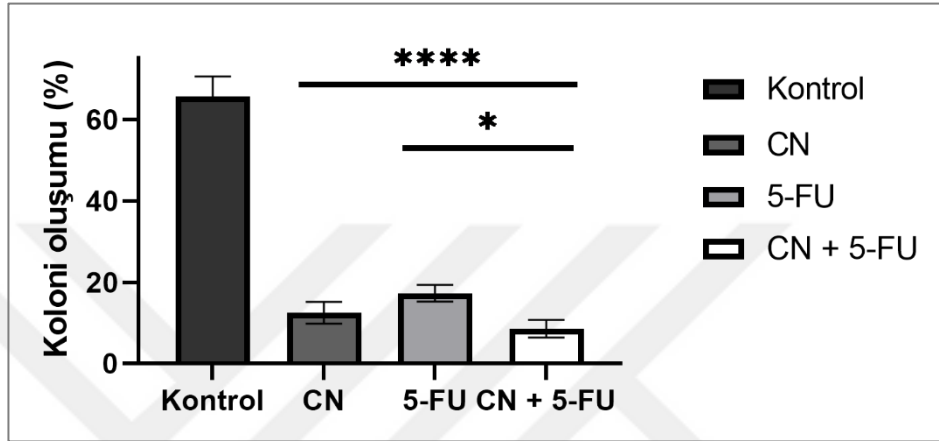
C. nebularis özütünün ve 5-FU ile kombinasyonunun HT-29 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki anti-proliferatif etkisini ileri analizlerle doğrulamak için koloni oluşumu deneyi gerçekleştirilmiştir. Koloni oluşumu deneyi, tek bir hücrenin bir koloni halinde büyüebilme yeteneğine dayanan bir *in vitro* hücre hayatta kalma deneyidir. Klonojenik tahlil sonucunda, monoterapi veya kombinasyonun HT-29 hücrelerinin çoğalma ve koloni oluşturma yeteneği üzerine olan etkileri belirlenmiştir.



Şekil 4.12 Koloni oluşumu deneyi sonuçları (10x inverted)

Şekil 4.12'de gösterildiği gibi, CN özütü HT-29 hücrelerinin çoğalma ve koloni oluşturma yeteneğini oldukça etkili bir şekilde engellemiştir. Ortamda canlı kalarak çoğalabilen hücrelerin de büyük koloniler oluşturmadağı görülmektedir. Ayrıca CN özütü kontrol grubuna kıyasla HT-29 hücrelerinin koloni oluşturmalarını engellemesinin yanı sıra, 5-FU ile kombinasyonu sonucunda tekil uygulamalara kıyasla oluşan koloni

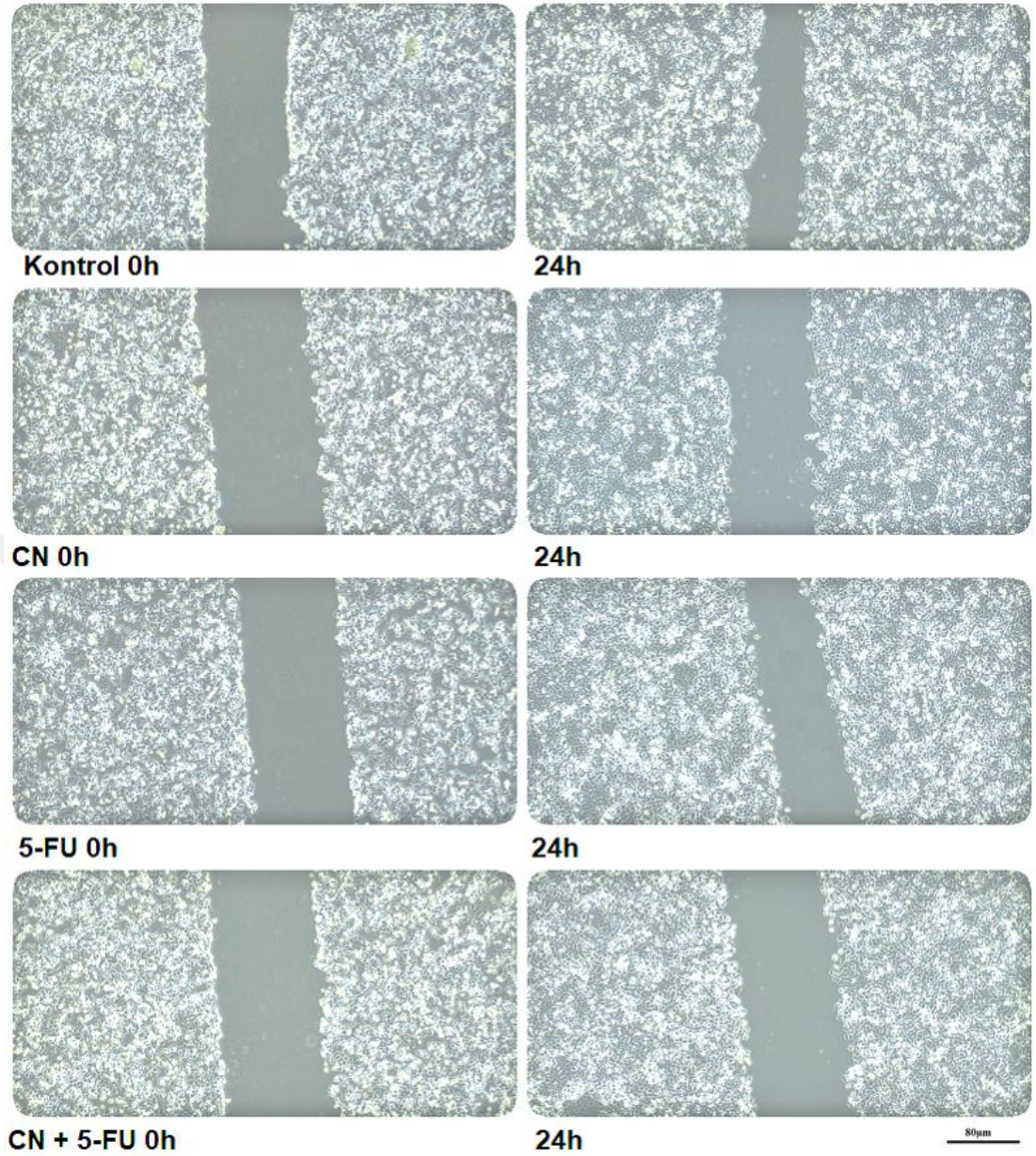
sayısını önemli ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.13). Tek başına 5-FU uygulanmış hücreler ile kıyaslandığında kombinasyon uygulaması ile koloni sayısının yanı sıra, oluşabilen kolonilerin büyüklüğünün de azaldığı belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar, CN ve 5-FU'nun önemli bir anti-tümör sinerjistik etkisi olduğunu ve HT-29 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir.



Şekil 4.13 Koloni oluşumu deneyi sonuçları (* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$)

4.6 Hücre göçü analizleri

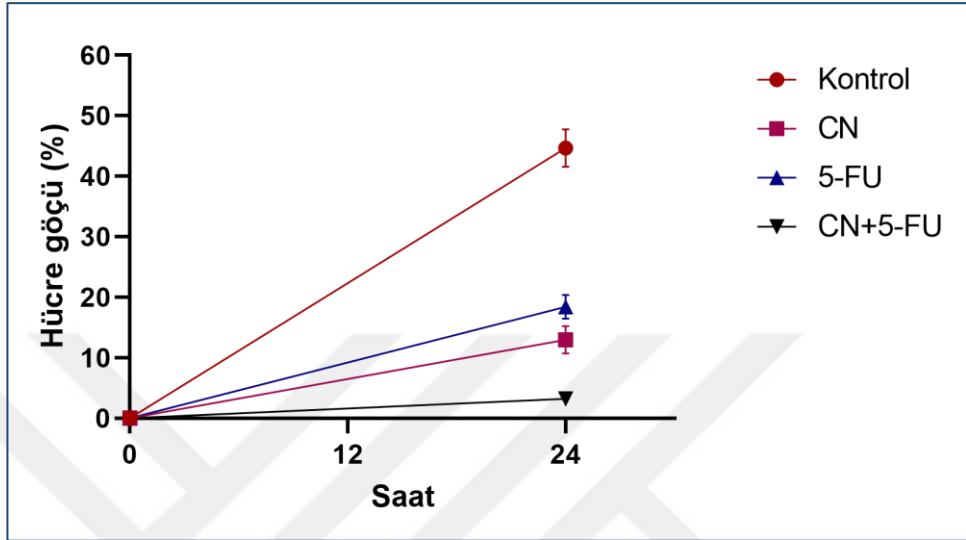
CN özütünün ve 5-FU kombinasyonunun HT-29 hücrelerinin göçü ve istilası üzerinde inhibe edici bir etkisi olup olmadığını araştırmak için *in vitro* yara iyileştirme deneyleri yapılmıştır. Hücre göçü birçok karmaşık fizyolojik ve patolojik süreçte merkezi bir rol oynamaktadır. Hücre göçü analizi, hücre göçünü *in vitro* olarak incelemek için oldukça etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde, birleşik hücre tabakasında yapay bir boşluk oluşturulmasıyla, oluşturulan boşluğun kenarındaki hücrelerin, yeni hücre-hücre temasları kuruluncaya kadar göç etmesinin gözlemlenmesine dayanmaktadır (Liang vd. 2007). CN özütünün bu göçe olası inhibe edici etkisinin araştırılması için, özüt ile muamele edilen HT-29 hücrelerinin, hücre göçü analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.14 Hücre göçü analiz sonuçları (4x)

Şekil 4.14’de gösterildiği gibi, CN ve 5-FU tek başına veya kombinasyon halinde uygulanmasından sonra HT-29 hücrelerinde yara onarımının kontrol gruplarına kıyasla geciktirildiği görülmektedir. 24 saatin sonunda kontrol grubunda bulunan hücrelerin oluşturulan yapay boşluğun yaklaşık %44’ünü kapattığı gözlemlenmiştir. Hücrelerin CN özütü ve 5-FU’ya tek başına 24 saat maruz kalmasından sonra onarılan alan yüzdesiyse sırasıyla %12 ve %18 olarak hesaplanmıştır ($P < 0.001$). Bununla beraber CN ve 5-FU birlikte uygulandığında ise hücre göçü etkili bir şekilde inhibe edilmiş ve

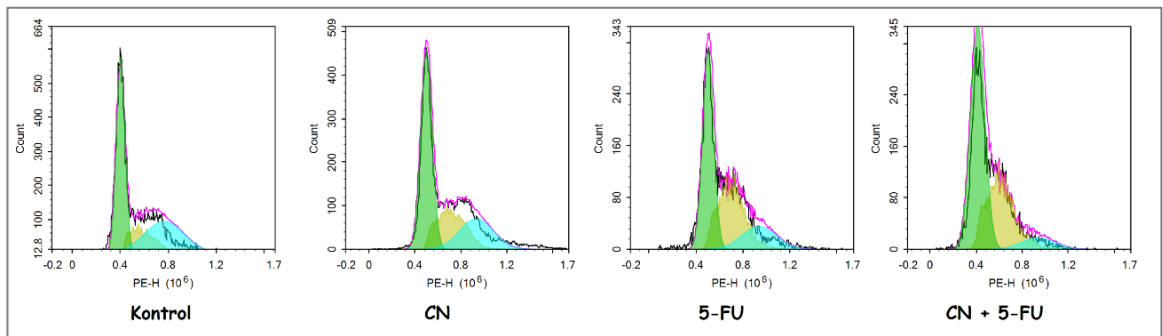
onarılan alan %3.2'ye kadar düşmüştür (Şekil 4.15). Sonuç olarak CN'nin 5-FU ile kombinasyonu, HT-29 hücrelerinin hareketliliğini sinerjistik olarak inhibe etmiştir ($P<0.001$).



Şekil 4.15 Hücre göçü analiz sonuçları

4.7 Hücre döngüsü analizi

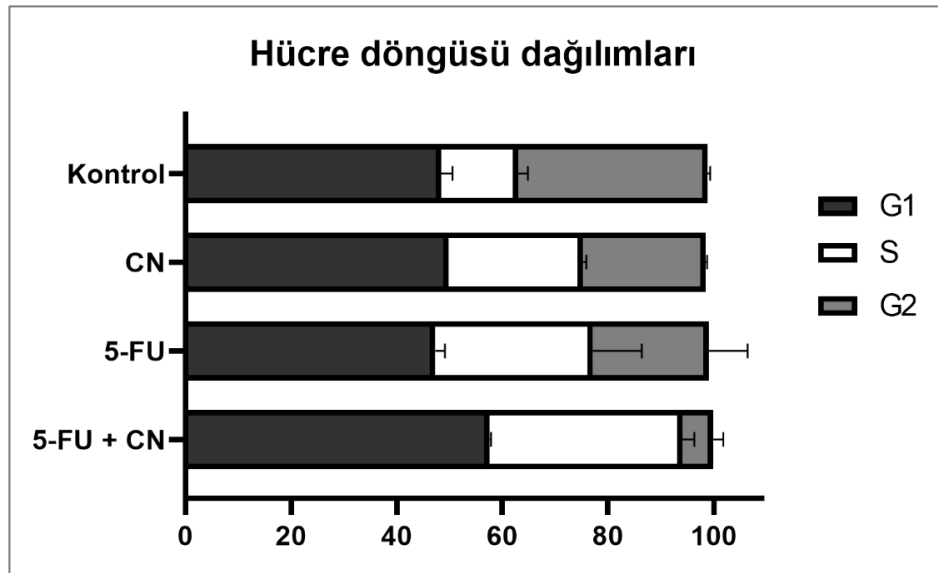
CN ve 5-FU'nun tek başına ya da birlikte uygulanmasının, HT-29 hücrelerinin hücre döngüsü üzerindeki etkilerini araştırmak için akış sitometrisi ile farklı fazlardaki hücrelerin dağılımı analiz edilmiştir. Akış sitometrisi analizi sonucunda elde edilen farklı hücre döngüsü dağılımları şekil 4.16'da paylaşılmıştır.



Şekil 4.16 Akış sitometrisi analizi sonucunda elde edilen hücre döngüsü dağılımları

24 saatlik uygulama sonrasında hücrelerin analizi gerçekleştirildiğinde, kontrol grubundaki hücrelerin dağılımları G1 (%48), S (%15) ve G2 (%36) olarak bulunmuştur. CN özütü ve 5-FU uygulanmış hücreler kontrol grubu ile kıyaslandığında, G1 fazında bulunan hücre miktarlarında herhangi önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (%49 ve %47). Bununla beraber, CN ve 5-FU uygulaması ile HT-29 hücrelerinde S fazında bulunan hücre miktarında dikkat çekici bir artış gözlemlenmiştir. CN özütü uygulanmış hücrelerde S fazındaki hücre miktarı %15'den %25'e, 5-FU uygulanmış hücrelerde ise %29'a yükselmiştir ($P<0.05$). Bununla bağlantılı olarak G2 fazına geçebilen hücre miktarlarında azalma gerçekleşmiş ve sırasıyla %23 ve %21 olarak bulunmuştur.

Her iki ajan hücrelere birlikte uygulandığıdaysa, sinerjik bir etki göstermiş ve S fazında bulunan hücre miktarında daha büyük bir artışa yol açmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, kombinasyon uygulaması ile S fazındaki hücre miktarı %15'den %36'ya yükselmiş ve G2 fazına geçebilen hücre miktarıysa %6'ya kadar gerilemiştir ($P<0.05$). Sonuç olarak CN özütü ve 5-FU hücrelerin S fazında tutulmasını sağlamış, birlikte uygulandıklarında ise bu etkide önemli bir artış gözlemlenmiştir. Böylece CN özütü ile 5-FU'nun kombinasyonu, HT-29 hücrelerinde S fazında indüklenen hücre döngüsü durdurulmasına yol açmıştır (Şekil 4.17).



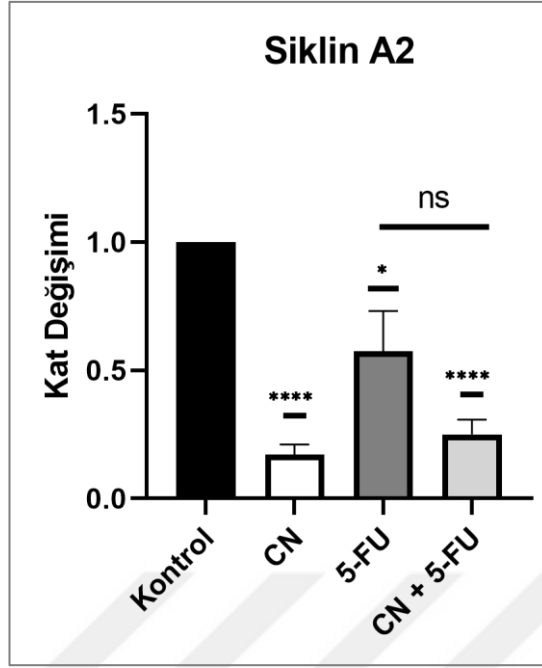
Şekil 4.17 Akış sitometrisi analizi sonucunda elde edilen hücre döngüsü dağılımları

4.8 Gen ifade analizleri

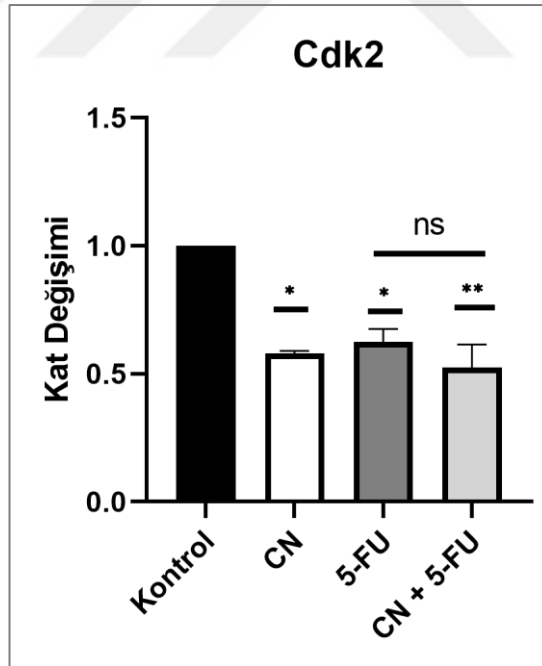
Akış sitometresi analizlerinden elde edilen sonuçlar, CN ve 5-FU'nun HT-29 hücrelerinin S fazında tutulmasını indüklediğini göstermiştir. Bu nedenle, S fazında indüklenen hücre döngüsü durmasının moleküler mekanizmasının anlaşılabilmesi için, hücre döngüsünün ilerlemesi ve S fazının düzenlenmesinden sorumlu genlerin (Siklin A2, Cdk1, Cdk2, p53, p21, p27) mRNA seviyelerindeki değişiklikler qRT-PCR metodu ile analiz edilmiştir.

HT-29 hücrelerinde 24 saatlik CN ve 5-FU uygulaması sonrasında şekil 4.18-19'da gösterildiği gibi, siklin A2 ve Cdk2 gen ifadeleri aşağı regüle edilmiştir. CN özütü uygulanmış hücrelerde siklin A2 ve Cdk2 mRNA seviyeleri sırasıyla 4 kat ve 2 kat azalırken, 5-FU uygulanmış hücrelerdeyse siklin A2 ve Cdk2 genlerinin ifadelerinin ikişer kat azaldığı bulunmuştur ($P<0.05$).

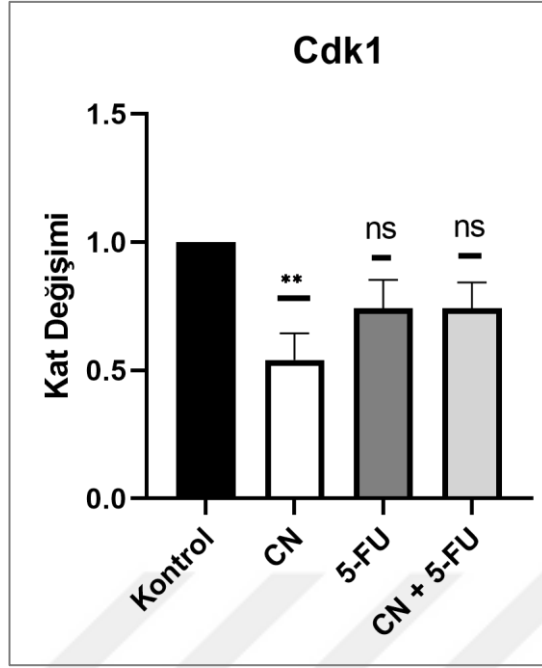
Kombinasyon uygulaması sonucundaysa, tek başına 5-FU uygulanmış hücrelere göre siklin A2 ve Cdk2 genlerinin ifade edilmesinde azalma gözlenirse de elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Benzer sonuçlar Cdk1 gen seviyelerinde de gözlenmiştir, CN uygulaması ile birlikte Cdk1 geninin ekspresyonunda 2 kat azalma gözlenmiştir. 5-FU'nun tekil ve CN ile kombine uygulanması da Cdk1 gen seviyelerini aşağı regüle etmiştir, ancak ifadedeki bu azalma kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.18 Siklin A2 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler (* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, ^{ns} anlamlı değil)

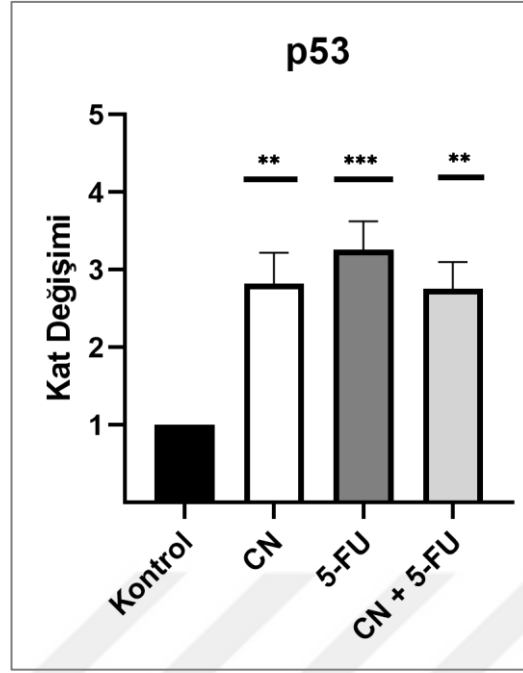


Şekil 4.19 Cdk2 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ^{ns} anlamlı değil)

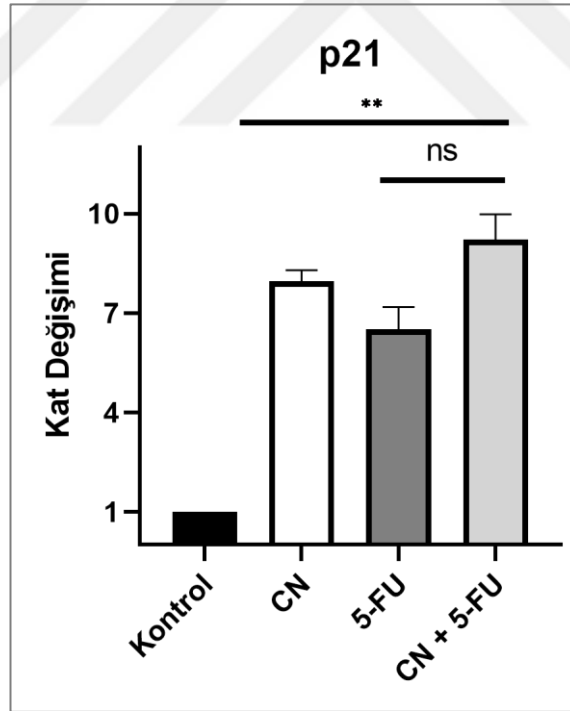


Şekil 4.20 Cdk1 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler (**P<0.01)

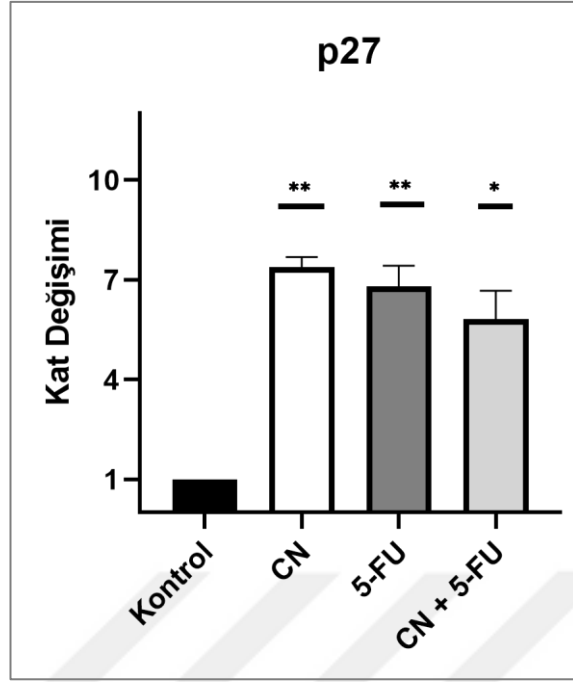
Siklin-Cdk komplekslerinin aktiviteleri, sikline bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından düzenlenmektedir. p21 ve p27 döngünün S fazında, Siklin-Cdk komplekslerinin kinaz aktivitelerinin kontrolünden sorumludur. Tümör süpressör gen p53, p21 ve p27'nin aktivasyonu aracılığıyla hücre döngüsünün ilerlemesinde düzenleyici rol oynamaktadır. Bu nedenle p21, p27 ve p53 mRNA seviyelerindeki değişiklikler de analiz edilmiştir. HT-29 hücreleri CN özütü ile muamele edildiğinde kontrol grubu ile kıyaslandığında p53 geninin ekspresyonunu yaklaşık 2.5 kat arttırmıştır (Şekil 4.21). p53 gen ifadesindeki bu artış, siklin/Cdk kompleksinin inhibitörleri olan ve S/G2 geçişini düzenleyen p21 ve p27'nin artan ekspresyonunu indüklemiştir. Artan p53 ekspresyonu sonucunda, p21 ve p27 ekspresyonlarının da CN özütü uygulanmış hücrelerde anlamlı şekilde 7'şer kat arttığı bulunmuştur (Şekil 4.22-23). Benzer sonuçlar 5-FU uygulanmış hücrelerde de gözlenmiştir, artan p53 ekspresyonu ile birlikte p21 ve p27 ifade seviyelerinde de artış gözlenmiştir (Şekil 4.21-23). Bununla beraber her iki ajanın birlikte uygulandığı hücrelerde p53 ve p27 gen ifade seviyelerinde anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir (Şekil 4.21-23). Kombinasyon uygulaması sonucunda 5-FU uygulanmış hücreler ile kıyaslandığında sadece p21 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Kombinasyon sonucunda p21 gen ifadesi artırılmış olsa da elde edilen sonuç 5-FU ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.21 p53 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler (**P<0.01, ***P<0.001)



Şekil 4.22 p21 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler (**P<0.001, ^{ns}anlamlı değil)



Şekil 4.23 p27 gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, günümüzde en önemli sağlık sorunlarından ve başlıca ölüm nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ölüm nedeni olarak hem dünya hem de ülkemizde ikinci sırada yer almaktadır. Global olarak yaklaşık her 6 ölümden birine, ülkemizde ise her 5 ölümden birine sebep olmaktadır (TÜİK 2016, WHO 2018). Kolorektal kanser, gastrointestinal sistemde en sık karşılaşılan kanser çeşididir. Ortalama %55 sağkalım oranı ile kansere bağlı ölümler arasında üçüncü sırada yer almaktadır (IACR 2018). Sebze ve meyve içermeyen gıdaların tüketimi, fiziksel aktivite/egzersiz eksikliği, tütün ürünleri, aşırı alkol tüketimi ve tehlikeli kimyasal maddelere maruz kalmak gibi çevresel ve değiştirilebilir yaşam tarzı gibi çevresel faktörler nedeniyle kolon kanseri insidansı günümüzde sürekli artmaktadır (Ait Ouakrim vd. 2015). Bununla bağlantılı olarak da 2035 yılında kolorektal kanser insidansının dünya çapında 2.5 milyon yeni vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir (Arnold vd. 2017).

Kolorektal kanserlerde birincil tedavi seçeneği cerrahi operasyondur ancak hastaların yaklaşık %33'ünde cerrahi sonrasında hastalık nüks etmektedir. Bu nedenle tedavi cerrahi operasyon öncesi veya sonrasında adjuvan kemoterapi ile birleştirilmektedir (Wang vd. 2007). Ayrıca kolorektal kanser teşhisi konulmuş hastaların yaklaşık %60'ında lenf nodu veya uzak bölge metastazı gözlenmektedir. İleri evrelerde ve metastatik kanserlerde cerrahi operasyon tek başına küratif tedavi sunma konusunda yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden kemoterapi, kolorektal kanserde kötü sağkalım oranlarını iyileştirmek için en güçlü tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. Kemoterapötik ajanlar tümör gelişimini yavaşlatmak ve operasyon sonrası hayatta kalma süresini uzatmak için neoadjuvan veya adjuvan uygulamaları tedavi yöntemi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Benson vd. 2018). 5-FU, ileri evre ve metastatik kolorektal kanser tedavisinde yaklaşık 30 yıldır klinikte en yaygın kullanılan kemoterapötik ajandır (Poon vd. 1991, Riahi-Chebbi vd. 2019). Ancak diğer kemoterapi ilaçlarında olduğu gibi, çoklu ilaç direnci (ing: multiple drug resistance, MDR), kolon kanseri için uygun kemoterapi tedavisinin önündeki birincil engel olmaya devam etmektedir (Hammond vd. 2016). Ayrıca ilaçların neden oldukları yan etkiler hastaların yaşam kalitesini olumsuz olarak etkilemekte, tedavinin etkinliğini de sınırlanmaktadır.

Bu nedenle, kemoterapötik ajanların etkinliğini arttırmak ve oluşturdıkları yan etkileri azaltmak için yeni ilaç veya kemoterapi duyarlılaştırıcı kombinasyonların klinikte kullanımı odak noktası haline gelmiştir. Kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılan FOLFOX (5-FU/folinik asit/oksalipatin), FOLFIRI (5-FU/folinik asit/irinotekan), CAPOX (kapesitabin/oksalipatin) ve FOLFOXIRI (folinik asit/5-FU/oksalipatin/irinotekan) gibi ilaç kombinasyonları örnek olarak verilebilir (Benson vd. 2006). Ayrıca sentetik kemosensitizörlerin geliştirilmesine yönelik çeşitli çalışmalar da yapılmıştır ancak sitotoksik etkileri ve sebep oldukları ters ilaç reaksiyonları sonucunda klinik deneylerde kullanımları yasaklamıştır (Li vd. 2019).

Doğal bileşikler, kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığı önlemek ve tedavi etmek için uzun süredir kullanılmaktadır ve bu bileşiklerin kanser tedavisinde kullanılacak yeni stratejilerin geliştirilmesinde önemli rol oynayabilecekleri düşünülmektedir. Zengin yapısal çeşitlilikleri ve karmaşıklıkları nedeniyle doğal ürünler ve türevleri, birinci basamak ilaçların keşfinde oldukça değerli kaynaklar olmuştur (Clardy ve Walsh 2004). Doğal bileşikler ve bunların klinikteki potansiyel kullanımları birçok avantaja sahiptir. Antikanser özellikleri ile ilgili olarak; proliferasyonu, anjiyogenezi, tümör metastazını etkileyen veya tümör hücresi apoptozunu indükleyen antioksidan (kemoprotektif) ve hatta prooksidan (pro-apoptotik) gibi özelliklere sahiptirler (Baena Ruiz ve Hernandez 2016). Bu nedenle, kanser tedavisinde doğal bileşiklerin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılması, kemoterapötik ajanların oluşturduğu olumsuz etkilerle mücadele etmek ve sitotoksik etkinliğini arttırmak için popüler bir yaklaşım olarak son yıllarda karşımıza çıkmaktadır. Hastalarda oluşan toksik yükü azaltmak için 5-FU veya oksaliplatin gibi kemoterapötik ajanların, tanımlanmış bir etkiye sahip doğal bir bileşik ile doz ikamesi yoluyla kullanımını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Rejhová vd. 2018). Benzer yaklaşımla doğal bileşiklerin, sitotoksikite yoluyla geleneksel tedaviye duyarlılığı arttırarak, uygulanan her iki terapötik maddenin (örn. EGCG ve sunitinib) birleşik etkisini karşılıklı olarak güçlendirerek tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkinliği arttırabileceği de gösterilmiştir (Zhou vd. 2016). Kombine tedavi uygulamasıyla çoklu sinyal yollarının hedef alınması mümkün olduğundan, ilaçların sitotoksik etkinliğin arttırılması ve yan etkilerinin azaltılmasının yanı sıra ilaç direnci gelişmesinden sorumlu değiştirilmiş

hücresel yollar üzerinde de etki gözlemlenebilir. Bu nedenle konvansiyonel kemoterapötiklerin efektif doğal bileşiklerle etkileşimiyle, kanser tedavisinde yeni stratejiler geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen tez çalışması kolon kanseri tedavisi için yeni, etkili ve toksik olmayan doğal bileşik kaynaklı anti-kanser etkinlik belirlemeyi amaçlamıştır. Bu nedenle, 5-FU ile kombine edilen *C. nebularis* özütünün HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri sistematik olarak değerlendirilmiş ve bu kombinasyonun etki mekanizması detaylı bir şekilde araştırılmıştır.

Doğal ürünler, ilaç araştırmaları için oldukça değerli kaynaklardır ve uzun süredir farmakolojik çalışmalar için model olmuştur. Günümüzde kullanılmakta olan birçok ticari ilaç, doğal bileşikler veya doğal bileşik türevleridir. Bu nedenle doğal bileşiklerden yeni farmasötik bileşenlerin keşfi için birçok çalışma yapılmaktadır. Makrofunguslar içerdikleri çok çeşitli kimyasal yapıdaki aktif bileşenlerle, doğal biyoaktif bileşiklerin değerli kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle ön çalışma olarak *C. nebularis* mantarından elde ettiğimiz etanolik özütün fitokimyasal içeriği, UPLC ve FT-IR spektroskopisi kullanılarak detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Ön çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar CN özütünün biyolojik olarak aktif çok sayıda molekülü içerdiğini ve güçlü antioksidan potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Dizeci vd. 2021). FT-IR spektroskopisi ile özütün kimyasal içeriği analiz edildiğinde fenolik bileşiklerin yanı sıra, protein ve polisakkaritlerin varlığı da gösterilmiştir. Ayrıca, CN özütü GST enziminin aktivitesini etkili bir şekilde inhibe etmiştir (Dizeci vd. 2021). GST, detoksifikasyon yolunun son ürünü olan merkapturik asit oluşumunun ilk aşamasını katalize ederek homeostaza neden olur. Özellikle kemoterapi uygulanan hastalarda ağır ilaç tedavisinin gerekli olduğu durumlarda GST'nin neden olduğu ilaç direncinin inhibisyonu çok önemlidir. Bu nedenle kemoterapi alan hastaların besin takviyesi olarak *C. nebularis* mantarını tüketmeleri GST'ye bağlı ilaç direncini ortadan kaldırmak için faydalı olabilir.

Mantarlar, yeni farmakolojik ilaçlar için zengin bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Mantarlarda bulunan biyolojik olarak aktif moleküller, düşük moleküler ağırlığa sahip olduklarından, hücre zarından kolaylıkla geçerek hücre içinde çeşitli yollarda hareket

ederek anti-tümör etkilerini gösterebilirler. Bu nedenle, *C. nebularis*'den elde edilen etanolik ekstraktların kolorektal kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkisi mevcut tez çalışması ile ilk kez araştırılmıştır.

CN özütü ve 5-FU'nun tek ajan olarak HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerindeki anti-kanser etkinliklerini değerlendirmek için öncelikle MTT deneyi yapılmıştır. 24 saatlik uygulama sonucunda, HT-29 hücrelerinde CN özütü için 243 ± 17 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri hesaplanmış ve uygulanan konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre canlılığını %60'a kadar azalttığı gözlenmiştir. CN özütü sitotoksik kemoterapötik ajan 5-FU ile kıyaslandığında, düşük konsantrasyonlar dışında oldukça etkili bir aktivite profili sergileyerek, HT-29 hücrelerinin canlılığını etkili bir şekilde azaltmıştır. HT-29 hücreleri üzerinde CN özütünün sergilediği etkili sitotoksik aktivitenin belirlenmesinden sonra, kolon kanseri heterojenitesini yansıtabilmek amacıyla aynı konsantrasyon aralığı kullanılarak özütün farklı bir kolon kanseri hücresi olan Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır.

24 saatlik uygulama sonucunda, Caco-2 hücrelerinde CN özütü için hazırlanan doz-yanıt eğrisi kullanılarak 298 ± 44 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri hesaplanmış ve hücre canlılığını %50 oranında azalttığı bulunmuştur. Son olarak, normal bir hücre hattı olan HEK-293 böbrek epitel hücreleri kullanılarak CN özütünün sağlıklı hücreler üzerindeki olası toksik etkisi araştırılmıştır. Her iki kolon kanseri hücre hatlarında kullanılan konsantrasyonlar kullanılarak gerçekleştirilen hücre canlılığı çalışmaları sonucunda, CN özütünün normal böbrek epiteli hücreleri üzerinde önemli bir toksik etkisinin olmadığı bulunmuştur. Çalışılan konsantrasyon aralığındaki hiçbir konsantrasyonda canlı hücre miktarlarında %50 ve üzerinde azalma gözlenmediği için HEK-293 hücrelerinde CN özütü için IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Sonuç olarak CN özütü insan kolon kanseri hücreleri üzerinde seçici sitotoksikite göstermiş, normal insan böbrek epitel hücrelerine düşük duyarlılık sergilemiştir. Kolon kanseri tedavisinde kullanılan mevcut anti-kanser ilaçların çoğu, normal hücreler üzerindeki toksisiteyi sebebiyle saç dökülmesi, mide bulantısı, yorgunluk, bağırsak toksisitesi ve kemik iliği baskılanması gibi istenmeyen yan etkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle günümüzde, daha selektif etki gösteren yeni ilaçların geliştirilmesi için çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu tez çalışmasında, CN

özütünün özellikle HT-29 kolon kanser hücre hatlarına karşı oldukça etkili ve selektif sitotoksik aktivitesinin olduğu belirlenmiştir.

CN özütünün sahip olduğu yüksek anti-proliferatif potansiyel, özütün içerdiği yüksek sayıda ikincil metabolitler ile ilişkili olması muhtemeldir. *C. nebularis* mantarı, Nebularin olarak adlandırılan bir purin ribonükleozid yapısını doğal olarak içermektedir (Löfgren ve Luning 1953). Bilindiği gibi kanser tedavisi için yaygın olarak kullanılan antimetabolit ilaçlar genellikle nükleozid türevleridir. Ayrıca, nebularin adenozin deaminaz enzimini etkileyerek anti-neoplastik etki göstermektedir (Lougakis vd. 2015). Organik yapıya sahip bir molekül olduğu için etanolde kolayca çözünür, FT-IR analizi sonuçları da CN özütünde nitrojenli yapıların varlığını işaret etmektedir (Dizeci vd. 2021). Bu nedenle, CN özütünde mevcut olabileceği düşünülmektedir. *C. nebularis*'te ayrıca proteaz enzimlerini güçlü bir şekilde inhibe eden klitosipin gibi çeşitli peptit yapıları da bulunmaktadır (Brzin vd. 2000). Bu yapıların viral ve bakteriyel enfeksiyonların, kanserin ve immünolojik hastalıkların tedavisinde terapötik etkiler gösterebileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. (Chang ve Wasser 2012). Pişlar ve arkadaşları (2016), *Clitocybe geotropa* mantarından L-amino asit oksidaz yapısını saflaştırmış ve MCF-7 ve Jurkat hücre dizilerinde hücre ölümünü indüklediğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, Kosanić ve arkadaşları (2020), *C. nebularis* ve *C. geotropa*'dan elde edilen aseton özütünün HeLa, K562, A549 ve PC-3 hücre hatları üzerinde orta derecede anti-kanser etkisi olduğunu göstermiştir.

CN özütünün kolon kanseri hücreleri üzerindeki selektif anti-tümör aktivitesinin belirlenmesinden sonra, HT-29 hücreleri üzerinde 5-FU ile birlikte kullanımını için, ilaç-ilaç etkileşimleri araştırılmıştır. CN özütü ve 5-FU kombinasyonu ile anti-tümör etkilerin artırılıp artırılmadığını belirlemek için, oluşturulan bir dizi kombinasyon uygulamaları HT-29 hücrelerinde araştırılmıştır. Araştırılan 7 farklı kombinasyon arasında, 1:1 kombinasyonunda (IC_{50} - IC_{50}) anlamlı bir sinerjistik etki gözlenmiştir. 24 saat boyunca CN özütü, 5-FU ile kombinasyon halinde hücrelere birlikte uygulandığında, tekil kullanımlarına kıyasla HT-29 hücreleri üzerindeki anti-kanser etkinlikleri önemli ölçüde artmıştır. Bu şekilde kombinasyon uygulamaları sonucunda konvansiyonel ajanların terapötik etkinliğinin artırılmasıyla, kullanılan dozu azaltırken

toksositeye neden olmadan aynı etkinliği devam ettirmek veya arttırmak, ilaç direncinin gelişiminin azaltmak veya minimize etmek gibi olumlu sonuçlar elde edilmesi mümkün olacaktır. Elde edilen bu sinerjistik etkiler, başta kanser olmak üzere pek çok tehlikeli hastalığa karşı ilaç kombinasyonlarının yoğun şekilde kullanılmasını ve tedavi etkinliğinin artmasını sağlamaktadır (Chou 2006). Sinerjistik iki ilacın kombinasyonu sonucunda, aynı inhibe edici etkiyi elde etmek için herhangi bir ilacın dozajını azaltabilir. Bu nedenle, 5-FU'nun CN özütü ile birlikte kullanılmasıyla etkinliği artırılabilir ve sebep olacağı yan etkilerin oluşumu en aza indirebilir.

Sinerjistik etkinin Chou-Talalay yöntemi kullanılarak tespit edilmesinden sonra, kombinasyonun etkisini ileri analizlerle doğrulamak için doz azaltma indeksi (DRI) yine aynı metot kullanılarak hesaplanmıştır. Kombinasyon çalışmalarında sinerjistik etki araştırılırken hesaplanan DRI >1 değeri, aynı etki seviyesi için kullanılan dozda azalma yapılabilmesine izin vermektedir. Bu da özellikle kemoterapi ilaçları tarafından indüklenen toksisitede önemli bir azalmaya yol açmaktadır. Çalışmamızda, CN özütü ile 5-FU'nun birlikte kullanımı için DRI >1 değeri de hesaplanmıştır. Dolayısıyla 5-FU'nun CN özütü ile birlikte kullanılmasıyla, daha az doz ile daha etkili sonuç alınması sonucunda ilacın sebep olacağı toksisiteyi azaltacak olan azaltılmış doz, faydalı sonuçların alınmasını sağlayacaktır. Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı, tez çalışmasındaki ileri uygulamalar, CN özütü ve 5-FU monoterapisi veya bunların kombinasyonu olacak şekilde uygulanmıştır.

Monoterapi ve kombinasyonun HT-29 hücreleri üzerindeki çoğalma önleyici etkisini ileri analiz yöntemleri ile doğrulamak için kristal viyole boyaması yapılmıştır. MTT deneyinden elde edilen sonuçlara benzer şekilde, CN özütü HT-29 hücrelerinin proliferasyonunu oldukça etkili bir şekilde inhibe etmiştir ve hücrelere 5-FU ile birlikte uygulandığında, 5-FU'nun sitotoksik etkinliğinin artmasına sebep olmuştur. Dolayısıyla CN özütünün hem tekil hem de kombine uygulanması sonucunda kolon kanseri hücrelerinin canlılığını azalttığı ikinci bir yöntem ile de gösterilmiştir.

Anormal hücre proliferasyonu, malign transformasyon geçirmiş hücrelerin tipik bir özelliğidir. İstilacı bir şekilde büyüme ile karakterize edilmiş hücreler, çeşitli doku ve organlara metastaz yaparak bu özelliklerini uzak bölgelerde de sergilemektedir (Welch ve Hurst 2019). Bu nedenle CN özütünün, HT-29 hücrelerinin hücrelerinin koloni oluşturma ve hareket yeteneği üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmıştır. CN özütünün HT-29 hücrelerinin hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki inhibitör etkisi, koloni oluşturma deneyi ile araştırılmıştır. Bu yöntem, sitotoksik ajanlarla tedaviden sonra tümör hücrelerinin hayatta kalmak ve koloniler oluşturmak üzere büyüebilme yeteneğini test etmektedir (Franken vd. 2006). Elde edilen sonuçlar CN özütünün HT-29 hücrelerinin koloni oluşumunu etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Bu sonuç, CN özütü ile muamele edilen hücrelerin, hücre büyümesi inhibisyonunun geri döndürülemez bir şekilde inhibe edildiğini ortaya koymuştur.

Birçok kanser hastası, sıklıkla vücudun uzak kısımlarında metastatik odaklara yol açan tümör mobilizasyonu nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Tümör metastazı, klinik tedavi başarısızlığının ve yüksek mortalitenin ana nedeni olan malign bir tümörün önemli bir patolojik özelliğidir (Badmus vd. 2015). Bu nedenle kanser hücrelerinin hareketliliğini ve metastazını önlemeye veya yavaşlatmaya yönelik girişimler kanser tedavisinde oldukça önemlidir. Kanser hücrelerinin göç yeteneği, bir tümörün malign derecesini belirlemede anahtar faktör olan kanser metastazını ölçebilmek için oldukça önemlidir. Bu nedenle, CN özütünün tek başına veya 5-FU ile birlikte, HT-29 hücrelerinin göç yeteneği üzerinde inhibe edici bir etkisi olup olmadığını araştırmak için *in vitro* yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. (Şekil 4.14-15)' de gösterildiği gibi, CN ve 5-FU ile tek başına veya 24 saat kombinasyon halinde uygulama sonrasında, HT-29 hücrelerinde oluşturulan yaranın onarımı kontrol grubuna kıyasla oldukça geciktirilmiştir. Sonuç olarak, göç eden hücre miktarının hem tek bir ajan tarafından hem de kombinasyon tarafından aşağı çekildiği, HT-29 hücrelerinin göç ve istila yetenekleri üzerinde CN özütünün sinerjik bir inhibisyona sahip olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, başta 5-FU olmak üzere çeşitli anti-kanser ilaçlar ile karşılaştırıldığında, CN özütünün daha az toksik olabilme avantajına sahip olarak tümör mobilasyonunu inhibe edebileceğini göstermektedir. Bu nedenle araştırma değeri olan potansiyel bir doğal anti-kanser bileşik olduğu düşünülmektedir.

Hücre canlılığı ve hücre döngüsünün ilerlemesi birbiri ile ilişki içerisinde. Hücre döngüsü, normal hücrelerin çoğalmasını düzenleyen oldukça önemli bir biyolojik aktivitedir. Ancak tümör hücrelerinde çoğunlukla döngünün düzenlenmesinin kontrolden çıktığı veya anormal aktiviteleri gözlenmektedir. Kanser hücrelerindeki döngünün kontrol yolları, hücre döngüsünü kırmak için genellikle büyük ölçüde değiştirilir, bu da hücre ömrü ve işlevinde anormal bir artışa neden olmaktadır. Tümör hücrelerinin karakteristik özelliği olan anormal hücre proliferasyonu, kontrol dışı hızlı mitoz bölünmeye dayanmaktadır. Bu nedenle mitoz sürecini inhibe etmeyi hedefleyen ilaçlar, geleneksel anti-kanser araştırmalarının popüler bir alanı olmuştur ve 5-FU gibi ajanlar uzun yıllardır klinikte yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Williams ve Stober 2012). CN özütünün HT-29 hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan güçlü inhibe edici etkisinin belirlenmesinden sonra, bu etkinin tek başına veya 5-FU ile kombinasyon halinde uygulanmasının hücre döngüsü ile olan ilişkisi akış sitometrisi analizi ile belirlenmiştir. 5-FU hücre döngüsünün S fazı sırasında, timidilat mevcudiyetini kısıtlayıp DNA sentezini inhibe ederek sitotoksik etkisini göstermektedir (Focaccetti vd. 2015). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar da bunu göstermektedir. 5-FU'ya maruz kaldıktan sonra S fazında bulunan hücre miktarında artış gözlenmiştir ve G2 fazına geçebilen hücre miktarında azalma olmuştur. 24 saatlik uygulama sonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CN özütüne maruz kaldıktan sonra S fazında bulunan hücre miktarlarında da artış gözlenmiştir. CN özütü de 5-FU ile benzer şekilde hücre döngüsünün S fazına etki etmiştir ve G2 fazında bulunan hücre miktarında azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca kombinasyon uygulaması, her iki ajanın tekil kullanımı ile karşılaştırıldığında S fazındaki hücrelerin miktarında çok daha büyük bir artışa yol açmıştır (Şekil 4.17). Böylece, CN özütü 5-FU ile kombine halde, HT-29 hücrelerinde S fazında sinerjik bir hücre döngüsü durdurulmasına yol açmıştır. 5-FU anti-tümör etkinliğini ağırlıklı olarak DNA hasarı aracılığıyla S fazında göstermektedir, CN özütü de benzer şekilde anti-kanser etkinliğini HT-29 hücrelerinin S fazında tutulmasını sağlayarak göstermiştir. Sonuç olarak her iki ajan hücrelere birlikte uygulandığında, oldukça etkili ve uyumlu bir aktivite profili sergileyerek S fazında hücre döngüsü durdurulmasına sebep olmuştur (Şekil 4.17). HT-29 hücrelerinin hücre döngüsü analizi sonucunda; özellikle kombinasyon uygulamasıyla, G2 fazındaki hücre miktarında ciddi bir azalma ile birlikte S-fazında bulunan hücrelerin miktarının CN ve 5-FU tedavisi ile

artmış olduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenle HT-29 hücrelerinde CN ve 5-FU aracılığıyla indüklenen S fazındaki tutuklamanın arkasındaki moleküler mekanizmaları daha da karakterize etmek için, hücre döngüsü ilerlemesi ve S fazının düzenlenmesinden sorumlu genlerin mRNA seviyelerindeki değişiklikler qRT-PCR ile analiz edilmiştir.

Ökaryotik hücre döngüsünün düzenlenmesi, siklin bağımlı kinaz (CDK) ve siklinlerden oluşan, protein kinaz komplekslerinin koordineli aktivitesi tarafından gerçekleştirilmektedir (Park ve Lee 2003). Bu kompleksler, hücre döngüsünün farklı aşamalarında oluşturulur ve aktive edilir, aktiviteleri farklı hücre döngüsü aşamalarının ilerlemesi için gereklidir. Döngüde S-fazının ilerlemesi, Siklin A/Cdk2 kompleksi tarafından düzenlenmektedir. Siklin A, S-fazında eksprese edilir ve Cdk2'ye bağlanır, böylece DNA replikasyonu ve S-fazının ilerlemesi gerçekleştirilir (Abbas ve Dutta 2009, Bertoli vd. 2013). CDK'ların aktiviteleri, sikline bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) tarafından düzenlenmektedir. p21(WAF1/CIP1) ve p27(KIP1) S fazında, Siklin A/Cdk2 kompleksinin kinaz aktivitelerini inhibe ederek, hücre döngüsü ilerlemesini kontrol altında tutmaktadır. Tümör baskılayıcı gen p53'de ayrıca hücre döngüsü ilerlemesinde önemli bir düzenleyici rol oynamaktadır. p53'ün aşağı akış hedefleri olan p21 ve p27, CDK'ların aktivitesini inhibe edebilen ve hücre döngüsü durdurmasına neden olan evrensel inhibitörlerdir (Yu vd. 2020). Bu nedenle mevcut çalışma dahilinde, S fazı ile ilişkili Siklin A2/Cdk1, Siklin A2/Cdk2 kompleksleri, CDK inhibitörleri p21, p27 ve hücre döngüsünün düzenlenmesinden sorumlu p53 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikler araştırılmıştır.

HT-29 hücrelerinde 24 saatlik CN ve 5-FU uygulanması sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, S fazının ilerlemesinden sorumlu olan Siklin A2/Cdk1, Siklin A2/Cdk2 komplekslerinin mRNA ifade seviyelerinin aşağı regüle edildiği bulunmuştur (Şekil 4.18-20). Sonuçlar ayrıca CN ve 5-FU uygulaması sonucunda, p53 ekspresyonunun da arttığını göstermiştir. Yapılan çalışmalar p53 ifade seviyelerindeki artışın, p53'ün aşağı akış hedefleri olan p21 ve p27'nin ekspresyonunu destekleyebildiğini ve Siklin A2/Cdk2'nin ekspresyonunu bloke ettiğini göstermiştir (Futamura vd. 2007). Bununla tutarlı olarak CN özütü ve 5-FU uygulanmış HT-29

hücreleri, kontrol grupları ile kıyaslandığında artan p53 aktivitesi sonucunda, hücre döngüsü düzenleyici genler p21 ve p27'nin mRNA ekspresyon seviyeleri artarken, bu genlerin hedefleri olan Siklin A, Cdk1 ve Cdk2'nin ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir.

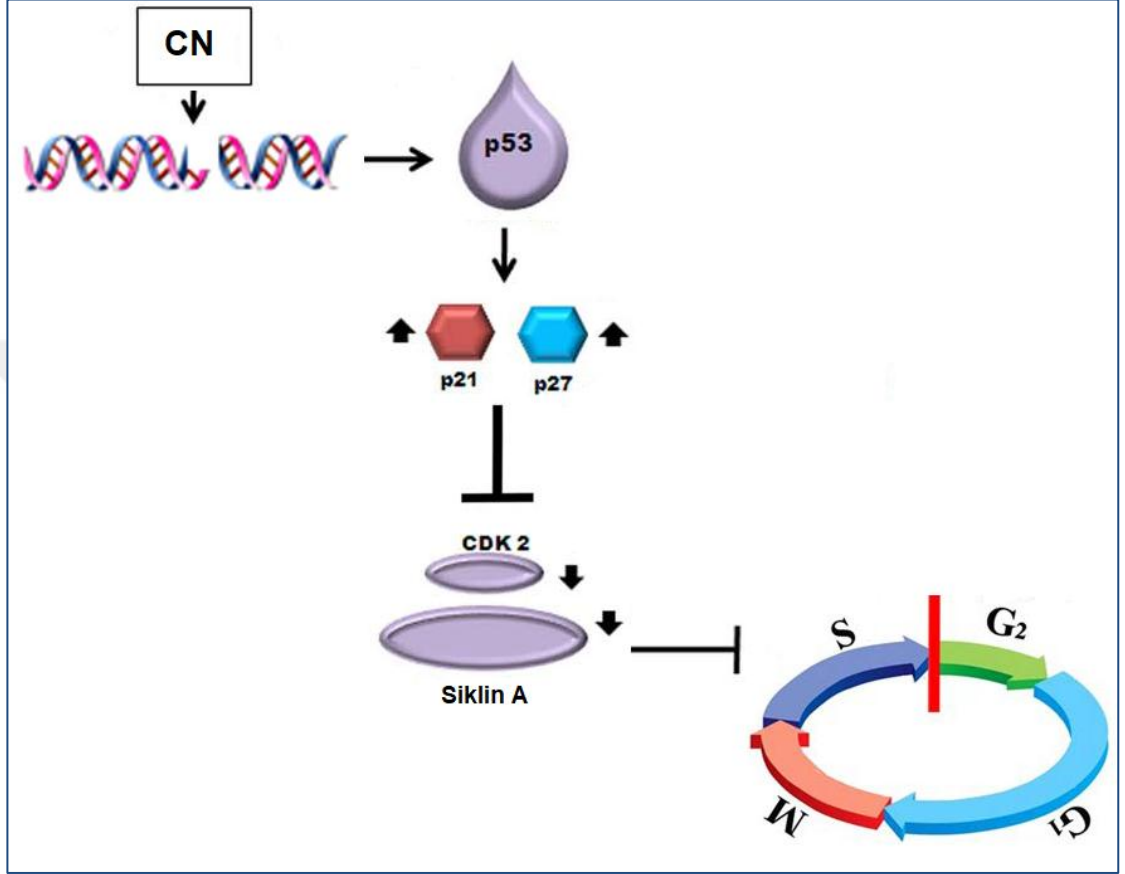
Cdk1 ve Cdk2 üretimlerindeki azalmanın, siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin regülasyon seviyeleri ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Oakes vd. 2014). Siklin A/Cdk1-2 kompleksi, DNA replikasyonunun başlatılmasında ve döngünün S fazı boyunca ilerlemesinde görev almaktadır (Moon vd. 2000). Bu nedenle, siklin A ve Cdk2'nin inhibisyonu, S-fazında hücre döngüsü durmasını indüklemektedir. p21 (CIP1/WAF1) ve p27 (Kip1), siklin-Cdk1-2 ile reaktif olmayan kompleksler oluşturup fosforilasyon yeteneklerini baskılayarak bunların aktivitesini inhibe eder ve böylece G1 ve S fazında hücre döngüsü ilerlemesinin düzenleyicisi olarak işlev görürler (Singh vd.2017). Çalışmamız sonucunda, CN özütünün, HT-29 hücrelerinde siklin A ve Cdk1-2 ekspresyon seviyelerini azaltarak, S-fazında hücre döngüsünün durmasını indüklediği gösterilmiştir.

p21 (CIP1/WAF1) ve p27 (Kip1)'nin yukarı regülasyonu ve siklin A2/Cdk komplekslerinin aşağı regülasyonu sonucunda hücre döngüsü boyunca S fazından G2 fazına ilerlemeyi inhibe ederek hücre döngüsünün durmasına veya yavaşlamasına neden olmaktadır. Tümör baskılayıcı gen p53 aktive edildiğinde, aşağı akış genleri p21 ve p27'yi aktive ederek hücre döngüsünü kontrol etmektedir (Godar vd.2008, Overton vd.2014). p21, DNA hasarı sonrasında p53 aktivitesinin ana hedefini temsil etmektedir. DNA hasarıyla gerçekleşen hücre döngüsü durması p53 aracılığıyla p21 aktivitesiyle ilişkilidir (el-Deiry vd.1993). Etkili kemoterapötik ajanların birçoğu da hücre döngüsüne yönelik mekanizmalar aracılığıyla etkinliklerini göstermektedir (Williams ve Stoeber 2007). 5-FU hücre döngüsünün S fazını hedef alan bir kemoterapötik ajandır, DNA hasarı oluşturarak sitotoksik aktivite gösterir ve ardından p53 aktivasyonunu indükler (Longley vd. 2003). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar da bunları işaret etmektedir. 5-FU ile muamele edilmiş HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, 24 saat sonunda S fazındaki hücre miktarının arttığı ve kontrol grubu ile kıyaslandığında p53 ekspresyon seviyesinin 3, aşağı akış hedefleri p21 ve p27'nin ekspresyon seviyelerinin

de 6 kat anlamlı şekilde artmış olduğu bulunmuştur (Şekil 4.21-23). Benzer sonuçlar CN özütü uygulanmış hücreler içinde elde edilmiştir. CN özütü uygulanmış HT-29 hücrelerinde, 24 saat sonunda S fazındaki hücre miktarının arttığı, G2 fazındaki hücre miktarının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.17). Bu nedenle, hücreler CN ile muamele edildikten sonra p53 ve aşağı akış hedefleri p21 ve p27 ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerde araştırılmıştır. CN özütü uygulanmış hücreler kontrol grubu ile kıyaslandığında p53, p21 ve p27 ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.21-23). Elde edilen sonuçlar, CN özütün gösterdiği sitotoksik aktivitenin 5-FU'ya benzer bir yol izlediğini düşündürmektedir. 5-FU ve CN özütünden elde edilen sonuçlar birlikte ele alındığında, CN özütünün sitotoksik aktivitesi sonucunda HT-29 hücrelerinde p53 aktivasyonu aracılığıyla S fazında hücre döngüsünün durdurulmasını indüklediğini göstermektedir (Şekil 5.1). Hücre döngüsünün S fazında stres kaynaklı DNA hasarı meydana geldiğinde, DNA sentezinin inhibisyonu yoluyla hücre büyümesi engellemektedir (Agarwal vd. 1998). Bu sonuçlar, yukarı regüle edilmiş p53 ve p21 ekspresyonu yoluyla S fazı durması ile ilişkilendirilmiştir. Hücrelerin CN özütüne maruz kalması sonucunda ortaya çıkan büyüme önleyici etki, DNA hasarı sonucunda S-fazında hücre döngüsü ilerlemesinin durdurulmasıyla gerçekleşmektedir. Akış sitometrisi analizleri sırasında apoptoz göstergesi olan sub G1 piklerinin gözlenmemiş olması da bunun bir göstergesidir (Şekil 4.16).

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular, CN özütünün kolon kanseri hücreleri üzerinde selektif anti-kanser etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, CN özütü ve 5-FU'nun HT-29 hücrelerine birlikte uygulandıklarında sinerjik anti-kanser etki gösterdikleri de bulgulanmıştır. CN özütünün 5-FU ile kombinasyonu, kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyonu, klonojenitesi, motilitesi etkilerken, aynı zamanda hücre döngüsü üzerinde sinerjistik bir anti-tümör etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar; CN özütünün 5-FU'nun anti-kanser etkinliğini güçlendirdiğini, dolayısıyla 5-FU'ya dirençli kolon kanserinin tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir. CN özütü ile 5-FU'nun birlikte kullanılmasıyla, 5-FU'ya karşı gelişen ilaç direncinin üstesinden gelinmesinin yanı sıra, azaltılmış doz sayesinde 5-FU'nun hastalarda oluşturduğu yan etkilerin azaltılmasına da yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak elde edilen in vitro bulgularımız, kolorektal kanser tedavisi için CN özütünün

tamamlayıcı bir tedavi olabileceği konusunda umut verici kanıtlar sağlamaktadır. Ayrıca mevcut bulgularımız, takip edecek kapsamlı araştırmalarla daha kesin sonuçlar elde edilebilmesi için *in vivo* etkinliğinde araştırılması konusunda temel oluşturmaktadır.



Şekil 5.1 CN özütünün p53 aracılığıyla hücre döngüsü inhibisyonu

KAYNAKLAR

- Abbas, T., Dutta, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 400-414.
- Abreu Velez, A.M., Howard, M.S. 2015. Tumor-suppressor Genes, Cell Cycle Regulatory Checkpoints, and the Skin. *N Am J Med Sci*, 7(5), 176-88.
- Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Chernova, O., Sharma, Y. Stark, G.R. 1998. A p53- dependent S- phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 14775-14780.
- Ait Ouakrim D, Pizot C, Boniol M, Malvezzi M, Boniol M, Negri E et al. 2015. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ* 2015; 351 :h4970.
- AJCC. 2018. AJCC 8th Ed Cancer Staging Manual. Springer International Publishing.
- Albini, A., Bruno, A., Gallo, C., Pajardi, G., Noonan, D.M., Dallaglio, K. 2015. Cancer stem cells and the tumor microenvironment: interplay in tumor heterogeneity. *Connect Tissue Res*, 56(5), 414-25.
- Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691
- Avanzo, P., Sabotič, J., Anžlovar, S., Popovič, T., Leonardi, A., Pain, R.H., Kos, J., Brzin, J. 2009. Trypsin-specific inhibitors from the basidiomycete *Clitocybe nebularis* with regulatory and defensive functions. *Microbiology (Reading)*, 155(12), 3971-3981.
- Badmus, J.A., Ekpo, O.E., Hussein, A.A., Meyer, M., Hiss, D.C. 2015. Antiproliferative and Apoptosis Induction Potential of the Methanolic Leaf Extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don). *Evid.-Based Complement. Altern. Med*, 2015, 756482.
- Baena Ruiz, R., Salinas Hernández, P. 2016. Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: Epidemiological evidence. *Maturitas*, 94, 13-19.
- Baran, Y., Kiraz, Y., Ulu, G.T. *Kanser Moleküler Biyololisi*, Kısayol Yayıncılık.
- Bartek, J., Lukas, C., Lukas, J. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 792-804.
- Bastos, D.A., Ribeiro, S.C., de Freitas, D., Hoff, P.M. 2010. Combination therapy in high- risk stage II or stage III colon cancer: current practice and future prospects. *Ther Adv Med Oncol*, 2(4):261-72.
- Benarba, B., Pandiella, A. 2018. Colorectal cancer and medicinal plants: Principle findings from recent studies. *Biomed Pharmacother*, 107, 408-423.
- Benson, A.B., Venook, A.P., Al-Hawary, M.M., Cederquist, L., Chen, Y.J., Ciombor, K.K., Cohen, S., Cooper, H.S., Deming, D., Engstrom, P.F., Garrido-Laguna, I., Grem, J.L., Grothey, A., Hochster, H.S., Hoffe, S., Hunt, S., Kamel, A., Kirilcuk, N., Krishnamurthi, S., Messersmith, W.A., Meyerhardt, J., Miller,

- E.D., Mulcahy, M.F., Murphy, J.D., Nurkin, S., Saltz, L., Sharma, S., Shibata, D., Skibber, J.M., Sofocleous, C.T., Stoffel, E.M., Stotsky-Himelfarb, E., Willett, C.G., Wuthrick, E., Gregory, K.M., Freedman-Cass, D.A. 2018. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *J Natl Compr Canc Netw*, 16(4), 359-369.
- Benson, A.B., Catalan, P., Meropol, N.J., Giantonio, B.J., Sigurdson, E.R., Martenson, J.A., et al. 2006. ECOG E3201: Intergroup randomized phase III study of postoperative irinotecan, 5- fluorouracil (FU), leucovorin (LV) (FOLFIRI) vs oxaliplatin, FU/LV (FOLFOX) vs FU/LV for patients (pts) with stage II/ III rectal cancer receiving either pre or postoperative radiation (RT)/ FU. *Journal of Clinical Oncology*, 24(18), 3526-3526.
- Berdasco, M., Esteller, M. 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*, 19(5):698-711.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 127-52.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M., de Bruin, R.A. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(8), 518-528.
- Blagodatski, A., Yatsunskaya, M., Mikhailova, V., Tiasto, V., Kagansky, A., Katanaev, V.L. 2018. Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget*, 9(49), 29259-29274.
- Botteri, E., Iodice, S., Bagnardi, V., Raimondi, S., Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P. 2008. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*, 300(23):2765-78.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424.
- Brenner, H., Kloor, M., Pox, C.P. 2014. Colorectal cancer. *Lancet*, 383(9927), 1490-1502.
- Brzin, J., Rogelj, B., Popovic, T., Strukelj, B., Ritonja, A. 2000. Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *clitocybe nebularis*. *J Biol Chem*, 275(26), 20104-9.
- Cai, S., Li, Y., Ding, Y., Chen, K., Jin, M. 2014. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*, 23, 532–39.
- Casale, F., Canaparo, R., Serpe, L., Muntoni, E., Pepa, C.D., et al. 2004. Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. *Pharmacol Res*, 50, 173–179.
- Chan, D.S., Lau, R., Aune, D., et al. 2011. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*; 6: e20456.
- Chang, S.T., Wasser, S.P. 2012. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *Int J Med Mushrooms*, 14(2), 95-134.

- Cho, R.W., Clarke, M.F. 2008. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 18(1):48-53.
- Cho, H.J., Park, J.H. 2013. Kaempferol Induces Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *J Cancer Prev*, 18(3), 257-63.
- Chou, T.C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, 58(3), 621-81.
- Chou, T.C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70(2), 440-6.
- Clardy, J., Walsh, C. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature*, 16;432(7019), 829-37.
- Cooper, G.M. 2000. *The Cell*, 2nd edition A Molecular Approach. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Dai, Y., Yang, Z., Cui, B., Yu, C., Zhou, I. 2009. Species Diversity and Utilization of Medicinal Mushrooms and Fungi in China (Review). *IntJMedMushr*, 11(3), 287-302.
- Deep, G., Agarwal, R. 2010. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 29(3), 447-63.
- De Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., Wilson, C., Morvan, F., Bonetti, A. 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18(16), 2938-47.
- Dekker, E., Tanis, P.J., Vleugels, J.L.A., Kasi, P.M., Wallace, M.B. 2019. Colorectal cancer. *Lancet*, 394(10207), 1467-1480.
- Delval, L., Klastersky, J. 2002. Optic neuropathy in cancer patients. Report of a case possibly related to 5 fluorouracil toxicity and review of the literature. *J Neurooncol*, 60(2), 165-9.
- Dizeci, N., Onar, O., Karaca, B., Demirtas, N., Coleri Cihan, A., Yildirim, O. 2021. Comparison of the chemical composition and biological effects of *Clitocybe nebularis* and *Infundibulicybe geotropa*. *Mycologia*, 113(6), 1156-1168.
- Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L., Rougier, P. 2000. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*, 25;355(9209), 1041-7.
- Edge, S.B., Compton, C.C. 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17(6), 1471-4.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), 817-25.

- Engelmann C, Blot E, Panis Y, Bauer S, Trochon V, Nagy HJ, Lu H, Soria C. 2002. Apigenin--strong cytostatic and anti-angiogenic action in vitro contrasted by lack of efficacy in vivo. *Phytomedicine*, 9(6), 489-95.
- Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3(6):453-8.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M. 2016. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(4), pdb.prot087379.
- Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., Bucci, E.O., Finzi, G., Sessa, F., Noonan, D.M., Albini, A. 2015. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PLoS One*, 10(2), e0115686.
- Fontana, S., Flugy, A., Schillaci, O., Cannizzaro, A., Gargano, M.L., Saitta, A., De Leo, G., Venturella, G., Alessandro, R. 2014. In Vitro Antitumor Effects of the Cold-Water Extracts of Mediterranean Species of Genus *Pleurotus* (Higher Basidiomycetes) on Human Colon Cancer Cells. *Int J Med Mushrooms*, 16(1), 49-63.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5), 2315-9.
- Futamura, M., Kamino, H., Miyamoto, Y., Kitamura, N., Nakamura, Y., Ohnishi, S., Masuda, Y., Arakawa, H. 2007. Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res*, 67(4), 1451-60.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, et al. 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 16(8), 1093-107.
- Ghoshal, K., Jacob, S.T. 1994. Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res*, 54(3), 632-6.
- Giacchetti, S., Perpoint, B., Zidani, R., Le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., Chollet, P., Llory, J.F., Letourneau, Y., Coudert, B., Bertheaut-Cvitkovic, F., Larregain-Fournier, D., Le Rol, A., Walter, S., Adam, R., Misset, J.L., Lévi, F. 2000. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18(1), 136-47.
- Glazer, R.I., Lloyd, L.S. 1982. Association of cell lethality with incorporation of 5-fluorouracil and 5-fluorouridine into nuclear RNA in human colon carcinoma cells in culture. *Mol Pharmacol*, 21(2), 468-73.
- Godar, S., Ince, T.A., Bell, G.W., Feldser, D., Donaher, J.L., Bergh, J., Liu, A., Miu, K., Watnick, R.S., Reinhardt, F., McAllister, S.S., Jacks, T., Weinberg, R.A. 2008. Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell*, 134(1), 62-73.

- Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., Braud, F., Wilson, C., Morvan, F., Bonetti, A. 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 8(16), 2938-47.
- Grem, J.L. 2005. Screening for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency. *Clinical Cancer Research*, 11(14), 5067-5068.
- Grem, J.L., Fischer, P.H. 1989. Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyridamole. *Pharmacol Ther*, 40(3), 349-71.
- Gu, J., Li, Z., Zhou, J., Sun, Z., Bai, C. 2019. Response prediction to oxaliplatin plus 5-fluorouracil chemotherapy in patients with colorectal cancer using a four-protein immunohistochemical model. *Oncol Lett*, 18(2), 2091-2101.
- Hammond, W.A., Swaika, A., Mody, K. 2016. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol*, 8, 57–84.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-74.
- Henrikson, N.B., Webber, E.M., Goddard, K.A., Scrol, A., Piper, M., Williams, M.S., Zallen, D.T., Calonge, N., Ganiats, T.G., Janssens, A.C., Zauber, A., Lansdorp-Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., Whitlock, E.P. 2015. Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. *Genet Med*, 17(9):702-12.
- Houghton, J.A., Tillman, D.M., Harwood, F.G. 1995. Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death. *Clin Cancer Res*, 1(7), 723-30.
- Hu, T., Li, Z., Gao, C.Y., Cho, C.H. 2016. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*, 22(30), 6876-89.
- Huang, X.M., Yang, Z.J., Xie, Q., Zhang, Z.K., Zhang, H., Ma, J.Y. 2019. Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomed Pharmacother*, 117, 109142.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Good, S.S., Knick, V.C., Tibbels, S., Richards, C.A. 1993. In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer research*, 53(19), 4619–26.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 350(23), 2335-42.
- Hwang, J.T., Ha, J., Park, O.J. 2005. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 332(2), 433-40.

- IARC. 2018. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. <https://www.iarc.who.int> Erişim tarihi: 12.09.2018
- IMPACT. 1995. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet*, 345(8955), 939-44.
- Jiang, T., Jahangir, M.M., Jiang, Z., Lu, X., Ying, T. 2010. Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 56(3), 209-215.
- Jiang, D., Wang, L., Zhao, T., Zhang, Z., Zhang, R., Jin, J., Cai, Y., Wang, F. 2017. Restoration of the tumor-suppressor function to mutant p53 by *Ganoderma lucidum* polysaccharides in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*, 37(1), 594-600.
- Jiao, S., Peters, U., Berndt, S., et al. 2014. Estimating the heritability of colorectal cancer. *Hum Mol Genet*, 23(14), 3898-905.
- Johnston, P.G., Kaye, S. 2001. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anticancer Drugs*, 12(8), 639-46.
- Jones, P.A., Baylin, S.B. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4):683-92.
- Jong, S.C., Donovan, R. 1989. Antitumor and antiviral substances from fungi. *Adv Appl Microbiol*, 34, 183-262.
- Kalyan, A., Kircher, S., Shah, H., Mulcahy, M., Benson, A. 2018. Updates on immunotherapy for colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*, 9(1):160-169.
- Kanamaru, R., Kakuta, H., Sato, T., Ishioka, C., Wakui, A. 1986. The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*, 17(1), 43-6.
- Kasi, P.M., Shahjehan, F., Cochuyt, J.J., Li, Z., Colibaseanu, D.T., Merchea, A. 2019. Rising Proportion of Young Individuals With Rectal and Colon Cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 18(1), 87-95.
- Khan, R., Khan, A.Q., Qamar, W., Lateef, A., Tahir, M., Rehman, M.U., Ali, F., Sultana, S. 2012. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol Appl Pharmacol*, 258(3), 315-29.
- Kim, Y.S., Lee, I.K., Seok, S.J., Yun, B.S. 2008. Chemical Constituents of the Fruiting Bodies of *Clitocybe nebularis* and Their Antifungal Activity. *Mycobiology*, 36(2), 110-3.
- Knudsen, H., Vesterholt, J. 2012. *Funga Nordica* vol 2. Copenhagen: Nordsvamp. p. 1083.
- Kosanić, M., Petrović, N., Stanojković, T. 2020. Bioactive properties of *Clitocybe geotropa* and *Clitocybe nebularis*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 1046-1053.
- Krishan, A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol*, 66(1), 188-93.

- Kumazaki M, Noguchi S, Yasui Y, Iwasaki J, Shinohara H, Yamada N, Akao Y. 2013. Anti-cancer effects of naturally occurring compounds through modulation of signal transduction and miRNA expression in human colon cancer cells. *J Nutr Biochem*, 24(11), 1849-58.
- Kyrgiou, M., Kalliala, I., Markozannes, G., Gunter, M.J., Paraskevaidis, E., Gabra, H., Martin-Hirsch, P., Tsilidis, K.K. 2017. Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. *BMJ*, 356:j477.
- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G.D., Mosconi, S., Mandalà, M., Cervantes, A., Arnold, D. 2013. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, Suppl 6:vi64-72.
- Lee, W., Hsu, K., Chiang, T., Chen, C. 2015. Phellinus Linteus Extract Induces Autophagy and Synergizes With 5-Fluorouracil to Inhibit Breast Cancer Cell Growth. *Nutr Cancer*, 67(2), 275-84.
- Lee, S., Lee, S.K., Jung, J. 2021. Potentiating activities of chrysin in the therapeutic efficacy of 5-fluorouracil in gastric cancer cells. *Oncol Lett*, 21(1), 24.
- Lefort, E.C., Blay, J. 2011. The dietary flavonoid apigenin enhances the activities of the anti-metastatic protein CD26 on human colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*, 28(4), 337-49.
- Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L. 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2(2), 329-33.
- Lin, S., Chang, C., Hsu, C., Tsai, M., Cheng, H., Leong, M.K., Sung, P., Chen, J., Weng, C. 2019. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *Br J Pharmacol*, 177(6), 1409-1423.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4), 402-8.
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., and Clarke, M.F. 2007. The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 675–699.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G. 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 330-8.
- Longley, D.B., Johnston, P.G. 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*, 205(2), 275-92.
- Lougiakis, N., Marakos, P., Pouli, N., Fragopoulou, E., Tenta, R. 2015. Synthesis of new nebularine analogues and their inhibitory activity against adenosine deaminase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 63(2), 134-42.
- Loree, J.M., Pereira, A.A.L., Lam, M., Willauer, A.N., Raghav, K., Dasari, A., Morris, V.K., Advani, S., Menter, D.G., Eng, C., Shaw, K., Broaddus, R., Routbort, M.J., Liu, Y., Morris, J.S., Luthra, R., Meric-Bernstam, F., Overman, M.J., Maru, D., Kopetz, S. 2018. Classifying Colorectal Cancer by Tumor Location Rather than Sidedness Highlights a Continuum in Mutation Profiles and Consensus Molecular Subtypes. *Clin Cancer Res*, 24(5), 1062-1072.

- Löfgren, N., Luning, B. 1953. On the structure of nebularine. *Acta them Scand*, 7, 225–229.
- Maehara, Y., Tsujitani, S., Saeki, H., Oki, E., Yoshinaga, K., Emi, Y., Morita, M., Kohnoe, S., Kakeji, Y., Yano, T., Baba, H. 2012. Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (KRESTIN®): review of development and future perspectives. *Surg Today*, 42(1), 8-28.
- Malumbres, M., Barbacid, M. 2006. Is Cyclin D1-CDK4 kinase a bona fide cancer target? *Cancer Cell*, 9(1), 2-4.
- Matherly, L.H., Czajkowski, C.A., Muench, S.P., Psiakis, J.T. 1990. Role for cytosolic folate-binding proteins in the compartmentation of endogenous tetrahydrofolates and the 5-formyl tetrahydrofolate-mediated enhancement of 5-fluoro-2'-deoxyuridine antitumor activity in vitro. *Cancer Res*, 50(11), 3262-9.
- Matsuoka, T. Yashiro, M. 2014. The role of PI3K/Akt/mTOR signaling in gastric carcinoma. *Cancers (Basel)*, 6, 1441- 1463.
- Medema, J.P. 2013. Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol*, 15, 338–44.
- Moon, J., Yu, S.J., Kim, H.S., Sohn, J. 2000. Induction of G(1) cell cycle arrest and p27(KIP1) increase by panaxydol isolated from *Panax ginseng*. *Biochem Pharmacol*, 59(9), 1109-16.
- Morgan, D.O. 2006. *Cell Cycle: Principles of Control*. New Science Press: London. p.297
- Nassar, D., Blanpain, C. 2016. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. *Ann Rev Pathol*; 11, 47–76.
- Nautiyal, J., Kanwar, S.S., Yu, Y., Majumdar, A.P. 2011. Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. *J Mol Signal*, 6, 7.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., Halazonetis, T.D. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(3), 220-8.
- Negrini, L., Samson, M., Guignonis, J.M., Rossi, B., Pierrefite-Carle, V., Baudoin, C. 2007. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation. *Mol Cancer Ther*, 6(10), 2747-56.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, 79(3), 629-61.
- Ng, K., Zhu, A.X. 2008. Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 65(1):8-20.
- Nigg, E.A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 21–32.
- Noordhuis, P., Holwerda, U., Van der Wilt, C.L., Van Groeningen, C.J., Smid, K., Meijer, S., Pinedo, H.M., Peters, G.J. 2004. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann Oncol*, 15(7), 1025-32.

- Oakes, V., Wang, W., Harrington, B., Lee, W.J., Beamish, H., Chia, K.M., Pinder, A., Goto, H., Inagaki, M., Pavey, S., Gabrielli, B. 2014. Cyclin A/Cdk2 regulates Cdh1 and claspin during late S/G2 phase of the cell cycle. *Cell Cycle*, 13(20), 3302-11.
- Onar, O., Akata, I., Celep, G.S., Yildirim, O. 2016. Antioxidant activity of extracts from the Red-Belt Conk medicinal mushroom, *Fomitopsis pinicola* (Agaricomycetes), and its modulatory effects on antioxidant enzymes. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18, 501–508.
- Overton, K.W., Spencer, S.L., Noderer, W.L., Meyer, T., Wang, C.L. 2014. Basal p21 controls population heterogeneity in cycling and quiescent cell cycle states. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(41), E4386-93.
- Pabla, B., Bissonnette, M., Konda, V.J. 2015. Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: Current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention. *World J Clin Oncol*, 10;6(5):133-41.
- Pan, M.H., Lai, C.S., Wu, J.C., Ho, C.T. 2011. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res*, 55(1), 32-45.
- Park, M.T., Lee, S.J. 2003. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol*, 36(1), 60-5.
- Parker, W.B., Cheng, Y.C. 1990. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther*, 48(3), 381-95.
- Patel, P., Chen, E.I. 2012. Cancer stem cells, tumor dormancy, and metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 125.
- Patel, S., Goyal, A. 2012. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2(1), 1-15.
- Patton, J.R. 1993. Ribonucleoprotein particle assembly and modification of U2 small nuclear RNA containing 5-fluorouridine. *Biochemistry*, 32(34), 8939-44.
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D.A., Michalopoulos, I. 2015. Human cancer databases (review). *Oncol Rep*, 33(1), 3-18.
- Pecorino, L. 2016. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Oxford University Press.
- Pišlar, A., Sabotič, J., Šlenc, J., Brzin, J., Kos, J. 2016. Cytotoxic l-amino-acid oxidases from *Amanita phalloides* and *Clitocybe geotropa* induce caspase-dependent apoptosis. *Cell Death Discovery*, 2, 16021.
- Pitot, H.C. 1993. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, 72(3), 962-70.
- Planas-Silva, M.D., Weinberg, R.A. 1997. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, 9(6), 768-72.
- Pohleven, J., Kos, J., Sabotič, J. 2016. Medicinal Properties of the Genus *Clitocybe* and of Lectins from the Clouded Funnel Cap Mushroom, *C. nebularis* (Agaricomycetes): A Review. *Int J Med Mushrooms*, 18(11), 965-975.
- Poon, M.A., O'Connell, M.J., Wieand, H.S., Krook, J.E., Gerstner, J.B., Tschetter, L.K., Levitt, R., Kardinal, C.G., Mailliard, J.A. 1991. Biochemical modulation of

- fluorouracil with leucovorin: confirmatory evidence of improved therapeutic efficacy in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 9(11), 1967-72.
- Puglisi, M.A., Tesori, V., Lattanzi, W., Gasbarrini, G.B., Gasbarrini, A. 2013. Colon cancer stem cells: Controversies and perspectives. *World J Gastroenterol*, 19(20), 2997–3006.
- Redondo-Blanco, S., Fernández, J., Gutiérrez-Del-Río, I., Villar, C.J., Lombó, F. 2017. New Insights toward Colorectal Cancer Chemotherapy Using Natural Bioactive Compounds. *Front Pharmacol*, 14, 8, 109.
- Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., Slíva, D., Vodička, P. 2018. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *Eur J Med Chem*, 144, 582-594.
- Renko, M., Sabotic, J., Mihelic, M., Brzin, J., Kos, J., Turk, D. 2010. Versatile loops in mycocybins inhibit three protease families. *J Biol Chem*, 285(1), 308-16.
- Riss, T.L., Moravec, R.A. 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol*, 2(1), 51-62.
- Sánchez-Martínez, C., Lallena, M.J., Sanfeliciano, S.G., de Dios, A. 2019. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: Recent advances (2015-2019). *Bioorg Med Chem Lett*, 29(20), 126637.
- Sarfraz, A., Rasul, A., Sarfraz, I., Shah, M.A., Hussain, G., Shafiq, N., Masood, M., Adem, Ş., Sarker, S.D., Li, X. 2020. Hispolon: A natural polyphenol and emerging cancer killer by multiple cellular signaling pathways. *Environ Res*, 190, 110017.
- Samuelsson, T. 1991. Interactions of transfer RNA pseudouridine synthases with RNAs substituted with fluorouracil. *Nucleic Acids Res*, 19(22), 6139-44.
- Schnell, F.M. 2003. Chemotherapy-induced nausea and vomiting: the importance of acute antiemetic control. *Oncologist*, 8(2), 187-98.
- Schüller, J., Cassidy, J., Dumont, E., Roos, B., Durston, S., Banken, L., Utoh, M., Mori, K., Weidekamm, E., Reigner, B. 2000. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, 45(4), 291-7.
- Sethy, C., Kundu, C.N. 2021. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. *Biomed Pharmacother*, 137:111285.
- Shimokawa, M., Ohta, Y., Nishikori, S., et al. 2017. Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells. *Nature*, 545, 187–92.
- Singh, S.K., Banerjee, S., Acosta, E.P., Lillard, J.W., Singh, R. 2017. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/ p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget*, 8(10), 17216-17228.
- Singh, C.K., George, J., Ahmad, N. 2013. Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management. *Ann N Y Acad Sci*, 1290(1), 113-21.

- Singh, B.N., Shankar, S., Srivastava, R.K. 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 82(12), 1807-21.
- Song, F., Liu, Y., Kong, X., Chang, W., Song, G. 2013. Progress on Understanding the Anticancer Mechanisms of Medicinal Mushroom: *Inonotus Obliquus*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(3), 1571-8.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249.
- Sesli, E., Denchev, C.M. 2008. Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey. *Mycotaxon*, 106, 65-67.
- The Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330-337.
- Tabernero, J., Yoshino, T., Cohn, A.L., Obermannova, R., Bodoky, G., Garcia-Carbonero, R., Ciuleanu, T.E., Portnoy, D.C., Van Cutsem, E., Grothey, A., Prausová, J., Garcia-Alfonso, P., Yamazaki, K., Clingan, P.R., Lonardi, S., Kim, T.W., Simms, L., Chang, S.C., Nasroulah, F. 2015. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 16(5), 499-508.
- Tao, J., Zhi, X., Tian, Y., Li, Z., Zhu, Y., Wang, W., Xie, K., Tang, J., Zhang, X., Wang, L., Xu, Z. 2014. CEP55 contributes to human gastric carcinoma by regulating cell proliferation. *Tumour Biol*, 35, 4389- 4399.
- TÜİK. 2016. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2016. <https://data.tuik.gov.tr/> Erişim tarihi: 27.04.2017
- TÜİK. 2018. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2018. <https://data.tuik.gov.tr/> Erişim tarihi: 26.04.2019
- Xiang, M. 1999. Advances in anti-cancer drugs for invasion and metastasis. *Chin. Pharmacol. Bull*, 15, 501-504.
- Valverde, M.E., Hernández-Pérez, T., Paredes-López, O. 2015. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *Int J Microbiol*, 2015, 376387.
- Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausová, J., Macarulla, T., Ruff, P., van Hazel, G.A., Moiseyenko, V., Ferry, D., McKendrick, J., Polikoff, J., Tellier, A., Castan, R., Allegra, C. 2021. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol*, 30(28), 3499-506.
- van Triest, B., Pinedo, H.M., van Hensbergen, Y., Smid, K., Telleman, F., Schoenmakers, P.S., van der Wilt, C.L., van Laar, J.A., Noordhuis, P., Jansen, G., Peters, G.J. 1999. Thymidylate synthase level as the main predictive

- parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 5(3), 643-54.
- Venook, A.P., Niedzwiecki, D., Innocenti, F., Fruth, B., et al. 2016. Impact of primary (1°) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology*, 34(15), 3504-3504.
- Venturini, M.E., Rivera, C.S., Gonzalez, C., Blanco, D. 2008. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. *J Food Prot*, 71(8), 1701-6.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36(3), 131-49.
- Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A.M., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Staedel, C., Lesuffleur, T. 2002. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer*, 98(4), 498-504.
- Wang, W., McLeod, H.L., Cassidy, J., Collie-Duguid, E.S.R. 2007. Mechanisms of acquired chemoresistance to 5-fluorouracil and tomudex: thymidylate synthasedependent and independent networks. *Cancer Chemother Pharmacol*, 59(6), 839-45.
- Wang, W., VanAlstyne, P.C., Irons, K.A., Chen, S., Stewart, J.W., Birt, D.F. 2004. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer*, 48(1), 106-14.
- Wasser, S.P., Weis, AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol*, 19(1), 65-96.
- Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(3), 258-74.
- Wasser, S.P. 2002. Review of Medicinal Mushrooms Advances: Good News from Old Allies. *HerbalGram*, 56, 28-33.
- Webber, E.M., Kauffman, T.L., O'Connor, E., Goddard, K.A.B. 2015. Systematic review of the predictive effect of MSI status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy. *BMC Cancer*, 21;15:156.
- Welch, D.R., Hurst, D.R. 2019. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res*, 79(12), 3011-3027.
- Williams, G.H., Stoeber, K. 2012. The cell cycle and cancer. *J Pathol*, 226(2), 352-64.
- Williams, G.H., Stoeber, K. 2007. Cell cycle markers in clinical oncology. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 672-679.

- Wohlhueter, R.M., McIvor, R.S., Plagemann, P.G. 1980. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J Cell Physiol*, 104(3):309-19.
- World Health Organization. 2018. Global Health Observatory. <https://www.who.int/data/gho> Erişim tarihi: 21.06.2018
- Ye, S.F., Hou, Z.Q., Zhong, L.M., Zhang, Q.Q. 2007. Effect of curcumin on the induction of glutathione S-transferases and NADP(H):quinone oxidoreductase and its possible mechanism of action. *Yao Xue Xue Bao*, 42(4), 376-80.
- Yu, M., Tong, X., Qi, B., Qu, H., Dong, S., Yu, B., Zhang, N., Tang, N., Wang, L., Zhang, C. 2014. Berberine enhances chemosensitivity to irinotecan in colon cancer via inhibition of NF- κ B. *Mol Med Rep*, 9(1), 249-54.
- Yu, S., Zhang, W., Yang, J., Zhao, W., Liu, M., Zhao, D., Bai, X., Wang, S. 2020. Herbal formula Renshenwuweizi decoction induces p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. *J Tradit Chin Med*, 40(5), 766-773.
- Zaidman, B., Yassin, M., Mahajna, J., Wasser, S.P. 2005. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67(4), 453-68.
- Zetterberg, A., Larsson, O. 1985. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(16), 5365-9.
- Zhong Y, Krisanapun C, Lee SH, Nualsanit T, Sams C, Peungvicha P, Baek SJ. 2010. Molecular targets of apigenin in colorectal cancer cells: involvement of p21, NAG-1 and p53. *Eur J Cancer*, 46(18), 3365-74.