



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Farmakoloji

Yüksek Lisans Tezi

**CLOSTRİDİUM BOTULİNUM NÖROTOKSİN A'NIN KOLON KANSERİ HÜCRE
HATTINDA KALSİYUM SİNYALİ ARTIŞI ARACILI OKSİDATİF STRES,
APOPTOZİS VE TÜMÖR HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

Sıdıka DEMİR
ORCID: 0000-0002-6956-2218

Danışman
Doç. Dr. İpek DUMAN
ORCID: 0000-0002-0079-6374

İkinci Danışman
Prof. Dr. Mustafa NAZİROĞLU
ORCID: 0000-0003-0887-6974

Bu tez çalışması BAP tarafından 221318004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2024



TEŞEKKÜR

Kendisiyle alıŐma fırsatı vererek, tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, danışman hocam Doç Dr. İpek DUMAN'a,

Kendi laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan, tezimin büyük bölümünde deneyim ve bilgisinden yararlandığım eŐ danışmanım Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na,

Yüksek lisans eğitim sürecinde bilgilerini benimle paylaŐan, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ayşe Saide ŞAHİN'e, Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK'a ve Prof. Dr. Salim Yalçın İNAN'a,

Laboratuvarının kapılarını bana açan BSN Sağlık ve ekibine,

Yüksek Lisans projemizi destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve tüm çalıŐanlarına,

Beni yetiŐtiren, her zaman, her koŐulda, hep yanımda olan, bana her türlü desteği sağlayan, karŐılıksız sevgisi ve emeği ile manevi desteğini her dem yanımda hissetiğim Can'a ve yol arkadaŐlarıma sonsuz teŐekkürlerimi sunuyorum.

Sıdıka DEMİR
Ocak 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TEZ ONAY SAYFASI	vi
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vii
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TABLolar LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Kanser	5
2.2. Kolon Kanseri	6
2.2.1. Kolon kanseri risk faktörleri	6
2.2.2. Kolon kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi	7
2.2.3. Kolon kanserinin sınıflandırılması.....	8
2.2.4. Kolon kanserinin tanı ve tedavi yöntemleri	9
2.3. Apoptoz.....	13
2.4. Kaspazlar	15
2.5. Oksidatif Stres ve Ca ⁺²	17
2.6. TRP Katyon Kanalları	20
2.7. Botulinum Nörotoksin	24
2.7.1. Botulinum nörotoksinin yapısı ve etki mekanizması.....	25
2.7.2. Botulinum nörotoksininin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri	28
2.7.3. Botulinum nörotoksinin kullanım alanları ve yan etkileri	30
2.7.4. Botulinum nörotoksinin kanser hücre hatları üzerinde etkisi	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Araştırmanın Türü.....	37
3.2. Araştırmanın Çalışma Grubu	37
3.3. Çalışmada Kullanılan Materyaller	37
3.3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	37

3.3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri	38
3.3.3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	38
3.4. Çalışmada kullanılan teknikler	40
3.4.1. Hücre kültürü	40
3.4.2. MTT (hücre canlılığı) Tayini	42
3.4.3. Casy Tone cihazı ile hücre sayısı, hücre canlılığı ve ölü hücre miktarının belirlenmesi.....	42
3.4.4. Apoptozis tayini	43
3.4.5. Hücre içi ROS tayini	44
3.4.6. Mitokondriyal membran depolarizasyon tayini	44
3.4.7. Kaspaz -3, kaspaz -8 ve kaspaz -9 tayini	44
3.4.8. Hücre canlılığı oranı belirlenmesi ve görüntülenmesi	45
3.4.9. Hücre içi Ca ⁺² görüntülemesi (Fluo-3 AM).....	45
3.5. Verilerin Toplanması	45
3.6. Sınırlılıklar	46
3.7. Verilerin Analizi	46
4. BULGULAR	47
4.1. Casy Tone Cihazı ve MTT Analiz Sonuçları.....	47
4.1.1. Tümör hücre sayısı, canlılığı ve debris miktarı sonuçları	47
4.2. Kuyucuk Okuyucu Cihazı Analiz Sonuçları.....	49
4.2.1. Apoptozis tayini sonuçları	49
4.2.2. Mitokondriyal membran depolarizasyon tayini ve hücre içi ROS sonuçları	49
4.2.3. Kaspaz -3, kaspaz -8 ve kaspaz -9 tayini sonuçları	50
4.3. Lazer Konfokal Mikroskop Görüntüleme Analiz Sonuçları.....	52
4.3.1 Hücre canlılığı oranı analiz sonuçları	52
4.3.2. [Ca ⁺²]i görüntülemesi (Fluo-3 AM) analiz sonuçları.....	53
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
6.1. Sonuç	61
6.2. Öneriler	62
7. KAYNAKLAR.....	63
8. EKLER	73
8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı.....	73

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **SIDIKA DEMİR**'in “**Clostridium Botulinum Nörotoksin A'nın Kolon Kanseri Hücre Hattında Kalsiyum Sinyali Artışı Aracılı Oksidatif Stres, Apoptozis ve Tümör Hücre Ölümü Üzerindeki Etkileri**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 18.01.2024

Tez Danışmanı Doç Dr. İpek DUMAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Prof. Dr. Ayşe Saide ŞAHİN
Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Prof. Dr. Hülagu BARIŞKANER
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 24.01.2024 tarih ve 02/05 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

“Clostridium Botulinum Nörotoksin A'nın Kolon Kanseri Hücre Hattında Kalsiyum Sinyali Artışı Aracılı Oksidatif Stres, Apoptozis ve Tümör Hücre Ölümü Üzerindeki Etkileri”

başlıklı tez çalışmamın toplam 49 sayfalık kısmına ilişkin, 05.01.2024 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%9** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

05/01/2024

Sıdıka DEMİR

Doç. Dr. İpek DUMAN

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

18.01.2024

Sıdıka DEMİR



SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

°C: santigrat derece

[Ca⁺²]_i: Hücre içi serbest kalsiyum iyonu

Ca⁺²: Kalsiyum iyonu

Na⁺ : Sodyum iyonu

Mg⁺²: Magnezyum iyonu



KISALTMALAR

- ACA: N-(p-amilsinnamoil) antranilik asit
ADP: Adenozin difosfat
ADPR: Adenozin difosforiboz
Bak: Bcl-2 antagonisti/öldürücü
Bax: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl- xL: B hücreli lenfoma-ekstra büyük
Bcl-2: B-hücreli lenfoma gen 2
Bid: BH3 ile etkileşime giren alan ölüm agonisti
Bim: Bcl-2 etkileşimli aracı
BTX-A: Botulinum nörotoksin tip A
CARV: Karvakrol
CC: Kolon kanser
CRC: Kolorektal kanser
cROS: Hücre içi reaktif oksijen türleri
DISC: Ölüm alanı içeren proteinler
DMSO: Dimetil sülfoksit
DR4/DR5: Ölüm reseptörü 4 / Ölüm reseptörü 5
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
DTT: Ditiyotritol
EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit
FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FOLFIRI: 5-fluorourasil, lökovorin, irinotekan
FOLFOX: 5-fluorourasil, lökovorin, oksaliplatin
g: Yer çekimi, gravite
GSH: Glutatyon
GSH-Px: Glutatyon peroksidaz
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HC: Ağır zincir
HCC: Ağır zincir C terminali
HCN: Ağır zincir N terminali
HSA: İnsan serum albümini
IU: İnternasyonal ünite

kDa: Kilodalton
kg: Kilogram
LC: Hafif zincir
LKM: Lazer konfokal mikroskop
Mcl-1: Miyeloid hücreli lösemi-1
mg: Miligram
ml: Mililitre
mM: Milimolar
MMP: Mitokondriyal membran depolarizasyonunu
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NAPs: Nörotoksin ile ilişkili protein
NF κ B: Nükleer faktör-kappa B
nm: Nanometre
NTNH: Toksik olmayan hemaglutinin olmayan
NUDT9-H: Nudix hidrolaz 9 homoloji
p53: Tümör protein 53
PBS: Fosfat tamponlu salin
PTC: Projenitör toksin kompleksi
ROS: Reaktif oksijen türleri
Rpm: Dakikadaki devir sayısı
SMAC: Kaspazın ikinci mitokondri türevli aktivatörü
SNAP-25: Sinaptozomal ile ilişkili protein 25
TNF-R: Tümör nekroz faktörü reseptörleri
TRAIL-R: TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptörleri
TRP: Geçici reseptör potansiyel
TRPA1: Geçici reseptör potansiyel ankyrin-1
TRPM2: Geçici reseptör potansiyel melastatin-2
TRPV1: Geçici reseptör potansiyel vanilloid-1
U: Ünite
UV: Ultraviyole
 μ g: Mikrogram
 μ l: Mikrolitre
 μ M: Mikromolar

TABLULAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Rektum kanserinde TNM evrelemesi.....	9
Tablo 2.2. Hücre içi temel reaktif oksijen türleri.....	17
Tablo 3.1. Hücre kültürü ve çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler.....	37
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri.....	38
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar.....	39
Tablo 4.1. HT29 CC hücre hattına BTX-A uygulanması sonrası kontrol (CNT) grubuna kıyasla elde edilen değerler.....	47



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. TRP kanalları üst ailesi.....	21
Şekil 2.2. Botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın yapısı.....	26
Şekil 2.3. Farklı nörotoksijenik Clostridium spp sınıfları tarafından üretilen botulinum nörotoksini (BTX)'nin serotipleri ve alt tipleri.....	28
Şekil 2.4. Botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın TRPM2 kanal aktivasyonu ve hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) artışı ile tümör hücrelerini öldürmesi üzerinde mümkün olan moleküler mekanizmalar.....	35
Şekil 3.1. Lazer konfokal mikroskop cihazı.....	39
Şekil 3.2. HT29 kolon kanseri hücre hattının ışık mikroskobundaki görüntüleri (40x).....	42
Şekil 3.3. Casy Tone model hücre sayım cihazı.....	43
Şekil 4.1. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, hücre sayısı (A), hücre canlılığı (B) ve ölü hücre artışı (debris) miktarı (C) üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A) inkübasyonlarının etkileri.....	48
Şekil 4.2. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, apoptozis değerleri üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri.....	49
Şekil 4.3. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, JC-1 ve ROS değerleri üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri.....	50
Şekil 4.4. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, kaspaz -3, kaspaz -8 ve kaspaz -9 aktiviteleri üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri.....	51
Şekil 4.5. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, hücre ölümü üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri.....	52
Şekil 4.6. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri.....	53

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Farmakoloji
Yüksek Lisans Tezi

CLOSTRIDIUM BOTULINUM NÖROTOKSİN A'NIN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA KALSİYUM SİNYALİ ARTIŞI ARACILI OKSİDATİF STRES, APOPTOZİS VE TÜMÖR HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Sıdıka DEMİR

Konya-2024

Clostridium botulinum suşları tarafından üretilen bir nörotoksin olan BTX, doğadaki en güçlü biyolojik toksinler arasındadır. Botulinum nörotoksin tip A (BTX-A), nöromusküler kavşaklardan asetilkolin salınımını inhibe ederek, kas gevşemesi ile nöromusküler blokaj üretir ve çeşitli nöromusküler bozukluklarda terapötik kullanım için onaylanmıştır. Kırk yıldan uzun süredir klinik kullanımda olan BTX-A'nın değişik alanlardaki yeni endikasyonları üzerinde halen çalışmalar devam etmektedir.

Botulinum nörotoksin tip A (BTX-A) kanser hücreleri üzerindeki etkilerinden dolayı son zamandaki bazı çalışmalara konu olmuştur. TRPM2 katyon kanalı oksidatif stres ile aktive olan bir kanaldır. BTX-A tedavisi TRPM2 aktivasyonu aracılı hücre içi serbest kalsiyum iyonu ($[Ca^{+2}]_i$) aşırı artışı ve mitokondri membran depolarizasyonu (MMP) artışı ile beraberinde zincirleme olayları başlatmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda BTX-A'nın aşırı $[Ca^{+2}]_i$ artışına neden olarak beyin ve meme kanseri hücreleri ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Fakat yaptığımız literatür taramasında kolon kanser (CC) hücrelerinde BTX-A'nın aşırı $[Ca^{+2}]_i$ artışı aracılı oksidatif stres, apoptozis ve tümör hücresi ölümü üzerindeki etkileri araştırılmamıştır.

Bu tez çalışmasının amacı HT29 CC hücrelerinde, BTX-A'nın, aşırı $[Ca^{+2}]_i$ artışı aracılı oksidatif stres, apoptozis ve tümör hücresi ölümü üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Bu proje kapsamında kontrol HT29 hücreleri ve HT29+BTX-A grupları oluşturulmuştur. Kontrol grubundaki hücreler 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında tutulurken, BTX-A grubundaki hücreler 24 saat süre ile 5 IU/ml BTX-A ile inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla HT29+BTX-A grubunda $[Ca^{+2}]_i$, ölü hücre oranı (propidium iodide/Hoechst), ölü hücre sayısı, debris (ölü artık hücre) miktarı, MMP, apoptozis ve kaspaz düzeylerinde (kaspaz -3, -8 ve -9) artış gözlenirken, hücre canlılığı miktarı ve sayısında azalma gözlenmiştir. TRPM2 kanal blokleri karvakrol inkübasyonu ile bu olayların tersine döndüğü saptanmıştır.

Sonuç olarak, BTX-A tedavisinin TRPM2 kanal aktivasyonu ve $[Ca^{+2}]_i$ artışı ile apoptotik ve oksidan mekanizmaları artırarak HT29 CC hücrelerini öldürdüğü görülmüştür. Bu araştırmanın sonuçları ile birlikte, BTX-A tedavisinin, CC tedavisinde potansiyel bir kaynak olarak daha ileri araştırmalarda incelenmesi literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Clostridium botulinum nörotoksin A, Kaspaz, Kolon kanseri, TRPM2 kanal.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Institute of Health Sciences
Department of Medical Pharmacology
Medical Pharmacology
Master's thesis

THE EFFECTS OF CLOSTRIDIUM BOTULINUM NEUROTOXIN A ON OXIDATIVE STRESS, APOPTOSIS AND TUMOR CELL DEATH MEDIATED BY AN INCREASE IN CALCIUM SIGNALING IN THE COLON CANCER CELL LINE

Sıdıka DEMİR

Konya -2024

BTX, a neurotoxin produced by Clostridium botulinum strains, is among the most potent biological compounds in nature. Botulinum neurotoxin type A (BTX-A) is approved for therapeutic use in muscle relaxation and various types of neuromuscular blockade and various neuromuscular diseases by inhibiting the release of acetylcholine from neuromuscular junctions. Studies are still ongoing on new indications of BTX-A, which has been in clinical use for more than forty years, in different fields.

Botulinum neurotoxin type A (BTX-A) has been the subject of recent studies due to its effects on cancer cells. The TRPM2 cation channel is a channel activated by oxidative stress. BTX-A treatment initiates chain events with an excessive increase in intracellular free calcium ion ($[Ca^{+2}]_i$) mediated by TRPM2 activation and an increase in mitochondrial membrane depolarization (MMP). In recent studies, it has been reported that BTX-A causes an excessive increase in $[Ca^{+2}]_i$, causing the death of brain and breast cancer cells. However, in our literature review, the effects of BTX-A on oxidative stress, apoptosis, and tumor cell death mediated by excessive $[Ca^{+2}]_i$ increase in colon cancer (CC) cells have not been investigated.

This thesis study aims to investigate the effects of BTX-A on oxidative stress, apoptosis, and tumor cell death mediated by excessive $[Ca^{+2}]_i$ increase in HT29 colon cancer cells. Control HT29 cells and HT29+BTX-A groups were formed within the scope of this project. While the cells in the control group were kept in the cell culture medium for 24 hours, the cells in the BTX-A group were incubated with 5 IU/ml of BTX-A for 24 hours. $[Ca^{+2}]_i$, dead cell ratio (propidium iodide/Hoechst), number of dead cells, amount of debris (dead residual cell), MMP, apoptosis and caspase levels (caspase -3, -8 and -9) were observed in the HT29+BTX-A group compared to the control group, while a decrease in the amount and number of cell viability was observed. It has been found that these events are reversed with the incubation of the TRPM2 channel blocker carvacrol.

As a result, it was observed that BTX-A treatment kills HT29 CC cells by increasing apoptotic and oxidant mechanisms with TRPM2 channel activation and $[Ca^{+2}]_i$ increase. Together with the results of this research, the study of BTX-A therapy as a potential source of CC treatment in further research will contribute to the literature

Keywords: Apoptosis, Clostridium botulinum neurotoxin A, Caspase, Colon cancer, TRPM2 channel.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tedavideki büyük ilerlemelere rağmen, kanser önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (Mun ve ark., 2018). Kolon ve/veya rektum kanserini kapsayan kolorektal kanser (CRC), yılda yaklaşık 1.4 milyon yeni teşhis edilen vaka ile dünya çapında en yaygın üçüncü malignitedir (Kreidieh ve ark., 2020). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yan etki riski oldukça yüksek olduğundan bunun önüne geçmek için birçok destekleyici tedaviye başvurulmaktadır. Destekleyici tedavi, kür oranını artırmak amacıyla kemoterapötik dozların artışını mümkün kılmıştır. Ancak, bununla da ciddi toksisiteden kaçınmak mümkün olmamış ve mutlak bir başarı sağlanamamıştır (Keefe ve Bateman, 2019).

Uzun vadeli sağkalım yararları elde etmek için çeşitli moleküler değişiklikleri veya kanser hücrelerini hedefleyen ilaç kombinasyonlarına ihtiyaç vardır (Zugazagoitia ve ark., 2016). Tedavi kombinasyonları sadece etkinlik açısından değil, aynı zamanda ciddi yan etkileri önlemek için toksisite açısından da ele alınmalıdır (Keefe ve Bateman, 2019). Kombinasyon tedavileri, ilaçlara dirençli hale gelen kanser hücrelerini kemo-duyarlı hale getirmek ve tümörlerin tedavisinde ilaçların performansını artırmak için kullanılır. Kombinasyon tedavileri ile sitotoksitenin yükselmesi, apoptozun artışı ve olası bir sinerjistik etki mümkündür (Anwanwan ve ark., 2020). Direkt apoptozu hedefleyen ilaçların, kanser tedavisinde ilaç direnci ile mücadele ettiği düşünülmektedir (Jiang ve ark., 2020; Tun ve ark., 2019).

Otuz yılı aşkın bir süredir, kanser hücrelerinin apoptoz yoluyla etkin bir şekilde ortadan kaldırılmasını destekleyen tedavilerin geliştirilmesi klinik onkolojinin hedefleri arasındadır. Bu programlanmış hücre ölümü sürecine, hücresel stres, DNA hasarı ve bağışıklık sistemi dahil olmak üzere birçok faktör tarafından tetiklenen birkaç sinyal yolu aracılık eder. Apoptoz yollarının diğer sinyal mekanizmalarıyla etkileşimi de hücre ölümünü etkileyebilir. Etkili proapoptotik ilaç keşif çalışmaları, biyoyararlanım, stabilite, tümör penetrasyonu, malign olmayan dokulardaki toksisite profili, ilaç etkileşimleri, ilaç yan etkileri ve ayrıca tümör biyolojisinin anlaşılmasını içerir (Carneiro ve El-Deiry, 2020).

Keşfedilecek yeni ilaçların kanser tedavisindeki başarısı, normal hücrelere karşı daha düşük toksisite ile bağlantılı olarak kanser hücrelerine yönelik spesifik toksisite göstermesi ile ölçülmelidir. Kanser tedavisinde hücre ölümü aktivasyonunu devreye sokmak için, hücre ölüm yolunu tetikleyen, tümör baskılayıcı yolları hedefleyen, direkt tümörü hedef alan stratejiler umut verici bulunmaktadır ve kanserin tedavi edilmesi için apoptozun uyarılması, mitotik aktivitenin engellenmesi mantıklı bir hedef olarak düşünülmektedir (Carneiro ve El-Deiry,

2020; Pistritto ve ark., 2016). Bazı çalışmalar botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın apoptoza katkısını ortaya çıkartmıştır (Shebl, 2019; Bandala ve ark., 2015; Bandala ve ark., 2013). Botulinum toksin (BTX)'lerin farklı kanser hücre hatları üzerindeki spesifik toksisite, antimitotik ve proapoptotik etkilerinin, kullandığı mekanizma ve yolların ortaya çıkarılması için daha fazla in vivo ve in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır.

Doğrudan apoptotik yolları hedefleyen ilaçların geliştirilmesi, tedavisi zor tümörlerde tümör gerilemesine yol açabilir ve bu ilaçların, onkojenik sağkalım yollarını hedefleyen ajanlarla, immünoterapi ve klasik kemoterapi ve radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanılması alternatif bir tedavi sunabilir (Carneiro ve El-Deiry, 2020). BTX'in, tümör büyümesini inhibe etme ve neoplastik hücrelerin apoptozunu destekleme yeteneğine sahip olduğu in vitro prostat (Shebl, 2019; Karsenty ve ark., 2009), meme (Bandala ve ark., 2013), kolon hücre hatlarında (Shebl, 2019) ve rat pankreas hücrelerindeki (He ve ark., 2016) çalışmalar ile desteklenmiş ve potansiyel kanser önleyici yönleri araştırmalara konu olmuştur (Grenda ve ark., 2022; Ulloa ve ark., 2015; Nam ve ark., 2012; Vezdrevanis, 2011; Ansiaux ve Gallez, 2007).

Birçok hayati faaliyetlerimizin gerçekleşmesi için hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) artışına ihtiyaç vardır. Kanser tedavisinde kullanılan birçok kimyasal (örneğin: rituksimab) hücre içi Ca^{+2} miktarını artırarak apoptozis oluşumu ve tümör hücre ölümüne neden olmaktadır (Latour ve ark., 2019). BTX-A, doğal olarak bulunan en güçlü toksik maddelerden biri olmasına rağmen, uygun şekilde hazırlandığında kanser hücreleri üzerindeki etkilerinden dolayı son zamanlarda bazı çalışmalara konu olmuştur. BTX-A tedavisi hücre içi aşırı Ca^{+2} ve mitokondriyal membran depolarizasyonu (MMP) artışı ile beraberinde zincirleme olayları başlatmaktadır (Akpınar ve ark., 2020). Bu zincirleme olaylar beyin tümör hücrelerinde ve meme kanser hücrelerinde araştırılmış olmasına rağmen, kolon kanser (CC) hücrelerinde yapılmış bir çalışma henüz yoktur. BTX-A'nın, ağrı ve nöromüsküler bozukluklara karşı terapötik etkilerine ek olarak, geçici reseptör potansiyel (TRP) melastatin 2 (TRPM2) kanal aracılığıyla mitokondri reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretimini aktive ettiği ve böylece nöroblastoma ve glioblastoma tümör hücrelerinin ölümüne neden olduğu ortaya konmuştur (Martinelli ve ark., 2020; Akpınar ve ark., 2020). Elde edilen sonuçlar, tümör tedavisinde BTX-A kullanımı için umut vericidir; ancak bu sonuçları doğrulamak için daha fazla çalışma gereklidir.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda BTX-A'nın aşırı hücre içi serbest kalsiyum iyonu ($[Ca^{+2}]_i$) artışına neden olarak beyin ve meme kanseri hücreleri ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Fakat yaptığımız literatür taramasında BTX-A'nın, TRPM2 aracılı aşırı $[Ca^{+2}]_i$ artışı ile oksidatif stres, apoptozis ve tümör hücresi ölümü üzerindeki etkileri CC hücrelerinde araştırılmamıştır.

Yaptığımız çalışmada; Clostridium botulinum suşları tarafından üretilen BTX-A'nın insan CC hücre hattında (HT29), $[Ca^{+2}]_i$ artışı aracılı oksidatif stres, apoptozis ve tümör hücresi ölümü üzerine olan etkileri moleküler tekniklerle araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında, HT29 CC hücre hatları kültürüne BTX-A eklenmesinin hücre proliferasyonuna, mitokondriyal oksidatif stres ürünleri ve bunun sonucunda apoptozis ve tümör hücre ölümüne etkileri değerlendirilmiştir. BTX-A'nın CC hücreleri üzerindeki göstermiş olduğu spesifik toksisite, antimitotik ve proapoptotik etkileri tedavide karşılaşılan sorunlara çözüm getirecek bir yaklaşım sunması açısından, mevcut çalışmalardaki eksikliğin giderilmesine katkıda bulunması açısından önemlidir.

Çalışmamızın sonucu ile CC tedavisindeki ekonomik ve sosyal yararların yanı sıra, potansiyel bir kaynak olarak daha ileri çalışmalara katkı sağlanması ve çalışmamız yayın haline getirilerek literatüre kazandırılması amaçlanmaktadır. $[Ca^{+2}]_i$ artışının mitokondri zar depolarizasyonu artışı, oksidatif stres ve apoptotik yolları tetikleyerek kanser hücre ölümünde rol oynadığı gösterilmiştir ve elde edilen bu veriler ile kanser hastalığına yönelik tedavi yaklaşımlarına yeni katkılar önerilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, dünya çapında en ölümcül ikinci hastalıktır (Khan ve ark., 2022). Kanser, hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm ölümlerin %21'ini oluşturmaktadır ve kalp hastalıklarından sonra ikinci önde gelen ölüm nedenidir; bununla birlikte, 40-79 yaş arası kadınlar ve 60-79 yaş arası erkekler arasında ölüm nedeni olarak öne çıkmaktadır (Siegel ve ark., 2022). En sık görülen kanserler ülkeler arasında farklılık göstermektedir (World Health Organization, 2023).

Kanser ülkemizde de dünyada olduğu gibi ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Küresel olarak yaklaşık her 6 ölümden biri, ülkemizde ise her 5 ölümden biri kanser nedeniyledir (World Health Organization, 2023; T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı, 2023).

Hücrelerin proliferasyonu ve apoptoz arasındaki dengenin, tümörijenik ve metastatik bir duruma ilerlemesi, çoklu anahtar sinyal proteinlerinde mutasyonların birikmesini ve daha agresif hücre fenotiplerinin evrimini ve klonal seçimini içerir. Bu olaylar, birçok proteinin ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkilidir. Bu tümörijenez süreci, kanserin doğasına bağlı olarak bir veya daha fazla TRP proteininin değiştirilmiş ekspresyonunu içermektedir (Prevarskaya ve ark., 2007).

Kansere bağlı ölümlerin %90'ından fazlası metastatik hastalıktan kaynaklanmaktadır. Metastaz, normal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalan onkojenik hücrelere dönüştüğü, bağışıklık sisteminden kaçan, programlanmış hücre ölümüne karşı dirençli hale gelen, anjiyogenezi uyaran, kan dolaşımında hayatta kalan ve uzak organlarda kanserli oluşumlara yol açan, dinamik ve çok yönlü bir süreçtir. Lokalize hastalığı olan hastalar, genellikle metastatik hastalar için mevcut olan sınırlı tedavi seçeneklerinden daha düşük toksisiteye sahip çeşitli tedavi seçeneklerine sahiptir. Metastatik kanser için ilk tedavi yöntemi sistemik kemoterapidir ancak hastalar genellikle organ yetmezliği ve yüksek enfeksiyon oranları gibi ciddi yan etkilere maruz kalmaktadır. Kanser tedavilerindeki son gelişmeler, metastatik kanser için daha az toksik tedavilere olanak vermektedir. Bunlar arasında, immünoterapiler (örneğin, pembrolizumab ve margetuximab-cmkb), epigenom değiştirici ajanlar (örneğin, azasitidin) ve ilaç konjugatları (örneğin, sacituzumab ve govitecan) ile hastalara daha yüksek bir yaşam kalitesi sunabilen, yaşam süresini uzatabilen yeni cerrahi rezeksiyon teknikleri yer almaktadır. Ancak bu tedavilerin metastatik yayılım üzerinde minimal etkileri vardır ve hastalık bir süre sonra nüks eder ve ilerler. Kanseri etkili bir şekilde hedef alan

yeni tedaviler geliştirmenin önünde, kanserin mekanizmasının tam anlamıyla aydınlatılmamış olması büyük bir engel teşkil etmektedir (Castaneda ve ark., 2022; Miller ve ark., 2019).

Kanser tedavisinde sitotoksik ajanlara direnç ve kemoterapi toksisitesi gibi birçok sorun vardır. Onkojenlerin moleküler hedefleri, tümör baskılayıcı genler ve RNA girişimi üzerinde çalışılarak yeni kanser tedavileri genişletilir. Bu tedavilerin amaçları arasında: 1. Hücre çoğalmasında rol oynayan kinaz inhibisyonu, 2. Kanserde hızlı bağışıklık tepkilerinin iyileştirilmesi, 3. İlaçlar konusunda uzmanlaşmak, 4. Kanser hücrelerine ilaç verilmesi ve 5. antikanser ilaçların yan etkilerinin azaltılması yer alır. İlacın inaktivasyonu, çoklu ilaç direnci, hücre ölümünün engellenmesi (apoptoz baskılanması), ilaç metabolizmasındaki değişiklikler, epigenetik ve ilaç hedefleri, DNA onarımının artırılması ve kemoterapiye dirence neden olan gen amplifikasyonu gibi çeşitli karşıt mekanizmalar da vardır (Mansoori ve ark., 2017).

2.2. Kolon Kanseri

Vücudun sindirim sisteminin bir parçası olan kolon ve/veya rektumda meydana gelen ve kolondaki normal glandüler epitel hücrelerinin yapısının ve fonksiyonunun çeşitli genetik ve fenotipik değişimler ile bozulması sonucu ortaya çıkan kanser türüne kolon kanseri (CC) (CRC, rektum kanseri veya bağırsak kanseri olarak da bilinir) denir. Kolonda meydana gelen bu bozulmalar düzeltilemez/tedavi edilemezse anormal hücre proliferasyonu ve tümör oluşumuna yol açarak CC'ye neden olmaktadır. Daha sonra lenf sistemine ve diğer organlara metastaz yapar (Hossain ve ark., 2022; Peterson, 2014; Calvert ve Frucht, 2002).

CC, karaciğer, akciğer, overler ve diğer mide-bağırsak organları da dahil olmak üzere vücudun farklı bölgelerine yayılma potansiyeli olan en tehlikeli kanser türlerinden biridir (Kuppusamy ve ark., 2014). Çoğu mutant DNA ile sonuçlanan anormal hücrel moleküler değişikliklerin bir sonucu olarak gelişir ve ilerler (Carethers, 2014).

2.2.1. Kolon kanseri risk faktörleri

Yüksek yağ, yüksek et, düşük lifli dengesiz bir diyetle, protein fermantasyonunun proinflatuar ve proneoplastik özellikleri ve safra asidi dekonjuge kalıntıları baskındır ve bu da CC riskinin artmasına neden olur (O'Keefe, 2016).

Sigara, sağlıksız beslenme, fiziksel aktivite azlığı gibi davranışsal ve diyetel etmenler ve hava kirliliği gibi çevresel karsinojenlere maruziyet kanser riskini arttırmaktadır. Gelir ve eğitim durumu, yaşanan bölge, yaş, cinsiyet, etnik köken, ırk gibi nedenlerle ayrımcılığa uğrama, sağlık hizmetine erişim, savaşlar, göçler kanser bakımını etkileyen diğer faktörlerden

bazılarıdır (İstanbul Tabip Odası, 2023). Yaşam tarzı ve diyetle ilgili faktörler de CC gelişimine katkıda bulunur (Mishra ve ark., 2013). Birinci derece akrabalarda CRC öyküsü varsa, risk genel popülasyona göre iki kattan fazla artmaktadır (Thanikachalam ve Khan, 2019).

CRC'le ilişkili olan durumlar arasında;

- Afro-Amerikan etnik köken
- Erkek cinsiyeti
- İnflamatuvar Bağırsak hastalığı-Crohn hastalığı
- Ülseratif kolit
- Üreterokolik anastomoz
- Hareketsiz yaşam tarzı
- Kırmızı et ve işlenmiş et
- Tütün kullanımı
- Alkol kullanımı
- Abdominal radyasyon öyküsü
- Akromegali
- Diabetes Mellitus ve insülin direnci
- Androjen yoksunluğu tedavisi
- Kolesistektomi
- Koroner arter hastalığı
- Obezite sayılmaktadır (Thanikachalam ve Khan 2019).

2.2.2. Kolon kanserinin epidemiyolojisi ve etiyojisi

CRC, yılda yaklaşık 1,4 milyon yeni teşhis edilen vaka ile dünya çapında en yaygın üçüncü malignitedir ve en yüksek yaygınlık Siyah Alaska yerlilerinde ve en düşük yaygınlık Asya/Pasifik Adalılarında görülür. (Khan ve ark., 2022; Kreidieh ve ark., 2020). Yüksek morbidite ve ölüm oranı ile dünyada en sık görülen malignitelerden biridir (Liu ve ark., 2022).

CC, dünya çapında en sık teşhis edilen gastrointestinal sistem kanserlerinden biridir (Chen, ve Shen, 2020) Amerika'da CC, meme ve akciğer kanserinin ardından üçüncü en yüksek insidansa sahiptir ve akciğer kanserinden sonra ikinci önde gelen ölüm nedenidir (World Health Organization, 2023). Kolektomi, kemoterapi ve immünoterapi dahil olmak üzere tedavilerdeki gelişmeler nedeniyle, CC hastaları için genel 5 yıllık göreceli sağkalım oranı yaklaşık %64'tür (Chen ve Shen, 2020).

Kolon ve rektal kanser ölümleri genelde birleştirilir çünkü rektum kanserinden kaynaklanan çok sayıda ölüm yanlış bir şekilde kolon olarak sınıflandırılmıştır (Siegel ve ark., 2022).

CRC insidansı 45-50 yaşlarına kadar düşüktür, ancak yaşla birlikte giderek artar ve erkekler kadınlara göre daha fazla risk altındadır (Tarraga ve ark., 2014). Türkiye'de CRC hem kadınlarda hem de erkeklerde üçüncü sıradaki yerini muhafaza etmektedir. Sıklığı erkeklerde yüz binde 24,8 iken kadınlarda yüz binde 14,7'dir. Bir yılda yaklaşık 18.750 kişiye CRC teşhisi

konulmuştur (T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı, 2023).

Kanser ölümlerindeki düşüş hızı, 1990'ların sonlarında yılda yaklaşık %1'den 2000'lerde yılda %1,5'e ve 2015'ten 2019'a kadar yılda %2'ye yavaş yavaş yükselmiştir. Genel ölüm eğilimlerinde, sağ kalımı uzatan erken teşhis ve tedavi ilerlemeleri nedeniyle son yıllarda düşüşlerin hızlandığı verilerle ortaya konulmuştur (Siegel ve ark., 2022).

2.2.3. Kolon kanserinin sınıflandırılması

CRC'nin sporadik, kalıtsal ve kolitle ilişkili olmak üzere üç ana türü vardır (Hossain ve ark., 2022). Birçok CC türü olmasına rağmen (örneğin; leiomyosarkom, lenfoma, melanom, nöroendokrin tümörler) en yaygın olanları adenokarsinomlardır (Peterson, 2014).

CRC için en sık kullanılan evreleme sistemi, 3 temel bilgiye dayanan Amerikan Kanser Derneği TNM (primer tümör boyutu (T), bölgesel lenf nodu (N) ve uzak metastaz (M) sistemidir:

- Tümörün boyutu (T): Kanser kolon veya rektum duvarına ne kadar yayılmış? Bu katmanlar içten dışa doğru şunları içerir:
 - Neredeyse tüm CRC'nin başladığı mukoza tabakası, buna ince bir kas tabakası (muscularis mukoza) da dahildir
 - Bu kas tabakasının altındaki fibröz doku (submukoza)
 - Kalın bir kas tabakası (muscularis propria)
 - Bağ dokusunun ince, en dış katmanları (subseroza ve seroza) kolonun çoğunu kaplar ancak rektumu kapsamaz
- Yakındaki lenf düğümlerine yayılma (N): Kanser yakındaki lenf düğümlerine yayıldı mı?
- Uzak bölgelere yayılma (metastaz) (M): Kanser uzak lenf düğümlerine veya karaciğer, akciğer gibi uzak organlara yayıldı mı?

Ocak 2018'den itibaren geçerli olan en yeni Amerikan Kanser Derneği sistemi: T, N ve M'den sonraki sayılar veya harfler bu faktörlerin her biri hakkında daha fazla ayrıntı sağlar (Tablo 2.1.). Daha yüksek sayılar kanserin daha ilerlemiş olduğu anlamına gelir. Bir kişinin T, N ve M kategorileri belirlendikten sonra bu bilgiler, genel bir aşamayı belirlemek için aşama gruplaması adı verilen bir süreçte birleştirilir (American Cancer Society, 2023)

Tablo 2.1. Rektum kanserinde TNM evrelemesi

EVRE	TANIM
TÜMÖR	
T1	Tümör submukozayı istila etmiş
T2	Tümör muskularis propriayı tutuyor ancak onu geçmiyor
T3	Tümör muskularis proprianın ötesine mezorektal veya perikolik yağ dokusuna uzanıyor
T4	Tümör komşu organları istila eder veya viseral peritonu deler
NODÜL	
N0	Nodal metastaz yok
N1	1-3 perirektal veya perikolik düğüm
N2	4 veya daha fazla perirektal veya perikolik düğüm
METASTAZ	
MX	Değerlendirilemiyor
M0	Metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Primer tümör boyutu (T), bölgesel lenf nodu (N) ve uzak metastaz (M) (Gowdra Halappa ve ark., 2012).

Aşama gruplaması çoğu kanser türünde olduğu gibi CC'de de beş farklı evreden oluşmaktadır: 0, I, II, III ve IV. Kanserin evresi bize kanserin yerini ve boyutunu, yakındaki dokularda ne kadar büyüdüğünü, yakındaki lenf düğümlerine veya vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmadığını belirtmekte ve kanser belirteçlerinin varlığını etkilemektedir. En erken evre CRC'ye evre 0 (çok erken kanser) adı verilir ve daha sonra evre I (1) ile IV (4) arasında değişir. Kural olarak sayı ne kadar düşük olursa kanser o kadar az yayılmıştır. Evre IV gibi daha yüksek bir sayı, kanserin daha fazla yayıldığı anlamına gelir (American Cancer Society, 2023).

2.2.4. Kolon kanserinin tanı ve tedavi yöntemleri

Tüm dünyada kanserin erken teşhisi ve tedavisi genellikle bireyin hayatta kalma şansını artırmaktadır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde, özellikle kırsal alanlarda, çoğu insan için etkili ve modern tanı yöntemlerine ve tesislerine erişim genellikle sınırlıdır (Aiello ve ark., 2019).

CRC ne kadar erken tespit edilirse hastanın hayatta kalma şansı o kadar fazla olur. Dolayısıyla tedavi, adenom-karsinom yolu boyunca yapılan müdahalelerden olumlu yönde etkilenir (Hossain ve ark., 2022). Kanser oluşumuna neden olan risk faktörlerinden kaçınarak kanserlerin %40-50'si önlenabilir, erken tanı ve doğru tedaviyle %65'i tedavi edilebilir. Dünya kanser epidemisi ile mücadele çok yönlüdür. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tüm kanserlerin %80'ini doğrudan ve dolaylı çevresel faktörlerle ilişkilendirmektedir. Bu nedenle, çevresel faktörlerin kontrolü ve koşulların iyileştirilmesi; kanser ve kanser ölümlerinin kontrol edilmesinde önemlidir (İstanbul Tabip Odası, 2023). Kanser insidansı ve ölüm oranlarındaki düşüğe rağmen, yeni kanser ve kansere bağlı ölüm vakalarının toplam sayısı giderek artmaktadır (Anaya ve ark., 2011).

Kolonoskopi, CRC'yi teşhis etmek için tercih edilen yöntem olmaya devam etmektedir. Herhangi bir tedaviden önce, hastanın CRC'sini evrelemek için göğüs, karın ve pelvisin kontrastlı BT (bilgisayarlı tomografi) görüntülemesi gereklidir. Evreleme yaygın olarak TNM sınıflandırma sistemi kullanılarak yapılır. Karsinoembriyonik antijen seviyeleri gibi tümör belirteç seviyeleri CRC'de yükselebilsede, CRC için teşhis edici değildir. Karsinoembriyonik antijen seviyeleri daha çok tedavi sonrası takipte ve sürveyans için bir izleme aracı olarak kullanılmaktadır. Karaciğer metastazı olan hastalarda anormal olan en yaygın laboratuvar parametresi, yüksek alkalin fosfataz seviyesidir. Arka planda karaciğer hastalığı olan hastalarda, karaciğer metastazlarının teşhisinde, kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme daha fazla doğruluk sağlayabilir (Thanikachalam ve Khan, 2019).

Kanser tedavisinin amacı, kanseri vücudun geri kalan kısmına zarar vermeden tamamen yok etmektir. Tedavi seçimi hastanın durumuna, kanserin yeri ve evresine bağlıdır (Mishra ve ark., 2013). Bununla birlikte, CRC'yi önlemenin ve toplum genelinde CRC'ye bağlı ölümleri azaltmanın en etkili yöntemi, ortalama riskli bireylerin taranmasıdır. Bu nedenle çoğu Avrupa ülkesi, Kanada, Kuzey ve Güney Amerika'nın belirli bölgeleri, Asya ve Okyanusya nüfusa dayalı tarama programları başlatmıştır (Hossain ve ark., 2022).

Kemoterapiye direnç kazanma riski, başta CC olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisinde önemli bir engel olmaya devam etmektedir. CRC ile ilgili olarak, uyumsuzluk onarımındaki kusurlar ve değiştirilmiş tümör protein 53 (p53) aracılı DNA hasar sinyali, direnç fenotipini kontrol eden ana faktörlerdir. Özellikle, p53 inaktivasyonu, kemorezistans ve kötü prognoz ile ilişkili görünmektedir (Khan ve ark., 2022; Köberle ve Schoch, 2021).

CC tedavisinin birçok bilimsel ve alternatif yöntemi bulunmaktadır. Tedavi denemeleri, hastalarda kanserin hangi aşamada tespit edildiğine ve hastaların yaşına bağlı olarak (yaşlılar için sonuçlar genç hastalara kıyasla daha kötü olmaktadır) daha yüksek veya daha düşük etkinlik göstermektedir (Mishra ve ark., 2013). Bununla birlikte, yaşlı hastalar için standart bakım tedavisi, genç popülasyonda gözlemlenenlere eşdeğer uzun vadeli sonuçlara yol açar; mevcut veriler, iyi seçilmiş hastalarda agresif cerrahi ve adjuvan tedavilerin kullanımını desteklemektedir (Anaya ve ark., 2011).

Kanser için standart tedavi genellikle radyoterapi, kemoterapi ve cerrahiye dayanır. Bu tedavilerin dışında, kanser ilerlemesinin tedavisi ve kontrolü için antianjiyojenik ajanlar da kullanılmaktadır. DSÖ, dünya nüfusunun yaklaşık %80'inin geleneksel tedavileri kullandığını

ileri sürmüştür. Bu tedavilerden biri de fitomedikal olarak da bilinen fitoterapi, yani bitkilerin veya bitki özlerinin karışımlarının hastalıkların tedavisinde kullanılmasıdır. Genel olarak sonuçlar üzüm, soya fasulyesi, yeşil çay, sarımsak, zeytin ve narın CC'ye karşı en etkili bitkiler olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalarda in vitro ve in vivo çalışmalar için meyveler, tohumlar, yapraklar ve bitki kökleri kullanılmıştır (Aiello ve ark., 2019). Bu anlamda, doğal kaynaklardan geliştirilen yeni antikanser ilaçlar, geleneksel kemoterapötik ilaçların etkinliğini artırabilir (Liberio ve ark., 2013). Şu anda dünyadaki birçok araştırmacı, genellikle zehirli olan bileşiklerin antikanser özellik gösterdiğini ortaya çıkartmıştır (Liu ve ark., 2014).

CC tanısı anında yaklaşık %80'i lokalize, %20'si ise uzak bölgelere metastaz yapmıştır. Lokal olanlarda hem kolon hem de rektal kanserler için cerrahi rezeksiyon tek küratif seçenek olmaya devam etmektedir. Klinik olarak gizli mikro metastaz, potansiyel olarak ameliyat bölgesinde meydana gelebilir ve adjuvan kemoterapi, mikro metastazların yok edilmesine yardımcı olur. Lokal ileri CRC'ler için bazen neoadjuvan kemoterapi endikedir. Lenf düğümlerini (Evre III ve üstü) veya uzak bölgeleri tutan CC için kemoterapi, adjuvan veya palyatif ortamda endikedir. Lokal olarak ilerlemiş rektal kanser için cerrahi olarak çıkarıldıktan sonra sıklıkla kemoradyasyon gerekir. Pembrolizumab ile immünoterapi, metastatik CRC için de bir seçenektir (Thanikachalam ve Khan, 2019).

Evre 0 ila III için tedavi tipik olarak ameliyatı içerirken, evre IV ve tekrarlayan CC'nin tedavisi, hem cerrahiye hem de kemoterapiye dayanmaktadır. Kanser evresine ve hasta özelliklerine bağlı olarak, CRC'nin tedavisi için çeşitli kemoterapötik ilaçlar ve diyetler önerilmiştir. Bu ilaçlar arasında neoadjuvan tedavilerin temelinde yer alan 5-florourasil ve lökovorin ile oksaliplatin (FOLFOX) veya irinotekan (FOLFIRI), bevasizumab, panitumumab veya setuksimab ile birlikte kullanılmaktadır. Kemoterapinin yan etkileri, sağlıklı hücreler hasar gördüğünde ortaya çıkar. Bu yan etkiler arasında yorgunluk, baş ağrısı, miyalji, mide ağrısı, diyare ve kusma, boğaz ağrısı, kan anormallikleri, konstipasyon, sinir sisteminde hasar, bellek sorunları, iştahsızlık ve alöpesi sayılabilir (Neugut ve ark., 2019 ; Aiello ve ark., 2019).

Platin türevi ilaçlar DNA hasarına yanıt olarak hücrelerde, ya hücre döngüsü durmasını indükleyen ve dolayısıyla DNA onarımını kolaylaştıran ya da apoptozu ve dolayısıyla hücre ölümünü tetikleyen çeşitli sinyal iletim yollarını aktive eder. DNA hasar yanıtının merkezinde aktive edilen tümör baskılayıcı protein p53 vardır. Tümör baskılayıcı protein p53, hücre döngüsü durması / DNA onarımı veya apoptoz gibi aşağı akış olaylarını kontrol eder. CRC'de, p53 hasar sinyalinin bozulması ilaç direncinin altında yatan ana etmenlerden biri olarak

görülmektedir. CRC gibi sisplatine yanıt vermeyen kanserlerde platin bazlı kemoterapinin iyileştirilmesi, yanıt vermeyen tümör hücrelerinde aktiviteyi koruyan yeni tasarlanmış sisplatin analogları ile sağlanabilir. Dahası, sisplatinin DNA hasar sinyalinin biyokimyasal modülatörleri ile kombinasyonu, sisplatine dirençli tümör hücrelerini ilaca duyarlı hale getirebilir ve böylece kanser tedavisini iyileştirmek için başka bir strateji sağlayabilir (Köberle ve Schoch, 2021; Yuan ve ark., 2021; Martin ve ark., 2008).

Aiello ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmayla tıbbi bitkilerin, in vivo modeller üzerinde potansiyel olarak CC hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engelleyebildiği gösterilmiştir. Birçok çalışmanın in vivo modellerine rağmen, çalışmalar arasında nadiren klinik denemeler bulunmaktadır. Aslında, bitkisel bileşiklerin saflaştırılması ve bunların etkinliğinin uygun in vivo modellerde ve ayrıca klinik araştırmalarda gösterilmesi, CC'yi kontrol altına alma ve tedavi etmenin alternatif ve etkili bir yolu olduğunu göstermektedir (Aiello ve ark., 2019).

Doğal toksinler olarak da bilinen biyotoksinerler, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen toksik maddeleri içerir. Biyotoksinerler, farmakolojik olarak aktif yeni bileşiklerin tasarımında araştırmacıların dikkatini çeken birçok kimyasal maddenin doğal bir kaynağı olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir dizi çalışmayla, yılan zehri, arı zehri, bazı bakteri toksinleri ve bitki toksinleri gibi biyotoksinerlerin antitümör ajan olarak büyük bir potansiyel oluşturduğu ve bu nedenle tümörlere karşı kemoterapötik ajanlar olarak kullanılabileceğine dair kanıtlar ortaya konmuştur (Shebl, 2019; Liu ve ark., 2014). Birçok biyotoksiner antitümör aktiviteye sahiptir; bazıları tümör hücrelerini doğrudan öldürür, bazıları tümör anjiyogenezini ve tümör büyümesini inhibe eder (Orsolice, 2012; Jain ve Kumar, 2012). Anaerobik spor oluşturan gram-pozitif Clostridium botulinum tarafından üretilen BTX bu toksinlerden biridir (Shebl, 2019).

Nutrasötiklerin CC riskini azaltma ve ilerlemesini yavaşlatma potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Nutrasötikler, CC ilerlemesini kontrol etmek için alternatif terapötik ajanlardır. Nutrasötikler şifalı bitkiler, deniz organizmaları, sebzeler ve meyveler gibi çeşitli doğal kaynaklardan elde edilir. Bu diyet maddeleri CC hücrelerinde normal metabolik fonksiyonu uyarır ve tümör baskılayıcı genleri ve bağışıklığı düzenler. Bu doğal ürünler, CC hücresindeki metabolik enzimlerin ve tümör büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonunu kontrol eder (Kuppusamy ve ark., 2014).

Çevresel faktörler ve beslenme alışkanlıkları; kolonik bakteri ve laktobasil konsantrasyonunu değiştirebilir, polip ve kötü huylu tümör oluşumuna yol açabilir. Bu nedenle probiyotik alımı, kanser hücresi gelişimini önleyebilir (Kuppusamy ve ark., 2014).

2.3. Apoptoz

Yunanca 'düşen yapraklar' anlamına gelen apoptoz terimi, ilk olarak 1972'de çok hücreli organizmalarda meydana gelen bir tür doğal hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (Giorgi ve ark., 2012). Apoptoz, hücrenin nihai ölümüne bağlanan karmaşık bir olaylar dizisini içeren koordineli ve genellikle enerjiye bağlı bir süreçtir (Elmore, 2007).

İnsan vücudu her gün 10 ila 100 milyar hücre üretir ve aynı sayıda hücre vücudumuzdaki homeostaziyi korumak için ölür. Fizyolojik koşullar altında meydana gelen hücre ölümü, doku homeostazisini koruyan, istenmeyen veya hasar görmüş hücreleri uzaklaştıran ve daha fazla büyüme ve farklılaşmayı teşvik eden hücresel bileşenlerin geri dönüşümünü sağlayan temel bir süreçtir (Nagata, 2018; Shalini ve ark., 2015).

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, bir hücre ölüm şeklidir (Karnak ve Xu, 2010). Programlanmış hücre ölümü kaspaza bağımlı ve kaspaza bağımlı olmayan olmak üzere iki genel türe ayrılır. Apoptoz, kaspaza bağımlı programlanmış hücre ölümünün en tipik biçimlerinden biridir (Tian ve ark., 2019); mitokondriyal/içsel ve reseptör aracılı/dışsal yollar olmak üzere iki aktivasyon mekanizması içerir. Hücre plazma zarı reseptörleri, apoptozun reseptör aracılı yolağında önemli bir role sahipken; mitokondri, mitokondriyal yolağında merkezi bir role sahiptir (Kahya ve ark., 2017).

Dış uyaranlar, farklı hücrelerin yüzeyinde bulunan Fas reseptörleri (Fas reseptörü), ölüm reseptörü 4/5 (DR4 / DR5), tümör nekroz faktör reseptörleri (TNF-R) ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptörleri (TRAIL-R) dahil olmak üzere ölüm reseptörleri yoluyla apoptozun dışsal yoluna aracılık eder. Hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri spesifik ligandlarıyla etkileşime girer (Kashyap ve ark., 2021).

Apoptozu başlatan içsel (mitokondriyal) sinyal yolu; mitokondriyal olarak başlatılan, hücre içi çeşitli sinyalleri üreten, doğrudan hücre içindeki hedeflere etki eden ve reseptör aracılı olmayan uyaranları içerir (Elmore, 2007). Mitokondriyal membran üzerinde bulunan, B hücreli lenfoma gen 2 (Bcl-2) protein aile üyeleri apoptozun mitokondriyal yolunun önemli düzenleyicileridir. Bu protein ailesi hem Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik molekülleri hem de Bax, Bak, Bim, Bid ve Bad gibi pro-apoptotik molekülleri içermektedir. Bu proteinler

esas olarak mitokondriyal dış membrandaki apoptozu düzenler ve mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin başlatılmasını kontrol eder (Karnak ve Xu, 2010; Kashyap ve ark., 2021). Her iki yol da, proteinleri ayırarak gözetmeksizin parçalayarak hücre ölümüne neden olan kaspazları aktive eder (Sun ve ark., 2023). Bax ve Bak'ın aktivasyonu her iki yolda mümkündür. Aşağı akış proteinleri (Bax, Bak) aktivatördür ve bir kez devreye girdiğinde hücreyi apoptoza sürükler. Bax proteinlerinin aktivasyonunun ardından mitokondriyal sitokrom c salınır, kaspaz aktivasyonu başlar bunun sonucunda hücresel bozulma meydana gelir (Zielinski ve ark., 2013).

Apoptoz, hastalık seyrinden sonra bağışıklık tepkilerinde ve hasarlı hücrelerin yok edilmesinde, savunma mekanizması olarak da kilit bir rol oynamaktadır. Farklı hücrelerde apoptozu tetikleyebilecek çeşitli koşullar veya uyaranlar vardır. DNA hasarı, hipoksi, serbest radikaller, oksidatif stres, radyasyon, belirli onkoproteinlerin ekspresyonu, viral enfeksiyon, glikoz konsantrasyonlarındaki ani değişiklikler, hipertermi, toksinler, toksik kimyasallar ve kalsiyum iyonundaki artış ile metabolik bozulmaların tümü ve daha birçok uyaran apoptoza aracılık eder. Ek olarak, sitokinler, steroidler ve peptid hormonları gibi hormonal faktörlerin fazlalığı veya bunların eksikliği de hücreyi apoptoza sürükleyebilir. Normal doku esas olarak hücre proliferasyonu ile apoptoz arasındaki ince bir denge ile belirlenir (Kashyap ve ark., 2021; Karnak ve Xu, 2010; Elmore, 2007; Kiess ve Gallaher, 1998).

Mitokondri ve hücre gelişimi gibi birçok nöronal fizyolojik fonksiyon, $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonundaki değişikliklerle tetiklenir. Apoptoz, hipoksi ve enflamasyon gibi çeşitli nörotoksikite fonksiyonları da $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonundaki artışla indüklenir. Bu nedenle, kalsiyum kanallarının modülasyonu yoluyla $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonunun sıkı kontrolü, fizyolojik ve patofizyolojik koşulların düzenlenmesi için önemlidir (Akyuva ve Nazıroğlu, 2020).

$[Ca^{+2}]_i$ artışının MMP'ni artırdığı iyi bilinmektedir. MMP artışı 3 sonuca neden olmaktadır; (1) aşırı ROS üretimi, (2) kaspaz aktivasyonları, (3) apoptozis gerçekleşmesidir. MMP'deki artış ile birlikte hücre içindeki apoptotik sinyal molekülleri serbest kalabilir. Bu durum, hücrelerin ölüm sürecini başlatır ve dokularda, organlarda hasara neden olabilir (Özsan, 2023; Akyuva ve Nazıroğlu, 2020; Kahya ve ark., 2017).

Hücredeki apoptozun düzenlenmesinden sorumlu olan genlerden birisi p53'tür. Hücrelerde meydana gelen DNA hasarı p53'e bağımlı apoptotik yolu aktive eder. Aktivasyon

sonrası p53, antiapoptotik faktörleri baskımlarken pro-apoptotik faktörleri aktive ederek apoptozun yolunu açar (Xu ve ark., 2019).

Yapılan araştırmalar, endoplazmik retikulumun apoptozda da rol oynadığını göstermiştir. Endoplazmik retikulumun içinde proteinlerin fazla birikmesi ve kalsiyum homeostazının bozulması, endoplazmik retikulum stresini ve dolayısıyla apoptozu tetikleyebilir (Xu ve ark., 2019).

Kanserlerin ayırt edici bir özelliği; apoptotik sinyali, apoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltarak ve/veya artan antiapoptotik molekül üretimi yoluyla hayatta kalma sinyallerini yükselterek apoptozdan kaçma yetenekleridir (Zielinski ve ark., 2013). Apoptozdaki kusurlar karsinogenezde ve tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Kanser hücrelerinde apoptozu indüklemek, günümüzde antikanser tedavi stratejileri arasında yer almaktadır (Sun ve ark., 2023; Kashyap ve ark., 2021; Karnak ve Xu, 2010).

2.4. Kaspazlar

Hem mitokondriyal hem de reseptör aracılı yolaklar tarafından tetiklenen apoptozun ortak mekanizması, kaspazlar adı verilen bir grup enzimin zincirleme halde aktivasyonunu tetikler. Kaspazlar, aspartat kalıntılarında hücre içi proteinleri kesen, programlanmış hücre ölümü ve enflamasyonda önemli rol oynayan, 15 üyeli, özgül, sistein proteaz ailesidir. Kaspaz kelimesi (sistein bakımından zengin aspartat kalıntıları, Cysteine-rich aspartate protease), bu proteazların enzimatik karakterini ifade eder (Zhou ve ark., 2018; Seaman ve ark., 2016; Chowdhury ve ark., 2008). Kaspazlar; apoptoz, piroptoz, nekroptoz ve otofajinin aracılık ettiği hücre ölümünde rol oynar. Kaspaz fonksiyonu hücre ölümüyle sınırlı değildir. Kaspazların apoptotik olmayan rolleri arasında proliferasyon, tümör baskılanması, farklılaşma, sinir gelişimi ve akson rehberliği ve yaşlanma yer alır (Shalini ve ark., 2015).

Kaspazlar, apoptozda (kaspaz -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 ve -11) ve inflamasyonda (kaspaz-1, -4, -5, -12) görev alan önemli bileşenlerdir. Apoptozda yer alan kaspazlarda, etki mekanizmalarına göre iki tür kaspaz tanımlanmıştır: başlatıcı kaspazlar (kaspaz -2, -8, -9, -10 ve -11) ve efektör/uygulayıcı kaspazlar (kaspaz -3, -6 ve -7) (Xu ve ark., 2019; McIlwain ve ark., 2013).

Genel olarak, bu enzimler inaktif bir formda sentezlenir ve prokaspaz olarak adlandırılır. Bunların aktive olabilmesi için aspartat kalıntılarında kurtulması gerekir. Kaspazlar aspartat kalıntılarını kesen ana enzimler olduğundan; aktive olan kaspazlar, diğer kaspazların aspartat

kalıntılarını keserek ve onları aktive ederek apoptoz için gerekli zincir reaksiyonunu başlatır (McIlwain ve ark., 2013; Green, 2022). Başlatıcı kaspazlar, mitokondriyal veya reseptör aracılı apoptoz yolu aracılığıyla etkinleştirildikten sonra efektör kaspazların aktivasyonuna aracılık ederler (Shalini ve ark., 2015).

Reseptör aracılı apoptozun arkasındaki mekanizma, öncelikle Fas/TNF-R gibi ölüm reseptörlerinin spesifik ligantları aracılığıyla aktivasyonudur. Bu işlem ölüm alanı içeren proteinler (DISC) tarafından kompleks oluşumuna, daha sonra apoptozu başlatan kaspaz -8'in aktivasyonuna yol açar. Kaspaz -8, efektör kaspazların doğrudan aktivasyonuna yol açar; ayrıca, Bid'i bölerek sitokrom c salınımına neden olur. Daha sonra, kaspaz -9 üzerinden dolaylı olarak mitokondriyal mekanizmada kaspaz-3'ü aktive eder ve bu, apoptozu daha da güçlendirir (Güvenç ve Güvenç, 2017; Shalini ve ark., 2015; Zielinski ve ark., 2013).

Mitokondriyal apoptoz, p53'ün ve Bax, Bak gibi pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aktivasyonuna ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olabilecek bir uyarı ile başlatılır. Bu uyarı mitokondriyal dış membran geçirgenliğine ve apoptozom adı verilen ölüme neden olan bir platformun aktivasyonuna yol açar. Bunu takiben kaspaz -9 bölünür ve kaspaz -3 gibi diğer efektör kaspazları aktive eder. Sitokrom c salınımı, apoptozu indükleyen faktör ve kaspazın ikinci mitokondriyal türevli aktivatörü (SMAC) gibi apoptojenik faktörlerin salınmasıyla başlatılır. Bu faktörler ya doğrudan kaspazları aktive eder ya da apoptoz proteinlerine bağlanarak kaspaz aktivitesini artırır. Alternatif olarak kaspaz -2, DNA hasarını takiben aktive olur (Shalini ve ark., 2015; Zielinski ve ark., 2013).

Temel olarak tümörler, proliferatif aktivitedeki kontrolsüz artış nedeniyle ortaya çıkar, ancak bunun nedeni çok faktörlüdür. Hücre sayısının artmasının en olası nedeni hücrelerin ölüm yollarındaki kontrol kaybıdır. Hücre ölümünde önemli rolleri olan birçok gen, tümör baskılayıcı fonksiyona sahiptir. Kromozomal translokasyon ve gen amplifikasyonu nedeniyle Bcl-2'nin aktivasyonu, kaspaz aktivasyonunu bloke eder ve Hodgkin dışı lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanserlerinde sıklıkla tespit edilir. Kanser terapötikleri olarak Bcl-2 proteinlerini hedef alan çeşitli klinik çalışmalar devam etmektedir (Shalini ve ark., 2015).

Anti-apoptotik proteinler, kaspaz aktivitesini inhibe ederek veya nükleer faktör-kappa B (NFκB) sinyal yollarını hedef alarak apoptozu baskılar. Kaspazlar hücre ölümünü teşvik eder ve bu nedenle kaspaz kaybının tümör gelişimini teşvik etmesi beklenir. Ancak bunlar aynı zamanda proliferasyon, invazyon ve migrasyonu etkileyerek apoptotik olmayan yollardan tümör oluşumunda da rol oynarlar (Shalini ve ark., 2015).

Apoptozun genel özelliklerine kaspaz -3 substratlarının aracılık ettiği düşünülebilir (Nagata, 2018). Kaspaz -3'ün, başlatıcı kaspaz -8 veya kaspaz -9 tarafından aktivasyonu sonucu hücre içindeki birçok önemli proteini parçalayarak apoptoza yol açan prototip bir apoptotik uygulayıcı olduğu gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2018). Kaspaz -3 gibi bazı kaspazlar, önemli otofajik proteinlerin bölünmesine aracılık eder ve böylece dolaylı olarak otofajiyi de kontrol eder (Shalini ve ark., 2015). Apoptozun biyokimyasal parametreleri, kaspaz inhibitörlerinin varlığında, apoptoz indüklenirse kaybolur; bu da, apoptoza aktif kaspazların aracılık ettiğini gösterir (Nagata, 2018).

Sitotoksik ilaçlar, radyoterapi veya immünoterapi dahil olmak üzere birçok antikanser tedavisi, kaspaz 3'ü aktive ederek tümör hücresi ölümüne neden olabilir. Bu nedenle kaspaz 3 aktivasyonu, çok sayıda araştırmacı tarafından kanser tedavisinin etkinliği için bir ikame belirteç olarak kullanılır. Kaspaz -3, sitotoksik ilaçlara, radyoterapiye veya immünoterapiye hücrel maruz kalma sırasında aktive olan apoptozun ana aracısı olduğundan, kanser tedavisinin etkinliğinde önemli bir belirteçtir. Bununla birlikte, son raporlar kaspaz -3'ün aynı zamanda tümör nüksetmesi ve tümör anjiyogenezinin desteklenmesi gibi apoptotik olmayan rollere de sahip olduğunu göstermektedir (Flanagan ve ark., 2016; Liu ve ark., 2015; Kurtova ve ark., 2015).

2.5. Oksidatif Stres ve Ca^{+2}

Bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron çiftine sahip olan ve bağımsız olarak varlığını sürdüren kimyasal maddelere serbest radikal denilmektedir. Oksijen metabolizması sırasında serbest radikallere genellikle reaktif oksijen türleri (ROS) denir (Phaniendra ve ark., 2015).

Tablo 2.2. Hücre içi temel reaktif oksijen türleri

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH^{\cdot})	Hipoklorik asit ($HOCl$)
Hidroperoksil radikali (HO_2^{\cdot})	Peroksinitrit ($ONOO^-$)
Peroksil radikali (RO_2^{\cdot})	Singlet oksijen (O_2)
Alkoksil radikali (RO^{\cdot})	Ozon(O_3)

Hücre içi ROS iki grup altında toplanır radikaller ve radikal olmayanlar (Phaniendra ve ark., 2015).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), aerobik organizmalarda en çok bulunan ROS'lardan biridir ve hem potansiyel bir toksik ajan hem de sinyallemede merkezi rol oynayan bir bileşendir. H_2O_2 , diğer ROS moleküllerine kıyasla in vivo olarak nispeten kararlıdır. H_2O_2 , diğer redoks sistemlerini doğrudan etkileyerek; hücre gelişimini, hücre çoğalmasını, hücre ölümünü ve sinyal iletimini düzenlemektedir. H_2O_2 dahil tüm ROS, apoptozu ve hücre çoğalmasını

tetikleyerek gelişimsel kontrolde rol oynar. H_2O_2 , hem otokrin (hücre içi dahil) hem de parakrin (hücreler arası) sinyal olarak çeşitli hücreyel işlemlerde bir sinyal molekülü olarak görev yapar. H_2O_2 , bir dizi farklı hücre tipinde hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarında değışiklikleri başlatabilir. H_2O_2 'nin Ca^{+2} iyon akışını, protein modifikasyonlarını ve gen ekspresyonunu tetikleyen translokasyon yapan haberci görevi gördüğü bildirilmiştir. İn vitro deneylerde oksidatif stres ajanı H_2O_2 uygulamasının hücre içi ROS düzeyini nasıl etkilediği, hücre içi ROS miktarının fluorometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmiştir (Katerji ve ark., 2019; Bienert ve ark., 2006).

Oksidatif strese esas olarak endojen pro-oksidatif enzimlerin (NADPH oksidaz, ksantin oksidaz veya mitokondriyal solunum zinciri gibi) ve anti-oksidatif enzimlerin (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, heme oksijenaz, tioredoksin peroksidaz/peroksiredoksin, katalaz ve paraoksonaz gibi) aktivitesi arasındaki dengesizlik neden olur (Förstermann, 2010). Oksidatif stres, hücrelerde ROS oluşumunun artması ve antioksidan savunmanın zayıflaması sonucu ortaya çıkan bir durumdur (Özsan, 2023). Antioksidan savunmanın ana işlevi aşırı ROS oluşumunu önlemek ve oksidasyon-redüksiyon (redoks) dengesini sürdürmektir (Moloney ve Cotter, 2018). Bu redoks dengesini bozan ajanlar da ROS birikimine neden olarak hücreyel hasara yol açabilir (Wang ve ark., 2013)

Mitokondri, ROS üretiminin ana kaynağıdır. ROS, mitokondriyal enerji metabolizması ve fagositik fonksiyonlar gibi fizyolojik fonksiyonlar sırasında üretilir (Akyuva ve Nazıroğlu, 2020; Övey ve Nazıroğlu, 2015). Mitokondriyal disfonksiyon, enerji üretiminin azalmasına, hücrelerin enerji ihtiyaçlarını karşılamakta zorlanmasına, hücreyel işlevlerin bozulmasına, oksidatif stresin artmasına, hücre içi ve hücreler arası iletişimde aksaklıklara neden olur. Mitokondriyal depolarizasyondaki ardışık artış, daha fazla ROS üretimini indükler ve Ca^{+2} homeostatik mekanizmalarını, özellikle voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarını bozar. Bu durum; hücrelerin normal işlevlerini yerine getirememesine, protein ve lipid peroksidasyonuna neden olabilir. Hücreyel strese bağlı olarak apoptozun mitokondriyal yolağı aktive edilir, akabinde proteinler ayırım gözetilmeksizin parçalanarak hücre ölümüne neden olan kaspazlar aktive edilir. Şiddetli mitokondriyal hasar durumunda, hücrelerde apoptozis denilen programlanmış hücre ölümü meydana gelir (Sun ve ark., 2023; Özsan, 2023; Kahya ve ark., 2017).

Düşük ROS konsantrasyonları, hücre içi sinyallemede ve patojenlere karşı savunmada vazgeçilmez bir role sahipken, daha yüksek miktarlarda ROS, artrit, kanser, diyabet, ateroskleroz, iskemi, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, multipl skleroz gibi nörodejeneratif, bağışıklık ve endokrin fonksiyonlardaki bozulmalar dahil olmak üzere bir dizi

hastalığın oraya çıkmasında rol oynar (Moloney ve Cotter, 2018; Rajendran ve ark., 2014). Serbest radikaller normal insan kolonosit aktivitesini artırabilir ve kolon poliplerinin oluşumuna neden olabilir (Kuppusamy ve ark., 2014).

Yüksek ROS seviyelerinin onkogenik olduğu, DNA'ya, proteinlere ve lipitlere zarar vererek tümör oluşumunu teşvik ettiği düşünülmektedir. ROS ayrıca kanserde sinyal molekülleri olarak da görev yaparak pro-tümörijenik sinyalleri aktive edebilir, hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını artırabilir ve DNA hasarını ve genetik dengesizliği tetikleyebilir. Anormal hücre büyümesine, metastaza, apoptoza karşı dirence, anjiyogeneze ve bazı kanser türlerinde farklılaşma bloğuna katkıda bulunur. Bunun yanı sıra ROS, anti-tümörijenik sinyali de destekleyerek oksidatif stresin neden olduğu tümör hücrelerinde apoptoza katkıda bulunabilir. Tümör hücreleri, yüksek ROS düzeylerini detoksifiye etmek, bir redoks dengesi oluşturmak ve aynı zamanda pro-tümörijenik sinyalleme ve apoptoza karşı direnci korumak için yüksek düzeyde antioksidan protein eksprese eder (Moloney ve Cotter, 2018).

Aşırı ROS üretimi veya enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerin azalmış aktivitesi nedeniyle oksidatif stres; kontrolsüz hücre büyümesine ve lipitler, karbonhidratlar ve proteinlerin oksidasyonuna yol açan redoks duyarlı sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla çoğu zaman çeşitli kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynar. Bu yüzden oksidatif stres, hem genetik hem de metabolik hücre hasarındaki rolü göz önüne alındığında ana kanser araştırma konularından biridir (Tirendi ve ark., 2023).

İstirahat halindeki bir hücrede $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonu yaklaşık olarak 50-100 nM civarındadır (Saygın ve Nazıroğlu, 2012). Birçok hayati faaliyetlerimizin gerçekleşmesi için $[Ca^{+2}]_i$ artışına ihtiyaç vardır. $[Ca^{+2}]_i$ homeostazındaki artışlar, mitokondriyal ROS üretimi de dahil olmak üzere birden fazla Ca^{+2} bağımlı yolu aktive eder. Patofizyolojik koşullarda aşırı $[Ca^{+2}]_i$ akışı aracılı yoğun oksidatif stres oluşumuna, ardından katyon kanallarının aktivasyonu yoluyla nöronal ve hücre hasara neden olur (Nazıroğlu, 2022). Bununla birlikte, $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonlarındaki aşırı artış, mitokondride çok fazla $[Ca^{+2}]_i$ biriktirerek Kaspaz -3/-9 yollarının aşırı aktivasyonuna yol açar (Nazıroğlu ve Lückhoff, 2008; Hara ve ark., 2002). Ca^{+2} , ROS üretimini artırabilirken; ROS, hücreye Ca^{+2} akışını ve hücre içi Ca^{+2} depolarını önemli ölçüde etkileyebilir (Magenta ve ark., 2016). İyon kanallarıyla hücreye düzensiz Ca^{+2} girişi MMP'yi artırmakta ve hücrenin depolarize olmasını sağlamaktadır. MMP artışı ise hücre içi ROS (cROS) üretimini arttırmaktadır (Martinelli ve ark., 2020; Akpınar ve ark., 2020).

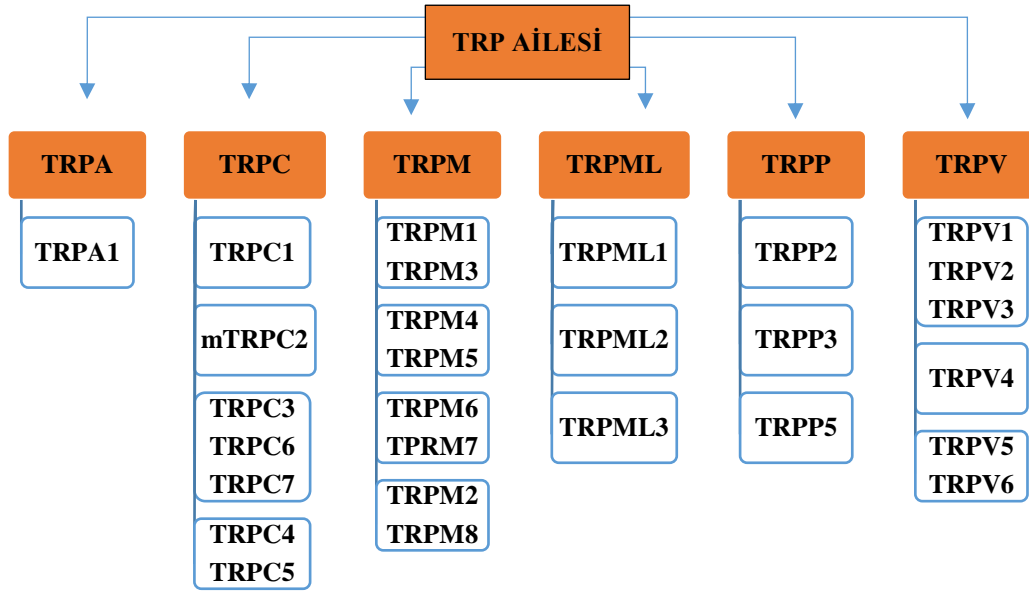
Kemoterapötik ajanların hücredeki serbest oksijen radikalleri tarafından hücre içi Ca^{+2} seviyelerini arttırdığı ve oksidatif strese yol açtığı bilinmektedir (Latour ve ark., 2019).

Hücrelerdeki ROS'u temizlemek, hücreleri zararlı etkilerinden korumak ve böylece hücrel redoks homeostazisini sürdürmek için çeşitli hücre içi savunma sistemleri mevcuttur (Dawane ve Pandit, 2012). Glutasyon (GSH) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidanlar, mitokondride ROS üretimini temizlemede önemli bir role sahiptir. Bu nedenle, GSH, GSH-Px ve ilgili enzimlerin, hücreleri tehlikeli ROS'tan korumada kritik roller oynadığına inanılmaktadır (Kahya ve ark., 2017).

2.6. TRP Katyon Kanalları

TRP kanalları ilk olarak 1989'da ışığa anormal bir yanıt sergileyen *Drosophila* türü sirke sineğinde ve birkaç yıl sonra da memelilerde keşfedilmiştir. 1997'de, TRP kanalı süper ailesinin bir üyesi olan (şimdi omurgalılarda ve omurgasızlarda 60'tan fazla üyesi olan ancak bakteri ve bitkilerde bulunmayan) TRPV1 (geçici reseptör potansiyel vanilloid-1)'in, daha sonra kapsaisin reseptörü olarak adlandırılan acı biberin keskin bileşenlerine yanıt verdiği bulunmuştur. O zamandan beri, bu bilimsel alanda araştırmalar hız kazanmıştır (Gees ve ark., 2012; Liedtke ve Heller, 2007). TRP kanalları, duyuşal nöronlarda yer alan, seçici olmayan bir grup katyon kanalıdır (Nazıroğlu ve Özgül, 2012; Liedtke ve Heller, 2007)

Memeli genomları, genellikle Na^{+} ve Ca^{+2} geçirgenliğine sahip çok çeşitli homo veya hetero-multimerik katyonik kanallar oluşturabilen proteinleri kodlayan 28 homolog gen içermektedir (Şekil 2.1.). TRP katyon kanalları altı alt üyeden oluşur: TRP ankyrin (TRPA; TRPA1), TRP kanonik (TRPC; TRPC1-7), TRP melastatin (TRPM; TRPM1-8), TRP polisistin (TRPP; TRPP2, TRPP3, TRPP5), TRP mukolipin (TRPML; TRPML1-3) ve TRP vanilloid (TRPV; TRPV1-6) (Santoni ve ark., 2015).



Şekil 2.1. TRP kanalları üst ailesi. TRP kanonik (TRPC) alt ailesini içeren 7, TRP vanilloid (TRPV) alt ailesi 6, TRP melastatin (TRPM) alt ailesi 8, TRP polisistin (TRPP) alt ailesi 3, TRP mukolipin (ML) alt ailesi 3 ve TRP ankyrin (TRPA) alt ailesi 1 üyeden oluşur (Nazıroğlu, 2012).

TRP katyon kanalı aile üyeleri farklı aktivatörler tarafından etkin hale getirilir. Bazıları sıcaklık, koku, tat, pH, ozmotik basınç, oksidatif stres ve mekanik uyarım gibi fiziksel ve kimyasal uyarılara karşı direkt cevap verirken bazıları ise dolaylı olarak fosfolipaz c mekanizmasının aktifleştirilmesiyle reseptörlerin uyarılmasını takiben cevap oluşturmaktadır (Duitama ve ark., 2020; Nilius, 2007).

Polimodal sensörler olarak işlev gören TRP katyon kanalları, altı transmembran segmentine (S1–S6) ve S5 ile S6 arasında katyon geçirgen bir gözenek bölgesine sahip membran proteinleridir. Farklı TRP'ler farklı katyon seçiciliği gösterir ve farklı geçit mekanizmaları içerir. Bu kanallar; membran depolarizasyonu, ligand bağlanması veya G-proteinine bağlı proteinlerin aktivasyonu sonucu açılabilir (Santoni ve ark., 2015).

Farklı fizyolojik ve patolojik süreçlerde, hücresel sinyal kaskadlarının ve nörosensör süreçlerinin sinyal iletiminde kritik işlevlere sahiptirler (Santoni ve ark., 2015; Liedtke ve Heller, 2007). Sıcaklık, koku, tat, ağrı, mekanik sinyallerin algılanması gibi duyuşal işlevlerde yer alırlar ve "geleneksel tıpta" kullanılan birçok doğal bileşiğe yanıt verirler. TRP kanalları, nörotransmitter salınımından gen transkripsiyonuna ve hücre ölümüne kadar birçok olayı kontrol eden Ca^{+2} sinyal iletiminde ana oyuncularlardır. Hücre içi Ca^{+2} , reseptör stimülasyonu ve Ca^{+2} bağımlı protein fosfataz gibi enzimler yoluyla TRP kanallarının aktivasyonunda görev alır; bu nedenle oksidatif stres ve apoptozda önemli bir rol oynar. Bu yüzden bazı TRP kanallarının oksidatif stres için moleküler bir sensöre sahip olabileceği varsayılmaktadır. Epitelyal Ca^{+2} ve

Mg⁺² yeniden emilimi ve lizozomal pH regülasyonu gibi birçok homeostatik fonksiyonlarda da rol oynarlar (Guler ve Ovey, 2018; Marsakova ve ark., 2017; Nazıroğlu, 2012; Nilius, 2007).

En az sekiz TRP kanalının (TRPM2, TRPM7, TRPC5, TRPV1, TRPV3 ve TRPV4, TRPM6 ve TRPM7) artan kanal aktivitesi ile oksidatif strese yanıt verdiği (Nazıroğlu, 2012), ayrıca TRP katyon kanallarının, pro-interlökin-1 β sitokinini olgun interlökin-1 β 'ya bölen olgun kaspaz -1'i oluşturmak için hem NF κ B hem de prokaspaz -1 aktivasyonu yoluyla doğuştan gelen bağışıklığa müdahale ettiği bulunmuştur (Santoni ve ark., 2015).

2.6.1. TRPM katyon kanalı

TRPM kanal ailesi, biyofiziksel ve fizyolojik özellikleri göz önüne alındığında birbirinden farklı 8 alt üyeden oluşur ve bu sekiz üye dizi homolojisine dayanarak 4 ana gruba ayrılır. Bunlar TRPM1/3, TRPM6/7, TRPM4/5 ve TRPM2/8'dir. TRPM kanal ailesi hemen hemen her dokuda bulunur ve 3 temel kısımdan oluşur: N terminali, C terminali ve transmembran bölgesi. Katyon geçirgen kanalı transmembran bölgesinde bulunur, altı segment parçasından oluşur (S1–S6). S5 ile S6 arasında katyon geçirgen bir gözenek bölgesi yer alır. N terminal bölgesi tüm TRPM ailesinde aynı yapıya sahiptir. TRPM katyon kanalları Ca⁺² ve Mg⁺²'a karşı oldukça değişken geçirgenlik sergiler. Bu nedenle Ca⁺² kanalı yerine katyon kanalı olarak adlandırılır (Santoni ve ark., 2015; Saygın ve Nazıroğlu, 2012).

TRPM katyon kanalları arasında, TRPM1 bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür; TRPM3, amiyotrofik lateral sklerozun etiolojisinde rol oynar; TRPM2, TRPM4 ve TRPM5 yüksek sıcaklıklara duyarlıdır. TRPM8 ise soğuğa duyarlıdır ve sıcaklık yaklaşık 20 °C'nin altına düştüğünde etkinleştirilir (Santoni ve ark., 2015).

2.6.2. TRPM2 katyon kanalı

TRP katyon kanalları ailesinin bir üyesi olarak TRPM2 1998'de, ilk üyesi (melastatin) kanser hücrelerinde keşfedilmiştir ve ilk olarak TRPC7, daha sonra LTRPC2 olarak adlandırılmış, son olarak da TRPM alt ailesinin bir üyesi olduğu kabul edilmiştir. TRPM2; Na⁺, K⁺ ve Ca⁺² iyonlarına geçirgen, seçici olmayan bir katyon kanalıdır (Saygın ve Nazıroğlu, 2012; Kühn ve ark., 2005; Pedersen ve ark., 2005).

Hücrelerdeki ana endojen geçit molekülü adenosin difosfat (ADP) riboz (ADPR)'dur (Sun ve ark., 2012). TRPM2'nin C terminalinde bulunan, oksidatif stres ürünlerinin bağlanmasıyla sorumlu olan ve TRPM2 kanallarının aktivasyonunda rol oynayan ADPR, pirofosfataz enzimine sahiptir; bu özellik onu benzersiz kılar (Nazıroğlu ve Lückhoff, 2008;

Hara ve ark., 2002). Ayrıca, TRPM2'nin C terminalindeki enzimatik bölgede, ADPR'ye bağlanabilen ve hidrolize edebilen Nudix hidrolaz 9 homoloji (NUDT9-H) bulunmaktadır. ADPR'nin NUDT9-H'ye bağlanması kanalı aktive ederek katyonların elektrokimyasal gradyanlarından aşağı geçişine izin verir. TRPM2 bir plazma zarı katyon kanalı olduğundan, TRPM2 açıldığında Ca^{+2} ve Na^{+} hücreye akacaktır (Nazıroğlu, 2012; Fliegert ve ark., 2007). TRPM2'nin, Ca^{+2} akışını ve Ca^{+2} aracılı hücre reaksiyonlarını indükleyen yeni bir sinyal sisteminin parçası olarak ADPR içeren sinyal yollarında kilit oyuncu olarak potansiyel rolü bulunmaktadır (Kühn ve ark., 2005).

TRPM2 katyon kanalları oksidatif stres ile kontrol edilebilir ve TRPM2'den Ca^{+2} girişi oksidatif stres tarafından indüklenebilir (Övey ve Nazıroğlu, 2015). TRPM2'nin hücrel redoks durumunun bir sensörü olarak işlev gördüğü ve oksidatif stres/ROS ve TNF aracılı Ca^{+2} akışı ve hücre ölümünde rol oynadığı öne sürülmüştür (Pedersen ve ark., 2005).

TRPM2 katyon kanalı, yüksek Ca^{+2} düzeyi ($1\mu M$) ile ilişkili olarak DNA hasarı sonucu ortaya çıkan ADPR, ısı değişikliği ve H_2O_2 tarafından aktive edilir (Saygın ve Nazıroğlu, 2012; Wehage ve ark., 2002). TRPM2'nin spesifik antagonistleri henüz keşfedilmemiştir. N-(p-amilsinnamoil) antranilik asit (ACA), aminoetoksifenilboran ve karvakrol (CARV) gibi bazı kimyasallar TRPM2'nin spesifik olmayan antagonistleridir (Nazıroğlu, 2022; Kraft ve ark., 2006). ADP, steroidal olmayan antiinflamatuvar bileşik flufenamik asit ve antifungal imidazoller, klotrimazol ve ekonazol gibi organik maddeler tarafından başarılı bir şekilde inhibe edildiğine dair bazı raporlar vardır (Clapham, 2007; Kühn ve ark., 2005).

Oksidatif stresin deneysel bir paradigması olan H_2O_2 aynı zamanda çekirdekte veya mitokondride ADPR oluşumunu da indükleyebilir. Hücrelerin H_2O_2 'ye maruz kalması, serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin benzer şekilde aracılık edebileceği oksidatif stres için deneysel bir model olarak düşünülmelidir. Bu nedenle, H_2O_2 ile TRPM2 kanalı, oksidatif stresin spesifik, Ca^{+2} bağımlı hücre reaksiyonlarını indüklemek için Ca^{+2} giriş yolunu kontrol ettiği bir sinyal oluşturabilir. Süperoksit anyonları, diğer serbest radikaller ve H_2O_2 , "oksidatif patlama" sırasında hücrelerin etrafında yüksek konsantrasyonlarda birikir. Bu artış, $[Ca^{+2}]_i$ ve oksidatif patlamanın indüklenmesi için destekleyici bir sinyaldir. H_2O_2 tarafından tetiklenen Ca^{+2} akışının, Ca^{+2} bağımlı hücre aktivasyonunu artırarak sürecin geri dönüşümsüzlüğüne katkıda bulunması beklenebilir (Kühn ve ark., 2005).

Hücre içi Ca^{+2} , TRPM2'nin önemli bir modülatörü ve kofaktörü gibi görünmektedir, çünkü artmış $[Ca^{+2}]_i$, TRPM2'nin ADPR'ye duyarlılığını önemli ölçüde artırabilir (Kolisek ve ark., 2005). TRPM2'nin ADPR aktivasyonu, $[Ca^{+2}]_i$ ve önemli bir ROS olan H_2O_2 ile güçlendirilir. Güçlendirme etkisine ek olarak, H_2O_2 , TRPM2 aktivitesini doğrudan uyarabilir. TRPM2 aşırı ekspresyonunun H_2O_2 kaynaklı apoptotik hücre ölümünü şiddetlendirdiği ve TRPM2 aktivitesinin kaspaz -3, kaspaz -8 ve kaspaz -9'u uyardığı bildirilmiştir. Bu bulgular ışığında, TRPM2 kanalının H_2O_2 'ye yanıt olarak hücrelere aşırı Ca^{+2} akışına aracılık ettiği ve çeşitli hücre tiplerinde ROS'un neden olduğu apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Sun ve ark., 2012).

TRPM2 kanalının tümör ve bağışıklık sistemi hücrelerinde hücre göçü (migrasyon) ve hücre ölümü üzerinde önemli etkileri olduğu; apoptozun tüm moleküler yolağında, hücre içi Ca^{+2} seviyesinin ve mitokondriyal membran depolarizasyonunun artışına yol açarak önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Guler ve Ovey, 2020; Guler ve Ovey, 2018). Kaya ve ark. (2023) tarafından fareler üzerinde yapılan çalışmada, CC hücrelerinde TRPA1, TRPM2 ve TRPV1 kanal aktivasyonlarının, apoptotik ve oksidan etkilerin artmasına neden olduğu gösterilmiştir.

2.7. Botulinum Nörotoksin

BTX ilk olarak 1820'de J. Kerner tarafından yapılan, Botulizm vakalarındaki semptomların, sosis zehirlenmesine bağlı olabileceğini araştırdığı bir çalışmada fark edilmiştir. J. Kerner, BTX'in bu etkisinin terapötik amaçla kullanılabileceğini ön görmüştür (Scott, 2004).

Genelde BTX olarak bilinen Clostridium botulinum ekzotoksininin, Van Ermengem tarafından 1897'de Clostridium botulinum olarak kategorize edilen çeşitli gram pozitif, anaerobik spor oluşturan Clostridial türler tarafından üretilen bir nörotoksin olduğu gösterilmiştir. Clostridium botulinum'un yanı sıra bazı Clostridium argentinense suşları ve nadir olarak Clostridium baratii ve Clostridium butyricum suşları tarafından da üretilir. Bu bakteriler dünya çapında her yerde bulunur. BTX doğadaki en güçlü biyolojik toksinler arasındadır. Bu güçlü toksinler sinir sistemini hedef alır ve nörotoksinler olarak adlandırılır (Dong ve ark., 2019; Pellett, 2013; Kartal Durmazlar ve Eskioğlu, 2009).

BTX'in terapötik kullanımı 1960'ların sonlarında Dr. Alan B. Scott strabismusu (şaşıklık) tedavi etmek için uzun süreli parenteral etkileri olan bir madde ararken BTX'in ilgisini çekmesi ile gündeme gelmiştir. Bu deneyler için standartlaştırılmış BTX preparatları ve sıkı güvenlik standartları, Edward J. Schantz ve Eric A. Johnson tarafından geliştirilmiştir. BTX, Dr. Alan

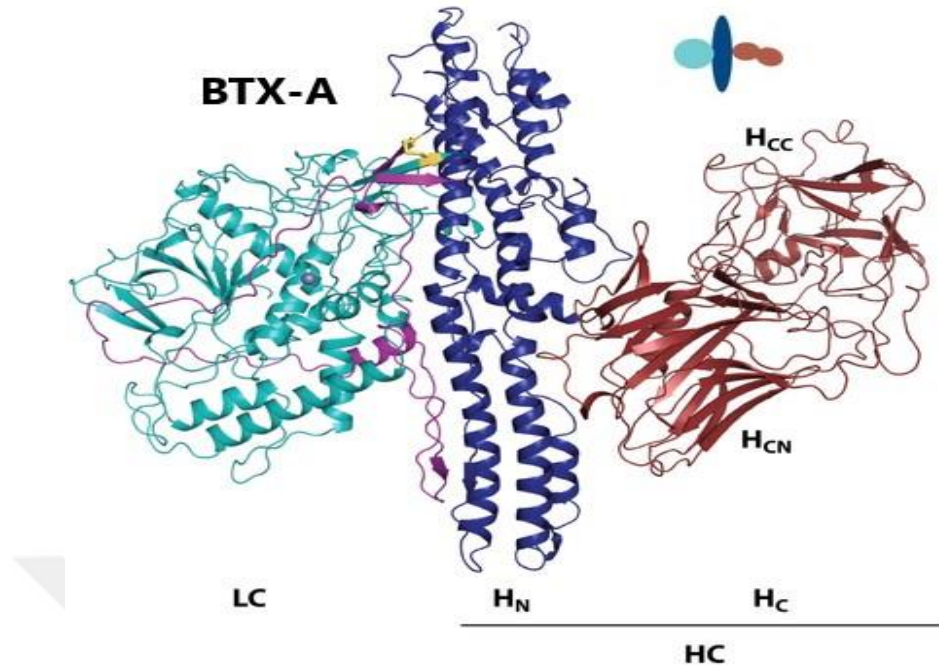
B. Scott tarafından ilk kez 1977'de strabismus tedavisi için kullanılmıştır. Bu verilerin 1980 yılında yayınlanmasıyla BTX yeni bir tedavi prensibi olarak kabul edilmiştir (Dressler ve Johnson, 2022; Dressler, 2012; Erbguth ve Naumann 1999; Scott, 1980).

BTX, yirminci yüzyılda birçok ülke tarafından biyolojik bir silah olarak kullanılmıştır. Birçok ülke Biyolojik ve Toksin Silahları Sözleşmesini imzaladıktan sonra biyolojik silahlarla ilgili araştırmaları durdursa da, BTX'in tıbbi kullanımı için çalışmalar devam etmiştir (Majid, 2010).

2.7.1. Botulinum nörotoksinin yapısı ve etki mekanizması

Tüm BTX'ler, klostridial nörotoksinler olarak bilinen toksin ailesine aittir ve çevrede doğal olarak oluşan en toksik maddelerdir. Bu toksinler aynı moleküler mimariyi paylaşır ve bakterilerde üç fonksiyonel alana sahip yaklaşık 150 kDa molekül ağırlığında protoksin olarak üretilir (Şekil 2.2.). BTX'in ana gövdesi, bir disülfid köprüsüne bağlı bir ağır zincir (HC) (~100 kDa) ve bir hafif zincirden (LC) (~50 kDa) oluşur. LC, çinkoya bağımlı bir proteazdır. HC, LC'nin sitozole iletilmesinden sorumlu bir N-terminal alanı (HN) (~50 kDa) ve spesifik hücre yüzeyi reseptörlerini tanımaktan sorumlu bir C-terminal alanı (HC) (~50 kDa) bulunan dağıtım aracıdır. HC ayrıca bir N terminali HCN ve bir C terminali HCC dahil olmak üzere iki alt alan içerir. LC ve HC arasındaki kısa bağlayıcı bölgenin, protoksini aktif formuna dönüştürmek için bakteri veya konakçı proteazlar tarafından bölünmesi gerekir (Grenda ve ark., 2022; Dong ve ark., 2019; Kartal Durmazlar ve Eskioğlu, 2009).

BTX kompleksi, ağırlığı 150 kDa olan BTX moleküllerinin yanı sıra gastrointestinal sistemde mide asidi gibi etkisizleştirici faktörlere karşı koruyucu rol oynayan toksik olmayan nörotoksin ile ilişkili protein (NAPs) kompleksinden oluşur. NAPs, hemaglutinin ve non-toksik non-hemaglutinin (NTNH) proteinlerden oluşur. Nörotoksinle ilişkili proteinler, doğası gereği hassas BTX'leri korur ve BTX'lerin genel dolaşıma salınmadan önce intestinal epitel bariyerinden geçmesine yardımcı olur. NTNH fraksiyonu ayrıca BTX tedavisinde antikor oluşumunun nedeni olarak kabul edilen spesifik antijenik proteinleri de içerir. Tüm ticari BTX preparatları, BTX stabilitesini artıran ve toksin toplanmasını veya emilimini önleyen ve raf ömrünü uzatan yardımcı madde olarak insan serum albümini (HSA) içerir (Grenda ve ark., 2022). Ayrıca, BTX'ler, toksini koruyan ve gastrointestinal kanalda emilimini kolaylaştıran bir progenitör toksin kompleksi (PTC) içinde bulunur (Dong ve ark., 2019).



Şekil 2.2. Botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın yapısı. [Protein Veri Bankası (PDB) 3 BTA]. Hafif zincir (LC, katalitik alan) turkuaz renkte gösterilmiştir. Ağır zincir (HC), mor renkte gösterilen translokasyon alanından (HN) ve kırmızı renkteki bağlanma alanından (HC) oluşur. Hc'nin iki alt alanı, C-terminali (H_{CC}) ve N-terminali (H_{CN}) bölgeleri ile gösterilmiştir. Hafif ve ağır zincirleri birbirine bağlayan disülfid bağı sarı çubuk şeklinde; çinko iyonu gri bir küre olarak gösterilmiştir (Dong ve ark., 2019).

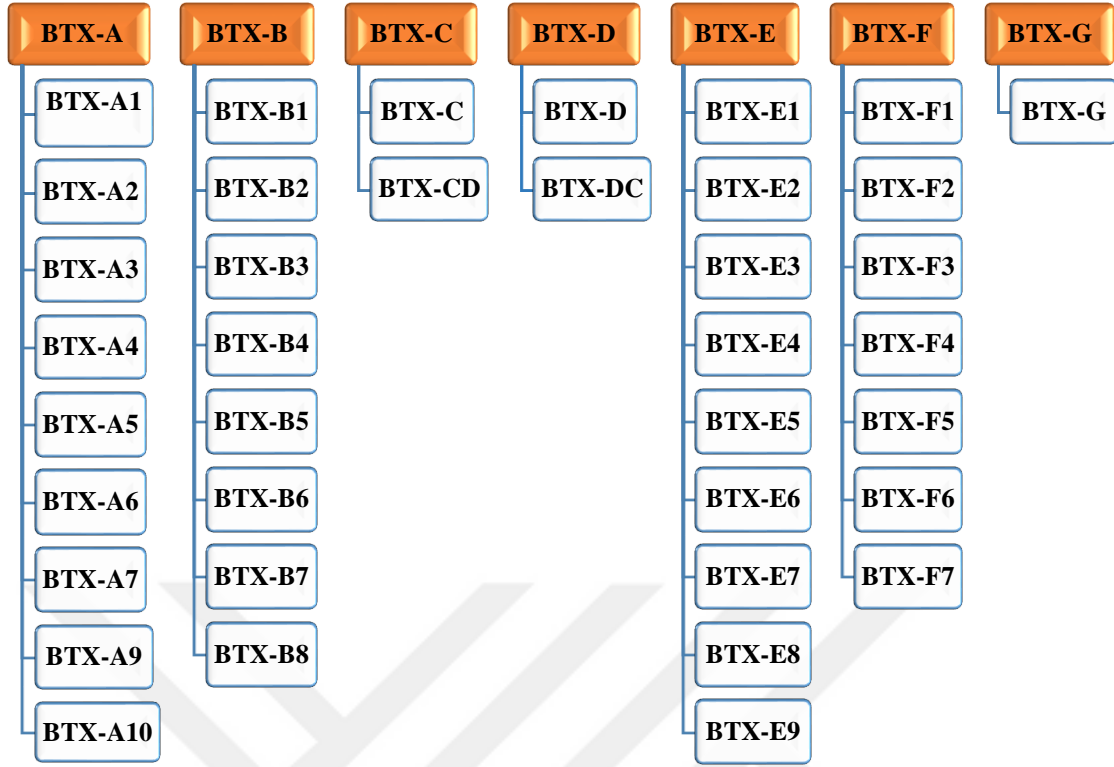
BTX'lerin hedef hücrelerine karşı yüksek afinitesi ve özgüllüğü vardır. BTX'lerin trimodüler yapısı, etki tarzının temelini oluşturur: Reseptör aracılı endositoz yoluyla nöromüsküler kavşaklardaki motor sinir terminallerini hedefler ve girerler. Endozomun asitlenmesi, LC'nin endozomal membranlar boyunca sitozole aktarılmasıyla sonuçlanan toksinlerin konformasyonel değişikliklerini tetikler; burada LC, endopeptidaz aktivitesi göstererek SNARE (çözünür N-etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma proteini reseptörü, soluble NSF [N-ethyl maleimide-sensitive factor] attachment protein receptor) proteinlerine etki eder (Dong ve ark., 2019; Kukreja ve Singh, 2015; Kartal Durmazlar ve Eskioğlu, 2009).

Sinaptobrevin, SNAP-25 (sinaptozomal ile ilişkili protein 25) ve sintaksinden meydana gelen SNARE protein kompleksi, taşıma veziküllerinin doğru hedef membranı tanınmasını ve o membranla kaynaşmasını sağlayan özel reseptörlerdir. Hücre için hayati önem taşıyan SNARE proteinleri plazma membranının iç yüzeyindeki veziküle nörotransmitterlerin alınmasından ve ekzositozundan sorumludur. BTX'in farklı serotipleri, farklı SNARE protein türlerine etki eder. BTX-A, SNARE protein kompleksinin bir parçası olan SNAP-25 proteinini bloke ederek SNARE protein kompleks oluşumunu önler ve böylece sinir terminallerinden asetilkolin salınımını inhibe eder. Bunun sonucunda BTX'in nöromüsküler kavşakta etkisi ortaya çıkar.

Yaklaşık 4–8 haftalık bir süreden sonra aksonal filizlenme ile yeni sinir terminalleri oluşur ve sinir iletimi tekrar başlar (Tanakol ve ark., 2019; Kukreja ve Singh, 2015; Hanağası, 2006).

Clostridium botulinum suşları tarafından üretilen BTX'in 7 farklı serotipi (A, B, C, D, E, F, G) vardır (Şekil 2.3.). Yedi nörotoksinin tümü yapısal olarak benzer ancak immünolojik olarak farklıdır. Her biri, onu üreten bakteri suşunun karşılık gelen harfiyle tanımlanan farklı bir nörotoksin üretir, bu nedenle 7 farklı nörotoksin vardır (BTX-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G). Bu nörotoksinlerin farklı spesifik toksisiteleri, sinir hücrelerinde farklı kalıcılık süreleri ve farklı etkileri vardır. BTX serotiplerinin tümü asetilkolin salınımını inhibe ettiği için yeterince yüksek doza maruz kalma durumunda insanlarda potansiyel olarak botulizme neden olabilir (Carr ve ark., 2021; Majid, 2010).

Beş BTX-A ürünü (onabotulinumtoxinA (Botox®), abobotulinumtoxinA (Dysport®), incobotulinumtoxinA, (Xeomin®), daxibotulinumtoxinA (Daxxify®), prabotulinumtoxinA (Jeuveau®)) ve bir BTX-B ürünü (rimabotulinumtoxinB (Myobloc®)), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından terapötik kullanım için onaylanmıştır (U.S. Food & Drug Administration, 2023; Carr ve ark., 2021). Bütün serotipler benzer yapıya sahiptir ancak bugüne kadar en çok kullanılan kuru toz formunda hazırlanmış onabotulinumtoxinA (Botox®)'dır (Kartal Durmazlar ve Eskiöğlü, 2009).



Şekil 2.3. Farklı nörotoksijenik Clostridium spp sınıfları tarafından üretilen botulinum toksini (BTX)'nin serotipleri ve alt tipleri (Rossetto ve ark., 2014).

2.7.2. Botulinum nörotoksininin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri

BTX'in tahmin edilen parenteral letal dozu 0,1-1 ng/kg ve oral insan letal dozu 1 µg/kg'dır (Pellett, 2013). Primatlarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, 70 kg ağırlığındaki bir yetişkinde intramüsküler BTX enjeksiyonu için öldürücü dozun yaklaşık 1 ng (30 U)/kg olduğu bildirilmiştir (Herrero ve ark., 1967); bu da BTX'leri bilinen en güçlü toksin yapar. BTX intraperitoneal enjeksiyonu yapılan fareler için öldürücü doz 0,1 -1 ng/kg arasında değişmektedir (Kukreja ve Singh, 2015). Bu kadar düşük toksin konsantrasyonunun ölümcül olması, hedef aldığı nöronlara karşı yüksek oranda spesifik olmasından kaynaklanır. Bu zorlukları karşılamak için BTX'ler, iki farklı reseptör sınıfını aynı anda tanıma stratejisi geliştirmiştir. Bir grup reseptör, nöronal yüzeylerde bol miktarda eksprese edilir ve nispeten düşük afiniteye sahip bağlarla etkileşime girer. İkinci reseptör grubu sinir terminallerine sıkıca bağlanarak toksinin endositozuna yol açar. Bu çift reseptör modeli ilk olarak 1986'da Cesare Montecucc tarafından önerilmiştir ve günümüzde BTX'lerin çoğu için kabul görmüştür (Dong ve ark., 2019).

BTX-A'nın iskelet kaslarındaki nöromüsküler kavşaklardan asetilkolin salınımını inhibe ettiği, Burgen ve ark. (1949) tarafından keşfedilmiştir. BTX, kolinerjik sinapsları iyi kontrol eder ve sinir uçlarında nörotransmitter asetilkolinin salınmasını tamamen geri dönüşümlü bloke

ederek kas aktivitesinin azalmasına veya felce neden olur (Dressler ve Johnson, 2022; Schantz ve Johnson, 1992).

BTX'in asetilkolin salınımını uzun süreli ancak geri dönüşümlü bir şekilde ve çok az yan etkiyle blokaj yeteneği, onu distoniler, titreme, tikler ve spastisite dahil olmak üzere çok çeşitli nöromüsküler bozukluklarda önemli bir tedavi aracı haline getirmiştir (Jankovic ve Brin,1997). BTX-A olağanüstü etkinlik ve güvenlik profiliyle neredeyse kırk yıldan uzun süredir klinik kullanımdadır. Klinik etkiler genellikle enjeksiyondan sonraki 1 hafta içinde görülür ve faydalar genellikle 3-6 ay sürer. Hasta seçimi ve uygun doz ve uygulama yeri seçimi, BTX tedavisine olumlu yanıtın en önemli belirleyicileridir (Jankovic ve Brin,1997).

BTX, oral alındığında nöroparalitik sendrom botulizmine neden olur (Carr ve ark., 2021). J. Kerner, botulizmin çoğunlukla uygun şekilde muhafaza edilmemiş yiyeceklerin tüketilmesinden kaynaklandığını belirtmiştir (Scott, 2004). Vahşi hayvanlarda sık sık botulizm salgınları vardır, ancak insanlar arasında botulizm insidansı nadir hale gelmiştir. Gıda kaynaklı bir hastalık olmasının yanı sıra, botulizme, bağırsağın Clostridium botulinum suşları tarafından kolonizasyonu da neden olabilir. Bu genellikle bebeklerde normal bağırsak mikrobiyotaları tam olarak gelişmeden önce ortaya çıkar ve bebek botulizmi olarak bilinir. Clostridium botulinum ayrıca nadir durumlarda yaraları kolonize edebilir ve yara botulizmine neden olabilir. Botulizmin tipik semptomu sarkık felç, yani iskelet kaslarının kasılmamasıdır. İlk işaret genellikle görme bozukluğudur, çünkü göz hareketini kontrol eden kaslar etkilenir ve bunu yüz kaslarının felci izler. Sonuçta, hastalar diyafram felcinin neden olduğu solunum yetmezliğinden ölürlere (Dong ve ark., 2019).

Botulizm, tetanozun aksine insanlarda nadir görülen bir hastalıktır. Bu nedenle genel nüfus BTX'lere karşı aşılınmamaktadır. Bu bağışıklık eksikliği, BTX'lerin giderek artan tıbbi durumların tedavisinde terapötik toksinler olarak ve kozmetik amaçlarla kullanılmasına olanak tanır. Aynı zamanda bu bağışıklık eksikliği, toplumu BTX'lerin biyoterörizm saldırılarında potansiyel kullanımına karşı savunmasız bırakmaktadır. Bu nedenle BTX'ler en tehlikeli biyoterörizm ajanlarından biri olarak sınıflandırılmaktadır (Dong ve ark., 2019).

Botulinum zehirlenmesinin klinik semptomları, periferik sinir sisteminin tutulumunun yanı sıra merkezi sinir sisteminin de etkilendiğini göstermektedir (Boroff ve Chen, 1975). Bununla birlikte, çeşitli çalışmalar, BTX-A'nın merkezi sinir sisteminin fonksiyonel organizasyonunu periferik mekanizmalar yoluyla dolaylı olarak etkilediğini kuvvetle ileri

sürmektedir. İnsanlarda terapötik dozlarda kas içine enjekte edilen BTX-A'nın doğrudan merkezi sinir sistemi yapıları üzerinde etkili olduğuna dair ikna edici kanıt bulunmamaktadır (Şahin İnan ve ark., 2023; Curra ve ark., 2004).

Bununla birlikte, hali hazırda onaylanmış BTX ürünlerinin etkileri genellikle enjeksiyondan belli bir zaman geçtikten sonra ortadan kalkmaktadır ve bu nedenle enjeksiyonların düzenli olarak tekrarlanması gerekmektedir. Ekzokrin bezlere yapılan enjeksiyonlarda bu süre daha uzun olabilir (Solish ve ark., 2021).

2.7.3. Botulinum nörotoksinin kullanım alanları ve yan etkileri

Botulizmden sorumlu nörotoksinin saflaştırılmış bir formu olan BTX, insanlık tarihindeki en dikkat çekici geçişlerden birini geçirmiştir. Bir zamanlar gıda güvenliği tehlikesi ve biyolojik savaş aracı olarak kötü bir şöhrete sahip olan bu madde, artık şaşırtıcı sayıda farklı hastalık için son derece etkili bir ilaç haline gelmiştir. BTX preparatları ve bunların terapötik uygulamaları şu anki noktaya kadar uzun bir yol kat etmiş olsa da, hala dinamik ve hızlı bir gelişme göstermektedir (Dressler ve Johnson, 2022).

BTX-A'nın terapötik uygulamaları, FDA tarafından onaylandıktan sonra hızla artmıştır. İnsanoğlunun bildiği en güçlü biyolojik toksin olmasına rağmen, uzun süreli çalışmalar onun çeşitli nörolojik ve nörolojik olmayan bozuklukların tedavisinde güvenliğini ortaya koymuştur (Jankovic, 2018). BTX, iskelet ve düz kas, ekzokrin bezler ve nosiseptif ağrı mekanizmalarını içeren bozukluklar dahil olmak üzere giderek artan sayıda endikasyon için klinik olarak kullanılmaktadır. BTX-A'nın terapötik uygulamasının artmasının temel nedenleri, belirgin klinik etkinliğe ve kanıtlanmış güvenlik kaydına sahip olmasıdır (Dressler ve Johnson, 2022; Cai ve ark., 2017).

BTX enjeksiyonları, birçok terapötik endikasyon için değerli bir tedavi yöntemi olmasının yanında estetik tıp alanında devrim yaratarak, dünya çapında uygulanan önde gelen kozmetik uygulamaların içinde yer almaktadır. BTX'in estetik tıpta kullanımı da, altta yatan kas hiperaktivitesinden kaynaklanan kırışıklıkları azaltabilen bu kas gevşetici etkisine dayanmaktadır (Dressler ve Johnson, 2022; Soğancı ve Yağcı, 2016).

Kas dokusuna enjekte edilen BTX, kas gevşemesi ile nöromusküler blokaj üretir; bu etkisiyle, çeşitli distoni formları, spastisite, infantil serebral palsy, hemifasiyal spazm, tikler, titreme ve mesane ve gastrointestinal motilite bozuklukları gibi kas hiperaktivite bozukluklarının ve anormal kas kasılmalarının tedavisinde dünya çapında kullanılmaktadır

(Dressler, 2012; Jankovic ve Brin, 1997). BTX enjeksiyonları ile tedavi, birçok endikasyonda kronik tıbbi durumları yönetmek için kullanılır (Carr ve ark., 2021); endikasyon alanı şu anda yaklaşık altı tıbbi uzmanlık dalındaki yaklaşık 26 endikasyonu kapsamaktadır. Bunlardan blefarospazm, servikal distoni, inme sonrası spastisite, infantil serebral palsi, hemifasiyal spazm, detrüsör aşırı aktivitesi ve şaşılık (Scott, 1980) kayıtlı endikasyonlardır (Dressler ve Johnson, 2022). Ayrıca, BTX ekzokrin bez dokularına enjekte edilirse ter, tükürük ve gözyaşı üretimini azaltır, Bu endikasyon alanında en sık görülen durumlar olan hiperhidroz ve siyalore de kayıtlı endikasyonlar arasındadır (Dressler ve Johnson, 2022; Dressler, 2012). BTX, 1989 yılında şaşılık, blefarospazm ve diğer yüz spazmlarında, 2000 yılında servikal distoni tedavisinde (Jankovic, 2018; Scott, 2004), 2002 yılında 18-65 yaş orta ve şiddetli dinamik glabellar çatık kaş çizgilerinin tedavisinde ve 2004 yılında primer aksiller hiperhidrozun geçici tedavisinde (Tanakol ve ark., 2019) kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır.

BTX-A'nın ağrıyla ilgili olarak onaylanmış tek kullanımı kronik migren tedavisidir ve daha yakın zamanda onaylanmış bir endikasyondur (Aurora ve ark., 2010). Göstermiş olduğu bu etki ile klasik kolinerjik etkilerinin ötesine geçmektedir (Dressler ve Johnson, 2022). BTX-A'nın ağrı endikasyon alanı içerisinde kronik migren dışında çeşitli endikasyonları üzerinde halen çalışılmaktadır (Siongco ve ark., 2020). Kontrollü klinik çalışmalar nöropatik ve diğer kronik ağrı bozukluklarında umut verici sonuçlar göstermektedir. Diğer konvansiyonel ve konvansiyonel olmayan analjezik ilaçlarla karşılaştırıldığında BTX-A kullanımının en büyük avantajı tek bir uygulama sonrasında etkisinin uzun süreli ve güvenli olmasıdır (Matak ve ark., 2019).

BTX'in, bruksizm (De la Torre Canales ve ark., 2017; Tinastepe ve ark., 2015), anterokollis (Herting ve ark., 2004), kamptokormi (Margraf ve ark., 2016), tremor (Samotus ve ark., 2017), tikler (Vincent, 2008; Porta, 2004), tardif ve levodopa kaynaklı diskinezi (Beckmann ve ark., 2011; Slotema ve ark., 2008; Hennings ve ark., 2008) ve huzursuz bacak sendromu dahil olmak üzere oromandibular distoni gibi hareket bozukluklarının tedavisinde (Agarwal ve ark., 2011) kullanılabileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu hareket bozuklukları için randomize kontrollü çalışmaların azlığına ve FDA onayı olmamasına rağmen, BTX-A'nın, bu hiperkinetik hareket bozuklukları olan hastalara fayda sağladığına ve uzman klinisyenler tarafından kullanıldığında güvenli bir tedavi olduğuna dair giderek artan sayıda çalışma bulunmaktadır (Jankovic, 2018).

Daha önce yapılan birkaç çalışma ile alın bölgesine yapılan BTX enjeksiyonlarının depresyonu azaltabileceği gösterilmiştir (Wollmer ve ark., 2012; Finzi ve Wasserman, 2006). Daha sonra yapılan randomize kontrollü çalışmalar ile bu anti-depresif etkileri doğrulanmıştır (Qian ve ark., 2020; Kruger ve Wollmer, 2015); nihai ilaç tescili için tasarlanan son çalışma ise önemli terapötik etkiler oluşturmada başarısız olmuştur (Brin ve ark., 2020).

İn vitro çalışmaların BTX-A'nın düz kas spazmlarını önlemede uzun süre etkili olduğunu göstermesi sonucu, araştırmalar vasküler kökenli bozukluklara odaklanmıştır. BTX-A, sinir terminalinden asetilkolin salınımını engelleyerek kas kasılmasını inhibe etmesinin yanında, norepinefrin vezikülünün iletimini bloke ederek vasküler düz kasın sempatik vazokonstriksiyonunu önler (Morris ve ark., 2001). Ayrıca, Rho/Rho kinaz ile etkileşime girerek Rho kinazı inaktive eder ve vasküler düz kas hücrelerinin Ca^{2+} duyarlılığı ve NO sistemi ile etkileşerek düz kas hücre daralmasını doğrudan inhibe eder (McMurtry ve ark., 2010).

Hayashi ve ark. (2014) ratlarda femoral arterdeki kan akışında kısmi bir artış rapor etmiştir. BTX-A ile ön tedavinin, mikroanastomoz öncesinde önemli ölçüde daha büyük arteriyel ve venöz çap ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fathi ve ark., 2010). BTX-A'nın, Raynaud fenomeninde vazospazm semptomlarını hafifletmedeki etkisi de giderek daha fazla ilgi görmektedir (Zebryk ve Puszczewicz, 2016).

BTX-A ile ön tedavi, in vitro olarak hem insan safen ven, hem de internal mammarian arter greftlerinde vazokonstriksiyonun hızlı inhibisyonu ile sonuçlanmış; ve bu inhibisyon, BTX konsantrasyonuna ve konstriktör ajana bağlı olarak 2. saatte devam etmiş ve hatta artmıştır. Her iki BTX-A konsantrasyonunda da greftlerde herhangi bir hasar gözlenmemiştir. (Duman ve ark., 2022) İnsan radial arter greftleri üzerinde yakın zamanda yapılan diğer bir çalışmada BTX-A ve papaverinin kasıcı maddeye göre değişen gevşetici etkileri ortaya konmuştur (Tanyeli ve ark., 2019).

Zehirlerin ve toksinlerin biyolojik çeşitliliği, onları yeni antikanser ajanlarının geliştirilebileceği benzersiz bir kaynak haline getirir (Liu ve ark., 2014). Çalışmalar, yılan ve arı zehirinden türetilen toksinlerin yanı sıra bazı bakteri ve bitki toksinlerinin kanser tedavisine potansiyel olarak yardımcı olabileceğini bildirmiştir. Anaerobik spor oluşturan Gram-pozitif Clostridium botulinum tarafından üretilen BTX bu toksinlerden biridir. BTX'in, tümör damarlarını açarak kanser hücrelerinin hasarını kolaylaştırdığı, böylece radyoterapi ve kemoterapinin kanser hücrelerine ulaşmasına olanak sağladığı bildirilmiştir (Shebl, 2019).

BTX-A tedavisi aşırı $[Ca^{+2}]_i$ ve MMP artışı ile beraberinde zincirleme olayları başlatmaktadır (Akpınar ve ark., 2020). Son zamanlarda prostat kanserinin tedavisinde BTX-A kullanımına yönelik ilgi artmıştır. BTX-A'nın, yapılan çalışmalar ile tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Proietti ve ark., 2012; Karsenty ve ark., 2009; Mazo ve ark., 2008).

Terapötik BTX'lerin kullanımıyla ilgili en büyük endişe özellikle uzun süreli tedavi ve sık enjeksiyon gerektiren kronik durumlarda, hastayı sonraki tedavilere tepkisiz hale getirebilecek nötralize edici antikörlerin oluşmasıdır (Kukreja ve Singh, 2015; Dressler ve ark., 2010). Bu nedenle, hastanın tedaviye yanıtını dengelerken konakçının bağışıklık tepkisini uyarmayı en aza indiren terapötik formülasyonlarla tedaviye yaklaşmak en ideal olanıdır. İmmünojenite, tedavi için biyolojik ilaçlar kullanan birçok durumda klinik bir sınırlamadır ve klinik olarak immünojenite azalması, daha küçük protein yapılarının tasarlanması ve gereksiz formülasyon bileşenlerinin azaltılması yoluyla elde edilmiştir. Benzer bir yaklaşım, BTX formülasyonlarının geliştirilmesinde de etkili olmuştur (Carr ve ark., 2021).

Yüksek doz BTX-A enjeksiyonundan sonra gözlemlenen kas atrofisi, denervasyonun bir sonucu olarak sık görülen bir yan etki olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, tavşanların longissimus dorsi kasına BTX-A (5-10 IU) enjeksiyonundan sonra önemli miktarda lif atrofisi gözlenmiştir. Ratlardaki bir çalışmada, BTX-A enjeksiyonlarından (5 U/kg vücut ağırlığı dozajı) sonra farklı kas proteinlerindeki değişiklikler araştırılmış ve çeşitli proteinlerin ekspresyonunun, salin enjeksiyonlarına kıyasla enjeksiyondan sonra değiştiği gözlemlenmiştir (Şahin İnan ve ark., 2023).

2.7.4. Botulinum nörotoksinin kanser hücre hatları üzerinde etkisi

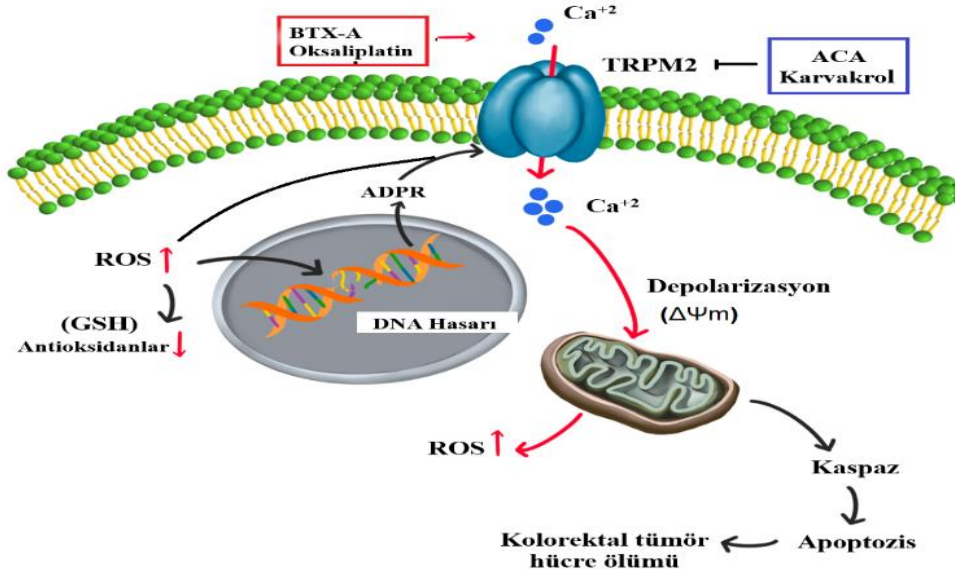
Doğrudan apoptotik yolları hedefleyen ilaçların geliştirilmesi, tedavisi zor tümörlerde tümör gerilemesine yol açabilir ve bu ilaçların, onkojenik sağkalım yollarını hedefleyen ajanlarla, immünoterapi ve klasik kemoterapi ve radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanılması alternatif bir tedavi sunabilir (Carneiro ve El-Deiry, 2020; Pistritto ve ark., 2016). BTX-A, doğal olarak bulunan en güçlü toksik maddelerden biri olmasına rağmen, uygun şekilde hazırlandığında kanser hücreleri üzerindeki etkileri umut vericidir. BTX'in, tümör büyümesini inhibe etme ve neoplastik hücrelerin apoptozunu destekleme yeteneğine sahip olduğu in vitro prostat (Shebl, 2019; Karsenty ve ark., 2009), meme (Bandala ve ark., 2013), kolon hücre hatlarında (Shebl, 2019) ve rat pankreas hücrelerindeki (He ve ark., 2016) çalışmalar ile desteklenmiş ve potansiyel kanser önleyici yönleri araştırmalara konu olmuştur

(Grenda ve ark., 2022; Ulloa ve ark., 2015; Nam ve ark., 2012; Vezdrevanis, 2011; Ansiaux ve Gallez, 2007).

BTX-A'nın, T47D, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattında apoptotik süreçler yoluyla yüksek oranda sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Bandala ve ark., 2015; Bandala ve ark., 2013). Ayrıca BTX-A'nın LNCaP (prostat kanseri lenf metastazı) insan prostat kanseri hücrelerinin in vitro ve in vivo büyümesini inhibe ettiği ve doza bağlı bir şekilde apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Proietti ve ark., 2012; Karsenty ve ark., 2009; Mazo ve ark., 2008).

BTX-A'nın, ağrı ve nöromusküler bozukluklara karşı terapötik etkilerine ek olarak, TRPM2 kanal aracılığıyla mitokondri ROS üretimini aktive ettiği, hücre içi aşırı Ca^{+2} ve MMP artışı ile beraberinde zincirleme olayları başlattığı ve apoptoza katkısı yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Akpınar ve ark., 2020; Martinelli ve ark., 2020; Shebl, 2019; Bandala ve ark., 2013). BTX-A, TRPM2 kanal aracılığıyla mitokondri ROS üretimini aktive ederek böylece nöroblastoma ve glioblastoma tümör hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır (Akpınar ve ark., 2020). BTX-A, $[Ca^{+2}]_i$, ROS, kaspazlar ve apoptozis üzerindeki etkisini, kanser tedavisinde sıklıkla kullandığımız oksaliplatin gibi TRPM2 katyon kanalı aracılığı ile (Şekil 2.4.) göstermektedir.

BTX-A'nın, sitotoksisite, hücre proliferasyonu ve apoptoz ile ilgili genin ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. BTX-A'nın, normal hücrelerde herhangi bir toksisite olmaksızın, kanser hücre hatlarında sitotoksisiteyi indükleyebileceği ortaya konulmuştur (Shebl, 2019).



Şekil 2.4. Botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın TRPM2 kanal aktivasyonu ve hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) artışı ile tümör hücrelerini öldürmesi üzerinde mümkün olan moleküler mekanizmalar (Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu tarafından hazırlanmıştır).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Türü

Araştırma bir hücre kültürü deneyi olarak planlanmıştır. İki farklı gruptaki CC hücreleri (HT29) üzerinde hücre kültürü ortamında BTX-A kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Çalışma Grubu

Bu tez çalışmasında 2 farklı ana grup kullanılmıştır. Hürelere uygulanan işlemler ve yapılan analizler hakkında detaylı bilgiler aşağıda grup başlıkları altında belirtilmiştir.

Kontrol grubu: Bu gruptaki CC hücreleri (HT29) hücre kültürü ortamında 24 saat süre ile tutulmuştur. Herhangi bir kimyasal uygulama yapılmayan gruptur.

BTX-A grubu: Bu gruptaki hücreler 24 saat süre ile 5 IU BTX-A (Botox-100, Allergan Drugs Inc., İstanbul, Türkiye) ile inkübe edilmiştir (Akpınar ve ark., 2020).

Lazer konfokal mikroskop analizleri için hücreler ortasında cam bulunan küçük plastik kaplara ekilirken, kuyucuk okuyucu ve Casy Tone cihaz analizleri için T25 flasklara ekilmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan Materyaller

3.3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Bu tez çalışmasında CC hücreleri kullanılmıştır. Cryo tüpler içerisinde ki hücreler T25 flasklar (SPL 70025, Thermo Fisher Sci., Almanya) içerisine ekilmişlerdir. Hücrelerin ekiminde besi yeri olarak %89 oranında DMEM/Ham's F12 hücre kültürü besi yeri karışımı (1:1) (DMEM-12-A, Capricorn, Almanya) kullanılmıştır. Ayrıca, bu besi yerine %10 sığır serum albümini (S0115, Sigma, Almanya) ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) (SLP-507-100, Serox, Almanya) eklenmiştir. Hücreler hücre kültürü ortamında (37 °C, %5 CO₂ ve %60-80 nem) steril inkübatörde tutulmuşlardır. Hücre kültürü ve çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler listesi Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Hücre kültürü ve çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal	Firma	Katalog Numarası
Antibiyotik (Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (100 ml)	Serox (Almanya)	SLP-507-100
DMEM/Ham's F12 Hücre Kültürü Medium Karışımı (Low Glucose (1 g/l), with L-Glutamine, with Sodium Pyruvate).	Capricorn (Almanya)	DMEM-12-A
Fetal Bovine Serum 500 ml	Sigma Aldrich, ABD	S0115
Trypsin-EDTA (%0.25) in HBSS (1x), with phenol red, 100 ml	Sigma Aldrich, ABD	T4049

3.3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

Çalışmamızda kullanılan sarf malzemelerinin listesi Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

Malzeme	Firma
APOPercentage Apoptosis Kit	Biocolor (Kuzey İrlanda)
Cryo Tüp (2ml)	CL2ARBEPSTS, Biosigma (İtalya)
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Hybri-Max, Sigma (Almanya)
Falkon tüp (15 ml, 50 ml)	ISOLAB, (Almanya)
Flask (T25, T75)	Thermo Fisher Sci. (Almanya)
Fluo-3 AM	Calbiochem, (Almanya)
HEPES	Sigma Aldrich (Almanya)
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma (Almanya)
Hoechst 33342	Santa Cruz Biotechnology (ABD)
JC-1	Santa Cruz Biotechnology (ABD)
Karvakrol	Sigma Aldrich (ABD)
Kaspaz 3 Substrat (Ac-DEVD-AMC)	Bachem, (İsviçre)
Kaspaz 8 Substrat (Ac-DEVD-AMC)	Bachem, (İsviçre)
Kaspaz 9 Substrat (Ac-LEHD-AMC)	Bachem, (İsviçre)
Otomatik Pipet Uçları	Eppendorf (Almanya), Select BioProducts (ABD)
Propidyum İyodür	Santa Cruz Biotechnology (ABD)
Tek kullanımlık steril pipetler (5 ve 10 ml)	Lp Italiana

3.3.3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmamızda kullanılan cihazlardan mikropilaka okuyucular veya mikropilaka fotometreleri olarak da bilinen plak okuyucular, mikropilaklardaki numunelerde biyolojik, kimyasal veya fiziksel olayları saptamak için kullanılan aletlerdir. Araştırmalarda, ilaç keşfinde yaygın olarak kullanılırlar (Pagano ve ark., 2023). Bir ışık kaynağı, numuneyi belirli bir dalga boyu (bir optik filtre veya bir monokromatör tarafından seçilir) kullanarak aydınlatır ve kuyunun diğer tarafında bulunan bir ışık detektörü, başlangıçtaki ışığın ne kadarının (%100) iletildiğini ölçer. İletilen ışığın miktarı tipik olarak ilgilenilen molekülün konsantrasyonu ile ilişkilidir.

Floresan mikroskoplarda yüksek çözünürlüklü görüntü sayesinde hücrelerin yaptıkları daha net bir şekilde görülebilir. Çalışmamızda kullanılan cihazlardan Lazer konfokal mikroskop (LKM)’ta ise bu ince doku örnekleri ve hücrelerden elde edilen görüntüleri üç boyutlu olarak incelemek mümkündür (Şekil 3.1.) Hücre içerisinde görünmeyen değişik

ürünler, katyonlar ve hücre yapılarını görünür hale getirebilmekte ve miktarlarını ölçebilmektedir. LKM temel kısımları; lazer, ışın ayırıcı, tarayıcı, objektifler ve lensler, Z kontrol sistemi, ışık yolu ve foto çoğaltıcı tüpten oluşmaktadır. Çalışmamızda kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Lazer konfokal mikroskop cihazı.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Cihaz	Marka/Model
%5 CO ₂ İnkübatör	NB-203QS MODEL, N-BIOTEK, (Güney Kore)
Biyogüvenlik Kabini	NB604WS120 Model N-BIOTEK, (Güney Kore)
Buzdolabı (2-8 °C)	Arçelik
Çalkalamalı Su Banyosu	Termal Laboratuvar Aletleri (Türkiye)
Derin dondurucu (-20 °C)	Uğur (Türkiye)
İnvert Mikroskop	Axio Observer 7, Zeiss, (Almanya)
Işık Mikroskobu	Axiovert 40 CFL, Zeiss, (Almanya)
Lazer Konfokal Mikroskop	LSM 800, Zeiss (Almanya)
Plate Reader	Tecan, Infinite M200 Pro (Avusturya)
Soğutmalı Santrifüjler	Hettich (Almanya) ve Kubota (Japonya)
Sonikatör	Bandelin HD4100 Ultrasonik sonikatör, (Almanya)
Vorteks	Nüve NM 100 (Türkiye)

3.4. Çalışmada kullanılan teknikler

3.4.1. Hücre kültürü

HT29 CC hücrelerinin ekim ve pasajlama işlemleri steril laminar akım kabini (laminar flow) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ekim ve pasajlama işlemlerinin öncesinde laminar akım kabininin kültür kaplarının alt yüzeyleri ile temas edecek çalışma alanı, 15 dakika boyunca ultraviyole (UV-C Lamba, 120 cm, TUV, 36W/G36 T8, Philips, Hollanda) ışığa maruz bırakılmak suretiyle sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Hücrelerin ekim işlemine geçmeden önce laminar akım kabini çalışma yüzeyi, invert mikroskopun tablası ve kullanacağımız diğer tek kullanımlık olmayan malzemeler %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarının öncesi ve sonrasında laminar kabin UV ışınları ile steril hale getirilmiştir. Hücre kültüründe inkübasyon alanı, %70'lik etanol ile temizlenmiştir. Hücre kültüründe inkübasyon, 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde gerçekleştirilmiştir. İnkübatörün tabanında bulunan ve içerisinde bakır sülfat içeren su haznesindeki distile su düzenli aralıklarla değiştirilmiş ve inkübatör kullanım talimatına uygun olacak şekilde temizlenmiştir.

Büyütme besiyeri hazırlama

HT29 hücrelerinin ilk ekimi ve flask bakımından sayıca yeterli çokluğa ulaşana kadar pasajlamada HAM'S F12 ve DMEM bazal medyumlarının 1:1 oranlarında birleşimiyle elde edilmiş ve ticari olarak satılan karışım medyumlar (DMEM-12-A, Capricorn, Almanya) kullanılmıştır. HT29 hücreleri için büyütme medyumunu %89 bazal medyum, %10 Fetal Bovine Serum (S0115, Sigma Aldrich, ABD) ve %1'i penisilin-streptomisin (SLP-507-100, Sigma Aldrich, ABD) antibiyotik kombinasyonu olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım terminolojik olarak 'büyütme medyum' olarak adlandırılrsa da ilerleyen bölümlerde sadece 'medyum' şeklinde anılmıştır.

Pasajlama

Laminar kabinde büyütme medyumundan tek kullanımlık steril pipetler yardımıyla flaslara 5'er ml konulmuştur. Flaskların kapakları kapatılarak hazır bir şekilde bekletilmiştir. HT29 hücreleri buldukları kültür kaplarının zeminine tutunma/yapışma özelliği gösterdiğinden deneysel çalışmaların yapılabilmesi için flask zemininden kaldırılmaları gerekmektedir. Steril çalışma zinciri bozulmadan flasklar inkübatörden alınarak önce invert mikroskopla hücrelerin üreme yoğunluğu (konfluens) ve kontaminasyon durumu kontrol edilerek laminar akım kabinine alınmıştır. İnkübatörde 24-48 saat süreyle bekletilen HT29 hücrelerinin flask taban alanını kaplama durumları invert mikroskop yardımıyla tespit edilerek en az %80 çoğalma konfluensine sahip olan flasklar çalışmaya dahil edilmiştir. Hücrelerin

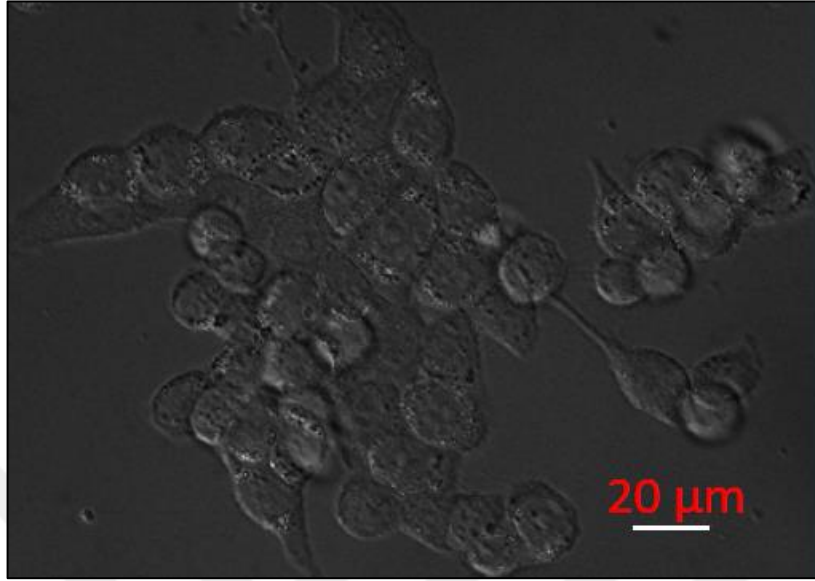
üzerinde bulunan medyum atık toplama kabına boşaltılmıştır. Her flaskın üzerine yaklaşık 1 kat seyreltik (1x) 10 ml hacimde fosfat tamponlu salin (PBS, S0115, Merck Millipore, ABD) koyularak yavaş hareketlerle flask öne-arkaya ve sağa-sola hareket ettirilip hücrelerin yıkanması sağlanmıştır. Flask içerisindeki PBS pipet yardımıyla hücrelerin bulunduğu flasktan uzaklaştırılmıştır. Ancak HT29 hücreleri flask tabanına tutunduğu için flask içerisinde kalmıştır. Böylece ölü hücre artıkları ve ekstraselüler ortamda bulunan toksik metabolitler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine %0,25'lik Tripsin-EDTA (T4049, Sigma Aldrich, ABD) solüsyonundan flask zeminini kaplayacak miktarda (yaklaşık olarak 3-5 ml) konulmuştur. Flasklar inkübatöre alınmadan laminar kabin içinde hassas bir şekilde çalkalanarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır.

Işık mikroskobu ile tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları teyit edilmiştir (Şekil 3.2.). Mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları tespit edilince flasklar tekrar laminar akım kabinine alınarak üzerlerine 10 ml medyum eklenmiştir. Hassas bir şekilde 10-15 kez pipetaj işlemi uygulanmıştır. Pipetaj işlemi bitince hücreler boş bir 15 ml'lik falkon tüpe alınmıştır. Tüpler 5 dk boyunca 1200 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Sonrasında laminar akım kabinine alınan tüplerden üstte kalan süpernatant dezenfekte atık toplama şişesine dökülmüştür. Böylece hücreler proteaz aktivitesi olan Tripsin-EDTA solüsyonundan arındırılmıştır. Falkon tüpün dip kısmına pelet şeklinde çöken HT29 hücre topluluğu üzerine yaklaşık 5 ml medyum eklenmiştir ve tek kullanımlık steril bir pipetle hassas bir şekilde pipetaj işlemi yapılmıştır. Daha önceden hazırladığımız ve içerisinde 5 ml medyum bulunan flaskların içerisine falkon tüpünde bulunan HT29 hücre topluluğu-medyum süspansiyonundan 1'er ml aktarılmıştır. Flaskın kapağı kapatıldıktan sonra bulunduğu zemin üzerinde öne-arkaya ve sağa-sola doğru çok yavaş hareket ettirilerek hücrelerin flask içerisindeki medyuma homojen bir biçimde yayılması sağlanmıştır.

Pasajlama işlemi tamamlanan hücreler invert mikroskopta son kez kontrol edilerek tekrar inkübatöre alınarak 24-48 saat boyunca inkübe (37 °C ve %5 CO₂) edilmiştir. Süre sonunda hücrelerin %80'den fazla konfluense ulaşması durumunda 'Hücrelerin Pasajlanması' başlığı altında belirtilen aşamalar takip edilerek yeniden pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasajlama işlemi her 48-72 saate bir tekrarlanmıştır (Öz ve Çelik, 2016).

Kuyucuk okuyucu ve Casy hücre sayım analizlerinde tutunmuş hücrelere ihtiyaç olmadığından T25 flasklardan elde edilen hücreler kullanılmıştır. Lazer konfokal mikroskop

analizlerinde tutunmuş hücelere ihtiyaç olduğundan ortasında cam içeren yuvarlak küçük flasklara ekilmiş ve tutunmaları sağlanmıştır.



Şekil 3.2. HT29 kolon kanseri hücre hattının ışık mikroskopundaki görüntüleri (40x).

3.4.2. MTT (hücre canlılığı) Tayini

Bütün grupların HT29 hücrelerinde hücre canlılığı esasına göre çalışan MTT deneyi uygulanmıştır. Bu deneyde sarı renkte olan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide maddesi canlı hücreler tarafından mitokondriyal solunum yolu ile mor renkli formozan kristaline dönüştürülmektedir. Eğer hücreler canlı değilse bu reaksiyon gerçekleşmemektedir. HT29 hücreleri MTT boyası (0,5 mg/ml dozda) ile 37 °C'de 90 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir ve santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Sonra formazan kristallerini çözmek için DMSO eklenmiştir ve işlemler iki kere yapılmıştır. Kuyucuk okuyucu cihazında, (Infinite M200 Pro, Tecan, Groedig, Avusturya) her bir kuyucuk için aynı absorbans değerleri (490 nm - 650 nm) kullanılarak hücre canlılığı analizi tamamlanmıştır. Hücrelerde protein değerleri de ölçüldükten sonra, elde edilen değerler kontrole kıyasla misli artış olarak verilmiştir.

3.4.3. Casy Tone cihazı ile hücre sayısı, hücre canlılığı ve ölü hücre miktarının belirlenmesi

Casy Tone hücre sayım cihazı (Şekil 3.3.) tanımlanmış bir gözenekle ayrılmış iki elektrot arasındaki iletkenliği ölçer. Yüzen hücreler, tanımlanmış bir tampon çözelti olan Casy Tone'de hazırlanır. Ölçüm sırasında, gözenekten geçen hücreler bir elektrik darbesi üretir. Sinyalin yoğunluğu doğrudan hücrenin hacmi ile ilişkilidir. Dolayısıyla Casy Tone hücre

sayım cihazı, gözenekten geçen her hücrenin hacmini algılar. Hücreler Casy Tone solüsyonu içerisine alınarak Casy Tone hücre sayım cihazı özel plastik kabı içerisine otomatik pipet yardımı ile eklenmiştir. Sayım ve analiz işlemleri gerçekleştirildikten sonra hücre sayımı ve ölü hücre (debris) miktarı sonuçları $\times 10^6$ hücre olarak verilmiştir (Öcal ve Nazıroğlu, 2022; Gökçe ve ark., 2019).



Şekil 3.3. Casy Tone model hücre sayım cihazı.

3.4.4. Apoptozis tayini

APOPercentage kit analizinde pembe renkli boya kullanılmaktadır. Bu boya ölü hücrelere geçebilirken canlı hücrelere geçememektedir. Hücreye girebilme özelliği fosfatidilserin transmembran hareketiyle gerçekleşmektedir. Bu pembe renkli boya canlı ve nekrotik hücrelere giremediğinden ve sadece apoptotik hücrelere girebildiğinden apoptozisin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Vazquez-de-Lara ve ark., 2018).

Bir ml 1x PBS ile dilüe edilmiş HT29 hücrelerinin 150 μ l'si apoptozis testi için ayrılmıştır. 150 μ l hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 50'şer μ l olacak şekilde üçe bölünmüştür. Daha sonra üzerine 950 μ l 1x PBS eklenmiştir. Pipetaj işlemi takiben üzerine 9 μ l apoptozis boyasından (APOPercentage, Biocolor, İngiltere) eklenmiştir ve 30 dk süreyle çalkalama cihazına bırakılmıştır. Çalkalama sonrası 1500 g (gravite, yer çekimi)'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atık kabına atılmıştır. Santrifüj edilen hücreler üzerine 1xPBS eklenerek yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkanan hücrelerin üzerine 200 μ l APOPercentage Dye Release'den ilave edilmiştir. Pipetaj ve ardından santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atık kabına atılmıştır. Kalan hücreler kuyucuklara aktarılıp 550 nm dalga boyunda kuyucuk okuyucu cihazında okunmuştur. Hücrelerde protein değerleri de ölçüldükten

sonra, elde edilen değerler kontrole kıyasla misli artış olarak verilmiştir (Öcal ve Nazıroğlu, 2022; Gökçe ve ark., 2019).

3.4.5. Hücre içi ROS tayini

Hücre içerisinde TRPM2 aracılı Ca^{+2} artışı olursa mitokondri zar depolarizasyonu ve hücre içi ROS üretimine neden olmaktadır. Bu nedenle, hücre içi ROS üretimi (cROS) analizleri yapılmıştır. 96 kuyucuklu kuyucuk okuyucu tabakaları içerisinde ve DMEM/F12 besi ortamındaki iki hücre grubu üzerine 0.02 mM DCFH-DA ilave edilmiştir. Hücrelerin boyanması için 15-20 dakika karanlıkta beklenmiştir. Oksidatif stres sonucu floresan olmayan DCFH-DA, floresan form olan DCF'ye dönüşmüştür. DCF'lerin yaydığı floresanlar kuyucuk okuyucu cihazında analiz edilmiştir. Kuyucuk okuyucuda uyarım dalga boyu olarak 495 nm kullanırken, emisyon dalga boyu olarak 527 nm kullanılmıştır. Sonuçlar kontrole kıyasla misli artış olarak verilmiştir (Öcal ve Nazıroğlu, 2022; Gökçe ve ark., 2019).

3.4.6. Mitokondriyal membran depolarizasyon tayini

Bir mililitre 1x PBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 μ l'si ise MMP analizi için ayrılmıştır. 150 μ l hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 50'şer μ l olacak şekilde üçe bölünmüştür. Daha sonra üzerlerine 950 μ l taze medyum koyularak 15-20 kez pipetaj yapılmıştır. Üzerine 1 μ l 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1, Life Technologies, ABD) MMP boyası koyulmuş ve tekrar 15-20 kez pipetaj yapılmıştır. Eppendorf tüpler 45 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de inkübe edilmiştir. Süre bitimini takiben 500 g devirde 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sonrasında süpernatant atılarak üzerlerine 300 μ l 1x PBS konulup ve pipetaj yapılmıştır. Her bir plate kuyucuğuna 100 μ l olacak şekilde bölünmüştür. Sağlıklı hücrelerde boya mitokondri matriksinde yoğunlaşmıştır. Burası boyanın kırmızı floresan kümeleşmeleri gerçekleştirdiği yerdir. Boya kırmızıdan (JC-1 kümeleşmeleri) yeşile (JC-1 monomerleri) dönerek hücrenin bütününe yayılır. Kuyucuk okuyucu cihazında 488 nm eksitasyon, 590 nm (JC-1 kümeleşmeleri) ve 525 nm (JC-1 monomerleri) emisyon dalga boylarında okunup 590/525 emisyon oranıyla sonuçlar hesaplanmıştır. Hücrelerde protein değerleri de ölçüldükten sonra, elde edilen değerler kontrole kıyasla misli artış olarak verilmiştir (Kahya ve ark., 2017).

3.4.7. Kaspaz -3, kaspaz -8 ve kaspaz -9 tayini

Öncesinde bir saat süre ile 37 °C'de 2 ml substrat solüsyonu (20 mM HEPES, 2 mM etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), %0,1 CHAPS, 5 mM ditiyotreitil (DTT), ve 8.25 μ M kaspaz substratı; pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı) içerisinde inkübe edilen hücreler, ultrasonik

(HD4100, Bandelin, Almanya) parçalama işlemine tabi tutulmuştur. Kaspaz -3, -8 ve -9 aktiviteleri floresan boyalar ile boyanarak değerlendirilmiştir (Ac-DEVD-AMC-kaspaz -3, Ac-IETD-AFC-kaspaz -8 ve Ac-LEHD-AMC-kaspaz -9) (Bachem AG, Bubendorf, İsviçre). Elde edilen veriler floresan birimi/miligram protein olarak değerlendirilmiş ve sonrasında araştırma grupları değerleri kontrol değerlerine bölünmüştür. Sonuçlar kontrole kıyasla % misli artış olarak verilmiştir.

3.4.8. Hücre canlılığı oranı belirlenmesi ve görüntülenmesi

Deney grupları arasında hücre canlılığı oranı propidyum iyodür (PI)/Hoechst boyları kullanılarak LKM ile araştırılmıştır. Analizler için izole edilen HT29 hücreleri, orta kısımları cam olan petrilere konularak üzerine 200 µL hücre kültürü mediumu olan DMEM eklenmiştir. Petri içerisinde bulunan hücre üzerine PI (5µg/ml) ve Hoechst 33342 (1µM) boyları eklenerek karanlık ortamda 30 dk bekletilmiştir. Görüntüler LKM’da PI ve Hoechst için 561 ve 405 nm’de argon lazer ile uyarımlar yapılarak, PI için, 305 nm ve 617 nm eksitasyon/emisyon dalga boylarında, Hoechst için, 348 nm ve 455 nm eksitasyon/emisyon dalga boylarında 40x yağlı objektif ile lazer uyarım yapılarak görüntülemeleri yapılmıştır. Elde edilen görüntülerdeki kırmızı/mavi renk sırasıyla ölü hücre (PI)/canlı hücre (Hoechst) oranı, ZEN 2.3 programı kullanılarak hesaplanmıştır ve sonuçlar kontrole kıyasla yüzde (%) oranla verilmiştir (Yıldızhan ve Nazıroğlu, 2020).

3.4.9. Hücre içi Ca⁺² görüntülemesi (Fluo-3 AM)

[Ca⁺²]i göstergesinde kullanılan en iyi floresan boyalardan bir tanesi Fluo-3 AM’dir. Bu boya hücre içerisine girdikten sonra [Ca⁺²]i iyonlarına bağlanmakta ve lazer ışık altında ışımaya yapmaktadır. Fluo-3 AM ile boyanan hücrelerin görüntülenmesi LKM cihazı ile yapılmıştır (Joshi ve Bakowska, 2011). Gruplardan elde edilen tüm CC hücreleri hücre kültürü ortamında (37 °C ve %5 CO₂) ve karanlıkta 1 µM Fluo-3 AM ile 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 488 nm’de argon lazer ile uyarımlar yapılarak, 515 nm’de 40x yağlı objektif ile görüntülemeleri LKM ile elde edilmiştir. Fluo-3 AM floresan boya yoğunluğu ZEN 2.3 programı ile hesaplanarak sonuçlar hücre içi floresan yoğunluğu arbitrary unit (a.u.) olarak verilmiştir. TRPM2 kanalı açıcısı H₂O₂ (1 mM) ile uyarımı yapılırken TRPM2 kanal blokeri CARV (200 µM) ile kanal inhibisyonları yapılmıştır (Yıldızhan ve Nazıroğlu, 2020).

3.5. Verilerin Toplanması

Araştırmaya başlamadan önce Necmettin Erbakan Üniversitesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu’ndan 18/03/2022 tarihli ve 2022/3706 karar sayılı Etik Onayı (EK 1)

alınmıştır. Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Farmakoloji AD ve BSN Sağlık Analiz Arge Laboratuvarında 13.08.2022-10.10.2023 tarih aralığında yapılan deneylerin sonuçları elde edilerek, çalışma ekibi tarafından veriler oluşturulmuş ve analizleri yapılmıştır.

3.6. Sınırlılıklar

Çalışmada bütçe olanakları içinde CC hücreleri (HT29) hücre kültürü için iki farklı grup oluşturulmuş ve çalışmada BTX-A tek bir dozda (5 IU) uygulanmıştır. Olanakların elvermesi durumunda farklı antineoplastik ilaçların ve farklı BTX-A dozlarının uygulanarak etkilerinin gözlenmesi daha kapsamlı karşılaştırma olanakları sağlayacaktır.

3.7. Verilerin Analizi

Çalışmada elde edilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Graplardan elde edilen sonuçlardaki bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıkların varlığı bağımsız örneklem t -testi (SPSS, Windows 25.0 paket bilgisayar programı) kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve istatistiksel fark olan değerler belirlenmiştir. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında BTX-A'nın, HT29 CC hücre hattında etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda, HT29 hücre hattının BTX-A ile inkübasyonları; MTT deneyi, Casy Tone cihazı, kuyucuk okuyucu cihazı ve LKM ile araştırılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. HT29 CC hücre hattına BTX-A uygulanması sonrası kontrol (CNT) grubuna kıyasla elde edilen değerler

Yapılan Analizler	CNT \pm SD	BTX-A \pm SD	n sayısı	p değeri
Hücre sayısı ($\times 10^6$)	4,18 \pm 0,32	3,40 \pm 0,09	6	0,009
Hücre canlılığı (%)	100 \pm 0,32	70,00 \pm 4,16	6	0,001
Debris miktarı ($\times 10^6$)	0,97 \pm 0,02	1,37 \pm 0,07	6	0,001
Apoptozis (%)	100 \pm 0,36	112,36 \pm 1,47	6	0,016
Mitokondriyal membran depolarizasyon tayini (%)	100 \pm 0,93	164,23 \pm 1,62	6	0,001
Hücre içi ROS tayini (%)	100 \pm 0,92	151,99 \pm 2,25	6	0,001
Kaspaz -3 (%)	100 \pm 0,43	144,54 \pm 2,15	6	0,001
Kaspaz -8 (%)	100 \pm 0,88	112,08 \pm 1,83	6	0,049
Kaspaz -9 (%)	100 \pm 0,63	111,25 \pm 1,01	6	0,012
Hücre canlılığı oranı (%) (PI/Hoechst)	5 \pm 0,75	11,89 \pm 2,65	3	0,001
[Ca ²⁺]i görüntülemesi (floresan yoğunluğundaki değişim) (a.u)	59,52 \pm 3,19	95,45 \pm 2,70	3	0,001
[Ca ²⁺]i görüntülemesi + H ₂ O ₂ (floresan yoğunluğundaki değişim)(a.u)	124,57 \pm 1,76	146,66 \pm 9,36	3	0,001
[Ca ²⁺]i görüntülemesi + H ₂ O ₂ + CARV (floresan yoğunluğundaki değişim) (a.u)	82,87 \pm 5,59	113,72 \pm 6,29	3	0,001

HT29 CC hücrelerinde BTX-A (5 IU) uygulaması sonrası, tabloda yer alan analizler sonucunda elde edilen değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

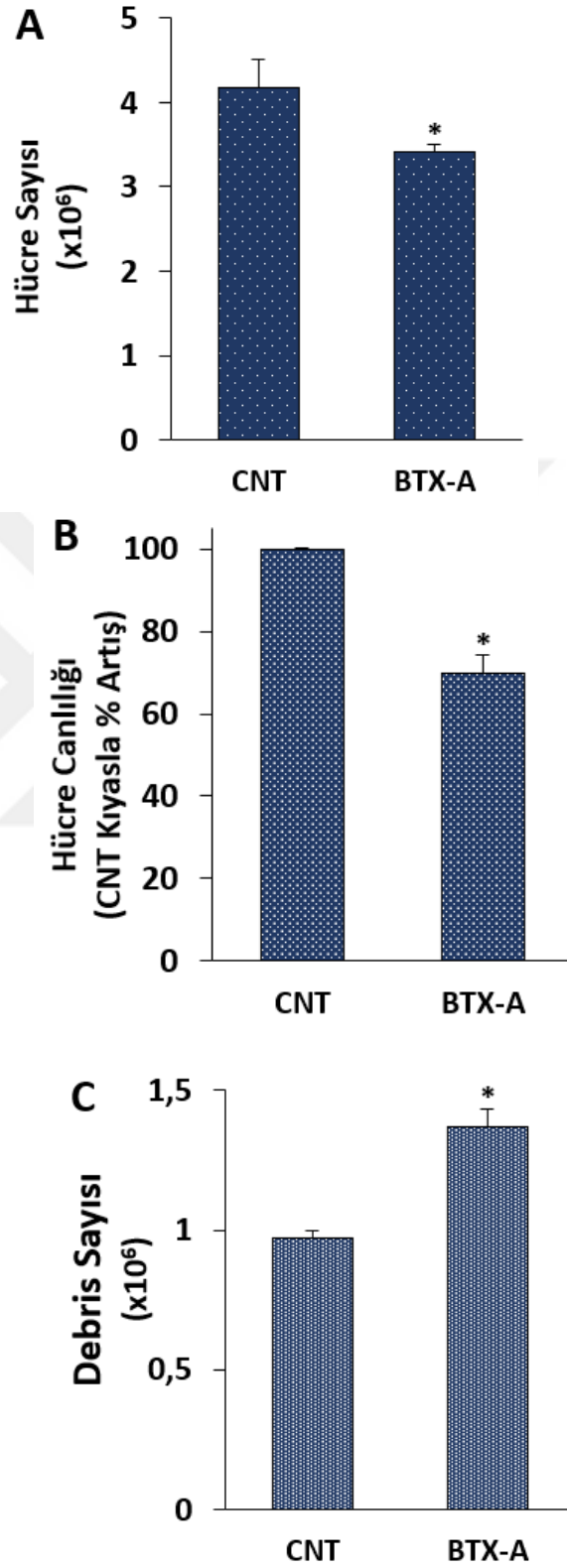
4.1. Casy Tone Cihazı ve MTT Analiz Sonuçları

Tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerinde hücre sayısı, hücre canlılığı ve hücrelerin ölümü sonucu oluşan debris miktarının belirlenmesinin büyük önemi vardır. Bu tez çalışmasının ilk amacı HT29 tümör hücrelerinde BTX-A uygulaması sonrası; hücre sayısı, hücre canlılığı ve debris miktarı belirlenmesiydi.

4.1.1. Tümör hücre sayısı, canlılığı ve debris miktarı sonuçları

Kontrol grubuna kıyasla, BTX-A grubunda hücre sayısı ($p=0,009$) (Şekil 4.1.A) ve hücre canlılığı değerleri ($p=0,001$) (Şekil 4.1.B) anlamlı düzeyde düşük iken, debris miktarı değerleri ($p=0,001$) (Şekil 4.1.C) anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Casy Tone solüsyonu ve MTT

analizi kullanılarak yapılan analizlerde BTX-A inkübasyonunun HT29 tümör hücrelerinin sayısını ve hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir.

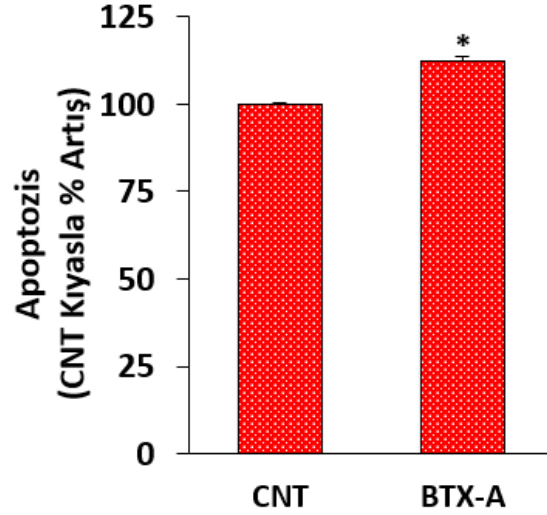


Şekil 4.1. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, hücre sayısı (A), hücre canlılığı (B) ve ölü hücre artışı (debris) miktarı (C) üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A) inkübasyonlarının etkileri. (Ortalama± Standart Sapma. n=6) (*: p=0,009 A grafiği; *: p=0,001 B grafiği; *: p=0,001 C grafiği; kontrol (CNT) grubuna kıyasla).

4.2. Kuyucuk Okuyucu Cihazı Analiz Sonuçları

4.2.1. Apoptozis tayini sonuçları

Apoptozis analizleri kuyucuk okuyucu cihazında ApoPercentage ticari kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, BTX-A grubunda apoptozis düzeyleri (Şekil 4.2.) anlamlı düzeyde ($p=0,016$) yüksek bulunmuştur.

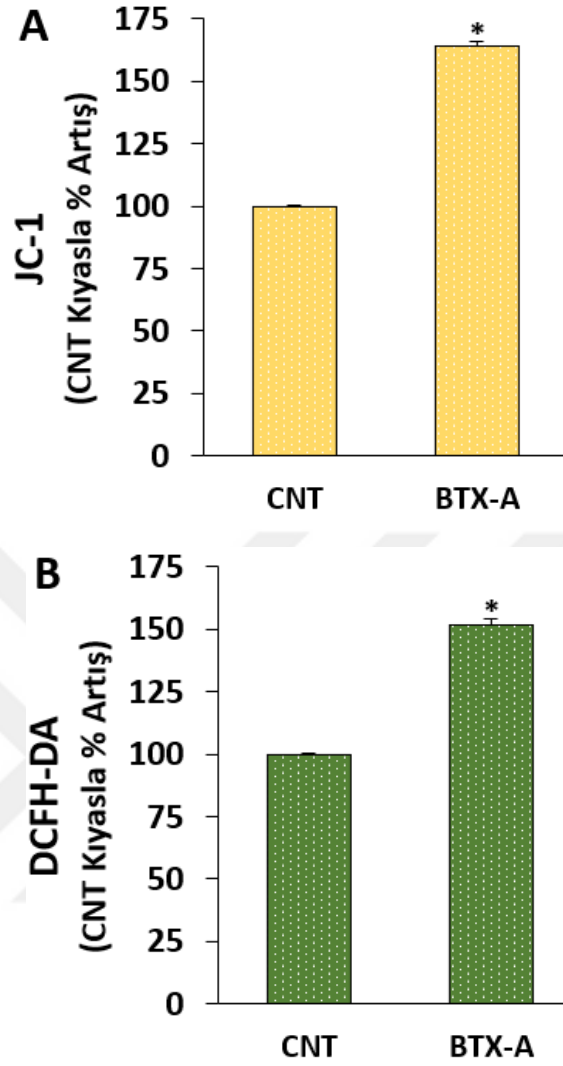


Şekil 4.2. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, apoptozis değerleri üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri. Apoptozis (A) analizleri ApoPercentage ticari kiti kullanılarak kuyucuk okuyucu cihazında belirlendi. (Ortalama± Standart Sapma. n=6) (*: $p=0,016$ kontrol (CNT) grubuna kıyasla).

4.2.2. Mitokondriyal membran depolarizasyon tayini ve hücre içi ROS sonuçları

Mitokondri membranları arası alandaki protonlar, elektron taşıma zinciri komponentleri, krebs döngüsü sonucu ortaya çıkan metabolitler MMP oluşumu ve sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Çalışmamızda MMP'de JC-1 boyası kullanılarak çalışılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla, BTX-A grubunda MMP (JC-1) düzeyleri (Şekil 4.3.A) anlamlı düzeyde ($p=0,001$) yüksek bulunmuştur.

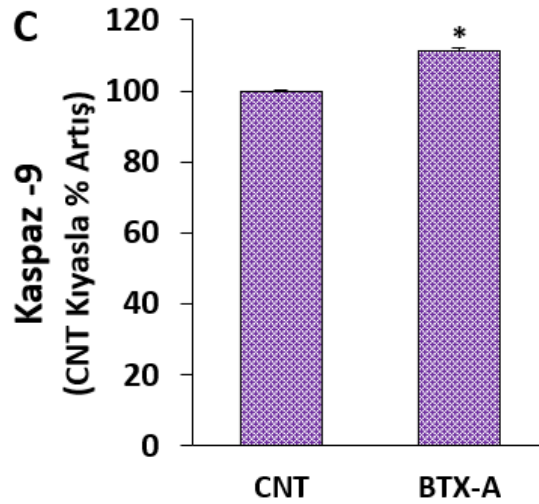
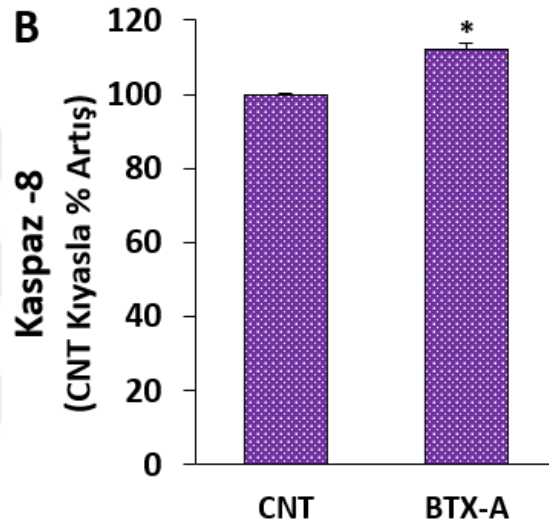
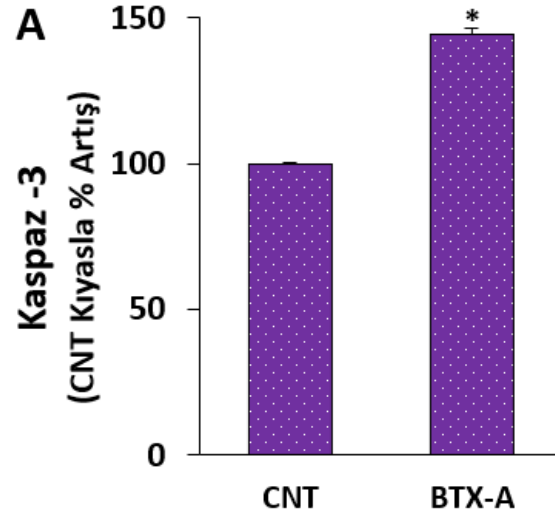
Kontrol grubuna kıyasla, BTX-A grubunda cROS düzeyleri (Şekil 4.3.B) anlamlı düzeyde ($p=0,001$) yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.3. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, JC-1 ve ROS değerleri üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri. JC-1 (A) ve ROS (B) analizleri floresan probolar kullanılarak kuyucuk okuyucu cihazında belirlendi. (Ortalama± Standart Sapma. n=6) (*: p=0,001 kontrol (CNT) grubuna kıyasla).

4.2.3. Kaspaz -3, kaspaz -8 ve kaspaz -9 tayini sonuçları

Kaspaz analizleri kuyucuk okuyucu cihazında kaspaz substratları kullanılarak yapılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla, BTX-A grubunda kaspaz -3 (p=0,001) (Şekil 4.4.A), kaspaz -8 (p=0,049) (Şekil 4.4.B) ve kaspaz -9 (p=0,012) (Şekil 4.4.C) aktiviteleri anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

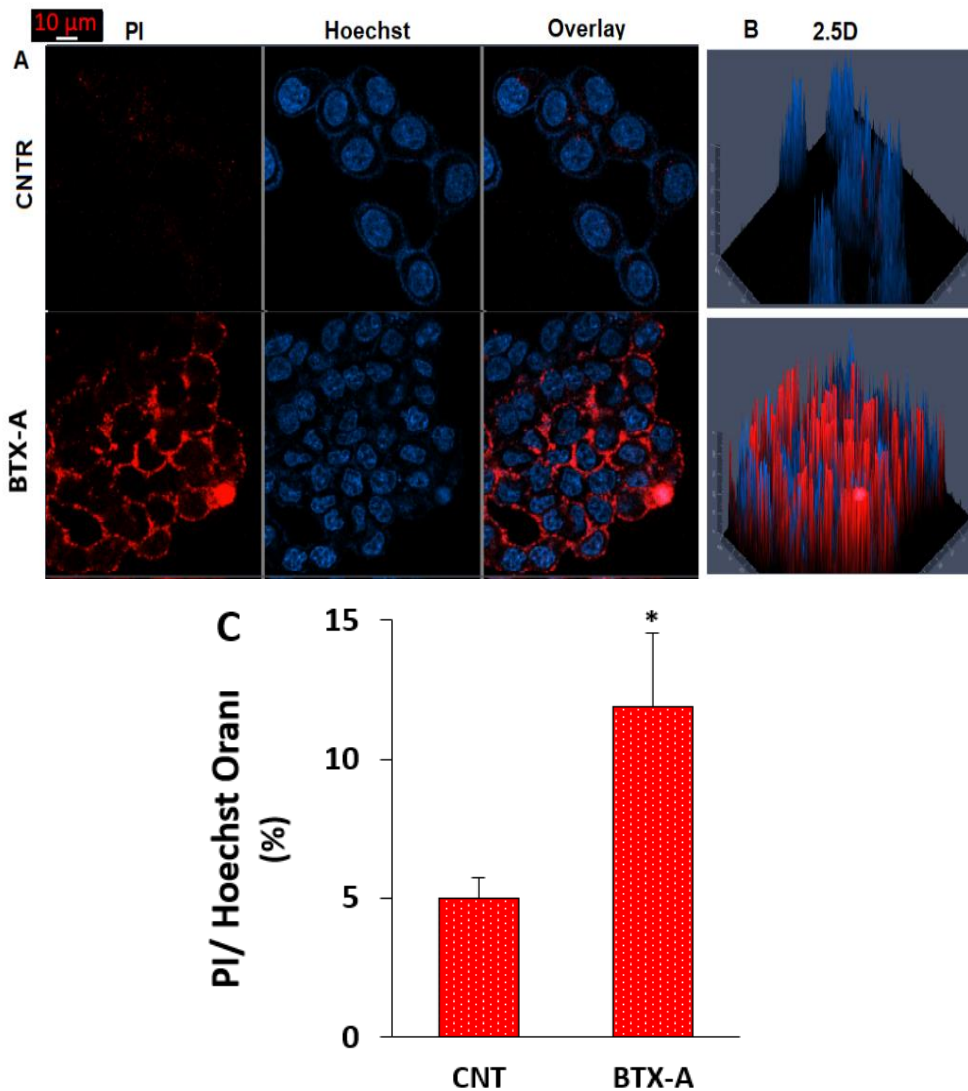


Şekil 4.4. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, kaspaz -3, kaspaz -8 ve kaspaz -9 aktiviteleri üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri. Kaspaz -3 (A), kaspaz -8 (B) ve kaspaz -9 (C) aktivite analizleri kaspaz substratları kullanılarak kuyucuk okuyucu cihazında belirlendi. (Ortalama± Standart Sapma. n=6) (*: p=0,001 A grafiği; *: p=0,049 B grafiği; *: p=0,012 C grafiği; kontrol (CNT) grubuna kıyasla).

4.3. Lazer Konfokal Mikroskop Görüntüleme Analiz Sonuçları

4.3.1 Hücre canlılığı oranı analiz sonuçları

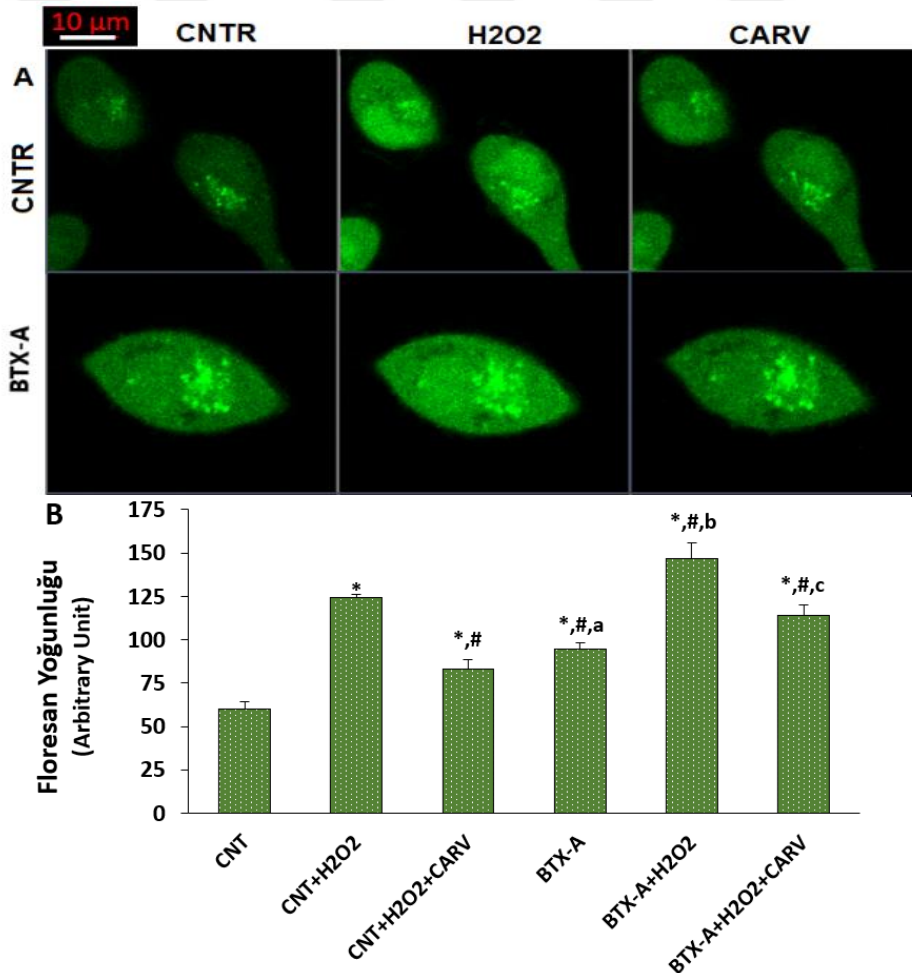
Grupların hücre canlılığı oranı PI/Hoechst boyaları kullanılarak LKM ile belirlenmiştir. Hoechst canlı hücrelerin sitoplazmasını boyar ve mavi görünür, PI ölü hücreleri boyar ve kırmızı görünür. Sonuçlar PI pozitif hücre sayısına göre % olarak verilmiştir. Bu çalışmada, PI boyası kullanılarak ölü hücrelerin, Hoechst boyası kullanılarak canlı hücrelerin sayıları tespit edilmiştir (Şekil 4.5.A). HT29 CC hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla, BTX-A grubunda PI pozitif hücre oranı istatistiksel olarak ($p=0,001$) yüksek bulunmuştur (Şekil 4.5.B). Diğer bir ifade ile kontrol grubuna kıyasla, BTX-A grubunda, PI pozitif hücre sayısının, anlamlı düzeyde arttığı ($p=0,001$) (Şekil 4.5.C) gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, hücre ölümü üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri. Canlı (mavi) hücreler Hoechst boyası ile boyanırken, ölü hücre çekirdekleri propidyum iyodür (PI) ile kırmızı renkte boyandı (A). Her iki rengin birleşik görüntüsü 'Birleşik' ve 2.5D olarak gösterildi (B). Ham değerlerin ortalaması kolon grafiği ile gösterildi (C). (Ortalama± Standart Sapma. n=6 ve her biri 8-10 kayıt) (*: $p=0,001$ kontrol (CNT) grubuna kıyasla).

4.3.2. $[Ca^{+2}]_i$ görüntülemesi (Fluo-3 AM) analiz sonuçları

Deney gruplarındaki $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerini belirlemek için Fluo-3 AM ile boyanmış hücreler yıkandıktan sonra LKM cihazının TRPM2 kanal stimülasyonu H_2O_2 (1 mM) ile yapılırken, TRPM2 kanal inhibisyonu CARV (200 μM) ile yapılmıştır. Sonuçlar floresan yoğunluğunda değişim (arbitrary unit, a.u.) olarak verilmiştir. Her grubun H_2O_2 verilmeden önceki durumuna kıyasla, H_2O_2 verilen gruplarda $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin istatistiksel olarak yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.A). $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri BTX-A grubunda CNT grubuna ($p=0.001$) ve CNT+ H_2O_2 +CARV grubuna kıyasla ($p=0.001$), BTX-A+ H_2O_2 grupları diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulunmuş ($p=0.001$); $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri BTX-A+ H_2O_2 grubunda en yüksek değere ulaşmıştır. Floresan yoğunluğunun, BTX-A+ H_2O_2 +CARV grubunda BTX-A+ H_2O_2 grubuna kıyasla belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir ($p=0.001$) (Şekil 4.6.B).



Şekil 4.6. HT29 kolon kanseri hücrelerinde, hücre içi serbest Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) düzeyleri üzerinde botulinum nörotoksin A (BTX-A)'nın etkileri. Hücreler Fluo-3-AM floresan boyası ile 45-60 dakika boyandı (A). Ham değerlerin ortalaması kolon grafiği ile gösterildi (B). (Ortalama \pm Standart Sapma. $n=6$ ve her biri 8-10 kayıt) (*: $p=0.001$ kontrol (CNT) grubuna kıyasla; #: $p=0.001$ CNT+ H_2O_2 grubuna kıyasla; a: $p=0.001$ CNT+ H_2O_2 +CARV grubuna kıyasla; b: $p=0.001$ BTX-A grubuna kıyasla; c: $p=0.001$ BTX-A+ H_2O_2 grubuna kıyasla).



5. TARTIŞMA

CC, dünyada görülen en yaygın kanser türlerinden biri olup, yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. CC'in önlenmesi ve tedavisi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Kanser ölümlerindeki düşüş hızı elimizdeki mevcut verilere bakıldığında 1990 sonlarından günümüze kadar yavaş yavaş yükselmektedir; ancak bu yükseliş yeni vakalardaki artış oranına kıyasla çok daha düşük seyretmektedir. Bu yüzden kansere yakalanan nüfus oranı yıldan yıla giderek artmaktadır (Siegel ve ark., 2022).

CC'den korunmak için öncelikle risk faktörlerinden (sağlıksız beslenme, fiziksel aktivite azlığı, sigara vb.) kaçınmak gerekir. CC insidansı yüksek olan bireylerin (afro-amerikan köken, erkek cinsiyeti, eşlik eden hastalıklar, ailede CC öyküsü) bu konuda çok daha dikkatli olması önerilmektedir. CC'i önlemek ve CC'ye bağlı ölümleri azaltmak için en etkili yollardan birisi düzenli yapılan sağlık taramalarıdır. Sağlığımıza zarar verecek her türlü alışkanlıklardan uzak durarak, doğal ürünler ile doğru ve dengeli beslenerek, düzenli yapılan fiziksel aktivite ile stresten uzak sağlıklı bir yaşam sürmek bu anlamda önem arz etmektedir (Hossain ve ark., 2022; Thanikachalam ve Khan, 2019; Mishra ve ark., 2013).

Kanser ve daha birçok hastalıkta, erken teşhis ve tedavi genellikle bireyin hayatta kalma şansını artırmaktadır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde erken teşhis ve tedavinin sağlanabilmesi için sağlık hizmetlerine ulaşım sıkıntısından kişinin gelir ve eğitim durumuna kadar birçok faktör sorumludur. Kanser oluşumuna neden olan risk faktörlerinden kaçınarak kanser vakalarının %40-50'si önlenebilir; erken tanı ve doğru tedaviyle ise %65'i tedavi edilebilir (İstanbul Tabip Odası, 2023; Aiello ve ark., 2019).

Kanser tedavisinin amacı, tümör dokusunu, vücudun geri kalan kısmına zarar vermeden tamamen yok etmektir. CC tedavisinde kullanılan kemoterapötikler yüksek toksisiteye, düşük özgüllüğe ve birçok olumsuz yan etkilere sahiptir; bu da, tedavi başarısızlığına ve/veya düşük hasta uyumuna yol açmaktadır (Khan ve ark., 2022). Bu ilaçlar arasında neoadjuvan tedavilerin temelinde yer alan 5-florourasil / lökovorin ile oksaliplatin (FOLFOX) veya irinotekan (FOLFIRI), bevasizumab, panitumumab veya setuksimab ile birlikte kullanılmaktadır. Kemoterapinin yan etkileri, sağlıklı hücreler hasar gördüğünde ortaya çıkar. Bu yan etkiler arasında yorgunluk, baş ağrısı, miyalji, mide ağrısı, diyare, kusma, boğaz ağrısı, anemi, konstipasyon, sinir sisteminde hasar, bellek sorunları, iştahsızlık ve alöpesi gibi birçok faktör kişinin yaşam kalitesine, sosyalizasyon sürecine olumsuz etki etmektedir (Neugut ve ark., 2019;

Aiello ve ark., 2019). Birçok antikanser ilacın normal hücreler üzerinde zararlı yan etkilere neden olduğu gerçeği göz önüne alındığında, kanser tedavisi için etkili ve güvenli ilaç adaylarının araştırılması, hızlı bir şekilde tedaviye kazandırılması gerekir. İdeal olarak, antikanser tedavilerinin seçici hücre öldürücü etkileri olmalıdır (Adaramoye ve ark., 2017).

Kanser tedavisini, tümörün büyümesinden ve ilerlemesinden sorumlu spesifik molekülleri ele alacak şekilde uyarlamak, klinik onkolojinin umut verici yeni bir alanıdır. Uzun yıllar boyunca apoptozu uyuracak moleküllerin hedeflenmesi ana odak noktası olmuştur, çünkü bu yolun inhibisyonu genellikle malign hücrenin hayatta kalmasında bir faktördür (Karnak ve Xu, 2010). FDA onaylı birkaç ajanın antitümör etkinliği apoptoz sinyal yolları üzerindeki etkilerine bağlıdır. Sınırlı sayıda FDA onaylı antikanser ajan doğrudan apoptotik yolları hedef alır; bu moleküllerden bazıları, anti-apoptotik Bcl-2 aile üyelerini inhibe etmek için tasarlanmıştır. Apoptoz sürecine oksidatif stres, DNA hasarı ve bağışıklık sistemi dahil olmak üzere birçok faktör tarafından tetiklenen mitokondriyal ve reseptör aracılı sinyal yolları aracılık eder. Tümör hücrelerinde apoptoz yollarının aktive edilmesi hücre ölümünü etkileyebilir. Kombinasyon rejimleri kullanarak bu etkiyi güçlendirme olasılığı şu anda araştırılmaktadır (Carneiro ve El-Deiry, 2020).

DSÖ, dünyadaki kişilerin yaklaşık %80'inin tedavi için geleneksel yöntemleri tercih ettiğini bildirmiştir. Bu tedavilerden biri de fitoterapidir. Genel olarak sonuçlar; üzüm, soya fasulyesi, yeşil çay, sarımsak, zeytin ve narın CC'ye karşı en etkili bitkiler olduğunu göstermektedir (Aiello ve ark., 2019). Bu anlamda, geleneksel doğal kaynaklardan geliştirilen yeni antikanser ilaçlar, kemoterapötik ilaçların etkinliğini artırabilir (Liberio ve ark., 2013). Şu anda dünyadaki birçok araştırmacı, genellikle zehirli olan bileşiklerin antikanser özellik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Zehirlerin ve toksinlerin biyolojik çeşitliliği, onları yeni antikanser ajanlarının geliştirilebileceği benzersiz bir kaynak haline getirmektedir (Liu ve ark., 2014). Çalışmalar, yılan ve arı zehrinden türetilen toksinlerin yanı sıra bazı bakteri ve bitki toksinlerinin kanser tedavisine potansiyel olarak yardımcı olabileceğini bildirmiştir. Anaerobik spor oluşturan Gram-pozitif Clostridium botulinum tarafından üretilen BTX bu toksinlerden biridir (Shebl, 2019).

Clostridium botulinum ekzotoksinlerinden biri olan BTX-A, insanoğlunun bildiği en güçlü biyolojik toksin olmasına rağmen BTX-A'nın, tıpta güçlü bir terapötik ajan olduğu uzun süreli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalar, çeşitli nörolojik ve nörolojik olmayan bozuklukların tedavisinde; çeşitli distoni formları, spastisite, infantil serebral palsi, hemifasiyal

spazm, tikler, titreme ve mesane ve gastrointestinal motilite bozuklukları gibi kas hiperaktivite bozuklukları ve anormal kas kasılmaları, blefarospazm, şaşılık, detrüsör aşırı aktivitesi, hiperhidroz, siyalore ve kronik migrende güvenli ve etkin bir tedavi seçeneği olabileceğini ortaya koymuştur (Dressler ve Johnson, 2022; Jankovic, 2018; Cai ve ark., 2017; Dressler, 2012; Aurora ve ark., 2010; Scott, 1980). Uygun bir şekilde kullanıldığında, BTX tedavisi, hastalara uzun süre semptomatik rahatlama sağlayabilir ve böylece yaşam kalitesini olumlu yönde etkileyebilir (Kukreja ve Singh, 2015).

Kanserin tedavi edilmesi için apoptozun uyarılması, mitotik aktivitenin engellenmesi mantıklı bir hedef olarak düşünülmektedir (Carneiro ve El-Deiry, 2020; Pistritto ve ark., 2016). Bandala ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada sunuclar, yaygın olarak iskelet kasları üzerindeki rahatlatıcı etkisi olduğu bilinen BTX-A'nın, T47D meme kanseri hücre hattında apoptotik süreçler yoluyla, hücrelerde doza ve zamana bağlı bir şekilde oldukça sitotoksik olduğunu açıkça göstermektedir. Düşük BTX-A konsantrasyonlarının (<0.1 U) hücre canlılığı üzerinde etkisi gözlenmezken, yüksek BTX-A konsantrasyonlarında (≥ 5 U), hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Karsenty ve ark. (2009) tarafından, prostat kanseri LNCaP (prostat kanseri lenf metastazı) ve PC3 (prostat kanseri kemik metastazı) hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmada, insan prostat kanser hücrelerinin büyümesini in vitro olarak inhibe ettiği saptanmıştır. BTX-A'nın, in vitro PC3 hücre hattında hücre proliferasyonu üzerinde değil, LNCaP hücre hatları üzerinde doza bağlı inhibitör etkisi gözlemlenmiştir. BTX-A'nın kısmen tümör büyüme hızında gözlenen düşüştten ve artan apoptozdan sorumlu olabileceği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışma ile HT29 CC hücrelerinde BTX-A'nın hücre sayısını ve hücre canlılığını azalttığı, debris miktarını arttırdığı gözlemlenmiştir. Apoptozis değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bulduğumuz sonuçlar, daha önce farklı kanser türlerinde yapılan çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Bu çalışmaya dayanarak, BTX-A tedavisinin CC'ye karşı alternatif bir tedavi ajanı olarak daha kapsamlı çalışmalarda incelenebileceği düşünülebilir. Daha önce yapılan çalışmalarda BTX'in, kanser tedavisinde faydalı olabileceği, kanser radyoterapisinden sonra analjezik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Grenda ve ark., 2022).

Kaspaz -3, kaspaz -8 ve kaspaz -9'un mitokondriyal ve reseptör aracılı apoptozis yollarında önemli araçlar olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Hücre canlılığındaki ve sayısındaki azalma, kaspaz aktivitelerinde de artışların olabileceğini düşündürmüştür Artan kaspaz aktiviteleri genellikle apoptozun bir işareti ve kanser tedavisindeki etkinliğin olumlu bir göstergesi olarak kabul edilir. Zincirleme bir şekilde gerçekleşen kaspaz aktivasyonu, apoptoz

yolaklarında görevli proteinleri ve immün sistem sinyal yollarını hedef alarak apoptozu uyardığı için kanser araştırmaları için de umut verici hedeflerdir. Apoptotik kaspazlar hücre ölümünü teşvik eder ve bu nedenle kaspaz kaybının tümör gelişimini teşvik etmesi beklenir (Shalini ve ark., 2015). Zhou ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada kaspaz -3'ün CC hücre istilasını ve metastazı teşvik etmede önemli rol oynadığı ve bu nedenle CC tedavisi için potansiyel bir hedef olarak hizmet edebileceği ortaya konulmuştur. Nam ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada ise proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi Bim'in ekspresyonu ve kaspaz-3'ün aktivasyonunun, C. difficile toksin A uygulanmasıyla önemli ölçüde arttığı; elde edilen sonuçlara göre, C. difficile toksin A'nın, kolorektal kansere ve meme karsinomlarına karşı potansiyel bir antikanser ajanı olabileceği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışma ile HT29 CC hücrelerinde BTX-A'nın, kontrol grubuna kıyasla kaspaz -3, kaspaz -8, kaspaz -9 aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı bulunmuştur. Kaspaz 3, kaspaz kademesinin sonunda olduğundan ve hem mitokondriyal hem de reseptör aracılı yollarla aktive edildiğinden, apoptoz sürecinin önemli araçlarıdır. Kaspaz -3, kaspaz -8, kaspaz -9 aktivasyonlarındaki artış hücre canlılığı ve hücre sayısındaki artış ile negatif, debris miktarındaki veriler ile pozitif korelasyon göstermektedir. Kaspazların apoptotik süreçlerin başlatılmasında hem mitokondriyal hem de reseptör aracılı yollarda üstlendiği görev düşünüldüğünde, kanser hücrelerinin ölümüne neden olduğu elde edilen verilerle ve daha önce yapılan birçok çalışma ile desteklenmektedir.

Son çalışmalarla kanser oluşumunda ve tedavisinde kaspaz 3'ün daha karmaşık bir rol aldığı ortaya konulmuştur. Liu ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışma, kaspaz 3'ün, tümör baskılayıcı olarak görev yapmak yerine, hücre kimyasallara ve radyasyona maruz kalma sonrasında karsinogenezi teşvik ettiğini göstermektedir. Kurtova ve ark. (2015) tarafından mesane kanseri hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada, kaspaz 3'ün, ölen, kemoterapiden sonra tümör hücresi çoğalmasını teşvik ettiği bildirilmiştir. Flanagan ve ark. (2016) tarafından hasta insanlar üzerinde yapılan başka bir çalışma ile düşük düzeyde aktif kaspaz -3'e sahip CC hastalarının hayatta kalma süresinin daha uzun olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlarla, Kaspaz -3'ün, özellikle düşük yoğunluklarda CC hücrelerinin in vitro tümörijenik yeteneklerinin desteklenmesinde önemli rol oynadığı da ileri sürülmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalar ile BTX-A'nın güvenlik indeksinin yüksek olduğu bildirilmiştir. BTX-A'nın terapötik uygulamasının artmasının temel nedenleri, belirgin klinik etkinliğe ve kanıtlanmış güvenlik kaydına sahip olmasıdır (Dressler ve Johnson, 2022; Cai ve ark., 2017). BTX-A'nın kanser hücreleri ile vero hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırmalı

olarak analiz edildiği çalışmalar da mevcuttur. BTX-A'nın, CC (HCT116), prostat kanseri (DU145) hücre hatlarında ve vero hücreleri üzerinde etkisi araştırılmıştır. BTX-A konsantrasyona bağlı olarak, p53 geninin yukarı regülasyonu yolu ile apoptozu indüklemiştir ve hücrel proliferasyonu kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde inhibe etmiştir. BTX-A'nın, vero hücrelerine herhangi bir toksisite olmaksızın, kanser hücre hatlarında sitotoksisiteyi indükleyebileceği ortaya konulmuştur (Shebl, 2019). Fakat yaptığımız literatür taramasında BTX-A'nın, TRPM2 aracılı aşırı $[Ca^{+2}]_i$ artışı ile oksidatif stres, apoptozis ve tümör hücresi ölümü üzerindeki etkileri CC hücrelerinde araştırılmamıştır.

Farklı fizyolojik ve patolojik süreçlerde, hücrel sinyal kaskadlarının ve nörosensör süreçlerinin sinyal iletiminde kritik işlevi bulunan TRPM2'nin, hücre içi Ca^{+2} iyonları ve ROS tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. TRP kanalları oksidatif stres durumunda bir sensör olarak aktive olmaktadır. TRPA1, TRPM2 ve TRPV1'in apoptotik ve oksidan etkilerinden dolayı kolon tümörlerinin tedavisinde etkili ajanlar olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (Kaya ve ark., 2013)

Guler ve Ovey, (2018) tarafından yapılan çalışma sonucunda 5-florourasil ve Lökovorin'in hem kolon (Caco-2) kanseri hem de meme (MCF7) kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin doğrudan TRPM2 kanalları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. 5-florourasil'in hücredeki serbest oksijen radikallerini artırarak oksidatif strese, antioksidan savunma sistemindeki apoptotik etkilerinden dolayı antioksidan savunma sisteminde hasara ve baskıya neden olduğu; TRPM2 kanallarının aktivasyonu sonucu $[Ca^{+2}]_i$ seviyelerinin artmasına ardından MMP artışına yol açarak apoptozun tüm basamaklarında kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir. Guler ve Ovey'in, (2020) daha sonra yaptığı bir başka çalışmada ise siklofosfamidin ve düşük seviyeli lazerin insan kolon (Caco-2) kanseri hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak; siklofosfamidin CC hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin doğrudan TRPM2 kanalları ile ilişkili olduğu, düşük seviyeli lazerin CC hücrelerinde TRPM2 kanalları yoluyla apoptozu arttırdığı ve siklofosfamidin apoptotik etkisini indüklediği gösterilmiştir.

Hücre içeresine Ca^{+2} iyon akışı, mitokondride depolarizasyon artışı yoluyla ROS üretimini artırmakta, artan cROS miktarı, gerek hücre içi organellerin kapılarını açarak ve gerekse katyon kanallarına zarar vererek sitozolde Ca^{+2} miktarını artırmaktadır. Mitokondriye daha fazla Ca^{+2} girişi ile depolarizasyonun artması, hücrede deformasyon veya apoptozis oluşturmaktadır. Ayrıca, artan cROS ile TRPM2 kanalları daha fazla aktive olmaktadır (Kahya

ve ark., 2017). $[Ca^{+2}]_i$ artışının mitokondri zar depolarizasyonu artış yoluyla, oksidatif stres ve apoptotik yolları tetikleyerek tümör hücre ölümünde rol oynadığı yakın zamanda yapılan birçok çalışma sonuçlarında gösterilmiştir. BTX-A'nın, TRPM2 kanal aracılığıyla mitokondri ROS üretimini aktive ettiği ve böylece nöroblastoma ve glioblastoma tümör hücrelerinin ölümüne neden olduğu ortaya konmuştur (Martinelli ve ark., 2020; Akpınar ve ark., 2020). Kanser tedavisinde kullanılan birçok kimyasal (örneğin: rituksimab) hücre içi Ca^{+2} miktarını artırarak apoptozis oluşumu ve akabinde tümör hücre ölümüne neden olmaktadır (Latour ve ark., 2019). BTX-A'nın da günümüzde kanser tedavisinde kullandığımız bazı ilaçlar ile benzer etki mekanizmasına sahip olması, bu literatürler ışığında BTX-A'nın da kanser tedavisindeki çalışmalarda yer alabileceğini düşündürmektedir.

MMP aracılı cROS artışının TRPM2 kanallarını HT29 hücrelerinde daha fazla aktive ettiğine dair daha önce yapılan bir çalışma yoktur. Yaptığımız çalışma ile HT29 hücre hattının BTX-A ile inkübasyonunun TRPM2 kanalları üzerindeki etkisi, TRPM2 kanal aktivatörü H_2O_2 ve TRPM2 kanal inhibitörü CARV kullanılarak; $[Ca^{+2}]_i$ miktarındaki değişim miktarı analiz edilmiştir. BTX-A uygulanan HT29 CC hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla $[Ca^{+2}]_i$ seviyelerinin, cROS miktarının ve MMP'nin artmış olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmayla; cROS miktarındaki artışın, TRPM2 kanal aktivasyonu sonucu Ca^{+2} 'un hücre içerisine akmasına ve böylece $[Ca^{+2}]_i$ seviyesinde artışa neden olduğu sonucu çıkarılabilir. Daha önce diğer kanser hücre hatlarında yapılan çalışmaların sonuçları ve elde ettiğimiz veriler, HT29 CC hücrelerinde BTX-A'nın apoptotik etkisinin; $[Ca^{+2}]_i$, cROS ve MMP seviyelerindeki artış ile desteklendiğini düşündürmektedir. BTX-A'nın TRPM2 uyarımı yoluyla apoptotik ve oksidan etkileri, CC tedavisinde sıklıkla kullanılan oksaliplatin ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar, BTX-A'nın, CC tedavisinde alternatif tedavi veya kombinasyon tedavisi çalışmalarında yer alabileceği hipotezini desteklemektedir.

BTX'lerin, etkisinin uzun olması, yapısı itibariyle hedef hücrelere karşı yüksek afinitesi ve özgüllüğü (Kukreja ve Singh, 2015); antikanser tedavilerinde hedeflediğimiz (güvenilirlik, yan etki profilinin düşük ve tümör dokusuna yüksek afinite göstermesi; etkisinin güçlü, seçici ve uzun süreli olması vb.) özelliklerin çoğunu karşılamaktadır. BTX-A'nın kanser tedavisinde kullanılabileceği daha önce yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler de daha önce yapılan çalışmaları desteklemektedir; ancak daha fazla in vivo ve in vitro çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Her yıl yeni kanser vakalarının sayısında ve kansere bağlı ölüm oranlarında büyük bir artış yaşanmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötikler ciddi advers etkilere neden olmaktadır; bununla birlikte, maliyetleri de yüksektir. Hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılabilmesi ya da durdurulabilmesi, semptomların azaltılması ya da yok edilmesi için alternatif tedavilerin veya ilaçların keşfedilmesi hayati önem taşımaktadır. Kanser tedavisinde hücre ölümü aktivasyonunu devreye sokmak için, hücre ölüm yolunu tetikleyen, tümör baskılayıcı yolakları veya direkt tümörü hedef alan stratejiler umut verici bulunmaktadır. Artan kaspaz aktiviteleri genellikle apoptozun bir işareti ve kanser tedavisindeki etkinliğin olumlu bir göstergesi olarak kabul edilir. Zincirleme bir şekilde gerçekleşen kaspaz aktivasyonu apoptoz yolaklarında görevli proteinleri ve immün sistem sinyal yollarını hedef alarak apoptozu uyardıkları için kanser araştırmaları için de umut verici hedeflerdir. Doğal ürünler ve bunların sentetik türevleri, kanser tedavisinde yeni bileşiklerin potansiyel kaynağı olarak değerlendirilebilir veya kemoterapinin neden olduğu yan etkilerin önlenmesine önemli katkı sağlayacağı düşünülebilir.

Clostridium botulinum tarafından üretilen BTX-A'nın apoptozu indüklediği ve çeşitli kanser hücre hatlarında büyümenin durmasını teşvik ettiği gösterildiğinden; BTX-A'nın HT29 CC hücre hatları üzerinde de göstereceği spesifik toksisite, antimitotik ve proapoptotik etkilerinin araştırılmasının, tedavide karşılaşılan sorunlara çözüm getirecek çalışmalara yol göstermesi açısından önemli sonuçlar vereceği düşünülerek bu çalışma planlanmıştır.

Bu tez çalışmasında BTX-A'nın, HT29 CC hücre hattında etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda, HT29 hücre hattının BTX-A ile inkübasyonları; MTT deneyi, Casy Tone cihazı, kuyucuk okuyucu cihazı ve LKM ile araştırılmıştır. MTT analizi ve Casy Tone cihazı kullanarak yaptığımız analizlerde, BTX-A uygulanan HT29 CC hücre hattında kontrol grubuna kıyasla, hücre sayısı ve hücre canlılığı düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı, debris miktarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. Kuyucuk okuyucu cihazı ve LKM ile yaptığımız analizlerde BTX-A ile inkübe edilen HT29 CC hücre hattında kontrol grubuna kıyasla; apoptozis, MMP, $[(Ca^{+2})_i]$ ve cROS miktarlarında, kaspaz-3, kaspaz -8 ve kaspaz -9 aktivasyonlarında istatistiksel olarak artış gözlemlenmiştir.

Kaspaz aktivasyonlarında meydana gelen artış MMP'de daha fazla artışa neden olarak hücre içerisine Ca^{+2} akışını artırmıştır. $[(Ca^{+2})_i]$ 'daki artış beraberinde cROS miktarında artışa yol açmıştır. Tümör hücresinde redoks dengesinin bozulması oksidatif stresin oluşmasını sağlar. Oksidatif stres bir sensör gibi davranarak TRPM2 kanal aktivasyonuna neden olur ve bunun sonucunda hücreye daha fazla Ca^{+2} akışı olur. Kaspaz-3, kaspaz -8, kaspaz -9, $[(Ca^{+2})_i]$, cROS, MMP ve TRPM2 kanal aktivasyonundaki artış apoptoz sinyal yollarının uyarır ve böylece hücrede apoptoz meydana gelir.

HT29 hücreleri ile yapılan bu in vitro çalışma sonucunda, BTX-A'nın, tümör hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, antimitotik aktivite gösterdiği, cROS miktarını artırdığı böylece oksidatif stres meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Kaspaz -3, kaspaz -8, kaspaz-9 aktivasyonu sonucu apoptozu teşvik ettiği bu yüzden proapoptotik özellik gösterdiği ortaya konulmuştur. BTX-A'nın etkisi ile TRPM2 kanal aktivasyonu daha fazla $[(Ca^{+2})_i]$ artışına katkı sağlayarak, MMP artışını ve oksidatif stresin oluşumunu desteklemiştir. TRPM2 kanal inhibitörü CARV eklenmesi, $[(Ca^{+2})_i]$ düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Sonuç olarak BTX-A, HT29 CC hücrelerinde oluşturduğu tüm sinyaller apoptozun artışına yol açmıştır. Hücre sayısı, hücre canlılığı ve debris miktarındaki değişim elde ettiğimiz sonuçları doğrulamaktadır.

6.2. Öneriler

BTX-A'nın güvenlik indeksini doğrulamak için yeni çalışmalara vero hücre grupları eklenerek daha kapsamlı çalışmalar yapılabilir. Yeni çalışmalarda, örneklem sayısı artırılarak, inkübasyon süreleri değiştirilerek ve farklı dozlar uygulanarak daha kapsamlı sonuçlar elde edilebilir; ayrıca farklı kanser tiplerinde etki ve toksisite araştırılabilir. Bunun için daha fazla in vivo ve in vitro çalışma yapılması gerekmektedir.

TRPM2 kanal aracılı sitozolik Ca^{+2} , ROS ve apoptozis artışının birçok kanser hücresinin ölümünde önemli rolü olduğu bilinmektedir. Fakat bu durum CC hücrelerinde yeterince incelenmemiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, BTX-A'nın kanser hücrelerinin ölümünü sağladığı bildirilmesine rağmen, TRPM2 kanal aracılı CC hücre öldürücü etki mekanizması henüz aydınlatılmamıştır. Bu araştırma sonuçları ile BTX-A'nın CC hücreleri ölümünde önemli bir role sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, BTX-A'nın yanı sıra TRPM2 kanalı uyarıcı etki yapan maddelerin CC hücreleri ölümü üzerindeki etkilerinin araştırılması; bunun yanında BTX-A'nın CC hücre öldürücü etkisinin TRPM2 geni olmayan CC hücrelerinde test edilmesi de bu alandaki boşluğu dolduracaktır.

7. KAYNAKLAR

- Adaramoye, O., Erguen, B., Nitzsche, B., Höpfner, M., Jung, K., et al. (2017). Punicalagin, a polyphenol from pomegranate fruit, induces growth inhibition and apoptosis in human PC-3 and LNCaP cells. *Chemico-Biological Interactions*, 274, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.07.009>
- Agarwal, P., Sia, C., Vaish, N., & Roy-Faderman, I. (2011). Pilot trial of onabotulinumtoxinA (Botox) in moderate to severe restless legs syndrome. *The International Journal of Neuroscience*, 121(11), 622–625. <https://doi.org/10.3109/00207454.2011.602774>
- Aiello, P., Sharghi, M., Mansourkhani, S. M., Ardekan, A. P., Jouybari, L., et al. (2019). Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2075614. <https://doi.org/10.1155/2019/2075614>
- Akpınar, O., Özşimşek, A., Güzel, M., & Nazıroğlu, M. (2020). Clostridium botulinum neurotoxin A induces apoptosis and mitochondrial oxidative stress via activation of TRPM2 channel signaling pathway in neuroblastoma and glioblastoma tumor cells. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 40(6), 620–632. <https://doi.org/10.1080/10799893.2020.1781174>
- Akyuva, Y., & Nazıroğlu, M. (2020). Resveratrol attenuates hypoxia-induced neuronal cell death, inflammation and mitochondrial oxidative stress by modulation of TRPM2 channel. *Scientific Reports*, 10(1), 6449. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63577-5>
- American Cancer Society. (2023, Oct. 14). All about cancer/Diagnosing and staging cancer/Cancer staging. <https://www.cancer.org/cancer/diagnosis-staging/staging.html>
- Anaya, D. A., Becker, N. S., & Abraham, N. S. (2011). Global graying, colorectal cancer and liver metastasis: new implications for surgical management. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 77(2), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.02.003>
- Ansiaux, R., & Gallez, B. (2007). Use of botulinum toxins in cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(2), 209–218. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.2.209>
- Anwanwan, D., Singh, S. K., Singh, S., Saikam, V., & Singh, R. (2020). Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1873(1), 188314. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188314>
- Aurora, S. K., Dodick, D. W., Turkel, C. C., DeGryse, R. E., Silberstein, S. D., Lipton, R. B., Diener, H. C., Brin, M. F., & PREEMPT 1 Chronic Migraine Study Group (2010). OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phase of the PREEMPT 1 trial. *Cephalalgia : an International Journal of Headache*, 30(7), 793–803. <https://doi.org/10.1177/0333102410364676>
- Bandala, C., Cortes-Algara, A. L., Mejia-Barradas, C. M., Ilizaliturri-Flores, I., Dominguez-Rubio, R., et al. (2015). Botulinum neurotoxin type A inhibits synaptic vesicle 2 expression in breast cancer cell lines. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(7), 8411–8418.
- Bandala, C., Perez-Santos, J. L., Lara-Padilla, E., Delgado Lopez, G., & Anaya-Ruiz, M. (2013). Effect of botulinum toxin A on proliferation and apoptosis in the T47D breast cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 14(2), 891–894. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.2.891>
- Beckmann, Y. Y., Seçil, Y., Saka, S., Kuserli, A., & Çiftçi, Y. (2011). Treatment of intractable tardive lingual dyskinesia with botulinum toxin. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 31(2), 250–251. <https://doi.org/10.1097/JCP.0b013e31820f4f70>
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(8), 994–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Boroff, D. A., & Chen, G. S. (1975). On the question of permeability of the blood-brain barrier to botulinum toxin. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 48(4), 495–504. <https://doi.org/10.1159/000231337>
- Brin, M. F., Durgam, S., Lum, A., James, L., Liu, J., et al. (2020). OnabotulinumtoxinA for the treatment of major depressive disorder: a phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled trial in adult females. *International clinical psychopharmacology*, 35(1), 19–28. <https://doi.org/10.1097/YIC.0000000000000290>

- Burgen, A. S., Dickens, F., & Zatman, L. J. (1949). The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. *The Journal of Physiology*, 109(1-2), 10–24. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1949.sp004364>
- Cai, B. B., Francis, J., Brin, M. F., & Broide, R. S. (2017). Botulinum neurotoxin type A-cleaved SNAP25 is confined to primary motor neurons and localized on the plasma membrane following intramuscular toxin injection. *Neuroscience*, 352, 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.049>
- Calvert, P. M., & Frucht, H. (2002). The genetics of colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine*, 137(7), 603–612. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-7-200210010-00012>
- Carethers J. M. (2014). DNA testing and molecular screening for colon cancer. *Clinical Gastroenterology And Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of The American Gastroenterological Association*, 12(3), 377–381. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.12.007>
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 17(7), 395–417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
- Carr, W. W., Jain, N., & Sublett, J. W. (2021). Immunogenicity of botulinum toxin formulations: potential therapeutic implications. *Advances in Therapy*, 38(10), 5046–5064. <https://doi.org/10.1007/s12325-021-01882-9>
- Castaneda, M., Den Hollander, P., Kuburich, N. A., Rosen, J. M., & Mani, S. A. (2022). Mechanisms of cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 87, 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.10.006>
- Chen, S., & Shen, X. (2020). Long noncoding RNAs: functions and mechanisms in colon cancer. *Molecular Cancer*, 19(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01287-2>
- Chowdhury, I., Tharakan, B., & Bhat, G. K. (2008). Caspases - an update. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 151(1), 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.05.010>
- Clapham D. E. (2007). SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell*, 129(1), 220. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.034>
- Curra, A., Trompetto, C., Abbruzzese, G., & Berardelli, A. (2004). Central effects of botulinum toxin type A: evidence and supposition. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 19 Suppl 8, S60–S64. <https://doi.org/10.1002/mds.20011>
- Dawane, J. S., & Pandit, V. A. (2012). Understanding redox homeostasis and its role in cancer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 6(10), 1796–1802. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/4947.2654>
- De la Torre Canales, G., Camara-Souza, M. B., Do Amaral, C. F., Garcia, R. C., & Manfredini, D. (2017). Is there enough evidence to use botulinum toxin injections for bruxism management? A systematic literature review. *Clinical Oral Investigations*, 21(3), 727–734. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2092-4>
- Dong, M., Masuyer, G., & Stenmark, P. (2019). Botulinum and tetanus neurotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 88, 811–837. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111654>
- Dressler D. (2012). Clinical applications of botulinum toxin. *Current Opinion in Microbiology*, 15(3), 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.05.012>
- Dressler, D., & Johnson, E. A. (2022). Botulinum toxin therapy: past, present and future developments. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 129(5-6), 829–833. <https://doi.org/10.1007/s00702-022-02494-5>
- Dressler, D., Wohlfahrt, K., Meyer-Rogge, E., Wiest, L., & Bigalke, H. (2010). Antibody-induced failure of botulinum toxin a therapy in cosmetic indications. *Dermatologic Surgery: Official Publication For American Society For Dermatologic Surgery [et al.]*, 36 Suppl 4, 2182–2187. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2010.01710.x>
- Duitama, M., Vargas-Lopez, V., Casas, Z., Albarracin, S. L., Sutachan, J. J., & Torres, Y. P. (2020). TRP Channels Role in Pain Associated With Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 782. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00782>
- Duman, I., Tanyeli, Ö., Dereli, Y., Oltulu, P., Toy, H., & Sahin, A. S. (2022). The effects of botulinum toxin A and papaverine on human saphenous vein and internal mammary artery grafts: an in vitro study. *Archives of Medical Science : AMS*, 18(6), 1607–1616. <https://doi.org/10.5114/aoms/110157>

- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Erbguth, F. J., & Naumann, M. (1999). Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786-1862) and the "sausage poison". *Neurology*, 53(8), 1850–1853. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.8.1850>
- Fathi, M., Fathi, H., Mazloumi, M., Khalilzadeh, O., Amanpour, S., et al. (2010). Preventive effect of botulinum toxin A in microanastomotic thrombosis: a rabbit model. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery : JPRAS*, 63(10), e720–e724. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2010.05.030>
- Finzi, E., & Wasserman, E. (2006). Treatment of depression with botulinum toxin A: a case series. *Dermatologic Surgery : Official Publication For American Society For Dermatologic Surgery [et al.]*, 32(5), 645–650. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2006.32136.x>
- Flanagan, L., Meyer, M., Fay, J., Curry, S., Bacon, O., et al. (2016). Low levels of Caspase-3 predict favourable response to 5FU-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: Caspase-3 inhibition as a therapeutic approach. *Cell Death & Disease*, 7(2), e2087. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.7>
- Fliegert, R., Gasser, A., & Guse, A. H. (2007). Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 1), 109–114. <https://doi.org/10.1042/BST0350109>
- Förstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 459(6), 923–939. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0808-2>
- Gees, M., Owsianik, G., Nilius, B., & Voets, T. (2012). TRP channels. *Comprehensive Physiology*, 2(1), 563–608. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110026>
- Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., et al. (2012). Mitochondrial Ca²⁺ and Apoptosis. *Cell Calcium*, 52(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.02.008>
- Gowdra Halappa, V., Corona Villalobos, C. P., Bonekamp, S., Gearhart, S. L., Efron, J., et al. (2012). Rectal imaging: part 1, High-resolution MRI of carcinoma of the rectum at 3 T. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 199(1), W35–W42. <https://doi.org/10.2214/AJR.11.8134>
- Gökçe Kütük, S., Gökçe, G., Kütük, M., Gürses Cila, H. E., & Nazıroğlu, M. (2019). Curcumin enhances cisplatin-induced human laryngeal squamous cancer cell death through activation of TRPM2 channel and mitochondrial oxidative stress. *Scientific Reports*, 9(1), 17784. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54284-x>
- Green D. R. (2022). Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 14(3), a041012. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041012>
- Grenda, T., Grenda, A., Krawczyk, P., & Kwiatek, K. (2022). Botulinum toxin in cancer therapy-current perspectives and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(2), 485–495. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11741-w>
- Guler, Y., & Ovey, I. S. (2018). Synergic and comparative effect of 5-fluorouracil and leucovorin on breast and colon cancer cells through TRPM2 channels. *Bratislavske Lekarske Listy*, 119(11), 692–700. https://doi.org/10.4149/BLL_2018_124
- Guler, Y., & Ovey, I. S. (2020). LLLT enhance cyclophosphamide induced TRPM2 channel activation in human colon cancer cells. *Bratislavske Lekarske Listy*, 1(5), 334–338. https://doi.org/10.4149/BLL_2020_053
- Güvenç, D., Güvenç T. (2017). Apoptotik hücre ölümü ve toksikolojik yanıtta önemi. *Animal Health Prod and Hyg (2017) 6(2) : 499 - 504*
- Hanağası, H.A. (2006). Botulinum toksininin yapısı ve etki mekanizması. *Nöropsikiyatri Arşivi*, 43(1-4): 15-19.
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., et al. (2002). LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular Cell*, 9(1), 163–173. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00438-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00438-5)
- Hayashi, M., Shimizu, Y., Sato, M., Yokoyama, T., & Yosimoto, S. (2014). Changes in the blood flow of the femoral artery by botulinum toxin A in rats. *Annals of Plastic Surgery*, 73(1), 98–101. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31826eabe3>
- He, D., Manzoni, A., Florentin, D., Fisher, W., Ding, Y., et al. (2016). Biologic effect of neurogenesis in pancreatic cancer. *Human Pathology*, 52, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.02.001>

- Hennings, J. M., Krause, E., Bötzel, K., & Wetter, T. C. (2008). Successful treatment of tardive lingual dystonia with botulinum toxin: case report and review of the literature. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(5), 1167–1171. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.09.010>
- Herrero, B. A., Ecklung, A. E., Streett, C. S., Ford, D. F., & King, J. K. (1967). Experimental botulism in monkeys - a clinical pathological study. *Experimental and Molecular Pathology*, 6(1), 84–95. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(67\)90007-x](https://doi.org/10.1016/0014-4800(67)90007-x)
- Herting, B., Wunderlich, S., Glöckler, T., Bendszus, M., Mucha, D., et al. (2004). Computed tomographically-controlled injection of botulinum toxin into the longus colli muscle in severe anterocollis. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 19(5), 588–590. <https://doi.org/10.1002/mds.10704>
- Hossain, M. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, J., et al. (2022). Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers*, 14(7), 1732. <https://doi.org/10.3390/cancers14071732>
- İstanbul Tabip Odası. (2023, May 24). 4 Şubat Dünya Kanser Günü kanser erken tanısı, tedavisi ve bakımındaki eşitsizlikler giderilmelidir. <https://www.istabip.org.tr/7466-4-subat-dunya-kanser-gunu-kanser-erken-tanisi-tedavisi-ve-bakimindaki-esitsizlikler-giderilmelidir.html#:~:text=Bu%20nedenle%20D%C3%BCnya%20Sa%C4%9Flu%20B1k%20C3%6rg%C3%BCt%C3%BC,ve%20126.000%20kanserden%20C3%B6l%C3%BCm%20ger%C3%A7te%20C5%9Fti.>
- Jain, D., & Kumar, S. (2012). Snake venom: a potent anticancer agent. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 13(10), 4855–4860. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.10.4855>
- Jankovic J. (2018). An update on new and unique uses of botulinum toxin in movement disorders. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 147, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.09.003>
- Jankovic, J., & Brin, M. F. (1997). Botulinum toxin: historical perspective and potential new indications. *Muscle & Nerve. Supplement*, 6, S129–S145.
- Jiang, M., Qiao, M., Zhao, C., Deng, J., Li, X., et al. (2020). Targeting ferroptosis for cancer therapy: exploring novel strategies from its mechanisms and role in cancers. *Translational Lung Cancer Research*, 9(4), 1569–1584. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-341>
- Joshi, D. C., & Bakowska, J. C. (2011). SPG20 protein spartin associates with cardiolipin via its plant-related senescence domain and regulates mitochondrial Ca²⁺ homeostasis. *PLoS One*, 6(4), e19290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019290>
- Kahya, M. C., Nazıroğlu, M., & Övey, İ. S. (2017). Modulation of diabetes-induced oxidative stress, apoptosis, and Ca²⁺ entry through TRPM2 and TRPV1 channels in dorsal root ganglion and hippocampus of diabetic rats by melatonin and selenium. *Molecular Neurobiology*, 54(3), 2345–2360. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9727-3>
- Karnak, D., & Xu, L. (2010). Chemosensitization of prostate cancer by modulating Bcl-2 family proteins. *Current Drug Targets*, 11(6), 699–707. <https://doi.org/10.2174/138945010791170888>
- Karsenty, G., Rocha, J., Chevalier, S., Scarlata, E., Andrieu, C., et al. (2009). Botulinum toxin type A inhibits the growth of LNCaP human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *The Prostate*, 69(11), 1143–1150. <https://doi.org/10.1002/pros.20958>
- Kartal Durmazlar, S.P., & Eskioğlu F. (2009). Botulinum toksini (uygulamaya geçmeden bilinmesi gerekenler). *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 29(3):702-7.
- Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 125, 73–120. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>
- Katerji, M., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1279250. <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>
- Kaya, M. M., Kaya, İ., & Nazıroğlu, M. (2023). Transient receptor potential channel stimulation induced oxidative stress and apoptosis in the colon of mice with colitis-associated colon cancer: modulator role of *Sambucus ebulus* L. *Molecular Biology Reports*, 50(3), 2207–2220. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08200-8>

- Keefe, D. M. K., & Bateman, E. H. (2019). Potential successes and challenges of targeted cancer therapies. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 2019(53), lgz008. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgz008>
- Khan, H., Alam, W., Alsharif, K. F., Aschner, M., Pervez, S., et al. (2022). Alkaloids and colon cancer: molecular mechanisms and therapeutic implications for cell cycle arrest. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(3), 920. <https://doi.org/10.3390/molecules27030920>
- Kiess, W., & Gallaher, B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology*, 138(5), 482–491. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1380482>
- Kolisek, M., Beck, A., Fleig, A., & Penner, R. (2005). Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Molecular Cell*, 18(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.033>
- Köberle, B., & Schoch, S. (2021). Platinum complexes in colorectal cancer and other solid tumors. *Cancers*, 13(9), 2073. <https://doi.org/10.3390/cancers13092073>
- Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C (2006). Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-aminocinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol*. 148(3):264-73. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706739>.
- Kreidieh, M., Mukherji, D., Temraz, S., & Shamseddine, A. (2020). Expanding the scope of immunotherapy in colorectal cancer: current clinical approaches and future directions. *Biomed Research International*, 2020, 9037217. <https://doi.org/10.1155/2020/9037217>
- Kruger, T. H., & Wollmer, M. A. (2015). Depression--An emerging indication for botulinum toxin treatment. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 107(Pt A), 154–157. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.035>
- Kukreja, R., & Singh, B.R. (2015). The botulinum toxin as a therapeutic agent: molecular and pharmacological insights. *Research and Reports in Biochemistry*, 5:173-183 <https://doi.org/10.2147/RRBC.S60432>
- Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., Ichwan, S. J., Soundharrajan, I., et al. (2014). Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: A review. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 4(3), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.04.002>
- Kurtova, A. V., Xiao, J., Mo, Q., Pazhanisamy, S., Krasnow, R., et al. (2015). Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature*, 517(7533), 209–213. <https://doi.org/10.1038/nature14034>
- Kühn, F. J., Heiner, I., & Lückhoff, A. (2005). TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 451(1), 212–219. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1446-y>
- Latour, S., Zanese, M., Le Morvan, V., Vacher, A. M., Menard, N., et al. (2019). Role of calcium signaling in GA101-induced cell death in malignant human B cells. *Cancers*, 11(3), 291. <https://doi.org/10.3390/cancers11030291>
- Liberio, M. S., Joanitti, G. A., Fontes, W., & Castro, M. S. (2013). Anticancer peptides and proteins: a panoramic view. *Protein and Peptide Letters*, 20(4), 380–391. <https://doi.org/10.2174/092986613805290435>
- Liedtke, W. B., & Heller, S. (Eds.). (2007). *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Liu, C. C., Yang, H., Zhang, L. L., Zhang, Q., Chen, B., & Wang, Y. (2014). Biotoxins for cancer therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 15(12), 4753–4758. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.12.4753>
- Liu, L., Huang, L., Chen, W., Zhang, G., Li, Y., et al. (2022). Comprehensive analysis of necroptosis-related long noncoding rna immune infiltration and prediction of prognosis in patients with colon cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 811269. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.811269>
- Liu, X., He, Y., Li, F., Huang, Q., Kato, T. A., et al. (2015). Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis. *Molecular Cell*, 58(2), 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.003>
- Magenta, A., Dellambra, E., Ciarapica, R., & Capogrossi, M. C. (2016). Oxidative stress, microRNAs and cytosolic calcium homeostasis. *Cell Calcium*, 60(3), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.04.002>

- Majid O. W. (2010). Clinical use of botulinum toxins in oral and maxillofacial surgery. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 39(3), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2009.10.022>
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3), 339–348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
- Margraf, N. G., Wrede, A., Deuschl, G., & Schulz-Schaeffer, W. J. (2016). Pathophysiological concepts and treatment of camptocormia. *Journal of Parkinson's disease*, 6(3), 485–501. <https://doi.org/10.3233/JPD-160836>
- Marsakova, L., Barvik, I., Zima, V., Zimova, L., & Vlachova, V. (2017). The first extracellular linker is important for several aspects of the gating mechanism of human TRPA1 channel. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00016>
- Martin, L. P., Hamilton, T. C., & Schilder, R. J. (2008). Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5), 1291–1295. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2238>
- Martinelli, D., Arceri, S., Tronconi, L., & Tassorelli, C. (2020). Chronic migraine and Botulinum Toxin Type A: Where do paths cross?. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 178, 69–76.
- Matak, I., Bölskei, K., Bach-Rojecky, L., & Helyes, Z. (2019). Mechanisms of botulinum toxin type A action on pain. *Toxins*, 11(8), 459. <https://doi.org/10.3390/toxins11080459>
- Mazo, E. B., Krivoborodov, G. G., Shkol'nikov, M. E., & Efremov, N. S. (2008). *Urologiia (Moscow, Russia : 1999)*, (4), 63–66.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- McMurtry, I. F., Abe, K., Ota, H., Fagan, K. A., & Oka, M. (2010). Rho kinase-mediated vasoconstriction in pulmonary hypertension. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 661, 299–308. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-500-2_19
- Miller, K. D., Nogueira, L., Mariotto, A. B., Rowland, J. H., Yabroff, K. R., et al. (2019). Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 69(5), 363–385. <https://doi.org/10.3322/caac.21565>
- Mishra, J., Drummond, J., Quazi, S. H., Karanki, S. S., Shaw, J. J., et al. (2013). Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 86(3), 232–250. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.09.014>
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
- Morris, J. L., Jobling, P., & Gibbins, I. L. (2001). Differential inhibition by botulinum neurotoxin A of cotransmitters released from autonomic vasodilator neurons. *American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281(5), H2124–H2132. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.5.H2124>
- Mun, E. J., Babiker, H. M., Weinberg, U., Kirson, E. D., & Von Hoff, D. D. (2018). Tumor-treating fields: a fourth modality in cancer treatment. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(2), 266–275. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1117>
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annual Review of Immunology*, 36, 489–517. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>
- Nam, H. J., Kang, J. K., Chang, J. S., Lee, M. S., Nam, S. T., et al. (2012). Cells transformed by PLC-gamma 1 overexpression are highly sensitive to clostridium difficile toxin A-induced apoptosis and mitotic inhibition. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(1), 50–57. <https://doi.org/10.4014/jmb.1107.07018>
- Nazıroğlu M. (2012). Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca(2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 32(3), 134–141. <https://doi.org/10.3109/10799893.2012.672994>
- Nazıroğlu M. (2022). A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol. *Metabolic brain disease*, 37(3), 711–728. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00887-1>

- Nazıroğlu, M., & Özgül, C. (2012). Effects of antagonists and heat on TRPM8 channel currents in dorsal root ganglion neuron activated by nociceptive cold stress and menthol. *Neurochemical Research*, 37(2), 314–320. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0614-z>
- Nazıroğlu, M., & Lückhoff, A. (2008). Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *Journal of the Neurological Sciences*, 270(1-2), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.03.003>
- Neugut, A. I., Lin, A., Raab, G. T., Hillyer, G. C., Keller, D., et al. (2019). Folfex and Folfiri use in stage IV colon cancer: Analysis of SEER-Medicare data. *Clinical Colorectal Cancer*, 18(2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.01.005>
- Nilius B. (2007). Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bulletin et Memoires de l'Academie Royale de Medecine de Belgique*, 162(3-4), 244–253.
- O'Keefe S. J. (2016). Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 13(12), 691–706. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.165>
- Orsolic N. (2012). Bee venom in cancer therapy. *Cancer metastasis reviews*, 31(1-2), 173–194. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9339-3>
- Öcal, Ö., & Nazıroğlu, M. (2022). Eicosapentaenoic acid enhanced apoptotic and oxidant effects of cisplatin via activation of TRPM2 channel in brain tumor cells. *Chemico-Biological Interactions*, 359, 109914. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109914>
- Övey, İ. S., & Nazıroğlu, M. (2015). Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience*, 284, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.078>
- Öz, A., & Çelik, Ö. (2016). Curcumin inhibits oxidative stress-induced TRPM2 channel activation, calcium ion entry and apoptosis values in SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of transfection procedure. *Molecular Membrane Biology*, 33(3-5), 76–88. <https://doi.org/10.1080/09687688.2017.1318224>
- Özsan, M. (2023). Mitokondriyal disfonksiyon ve stres. *Sağlık Bilimlerinde Öncü ve Çağdaş Çalışmalar*, 681-700.
- Pagano, E., Romano, B., Cicia, D., Iannotti, F. A., Venneri, T., et al. (2023). TRPM8 indicates poor prognosis in colorectal cancer patients and its pharmacological targeting reduces tumour growth in mice by inhibiting Wnt/β-catenin signalling. *British Journal of Pharmacology*, 180(2), 235–251. <https://doi.org/10.1111/bph.15960>
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, 38(3-4), 233–252. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.028>
- Pellett S. (2013). Progress in cell based assays for botulinum neurotoxin detection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 364, 257–285. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33570-9_12
- Peterson E. (2014). Colon Cancer: Protect Yourself: Brain Food.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
- Porta, M., Maggioni, G., Ottaviani, F., & Schindler, A. (2004). Treatment of phonic tics in patients with Tourette's syndrome using botulinum toxin type A. *Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 24(6), 420–423. <https://doi.org/10.1007/s10072-003-0201-4>
- Prevarskaya, N., Zhang, L., & Barritt, G. (2007). TRP channels in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1772(8), 937–946. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.05.006>
- Proietti, S., Nardicchi, V., Porena, M., Giannantoni, A. (2012). Attività della tossina botulinica A in linee cellulari di cancro prostatico [Botulinum toxin type-A toxin activity on prostate cancer cell lines]. *Urologia*, 79:135–141. <https://doi.org/10.5301/RU.2012.9254>

- Qian, H., Shao, F., Lenahan, C., Shao, A., & Li, Y. (2020). Efficacy and safety of botulinum toxin vs. placebo in depression: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Psychiatry*, 11, 603087. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.603087>
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., et al. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 436, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
- Rossetto, O., Pirazzini, M., & Montecucco, C. (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(8), 535–549. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3295>
- Samotus, O., Lee, J., & Jog, M. (2017). Long-term tremor therapy for Parkinson and essential tremor with sensor-guided botulinum toxin type A injections. *PloS One*, 12(6), e0178670. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178670>
- Santoni, G., Cardinali, C., Morelli, M. B., Santoni, M., Nabissi, M., et al. (2015). Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 21. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0239-2>
- Saygın, M., & Nazıroğlu, M. (2012). Kalpteki moleküler Ca²⁺ sinyali üzerinde TRPM katyon kanallarının rolleri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29(2), 83–90. <https://doi.org/10.5835/jecm.omu.29.02.001>
- Schantz, E. J., & Johnson, E. A. (1992). Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiological Reviews*, 56(1), 80–99. <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.80-99.1992>
- Scott A. B. (1980). Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology*, 87(10), 1044–1049. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(80\)35127-0](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(80)35127-0)
- Scott A. B. (2004). Development of botulinum toxin therapy. *Dermatologic clinics*, 22(2), 131–v. [https://doi.org/10.1016/s0733-8635\(03\)00019-6](https://doi.org/10.1016/s0733-8635(03)00019-6)
- Seaman, J. E., Julien, O., Lee, P. S., Rettenmaier, T. J., Thomsen, N. D., & Wells, J. A. (2016). Caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues. *Cell death and differentiation*, 23(10), 1717–1726. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.62>
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22(4), 526–539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
- Shebl R. I. (2019). Anti-cancer potential of captopril and botulinum toxin type-A and associated p53 gene apoptotic stimulating activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 18(4), 1967–1977. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100800>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Siongco, P. R. L., Rosales, R. L., Moore, A. P., Freynhagen, R., Arimura, K., et al. (2020). Botulinum neurotoxin injections for muscle-based (dystonia and spasticity) and non-muscle-based (neuropathic pain) pain disorders: a meta-analytic study. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 127(6), 935–951. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02163-5>
- Slotema, C. W., van Harten, P. N., Bruggeman, R., & Hoek, H. W. (2008). Botulinum toxin in the treatment of orofacial tardive dyskinesia: a single blind study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(2), 507–509. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.10.004>
- Soğancı, G. & Yağcı, F. (2016). Dış hekimliğinde botoks: Derleme. *Atatürk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 26 (2). <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunidfd/issue/24329/257844>
- Solish, N., Carruthers, J., Kaufman, J., Rubio, R. G., Gross, T. M., et al. (2021). Overview of daxibotulinumtoxin A for injection: A novel formulation of botulinum toxin type A. *Drugs*, 81(18), 2091–2101. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01631-w>
- Sun, D. P., Huang, H. Y., Chou, C. L., Cheng, L. C., Wang, W. C., et al. (2023). Punicalagin is cytotoxic to human colon cancer cells by modulating cell proliferation, apoptosis, and invasion. *Human & Experimental Toxicology*, 42, 9603271231213979. <https://doi.org/10.1177/09603271231213979>
- Sun, L., Yau, H. Y., Wong, W. Y., Li, R. A., Huang, Y., et al. (2012). Role of TRPM2 in H₂O₂-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PloS One*, 7(8), e43186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043186>

- Şahin İnan, D., Akın Polat, Z. & Hamutoğlu, R. (2023). The effect of two different botulinum neurotoxin a on the cortical neuron cells in terms of apoptosis and MMP 2, MMP 7, and MMP9 localizations. *Cumhuriyet Science Journal*, 44 (1), 19-27. <https://doi.org/10.17776/csj.1180547>
- T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı. (2023, May 24). 2018 yılı Türkiye kanser istatistikleri. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2017-turkiye-kanser-istatistikleri.html>
- T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı. (2023, Oct. 13). 2018 yılı Türkiye kanser istatistikleri. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/Dokumanlar/Istatistikler/Kanser_Rapor_2018.pdf
- Tanakol, A., Kutlubay, Z., Engin, B., & Serdaroğlu, S. (2019). Botulinum Toksini. *Dermatoz*,10(4):107-110. <http://doi.org/10.4274/dermatoz.galenos.2019.54264>
- Tanyeli, O., Duman, I., Dereli, Y., Gormus, N., Toy, H., & Sahin, A. S. (2019). Relaxation matters: comparison of in-vitro vasodilatory role of botulinum toxin-A and papaverine in human radial artery grafts. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 14(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13019-019-0837-7>
- Tarraga Lopez, P. J., Albero, J. S., & Rodriguez-Montes, J. A. (2014). Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clinical Medicine Insights. Gastroenterology*, 7, 33–46. <https://doi.org/10.4137/CGast.S14039>
- Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, 11(1), 164. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>
- Tian, W., Li, J., Su, Z., Lan, F., Li, Z., et al. (2019). Novel anthraquinone compounds induce cancer cell death through paraptosis. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(5), 732–736. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00624>
- Tinastepe, N., Küçük, B. B., & Oral, K. (2015). Botulinum toxin for the treatment of bruxism. *Cranio : The Journal of Craniomandibular Practice*, 33(4), 291–298. <https://doi.org/10.1080/08869634.2015.1097296>
- Tirendi, S., Marengo, B., Domenicotti, C., Bassi, A. M., Almonti, V., et al. (2023). Colorectal cancer and therapy response: a focus on the main mechanisms involved. *Frontiers in Oncology*, 13, 1208140. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1208140>
- Tun, J. O., Salvador-Reyes, L. A., Velarde, M. C., Saito, N., Suwanborirux, K., et al. (2019). Synergistic cytotoxicity of renieramycin M and doxorubicin in MCF-7 breast cancer cells. *Marine Drugs*, 17(9), 536. <https://doi.org/10.3390/md17090536>
- U.S. Food & Drug Administration. (2023, Dec. 12). Drug Databases / Drugs@FDA. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>
- Ulloa, F., González-Juncà, A., Meffre, D., Barrecheguren, P. J., Martínez-Mármol, R., et al. (2015). Blockade of the SNARE protein syntaxin 1 inhibits glioblastoma tumor growth. *PloS One*, 10(3), e0119707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119707>
- Vazquez-de-Lara, L. G., Tlatelpa-Romero, B., Romero, Y., Fernandez-Tamayo, N., Vazquez-de-Lara, F., et al. (2018). Phosphatidylethanolamine Induces an Antifibrotic Phenotype in Normal Human Lung Fibroblasts and Ameliorates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2758. <https://doi.org/10.3390/ijms19092758>
- Vezdrevanis K. (2011). Prostatic carcinoma shrunk after intraprostatic injection of botulinum toxin. *Urology Journal*, 8(3), 239–241.
- Vincent Jr D. A. (2008). Botulinum toxin in the management of laryngeal tics. *Journal of Voice : Official Journal of the Voice Foundation*, 22(2), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2006.08.014>
- Wang, L., Yeung, J. H., Hu, T., Lee, W. Y., Lu, L., et al. (2013). Dihydrotanshinone induces p53-independent but ROS-dependent apoptosis in colon cancer cells. *Life Sciences*, 93(8), 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.07.007>
- Wehage, E., Eisfeld, J., Heiner, I., Jüngling, E., Zitt, C., et al. (2002). Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23150–23156. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112096200>

- Wollmer, M. A., De Boer, C., Kalak, N., Beck, J., Götz, T., et al. (2012). Facing depression with botulinum toxin: a randomized controlled trial. *Journal of Psychiatric Research*, 46(5), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.01.027>
- World Health Organization. (2023, May 24). Colon cancer fact sheets. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- Yıldızhan, K., & Nazıroğlu, M. (2020). Glutathione Depletion and Parkinsonian Neurotoxin MPP⁺-Induced TRPM2 Channel Activation Play Central Roles in Oxidative Cytotoxicity and Inflammation in Microglia. *Molecular Neurobiology*, 57(8), 3508–3525. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01974-7>
- Yuan, J., Li, X., Zhang, Y., Zhang, G., Cheng, W., et al. (2021). USP39 attenuates the antitumor activity of cisplatin on colon cancer cells dependent on p53. *Cell Biology and Toxicology*, 10.1007/s10565-021-09683-0. Advance Online Publication. <https://doi.org/10.1007/s10565-021-09683-0>
- Zebryk, P., & Puszczewicz, M. J. (2016). Botulinum toxin A in the treatment of Raynaud's phenomenon: a systematic review. *Archives of Medical Science : AMS*, 12(4), 864–870. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.48152>
- Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., et al. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 143(4), 921–930. <https://doi.org/10.1002/ijc.31374>
- Zielinski, R. R., Eigl, B. J., & Chi, K. N. (2013). Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 19(1), 79–89. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3182801cf7>
- Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., et al. (2016). Current challenges in cancer treatment. *Clinical Therapeutics*, 38(7), 1551–1566. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>

8. EKLER

8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 150	Toplantı Tarihi: 18 Mart 2022
-----------------------------	--------------------------------------

Karar Sayısı:2022/3706:(9221)N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi İpek DUMAN'ın "Clostridium Botulinum Nörotoksin A'nın Kolon Kanseri Hücre Hattında Kalsiyum Sinyali Artışı Aracılı Oksidatif Stres, Apoptozis ve Tümör Hücre Ölümü Üzerindeki Etkileri" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 12.03.2022 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Eczacı Sıdika DEMİR'in yüksek lisans tez çalışmasının N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi İpek DUMAN'ın koordinatörlüğünde bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Koordinasyondan Sorumlu Araştırmacı: Dr. Öğr. Üyesi İpek DUMAN

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

Yardımcı Araştırmacı: Eczacı Sıdika DEMİR

ASLI GİBİDİR
18.03.2022



Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı