

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Deneysel Oluşturulan Kolon Kanser Modelinde Diallil Disülfid'in
TNF-a Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi**

Ümit Yasin ÇOBAN

YÜKSEK LİSANS

Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı

Danışman

Prof. Dr. Zafer BULUT

KONYA-2024

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Deneyisel Oluşturulan Kolon Kanser Modelinde Diallyl Disülfid'in
TNF-a Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi**

Ümit Yasin ÇOBAN

YÜKSEK LİSANS

Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı

Danışman

Prof. Dr. Zafer BULUT

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 21202135 Proje numarası ile
desteklenmiştir.

KONYA-2024

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Ümit Yasin ÇOBAN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof.Dr. Ercan KURAR	İmza
	Necmettin ERBAKAN Üniversitesi	
Danışman:	Prof. Dr. Zafer BULUT	
	Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	Prof.Dr. Seyfullah HALİLOĞLU	
	Selçuk Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. F. Hümevra YERLİKAYA AYDEMİR

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini benim ile paylaşan, karşılaştığım her türlü sıkıntıda yanımda olan ve çözüm bulan danışmanım Prof. Dr. Zafer BULUT'a saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca bu süreç içerisinde tüm desteklerini sunan, bilgi ve tecrübelerini paylaşan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU, Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR, Prof. Dr. Firuze KURTOĞLU, Prof. Dr. Vahdettin ALTUNOK, Prof. Dr. Seyfullah HALİLOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Beyza SUVARIKLI ALAN hocalarıma saygı ve şükranlarımı sunarım. Çalışmamın istatistiksel analizlerinde ve genelinde desteğini esirgemeyen Prof.Dr. Enver YAZAR hocama ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak bana devamlı destek olan değerli nişanlım ve yüksek lisans arkadaşım Elif Nurcan EMRE'e, annem Hatice ÇOBAN, babam Hüseyin ÇOBAN, amcam İbrahim ÇOBAN'a destekleri ve yardımları için teşekkürü borç bilirim.

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından 20/10/2021 tarih ve 2021/105 nolu kararı ile onaylanmıştır. Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (SUBAP) birimi (Proje No: 21202135) tarafından finanse edilmiştir.

Ümit Yasin ÇOBAN

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kolon Kanserinin Epidemiyolojisi, Risk Faktörleri ve Sınıflandırılması	3
1.1.1 Kolon Kanserinin Moleküler Biyolojisi	6
1.2. Diallil Disülfid.....	10
1.2.1 Diallil Disülfid'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	11
1.3. Deneysel Kolon Kanseri Modelleri	13
1.3.1 Azoksimetan Kullanılarak Ratlarda Deneysel Kolon Kanseri Modeli Oluşturma	14
1.4. TNF- α	16
1.4.1 TNF- α ve Kanseri İlişkisi	18
1.5. Diallil Disülfid'in TNF- α Üzerindeki Etkisi	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	25
2.1. Hayvan Grupları ve Uygulamaları	25
2.2. Azoksimetanın Hazırlanması ve Uygulanması	26
2.3. DADS'ın Hazırlanması ve Uygulanması	27
2.4. Doku Örnekleri Eldesi.....	28
2.5. Yapılan Analizler	28
2.5.1. RNA izolasyonu ve Elde Edilen RNA'ların Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	28
2.5.2. Elektorforez İşlemi	30
2.5.3. Temin Edilen Primerlerin Verimliliği	30
2.5.4. mRNA'dan cDNA Sentezi	31
2.5.5. Hedef mRNA'ların RT-qPCR ile Çoğaltılması	31
3. BULGULAR	33
4. TARTIŞMA	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	38

6. KAYNAKLAR	39
7. EKLER	43
EK A: Turnitin Raporu.....	43
EK B: Etik Kurul Kararı	44
8. ÖZGEÇMİŞ	45



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABGE	: Siyah sarımsak ekstraktı
AML	: Akut miyeloid lösemi
AOM	: Azoksimetan (Azoxymethane)
BER	: Base Excision Repair
BG	: Siyah sarımsak
CD	: Crohn hastalığı
cDNA	: Komplementer DNA
CP	: Siklofosfamid
Ct	: Cycle Threshold
DADS	: Diailil sülfid
DC	: Dendritik hücreler
DMH	: 1,2 dimethylhydrazine
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSS	: Dekstran sülfat sodyum
EMT	: Epitel-Mezankimal Geçiş
Et-Br	: Etidyum Bromid
FAP	: Ailesel adenomatöz polipozis
G	: Gram
GEMM	: Genetik olarak değiştirilmiş fare modelleri
IBH	: İnflamatuar bağırsak hastalığı
Kg	: Kilogram
KRK	: Kolorektal kanser
ML	: Mililitre
MMR	: MisMatch Repair
MNNG	:N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
mRNA	: Messenger Ribonükleik Asit
MSI	: Mikrosatellit instabilitesi
NFW	: Nuclease-Free Water
Ng	: Nanogram
NF-κB	: Nükleer faktör κB
NER	: Nucleotide Excision Repair
nM	: Nanometre

PDO	: Hasta türevli organoidler
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribo Nükleik Asit
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
rRNA	: Ribozomal RNA
TACE	: TNF dönüştürücü enzim
TIL	: Tümör içi lökosit
TME	: Tümör mikroçevresi
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNF-a	: Tümör nekroz faktörü alfa
ÜK	: Ülseratif kolit
%	: Yüzde
°C	: Derece (Santigrat)
Δ Ct	: Delta Cycle Threshold
Mg	: Mikrogram
ml	: Mikrolitre

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Deneyisel Oluşturulan Kolon Kanseri Modelinde Diallyl Disülfid'in TNF- α Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Ümit Yasin Çoban

Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2024

Kolorektal kanser (KRK), kalın bağırsak ve rektumda gelişen, dünya çapında kansere bağlı ölümler arasında önemli bir yere sahip olan bir kanser türüdür. KRK, erken teşhis edildiğinde tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen, ileri evrelerde tedavisi zorlaşmaktadır. Hastalığın gelişimi, genetik faktörler, çevresel etkiler ve yaşam tarzı seçimleri gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Anormal hücre büyümesi ve çoğalması ile karakterize olan KRK'nın biyolojik mekanizmaları oldukça karmaşıktır.

Bu tez çalışmasında, ratlarda deneyisel olarak oluşturulan kolon kanseri modelini kullanarak, diallil disülfidin (DADS) TNF- α üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırmada, 50 erkek Wistar albino rat, beş farklı gruba ayrılarak, sağlıklı kontrol, kanser kontrol, sağlıklı DADS, kanser DADS ve mısır yağı grupları olarak deneylere tabi tutulmuştur. Kanser gruplarına, kolon kanserini simüle etmek için azoksimetan (AOM) uygulanırken, DADS gruplarına belirli dozlarda (50 mg/kg vücut ağırlığı) DADS verilmiştir. Çalışmanın sonunda, ratların doku örneklerinden alınan veriler analiz edilerek, DADS'ın TNF- α üzerindeki etkileri ve KRK'deki potansiyel rolü değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizler, diallil disülfidin (DADS) TNF- α üzerindeki etkisinin anlamlı olmadığını ($p>0.05$) göstermiştir. Ancak grafiksel tablo DADS'ın TNF- α ile ilişkili yollar üzerinde etkili olabileceğini ve bu şekilde KRK'nın ilerlemesini etkileyebileceğini göstermektedir. Özellikle, DADS'ın anti-inflamatuar ve apoptotik süreçler üzerindeki etkileri, KRK tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılmasının önünü açabilir. Farklı dozajlar, uygulama süreleri ve model sistemlerinde yapılacak ileri çalışmalar, DADS'ın KRK tedavisindeki rolünü daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

Anahtar Sözcükler: Diallyl Disülfid, Kolon Kanseri, RAT, TNF- α

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Evaluation of the Effect of Diallyl Disulfide on TNF- α in an Experimentally Created Colon Cancer Model

Ümit Yasin ÇOBAN

Department of Veterinary Biochemistry

MASTER'S THESIS / KONYA-2024

Colorectal cancer (CRC) is a type of cancer that develops in the large intestine and rectum and has an important place among cancer-related deaths worldwide. Although CRC is a treatable disease when diagnosed early, it becomes difficult to treat in advanced stages. The development of the disease varies depending on various factors such as genetic factors, environmental influences and lifestyle choices. The biological mechanisms of CRC, which is characterised by abnormal cell growth and proliferation, are highly complex.

In this thesis, the effects of diallyl disulfide (DADS) on TNF- α were investigated using an experimentally induced colon cancer model in rats. In the study, 50 male Wistar albino rats were divided into five different groups as healthy control, cancer control, healthy DADS, cancer DADS and corn oil groups. The cancer groups were treated with azoxymethane (AOM) to simulate colon cancer, while the DADS groups were given DADS at specific doses (50 mg/kg body weight). At the end of the study, the effects of DADS on TNF- α and its potential role in CRC were evaluated by analysing the data obtained from tissue samples of rats.

Statistical analyses showed that the effect of diallyl disulfide (DADS) on TNF- α was not significant ($p>0.05$). However, the graphical representation suggests that DADS may act on TNF- α related pathways and thereby affect the progression of CRC. In particular, the effects of DADS on anti-inflammatory and apoptotic processes may pave the way for its use as a potential therapeutic agent in the treatment of CRC. Further studies in different dosages, administration times and model systems may help us better understand the role of DADS in CRC treatment.

Key Words: Colon Cancer, Diallyl disulfide, RAT, TNF- α

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz ve anormal bölünmesi sonucu oluşan, vücudun çeşitli organları ve bölgelerinde gelişebilen bir hastalıktır. Bu süreçte, normal hücrelerin aksine kanserli hücreler ölmez ve kontrolsüz bir şekilde çoğalarak tümörler oluşturur. Bu tümörler genellikle belirli bir boyuta ulaştığında 1 cm veya 1 milyon hücre- "kitle" veya "tümör" olarak tespit edilebilir. Kan ve kemik iliği kanserleri gibi bazı türler, kitle oluşturmadan laboratuvar testleriyle belirlenebilir. Kanser hücrelerinin gelişimi sadece hücre dönüşümüne bağlı değildir, aynı zamanda bağışıklık sisteminin bu hücreleri erken aşamada etkisiz hale getirememesiyle de ilişkilendirilebilir. Bu anormal hücre büyümeleri, sağlıklı dokulara sızabilir ve tümörlerin büyümesini ve yayılmasını destekleyen yeni kan damarları oluşumuna neden olabilir (Roy ve Saikia 2016, Muller 2017). Ayrıca, kanser hücrelerindeki genetik değişiklikler, hem somatik (tümöre özgü) hem de kalıtsal olabilir ve tümör oluşumuna yol açabilir. Özellikle akut miyeloid lösemi (AML) üzerine yapılan çalışmalarda tedavi yöntemlerinin son 25 yılda önemli bir değişiklik göstermediği ve hastaların çoğunun "ara risk" kategorisine yerleştirildiği belirtilmiştir (Mardis 2012). Bu bilgiler, kanserin karmaşık doğası ve tedavisindeki zorlukları vurgulamaktadır.

Kolon kanseri, sindirim sisteminin son bölümünde, yani kolon ve rektumda gelişen bir hastalıktır. Bu hastalık, küçük bağırsağın sonunu işaret eden ve ince bağırsağın son bölümü ile kalın bağırsağın başlangıcı arasında bir geçiş noktası olan ileoçekal valf noktasından başlayarak anüse kadar uzanan bir alanda görülebilir. İleoçekal valf, ince bağırsaktan kalın bağırsağa içeriğin geçişini düzenleyen ve geri akışını önleyen kritik bir yapıdır. Dünya çapında tıbbi gelişmeler ve artan sağlık hizmetlerine erişim ile bulaşıcı hastalıklardan ölüm oranları iyileşmiş olsa da kansere bağlı ölümler son 40 yılda neredeyse %40 oranında artmış ve önümüzdeki 15 yıl içinde %60'lık bir artış daha beklenmektedir (Kuipers ve ark 2015). Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 135.000 yeni vaka tespit edilir ve bu hastalık nedeniyle ortalama 57.000 kişi hayatını kaybeder. Özellikle son yıllarda Çin'de ve dünya genelinde KRK yaygın bir kanser türü haline gelmiştir. Çin'deki 5 yıllık prevalans oranı erkeklerde 100.000'de 74,6; kadınlarda ise 100.000'de 58,3 olarak kaydedilmiştir. Ayrıca bir kişinin yaşamı boyunca bu hastalığa yakalanma riski yaklaşık %6 olarak hesaplanmıştır. Kolon kanseri, genellikle kolonun iç yüzeyini kaplayan kolonik epitelyal hücrelerde başlar ve bu hücrelerin her beş günde bir kök

hücrelerden yenilenmesi sonucunda oluşabilir. Bu durum, yıllar boyunca süren çok aşamalı bir neoplazi süreci ile ilişkilendirilmiştir (Markowitz ve ark 2002, Gao ve ark 2017). Kolorektal kanser olarak da adlandırılan bu hastalık, tipik olarak kolonun iç kısmında oluşan ve zamanla kötü huylu hale gelebilecek iyi huylu poliplerle başlar. Hastalığın belirtileri arasında bağırsak alışkanlıklarında değişiklikler, rektal kanama, sürekli karın ağrısı, bağırsağın tam boşalmadığı hissi, halsizlik ve açıklanamayan kilo kaybı yer alabilir. Kolon kanserinin nedenleri tam olarak bilinmese de ileri yaş, belirli ırklar, önceki kolorektal polip veya kanser öyküsü, enflamatuvar bağırsak durumları, düşük lifli ve yüksek yağlı diyet, hareketsiz yaşam tarzı, diyabet, obezite, sigara ve alkol kullanımı, karına yönelik radyasyon tedavisi ve aile öyküsü gibi risk faktörleri tanımlanmıştır. Düzenli tarama testleri, polipleri kanserleşmeden önce tespit ederek önleyici bir rol oynayabilir. Ayrıca, kalıtsal faktörler de kolon kanserine yatkınlıkta rol oynayabilir (Kuipers ve ark 2015, Attarabeen ve ark 2018). Ayrıca kolorektal kanser riski ve mortalitesinin 65 yaş üstü popülasyonda kadınlarda erkeklerden daha yüksek olduğu belirtilmiştir, bu da kadınların daha uzun yaşam beklentisi göz önünde bulundurulduğunda, cinsiyet hedefli stratejilerin önemini artırmaktadır. Bu bilgiler kolorektal kanserin önlenmesi ve tedavisinde cinsiyet ve yaş odaklı yaklaşımların önemini vurgulamaktadır (Kim ve ark 2015). Kolon kanserinin belirtileri arasında dışkıda kan, değişken dışkılama alışkanlıkları (örneğin ishal veya kabızlık), karın ağrısı, halsizlik ve kilo kaybı bulunabilir. Erken evrelerde belirti vermeyebilir, bu nedenle düzenli tarama önemlidir. Tanı genellikle kolonoskopi ve biyopsi yoluyla konulur (Ricciardiello ve ark 2016).

Bağırsak mikrobiyotasının KRK gelişimi ve ilerlemesiyle yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bağırsak mikrobiyotasının hem gastrointestinal sistemin iç kısmı (lümen) hem de bağırsağı döşeyen dokularda farklılık gösterdiği ve bu farklılıkların KRK ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Özellikle, *Fusobacterium nucleatum* gibi bazı patojen bakterilerin KRK ile bağlantılı olduğu ve lenf nodu metastazı ile ilişkilendirildiği gözlemlenmiştir. KRK olan bireyler ile sağlıklı bireyler arasında mikrobiyotada farklılıklar bulunmuştur ve kemirgen modellerinde, bağırsak mikrobiyotasının değiştirilmesinin kanserleşme sürecini yavaşlatabileceğini gözlemlenmiştir (Gao ve ark 2017).

1.1. Kolon Kanserinin Epidemiyolojisi, Risk Faktörleri ve Sınıflandırılması

Kolon kanserinin epidemiyolojisi, inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBH) bağlamında incelendiğinde, ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CD) gibi durumların, KRK riskini artırabileceği gözlemlenmiştir. Uzun süreli ÜK ve Crohn koliti (proktit hariç) olan bireylerde KRK riskinin yaklaşık 2-3 kat arttığı belirtilmekle birlikte, bu risk oranları çalışmanın yapısına, zaman dilimine ve bireysel risk faktörlerine göre değişkenlik göstermektedir. IBH, sindirim sisteminde kronik inflamasyona yol açan durumlar olup, bu hastalıkların iki ana alt tipi olan CD ve ÜK şeklinde karşımıza çıkar. Ülseratif kolit, özellikle rektumdan başlayıp kalın bağırsağın daha üst kısımlarına doğru ilerleyebilen, mukozal tabakayla sınırlı kronik ve tekrar eden inflamatuvar bir durumdur. Karın krampları, irinli veya müsinli dışkılama gibi belirtilerle kendini gösterir. ÜK'nin seyri genellikle uzun olup, nüksetme riski yüksektir ve tedavisi zorlayıcı olabilir. Gelişmiş tıbbi tedaviler ve düzenli kolonoskopik taramalar sayesinde zaman içinde KRK oranlarının azaldığı gözlemlenmiş olup, bu durum, eski ve yeni çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında daha net anlaşıldığı düşünülmektedir. Özellikle, Asya-Pasifik toplumlarından elde edilen veriler, bu bölgelerdeki IBH koliti olan hastalarda da KRK riskinin benzer bir artış gösterdiğine işaret etmektedir. KRK riskinin etnik köken veya coğrafi konum gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterip göstermediği tam olarak netleşmemiş olup, bu durumun çeşitli gözetim uygulamaları, gastroenterolojik uzmanlık bakımına erişim ve IBH tedavi yöntemleri gibi faktörlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu gözlemler, KRK'nın epidemiyolojik değerlendirmesinde inflamatuvar bağırsak hastalıklarının önemli bir etken olduğunu göstermektedir (Moghimi-Dehkordi ve Safaee 2012, Shah ve Itzkowitz 2022, Pan ve ark 2023).

KRK, dünya genelinde erkekler ve kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Özellikle 65 yaşın üzerindeki kadınlarda, yaşlıları olan erkeklere göre daha yüksek ölüm oranları ve daha düşük 5 yıllık hayatta kalma oranları gözlemlenmiştir. Ayrıca, kadınların sağ taraftaki (proksimal) kolon kanserine yakalanma riskinin, erkeklere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Sağ taraftaki kolon kanserleri, sol taraftakilere (distal) kıyasla genellikle daha agresif seyreden türler olarak kabul edilmektedir. Bu durum, kolorektal kanserin cinsiyet ve yaşa göre farklı risk profilleri ve seyir özellikleri olduğuna işaret etmektedir (Hansen ve Jess 2012, Kim ve ark 2015).

Kolon kanseri, sporadik, ailesel ve kalıtsal olmak üzere üç ana türe ayrılmaktadır. DSÖ'nün 4 × 4 modeline göre tütün kullanımı, fiziksel hareketsizlik, sağlıksız beslenme ve alkol tüketimi gibi davranışsal risk faktörleri yanı sıra, hiperglisemi, hiperlipidemi, hipertansiyon ve obezite gibi fizyolojik anormallikler kolon kanseri riskini artırmaktadır. Bu bulgular, kolon kanserinin risk faktörlerinin karmaşık ve çeşitli olduğunu ve bu faktörlerin hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Pourhoseingholi 2012, Chottanapund ve ark 2021).

Tablo 1.1. KRK risk faktörlerinin genel olarak iki kategori de incelenmesi. [Ionescu ve ark (2023)'dan düzenlenerek alınmıştır.]

Değiştirilemez Risk Faktörleri	Değiştirilebilir Risk Faktörleri
Etnik Köken	Hareketsiz Yaşam Tarzı
Cinsiyet	Obezite
Yaş	Diyet
Kalıtsal Mutasyonlar	Sigara Kullanımı
İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları	Alkol Tüketimi
Karın Bölgesine Yapılan Radyasyon	Diyabet ve İnsülin Direnci
Kistik Fibrozis	Bağırsak Mikrobiyotası
Akromegali	
Kolesistektomi	
Androjen Türevleri ile Tedavi	

Erken başlangıçlı kolorektal kanser teşhisi alan bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda, İBH öyküsü olan hastaların, sporadik kanser vakalarına kıyasla daha yüksek metastatik hastalık oranlarına sahip oldukları ve histolojik farklılaşma derecelerinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu hastalarda lenfovasküler ve perinöral invazyonun varlığı daha yaygın bulunmuş ve bu durumların sağkalım oranlarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olan bireylerin prognozlarında farklılık

olmadığı, ancak farklılaşmamış İBH olan bireyler için prognoz daha kötü olduğu bulgusuna ulaşılmıştır. Araştırmacılar, İBH ile ilişkili kronik inflamasyonun, bu malign durumun kötü prognozunu açıklayabilecek spesifik bir genetik profil ile sonuçlanabileceğini öne sürmüşlerdir. Ek olarak, İBH popülasyonunda müsinöz ve taşlı yüzük histolojisinin (negatif prognostik faktörler) daha yüksek prevalansına ve daha yüksek pozitif cerrahi sınır oranlarına dikkat çekmişlerdir. Bu bulgular, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının kolorektal kanser prognozunu etkileyebileceğini ve bu durumların özellikle erken başlangıçlı kolorektal kanser vakalarında dikkate alınması gerektiğini göstermektedir (Granados-Romero ve ark 2017, Cho ve ark 2019, Arif ve ark 2021, Ionescu ve ark 2023).

KRK, etiyolojik ve genetik etmenlere göre genellikle üç ana grupta incelenir: Bunlar sporadik, kalıtsal ve ailesel vakalardır. Sporadik vakalar kolorektal kanserlerin büyük bir kısmını oluşturur ve aile öyküsü olmayan kişilerde görülür. Yaşın ilerlemesiyle birlikte diyet ve çevresel etkilerin etkisiyle 50 yaş üstü bireylerde daha yaygın hale gelir. Sporadik kanserlerin oluşumunda genellikle yaşlanma da etkilidir ve tüm kolorektal kanser vakalarının yaklaşık yüzde onun da genetik bir eğilim saptanmıştır. Kalıtsal kolorektal kanserler, genetik sendromlarla ilişkili olarak gelişir ve genellikle poliplerin varlığı ile karakterizedir. Sporadik kolorektal kanser, genetik bir predispozisyon olmaksızın ortaya çıkar. Ailesel kolorektal kanserler, belirgin bir genetik marker olmaksızın, aile içinde artmış bir risk gösteren vakaları kapsar ve genellikle çevresel faktörlerin etkisiyle birlikte genetik bir yatkınlık gösterir. Kalıtsal kolorektal kanser ise, adenomatöz poliplerin varlığına bağlı olup, FAP ve HNPCC gibi özel varyantları içerir. Bu kalıtsal türler, sindirim sistemi dışındaki kanser riskinin yüksek olduğu durumlarla ilişkilendirilebilir ve genellikle belirgin bir aile öyküsü ile karakterize edilirler. Bu sınıflandırma, kolorektal kanserin anlaşılması ve yönetilmesinde önemli bir rol oynar ve hem genetik hem de çevresel faktörlerin hastalığın gelişimindeki rolünü vurgular. Bu grup içinde en bilinen örnekler Lynch sendromu ve aile kanser sendromudur. Bu tür kanserler, kolorektal kanserlerin tüm tipleri arasında daha az yaygın olmakla birlikte, hastalığın biyolojisi konusunda önemli bilgiler sunar. Ailesel kolorektal kanserler ise, aile içinde kanser vakalarının sıkça görüldüğü ancak kalıtsal bir düzen göstermeyen durumlardır. Bu tip, kolorektal kanser vakalarının yaklaşık dörtte birini kapsayabilir ve genellikle belirgin genetik bir modellere uymaz (Calvert ve Frucht 2002, Sameer 2013, Arvelo

ve ark 2015). Kalıtsal kanser yatkınlığına sahip bireylerin, özellikle Lynch sendromu gibi durumların tespiti, kanserin ve ona bağlı ölümlerin önlenmesine önemli ölçüde katkıda bulunabilir. Bu, uygun kanser önleme stratejileri ve erken tarama programlarının yanı sıra ileri evre kanser için hedeflenmiş terapilerin uygulanmasını içerir. Lynch sendromu da dahil olmak üzere kansere kalıtsal yatkınlığı olan bireylerin belirlenmesi, belirli kanser önleme ve taramalarının yanı sıra ilerlemiş kanseri olan bireyler için altta yatan neoplastik sürece yönelik tedavilerin kullanılmasına olanak sağlayarak kanserin ve kansere bağlı ölümlerin önlenmesine yardımcı olabilir (Yurgelun ve Hampel 2018).

Lynch sendromu, otozomal dominant yolla kalıtılan ve eksik penetransa sahip olan, kolorektal kanserlerin yaklaşık %3'ünü ve endometriyal kanserlerin %2'sini oluşturan genetik bir yatkınlık durumudur. Bu sendrom, MMR (Mismatch Repair) DNA onarım sisteminin genlerinde meydana gelen mutasyonlarla karakterize edilir. En yaygın etkilenen genler MLH1 ve MSH2'dir ve hastaların %60-80'inde bu genlerde mutasyonlar bulunur. MMR sisteminin inaktivasyonu, çeşitli genlerde mutasyonların birikmesine ve mikrosatellit instabilitesi (MSI) tümör fenotipinin gelişimine neden olur. Mikrosatellit instabilitesi (MSI), hücrelerin DNA'sında bulunan ve tekrar eden DNA dizileri olan mikrosatellitlerde meydana gelen uzunluk değişikliklerini ifade eder. MSI, DNA'nın uyumsuzluk onarım sistemi (mismatch repair- MMR) genlerindeki bozukluklar nedeniyle oluşur. Bu genler, DNA'nın kopyalanması sırasında meydana gelen küçük hataları düzeltmekten sorumludur. Eğer bu genlerde bir mutasyon veya işlev bozukluğu varsa, DNA'nın hatalı kısımları onarılamaz ve mikrosatellit bölgelerinde tekrar sayısında artış veya azalış gibi değişiklikler meydana gelir. Lynch sendromu hastaları sadece kolorektal ve endometriyal kanser riski taşımazlar, aynı zamanda ürotelyal ve ince bağırsak kanserleri gibi dar spektrumlu kanserlere de yatkınlık gösterirler. Geniş spektrumlu kanserler arasında mide, kolanjiokarsinom, yumurtalık ve pankreas kanserleri bulunur (Biller ve ark 2019, Pellat ve ark 2019).

1.1.1. Kolon Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve stabilite genleri, kanser gelişiminde önemli roller oynarlar. Onkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonları, hücre bölünmesini artırarak veya hücre ölümünü engelleyerek tümör oluşumuna katkıda

bulunur. Onkogenler, hücre döngüsünü aktive ederken, tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybı, hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına yol açar. Ayrıca bu genler apoptotik süreçleri baskılayabilir veya anjiyogenez yoluyla tümöre besin sağlayabilir. Stabilite genleri, DNA'daki hataların onarımından sorumlu olup, MMR, NER ve BER gibi farklı onarım mekanizmalarını içerir (Kheirelseid ve ark 2013).

MMR (MisMatch Repair): DNA replikasyonu sırasında oluşan eşleşme hatalarını düzelten bir sistemdir. Bu hatalar genellikle yanlış baz çiftlerinden veya DNA'nın kopyalanması sırasında oluşan eklemelerden veya silinmelerden kaynaklanır. MMR, bu hataları tanır ve düzeltir, böylece genetik stabiliteyi korur (Hsieh 2001).

NER (Nucleotide Excision Repair): Genellikle UV ışığı gibi dış etkenlerle oluşan DNA hasarını onarır. NER, DNA'da oluşan büyük yapısal bozuklukları, özellikle dimerleri ve çapraz bağları tanır ve onarır. Bu mekanizma, DNA'nın hasar görmüş bölgesini kesip çıkararak ve ardından doğru nükleotid dizisi ile değiştirerek çalışır (Reardon ve Sancar 2005).

BER (Base Excision Repair): DNA'nın bazlarında meydana gelen küçük değişiklikleri, özellikle oksidasyon veya alkilasyon yoluyla oluşan hasarları onarır. BER, hasarlı bazı tanır, çıkarır ve doğru baz ile değiştirir, bu da DNA'nın bütünlüğünü korumaya yardımcı olur (Sancar 1996).

Bu genlerin mutasyona uğraması, diğer genlerde daha fazla mutasyonun meydana gelmesine yol açar. Stabilite genlerinin inaktivasyonu, genellikle her iki alelin de etkilenmesini gerektirir. Bu üç gen sınıfındaki mutasyonlar, germ hattında (kalıtsal kanser riski yaratır) veya somatik hücrelerde (sporadik tümörler) meydana gelebilir. Mutasyonlar, genetik dizilimde çeşitli değişiklikler şeklinde olabilir; bunlar arasında tek baz çifti değişiklikleri, delesyonlar, insersiyonlar, amplifikasyonlar veya translokasyonlar bulunur. Bu genetik değişiklikler, kanserin gelişimi ve ilerlemesinde kritik roller oynayarak, hücrelerin anormal büyümesine ve kanser oluşumuna katkıda bulunur (Kheirelseid ve ark 2013, Müller ve ark 2016). KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, APC, TP53 gibi birçok genin yüksek mutasyon sıklığı ve ERBB2, IGF2 gibi genlerdeki kopya sayısı değişiklikleri, MLH1'deki metilasyon değişiklikleri, mRNA ve protein seviyelerindeki ifade bozuklukları ve NAV2/TCF7L1 gibi translokasyonlar KRK'nın moleküler genetiğini belirleyen önemli faktörlerdir (Kudryavtseva ve ark 2016).

Kodlanmayan RNA'lar (ncRNA'lar), gen ekspresyonu, epigenetik süreçler, hücre farklılaşması, çoğalması, göçü ve apoptozu gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer alırlar. Yüksek kapasiteli teknikler, eukaryotik genomun büyük bir kısmının ncRNA'lar olarak transkribe edildiğini ortaya koymuştur. Bu ncRNA'lar, küçük ncRNA'lar (sncRNA'lar) ve uzun ncRNA'lar (lncRNA'lar) olmak üzere boyutlarına göre iki ana gruba ayrılır. Bu RNA türleri, kanser dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarında önemli roller oynamakta ve potansiyel teşhis veya prognoz belirteçleri olarak kabul edilmektedirler. Özellikle mikroRNA'lar (miRNA'lar), kanser gibi çeşitli insan hastalıklarında önemli biyolojik rolleri olan küçük ncRNA'lardır. miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'-UTR bölgesine bağlanarak gen düzenleyici rollerini yerine getirir ve transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu baskılayarak kanserin gelişim ve yayılımında önemli bir rol oynayabilirler. miRNA'lar, kanserde onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebilirler ve KKK gelişim ve ilerlemesinde yer alan bir dizi miRNA'nın düzensiz ekspresyonu bu süreçte etkili olduğu düşünülmektedir (Wang ve ark 2015). MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ifadesini transkripsiyon sonrası düzenleyen ve yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olan kısa RNA molekülleridir. Bu moleküller, kanser gelişimini ya teşvik ederek onkogen işlevi görürler ya da baskılayarak tümör süppresörü işlevi üstlenirler. KKK bağlamında, belirli miRNA'ların önemli rolleri olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, miR-21 sıklıkla KKK'de yükseltilmiş bir ifade düzeyine sahip bulunur ve PDCD4, SPRY2 ve PTEN gibi tümör baskılayıcı genleri hedef alarak hücre çoğalmasını, invazyonunu ve göçünü teşvik eder. Tersine, miR-143 ve miR-145 KKK'de düşük ifade düzeylerine sahip olup tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak işlev görürler ve KRAS, MYC, CD44 ve BRAF gibi kronik inflamasyon ve kanser ilerlemesine katkıda bulunan onkogenlerin ifadesini düzenleyerek çalıştığı düşünülmektedir (Francavilla ve ark 2019).

KKK gelişiminde, hücre bölünmesi sırasında kromozomların sayı veya yapısında meydana gelen anormallikler olan kromozomal instabilitenin (CIN) bir rol oynadığı ve kanser hücrelerinin genellikle yüksek oranda hücrelerde normalden fazla veya az kromozom bulunması durumu olan anöploid olduğu ve gen kopya sayısında önemli değişiklikler gösterdiği belirtilmiştir. KKK vakalarının yaklaşık %90'ında Wnt sinyal yolunu aktive eden gen anormallikleri mevcuttur. Bu genellikle APC geninin işlev kaybı mutasyonlarından kaynaklanır. Wnt sinyal yolu, hücre büyümesi

ve gelişimi için kritik olan bir sinyal iletim yoludur. APC geni, bu yolun önemli bir bileşenidir ve APC'nin işlev kaybı mutasyonları, Wnt yolunun aşırı aktive olmasına ve kontrolsüz hücre bölünmesine yol açabilir. APC proteininin işlev kaybı, β -catenin'in fosforilasyonunu engelleyerek onun proteazomda yıkılmamasına ve hücre çekirdeğine taşınarak gen ifadesini artırmasına yol açar. Bu durum, KRK'nın öncü lezyonları olan adenomatöz poliplerde görülür ve KRK karsinogenezinde erken bir olay olarak kabul edilir (Bosman ve Yan 2014).

Tümör mikroçevresi (TME), tümörün çevresindeki bağ dokusu, kan damarları, immün hücreler ve diğer hücre tiplerini içeren bir yapıdır (van Wyk ve ark 2016). TME, kanser hücrelerinin davranışını etkileyebilir ve bağışıklık sistemini baskılayarak kanserin gelişimine ve yayılmasına katkıda bulunabilir. TME içerisindeki bağışıklık hücreleri, kanser hücrelerini tanıyıp yok etmeye çalışır. Ancak, bazı kanser türleri bağışıklık sisteminin bu hücelere saldırmasını engelleyen mekanizmalar geliştirebilir. Bu durum, immünoterapinin gelişiminde önemli bir alan olarak kabul edilir (O'Toole ve ark 2014). Çoğu kanserin açık bir inflamasyon (iltihap) ile başlamadığı düşünülmektedir. Ancak mevcut olan sporadik tümörler (genetik bir predispozisyon olmaksızın ortaya çıkan tümörler) inflamasyonu tetikleyebilir. Bu durum, tümör mikroçevresinde (TME) bulunan çeşitli hücre türleri arasındaki etkileşimlere bağlıdır. Bu etkileşimler, tümörün büyümesi, yayılması ve metastaz yapması için önemli bir rol oynar. APC genindeki mutasyonlar, bağırsak bariyeri işlevinin kaybına yol açabilir. Normalde bağırsak bariyeri, bağırsak lümeninden vücuda zararlı olabilecek maddelerin geçişini engeller. APC mutasyonu sonucunda bu bariyerin işlevsiz hale gelmesi, bağırsak lümeninden gelen mikrobiyal ürünlerin dokuda bulunan ve IL-23 ifade eden miyeloid hücreleri aktive etmesine neden olabilir. Bu aktivasyon, erken evre KRK gelişimini teşvik edebilir (Schmitt ve Greten 2021). TME'nin önemi anlaşıldıkça, immün kontrol noktalarının (örneğin PD-1, LAG-3, TIM-3) rolü ve KRK tedavisindeki potansiyeli daha da belirginleşmektedir. Yapılan araştırmalar, tümör hücrelerinde ve TME'deki immün hücrelerde bu kontrol noktalarının ifadesinin KRK'nın prognozu ve tedaviye yanıtı üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir. Örneğin, tümör hücrelerinde yüksek LAG-3 ve PD-1 ifadesi, kötü kanserle özgü hayatta kalma ile ilişkilendirilirken, TME'deki stromal immün hücrelerde yüksek TIM-3, LAG-3 ve PD-1 ifadesi, iyileştirilmiş kanserle özgü hayatta kalma ile ilişkilendirilmiştir. Bu

durum, immün kontrol noktalarının birleşik ifadelerinin (CICSS gibi) KRK prognozunu daha iyi öngörebileceğini ve immünoterapi yaklaşımlarının geliştirilmesi için potansiyel hedefler sunabileceğini göstermektedir. Böylece, KRK'nın yönetimi ve tedavisinde TME'nin ve immün kontrol noktalarının rolü, hastalığın daha iyi anlaşılmasını ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlayabilir (Al-Badran ve ark 2021) KRK'da, tümör mikroçevresi (TME) içindeki dendritik hücrelerin (DC'ler) olgunlaşması baskılanmakta ve bu durum tümörün immün yanıtta kaçmasına yol açabilmektedir. Tümörden elde edilen koşullandırılmış ortam (TCM), DC'lerin IL-12p70 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasını azaltırken, IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini artırır. Bu süreç, tümörün immün baskılayıcı bir ortam oluşturmasını sağlar. TCM'de bulunan CCL2, CXCL1, CXCL5 gibi kemokinler ve VEGF, DC fonksiyonunu etkileyerek tümörün gelişimine ve yayılmasına uygun bir ortam yaratır. Ayrıca, TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü alfa) gibi pro-inflamatuar sitokinlerin TME'deki dengesi, KRK'nın ilerlemesi ve tedaviye yanıtında önemli rol oynamaktadır. TNF- α , hem tümör baskılanmasını teşvik edebilir hem de tümörün bağışıklık sisteminden kaçmasına neden olabilir. Bu çelişkili etkiler, KRK tedavisinde TNF- α ve diğer TME faktörlerini potansiyel hedefler olarak ön plana çıkarır (Michielsen ve ark 2011).

1.2. Diallyl Disülfid

Sarımsak, Alliaceae familyasına ait bir bitki olup, özellikle Orta ve Güney Asya'da yetişir. Günümüzde dünya genelinde, özellikle kuru ve sıcak iklimlerde yetiştirilir. Çin, Hindistan, Güney Kore, Mısır ve ABD en büyük üreticileri arasındadır. Binlerce yıldır hem mutfakta hem de geleneksel tıpta kullanılan sarımsak, viral hastalıklar da dahil çeşitli sağlık sorunlarına karşı etkilidir. FDA tarafından "genel olarak güvenli" olarak kabul edilen sarımsak, Asya ve Avrupa'da çeşitli hastalıkların tedavisinde, Afrika geleneksel tıbbında ise enfeksiyonlar ve diğer sağlık sorunlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Rouf ve ark 2020). Sarımsak, sağlık üzerinde çeşitli olumlu etkileri olan bir baharat olarak tanınmaktadır. İçeriğinde organik sülfidler, saponinler, fenolik bileşikler ve polisakkaritler gibi çeşitli biyoaktif maddeler barındırır. Araştırmalar, sarımsağın antioksidan, kardiyovasküler koruyucu, antikanser, anti-enflamatuar ve immünomodülatör gibi işlevleri olduğunu göstermektedir. Siyah sarımsak (BG), yüksek sıcaklık ve nemde fermente edilmiş taze sarımsak olarak tanımlanmaktadır ve bu işlem ona tatlı bir tat ve jöle benzeri bir

kıvam kazandırmaktadır. Güney Kore, Japonya ve Tayland gibi bölgelerde tüketimi gözlemlenmiştir ve son zamanlarda uluslararası alanda da ilgi görmektedir. Taze sarımsağa kıyasla daha az allisin içermesi, BG'nin daha hafif bir tada sahip olduğuna işaret etmektedir. Araştırmalar BG'nin çeşitli sağlık yararlarına sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu yararlar arasında antioksidan, antialerjik ve antidiyabetik etkiler bulunmaktadır. Özellikle siyah sarımsak, taze sarımsağa göre daha yüksek polifenol ve flavonoid içeriği ve antioksidan özellikleriyle dikkat çekmektedir (Kimura ve ark 2017, Shang ve ark 2019).

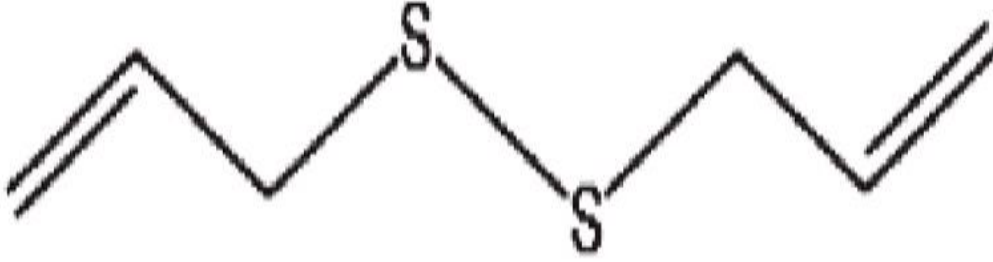
Kolon kanseri, gastrointestinal kanserler arasında yaygındır ve cerrahi sonrası nüks oranı yüksektir. Kemoterapi, kanser tedavisinde altın standart olmakla birlikte, ciddi yan etkilerle ilişkilidir. Bu bağlamda, daha az toksik antikanser ajanlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Sarımsak ve özellikle allisin bileşiğinin kanser hücrelerine karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir. (Dong ve ark 2014). Yapılan bir çalışmada SGC-7901 insan mide kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozun indüksiyonu üzerindeki etkisini değerlendirilmiş, yaşlandırılmış siyah sarımsak ekstraktının (ABGE) mide kanserine karşı olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark 2012).

1.2.1. Dialil Disülfid'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Sarımsağın karakteristik kokusu, allisin ve yağda çözünen diğer sülfür bileşiklerinden kaynaklanır. Sarımsak hasar gördüğünde, allinaz enzimi allini parçalar ve allisin gibi tiyosülfinatları oluşturur. Bu süreçte ayrıca dialil sülfid (DAS), dialil disülfid (DADS), dialil trisülfid gibi tipik uçucu maddeler de üretilir. Bu bileşikler, sarımsağın yoğun ve karakteristik kokusunu oluşturur ve sarımsağın ezilmesi, kesilmesi ya da diğer işlemlere maruz kalmasıyla çeşitlenir (Amagase ve ark 2001).

Dialil disülfid (DADS), moleküler ağırlığı 146.27 olan ve sarımsak yağının önemli ve bol bulunan bileşenidir. Sarımsak tüketimi sonucu allinaz enziminin etkisiyle allinden oluşur. Bu bileşik vücutta hızla değişime uğrar ve çeşitli metabolitlere (allilmerkaptan ve allilmetil sülfid gibi) dönüşür. İnsanlarda sarımsak tüketimi sonrası DADS'nin nefeste tespit edildiği gözlemlenmiştir. DADS ve metabolitlerinin in vivo etkileri, farmakolojik olarak zayıflamış olabilir, ancak bazı metabolitlerin DADS'den daha etkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle,

DADS'nin biyolojik etkileri, metabolizmanın etkisiyle değişebilir (He ve ark 2021).



Diallil Disülfid

Şekil 1.1. Diallil Disülfid'in kimyasal yapısı. [He ve ark (2021)'dan düzenlenerek alınmıştır.]

Sarımsaktan türetilen bir doğal organik kükürt bileşiği olan dialil disülfid (DADS), çeşitli biyolojik işlevlere sahiptir. Bu işlevler, anti-inflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal, kardiyovasküler koruyucu, nöroprotektif ve antikanser aktiviteleri içerir. DADS, bu işlevleri özellikle kimyasal yapısına bağlı olarak sergiler. İnflamasyona karşı etkili olan DADS, çeşitli hastalıklarda inflamasyonu engeller. Antioksidan etkisi, zararlı reaktif oksijen türlerini nötralize ederek doku hasarını azaltır. Ayrıca, DADS'in antikanser etkileri araştırılmakta ve potansiyel tedavi yöntemleri arasında değerlendirilmektedir. Antioksidan özellikleri zararlı reaktif oksijen türlerinin nötralize edilmesine yardımcı olarak doku hasarını azaltır. DADS'in anti-enflamatuar etkisi, enflamasyonla ilişkili hastalıkların yönetiminde faydalıdır. Özellikle kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebildiği ve tümör büyümesini inhibe edebildiği için potansiyel antikanser etkileri araştırılmaktadır. Bu özellikler DADS'i birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde umut verici bir ajan olarak düşündürmektedir (Song ve ark 2021).

DADS'ın önemli bir anti-kanser potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Apoptozu teşvik etme, karsinogenleri detoksifiye eden enzimleri aktive etme, reaktif oksijen türlerinin üretimini engelleme, DNA addukt oluşumunu baskılama ve hücre döngüsü durdurma gibi mekanizmalarla etki gösterir. Özellikle, tümörlerin metastatik potansiyelini baskılamada, örneğin epitel-mezankimal geçiş (EMT), invazyon ve migrasyonun engellenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Mitra ve

ark 2022). DNA addukt oluşumu, DNA molekülüne zararlı maddelerin (Ör: kimyasal karsinojenler) bağlanarak genetik yapısını değiştirmesidir. Bu süreç hücrenin normal işleyişini, yaşam döngüsünü bozabilir ve kanser gibi hastalıklara yol açabilir. Dialil disülfidin DNA addukt oluşumunu baskılama yeteneği, bu zararlı maddelerin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek veya bu tür bağların oluşumunu azaltarak genetik hasarı önlemesi anlamına gelmektedir (Jin ve ark 2013).

1.3. Deneysel Kolon Kanseri Modelleri

Deney hayvanı modelleri, KRK araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Fare modelleri, KRK'nın mekanistik çalışmalarında ve ilaç geliştirilmesinde temel araçlardır. Apc genindeki mutasyonları taşıyan fareler, ailesel adenomatöz polipozis (FAP) modeli olarak kullanılırken, β -katenin sinyal yolu mutasyonları, hem FAP hem de herediter nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC veya Lynch sendromu) ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkili KRK modellerini sunmaktadır. Bu modeller, KRK'nın biyolojik süreçlerini, tümör gelişimini ve potansiyel tedavi yöntemlerini anlamada kritik öneme sahiptir (Taketo ve Edelman 2009).

KRK'nın moleküler karakterizasyonu ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli olan genetik olarak değiştirilmiş fare modelleri (GEMM) ve hasta türevli organoidler (PDO) üzerinde durulmaktadır. GEMM'ler, doğal seleksiyon yoluyla genişleyen ve metastaz yapabilen spontan tümörler oluşturarak, tümör ekosistemi üzerinde çalışmalar yapılmasını sağlar. PDO kültürleri ise, klinik öncesi sonuçların insan hastalıklarına uygulanabilirliğini artırmak için kullanılmaktadır. Bu modeller KRK'nın daha iyi anlaşılması ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Lannagan ve ark 2021).

Deneysel kolon kanseri modellerinde kimyasal ajanların kullanımı, tümörlerin gelişimini tetiklemek için önemli bir yöntemdir. Özellikle kimyasal ajanlarla indüklenen kolon karsinogenez modelleri, fare ve sıçanlarda kullanılan yaygın yöntemlerdendir. Bu modeller KRK'nın mekanizmalarını ve tedavi stratejilerini anlamak için değerli araçlar sağlamaktadır (Krasteva ve Georgieva 2022). Bu çalışmaların bir örneği, farelerde düşük doz endoskopinin N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) tarafından indüklenen karsinogenezin analizinde kullanılmasını inceleyen bir çalışmadır. Bu çalışmada, 30 C57BL6 fare iki gruba ayrılmıştır: kontrol grubu tuzlu su ile, karsinojen grubu ise 100 mg/kg MNNG ile

rektal olarak tedavi edilmiştir. Her iki grupta da düşük doz endoskopiler 4. ve 8. haftalarda yapılmıştır. Bu çalışma, MNNG'nin düşük konsantrasyonlarında kolonik epitelde abberant kript odaklarının oluşumunu tetikleyebildiğini, bu odakların preneoplastik lezyonlar olduğunu ve yüksek oranda malign transformasyona sahip olduklarını göstermiştir (Machado ve ark 2020).

Yine kimyasal bir ajan olan Azoksimetan (AOM) kullanılarak yapılan bir çalışmada, kemik iliği kanserine duyarlı Apc mutantlı bir sıçan kullanılarak yapılan bir kemoterapi biyoassayının detayları incelenmiştir. Araştırma, AOM/DSS ile tedavi edilen KAD sıçanlarının kolonlarında endoskopik gözlemler gerçekleştirmiş ve hayvanları kolon tümörlerinin sayısına göre gruplara ayırmıştır. 8. haftada AOM/DSS ile tedavi edilen KAD sıçanlarında %100 oranında kolon tümörü görülmüştür. Sıçanlar bir ila dört tümör geliştirmiştir. Makroskopik olarak, KAD sıçanlarının büyük bağırsakları incelenmiş ve kolon tümörlerinin çoğunlukla rektum ve distal kolonda geliştiği gözlemlenmiştir. Proksimal kolonda hiçbir tümör gözlemlenmemiştir (Yoshimi ve ark 2012).

1.3.1. Azoksimetan Kullanılarak Ratlarda Deneysel Kolon Kanseri Modeli Oluşturma

AOM fare modellerinde kolorektal kanseri modellemek için yaygın olarak kullanılan bir kimyasal ajandır. Bu maddenin farelerde kolorektal kanser oluşumunu indüklediği ve bu süreçte genetik faktörlerin yanı sıra doz, uygulama yolu ve diyet gibi çevresel faktörlerin de önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. AOM'un farelerdeki etkilerini incelemek için farklı dozlar, uygulama yolları ve diyetlerle yapılan deneyleri kapsamaktadır. Farklı fare ırkları, AOM'a karşı farklı derecelerde duyarlılık göstermiş, bu da bu kimyasalın farklı genetik yapıları olan farelerde farklı etkiler yaratabileceğini göstermiştir. Ayrıca AOM'un farelerdeki etkilerinin cinsiyete bağlı olmadığı da gözlemlenmiştir (Bissahoyo ve ark 2005). AOM, genotoksik bir ajan olup, DNA alkilasyonu yoluyla kanseri başlatır. Bu süreçte, O6-metilguanin (O6MeG) gibi yüksek sitotoksik, mutajenik, apoptotik, rekombinojenik ve klastojenik DNA adduktları oluşur. AOM, farelerde uygulandığında insan kolorektal kanserine benzer tümörler oluşturur ve bu tümörler, moleküler düzeyde WNT sinyal yolunun düzensizleşmesi, benzer hedef genler ve K-ras mutasyonları gösterir (Nasuno ve ark 2014). AOM'un farelerde kolorektal kanser araştırmalarında

kullanılan yaygın ve etkili bir modeldir. Bu model, farelerde ve insanlarda kolon kanseri gelişimi ve tedavisi ile ilgili çeşitli hipotezlerin test edilmesi için ideal bir platform sağlamaktadır. AOM'un farelerde kolon kanserini başlatma ve teşvik etme kapasitesi, kanser araştırmalarında önemli bir araç olarak kullanılan genetik olarak değiştirilmiş fare modelleri (GEMM) ve hasta türevli organoidler (PDO) ile birlikte, kolon kanseri gelişimini ve tedavisini daha iyi anlamak için kritik öneme sahiptir (Reddy 2004).

Venning ve ark (2013)'nın yaptıkları çalışmada, AOM'un kolon kript patolojisinin erken inflamasyonla indüklenmesini nasıl artırdığı, AOM normal SCID farelerinin ve T hücre transferiyle oluşan kolitli SCID farelerinin kolon kript patolojisi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmada, AOM kendi başına ne kilo kaybına ne de inflamasyona yol açmış, ancak kript genişliklerini ve sayılarını etkilemiştir. AOM, T hücre transferiyle birlikte uygulandığında, bağırsak iltihabı seviyesini artırmamış, ancak kolon iltihabı ile ilişkili kript değişikliklerini artırmıştır. Bu değişiklikler, büyük bağırsakta kript sayılarının azalması ve kript genişliklerinin artması şeklinde gözlemlenmiştir. Bu bulgular AOM'un inflamasyon indüklenmiş değişikliklerin eşliğini düşürerek neoplaziye yol açabileceğini göstermektedir. Ayrıca, çalışmada AOM'un, T hücresi transferi sonucu oluşan kolitli farelerde kript patolojisini artırdığı ve bu durumun neoplastik lezyonlara yol açabileceği öne sürülmüştür. Bu çalışma, AOM'un erken aşamalarda kolon patolojisine küçük bir etkisi olmasına rağmen, T hücreleri tarafından indüklenen inflamasyon alanlarında kolon patolojisini artırabileceğini göstermektedir.

AOM metil gruplarının hidroksilasyonu yoluyla metilazoksümetanola (MAM) dönüştürülür ve bu işlem CYP2E1 ve diğer P-450 izozimleri tarafından katalize edilir. MAM, karaciğer ve ekstrahepatik organlarda CYP2E1 tarafından metilazoksiformaldehide oksitlenir, bu da bir metildiazonyum iyonunu oluşturur ve DNA'yı metilleme yeteneğine sahiptir. AOM'un kolon kanseri oluşturma süreci, çok aşamalı bir karsinogenez süreci olarak kabul edilir ve tümör oluşumunu tetikleyen, teşvik eden ve ilerleten aşamaları içerir. AOM tarafından indüklenen kolon kanserinin, farelerdeki tümörlerin ışık ve elektron mikroskopik morfolojisi, histokimyasal özellikleri ve biyolojik davranışı, insan kolon kanserlerine oldukça benzerdir. AOM ile indüklenen kanserler, bölgesel lenf düğümlerine ve karaciğere metastaz yapabilir ve bu kanserler nakledilebilir. AOM tedavisi, farelerdeki K-ras ve

H-Ras genlerindeki mutasyonları indükler ve bu proto-onkogenlerin aşırı ifadesi, kolon tümör gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, AOM ile indüklenen kolon tümörleri, insan kolon tümörlerine benzer şekilde, siklooksijenaz-2 (COX-2) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ifadesinin arttığını göstermiştir (Reddy 2004).

AOM ve 1,2-dimetilhidrazin (DMH) kullanılarak germ-free (mikrop barındırmayan) fareler üzerinde yapılan bir çalışmada (Reddy ve ark 1975) bağırsak mikroflorasının, AOM ve DMH'nin bağırsağın kanserojen etkisine duyarlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. AOM'nin intrarektal olarak uygulanması, germ-free farelerde ve *Clostridium perfringens* ile kontamine gnotobiyotik farelerde, konvansiyonel kontrollere kıyasla kolonik tümörlerin çoğalmasında önemli ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir. Çalışmada, germ-free ve konvansiyonel fareler, AOM'nin farklı dozlarıyla tedavi edilmiştir. Germ-free farelerin hiçbirinde kulak kanalı tümörü gözlemlenmezken, monocontamine ve konvansiyonel hayvanların yaklaşık yarısında skuamöz hücreli karsinomların geliştiği bildirilmiştir. Ayrıca, AOM tedavisi sonrası, germ-free farelerin bağırsak mikroflorasının, DMH tarafından indüklenen kolon tümör üretimini hızlandırdığı belirtilmiştir.

Lai ve ark (2011)'de yaptıkları çalışmada AOM'un kolonik epitelde anormal kript odaklarının (ACF) oluşumunu tetiklediğini gözlemlemişlerdir. Bu odaklar, preneoplastik lezyonlar olarak kabul edilir ve yüksek oranda malign transformasyona sahip olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar AOM tedavisinden sonra bu lezyonların sayısı ve boyutunun arttığını, bu durumda AOM'un kolon kanseri gelişiminde önemli bir rol oynadığını gösterdiğini belirtmişlerdir.

1.4. TNF- α

Tümör Nekrozis Faktör (TNF), 1970'lerin sonlarında tümör hücre çoğalmasında baskılayabilen ve tümör gerilemesine neden olabilen bir sitokin olarak tanımlanmıştır. TNF, 157 amino asitten oluşan bir protein olup, TNF dönüştürücü enzim (TACE) aracılığıyla serbest bırakılan membrana bağlı bir protein (pro-TNF) olarak sentezlenir. TNF, hücre hayatta kalması, çoğalması, farklılaşması ve ölümü gibi çeşitli hücresel olaylarda önemli roller oynayan çok işlevli bir sitokindir. Pro-inflamatuar bir sitokin olarak TNF, iltihapla ilişkili kanser gelişimine katkıda bulunabilecek inflamatuvar hücreler tarafından salgılanır. TNF, biyolojik

fonksiyonlarını nükleer faktör κ B (NF- κ B) ve c-Jun N-terminal kinazı (JNK) gibi farklı sinyal yollarını aktive ederek gerçekleştirir. NF- κ B, anti-apoptotik bir hücre hayatta kalma sinyali iken, sürdürülen JNK aktivasyonu hücre ölümüne katkıda bulunur (Wang ve Lin 2008).

TNF- α , iltihabi tepkilerde ve hücre ölümüne yol açarak hastalık gelişimine neden olan inflamatuvar immün tepkileri tetiklemede merkezi rol oynayan önemli bir sitokindir. Kronik inflamatuvar ve otoimmün patolojilerin tedavisinde kullanılan TNF'yi nötralize eden biyolojik ilaçlar, bu tür hastalıkların tedavisinde oldukça başarılı olmuştur. TNF, doğrudan inflamatuvar gen ifadesini tetikleyerek ve dolaylı olarak hücre ölümüne yol açarak inflamatuvar yanıtları yönlendirir. Bu nedenle hücre ölümünü engelleyen inhibitörler, TNF-bağımlı inflamatuvar hastalıkların tedavisi için yeni bir terapötik strateji olarak düşünülmektedir (van Loo ve Bertrand 2023).

TNF- α çok fonksiyonlu bir sitokindir ve bağışıklık fonksiyonu, hücre farklılaşması, çoğalması, apoptozisi ve enerji metabolizması gibi birçok hücrel ve biyolojik süreci düzenleyebilir (Cawthorn ve Sethi 2008). TNF- α , doğuştan gelen bağışıklık yanıtında önemli rol oynayan bir sitokindir. Bu sitokin, bakteri hücre yüzey ürünleri gibi polisakkaritler, karbonhidratlar ve lipopolisakkaritleri tespit eden membran bağlı desen tanıma moleküllerinin aktivasyonu sonucu makrofajlar tarafından üretilir. TNF- α başlangıçta, 26 kDa ağırlığında biyolojik olarak aktif bir membran bağlı öncül protein olarak üretilir. Bu protein daha sonra, çoğunlukla TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) tarafından işlenerek, serbest 17 kDa protein haline getirilir. Bu proteinler, biyolojik olarak aktif homotrimerler oluşturur ve her yerde bulunan TNF- α reseptörleri 1 ve 2'ye (p55 ve p75 veya TNFR1 ve TNFR2) etki eder. Bu reseptör-ligand etkileşimi, kompleksin içselleştirilmesi olmadan hücre içi sinyalleşmeye neden olur ve bu da nükleer faktör- κ B'nin fosforilasyonuna ve ardından p50-p65 alt biriminin DNA kromatin yapısı ile etkileşimine, IL-8, IL-6 ve TNF- α 'nın kendisi gibi proinflamatuvar genlerin transkripsiyonunun artmasına yol açar. TNF- α aktivasyonuna verilen yanıt, TNF- α reseptörlerinin ekstrasellüler bölgesinin atılması ile dengeye getirilir (Berry ve ark 2007).

TNF- α , akut inflamasyonda makrofajlar/monositler tarafından üretilen bir inflamatuvar sitokindir. Hücre içi sinyal olaylarının geniş bir yelpazesinden sorumlu olup, hücre nekrozu veya apoptozisine yol açar. TNF α , ayrıca enfeksiyon ve kanserlere karşı direnç için de önemlidir. TNF α , 55 kDa hücre zarı reseptörü TNFR-

1 veya 75 kDa hücre zarı reseptörü TNFR-2'ye üçlü olarak bağlanarak çoğu etkisini gösterir. Bu reseptörler, TNF reseptör süperfamilyasına aittir. Süperfamilyanın tanımlayıcı özelliği, iki ila altı tekrarlı sistin zengini motifler içeren bir hücre dışı bölgedir (Idriss ve Naismith 2000).

Tablo 1.2. TNF- α 'nın genel biyolojik fonksiyonları [Schottelius ve ark (2004)'dan alınarak düzenlenmiştir.]

Özellik/Fonksiyon	Açıklama
İnflamasyonun Düzenlenmesi	TNF- α , vücutta inflamasyonun düzenlenmesinde kilit bir rol oynar. Bu, inflamatuvar hücrel yanıtı tetikleyerek ve çeşitli hücre tiplerine etki ederek gerçekleştirilir.
Hücre Ölümü (Apoptozis)	TNF- α , hücre ölümünü (apoptozis) tetikleyebilir, bu da dokuların hasarlanması ve çeşitli hastalıkların gelişiminde önemli bir faktördür.
Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Etkileri	TNF- α , bağışıklık sisteminin aktivasyonunda ve düzenlenmesinde rol oynar. Özellikle makrofajlar ve diğer immün hücreler tarafından salınır ve bağışıklık yanıtının modülasyonunda etkilidir.
Hastalıklarla İlişkisi	TNF- α , romatoid artrit, psöriatik artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patofizyolojisinde merkezi bir rol oynar.
Reseptör Etkileşimi	TNF- α 'nın etkileri, iki ana TNF reseptörü, TNF-RI ve TNF-RII aracılığıyla gerçekleşir. Bu reseptörler hücre yüzeyinde bulunan ve TNF- α ile etkileşen transmembran glikoproteinlerdir.

1.4.1. TNF- α ve Kanser İlişkisi

TNF- α , 1975 yılında tümör nekrozuna yol açan bir faktör olarak keşfedilmiştir. Başlangıçta antitümör özellikleri nedeniyle adlandırılan TNF- α , daha sonra iltihaplanma ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli diğer durumlarla

ilişkilendirilmiştir. TNF- α , tümörle ilişkili damarlarda hiperpermeabiliteye neden olarak ve melphalan gibi ilaçların tümör bölgesine girişini kolaylaştırarak antitümör etkisi gösterir. Bu etkiler, apoptotik ve nekrotik sinyal yollarını tetikleme yeteneğinden ziyade, iltihaplanma ile ilgili endotel geçirgenliğini düzenleme kapasitesinden kaynaklanmaktadır (Wajant 2009).

TNF- α , insanlarda 157 amino asitten oluşan ve çözeltide homotrimer halinde bulunan 17 kDa'lık bir proteindir. Gen, insanlarda 6. kromozoma haritalanmıştır. Biyoaktivitesi çoğunlukla çözünür TNF- α bağlayıcı reseptörler tarafından düzenlenir. TNF- α , esas olarak aktive makrofajlar, T lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından üretilir. Fibroblastlar, düz kas hücreleri ve tümör hücreleri gibi diğer hücre türlerinde daha düşük ifade edildiği bilinmektedir. TNF- α , hücrelerde pro-TNF (26 kDa) olarak sentezlenir ve membrana bağlıdır ve pro bölgesinin TNF dönüştürücü enzim (TACE) tarafından kesilmesiyle serbest bırakılır (van Horssen ve ark 2006).

TNF- α ve kanser arasındaki ilişki, bu sitokinin hem kanser tedavisinde hem de kanser gelişiminde rol oynayabilmesi nedeniyle karmaşık ve çelişkili olduğu düşünülmektedir. TNF- α 'nın tümör hücrelerinin apoptozunu (programlanmış hücre ölümü) tetikleyebilme yeteneği vardır. Bazı durumlarda, özellikle yüksek dozlarda, TNF- α 'nın anti-tümör özellikleri gözlemlenmiştir. TNF- α , sarkoma tedavisinde ve vasküler geçirgenliği artırarak kemoterapötik ilaçların tümör içinde birikmesine yardımcı olmak için kullanılmıştır. Bu birikim, tümör damarlarının yıkımına yol açabilir (Zidi ve ark 2010).

Anjiyogenez, yeni kan damarlarının mevcut olanlardan oluşması, tümör büyümesi ve metastaz için hayati öneme sahiptir. TNF- α , endotel hücrelerini normal damarlardan farklı olarak etkileyerek ve potansiyel olarak tümörle ilişkili damarları daha geçirgen hale getirerek tümörle ilişkili damarları etkiler. Tümör damarlarının, sağlıklı damarlara kıyasla, sürekli olmayan bir endotel ve anormal perisit örtüsü gibi özelliklerle daha kaotik bir yapıya ve işleve sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu özellikler, tümör damarlarını TNF- α tedavisi için özel bir hedef haline getirdiği bilinmektedir. TNF- α tedavisi uygulandığında, tümör damarları hiper geçirgen hale gelir, eritrositlerin ve diğer kan hücrelerinin ekstrasvazasyonu ile masif hemorajik tümör nekrozu meydana gelir. Bu etki, TNF- α 'nın doğrudan damar endoteli hücrelerine olan yüksek doz sitotoksitesiyle de artırılır ve bu süreç indüklenen hiper geçirgenliği güçlü bir şekilde artırdığı düşünülmektedir (van Horssen ve ark 2006).

Arnott ve ark (2004)'nın yaptığı çalışmada TNF- α , epidermal malignitede (yani cilt kanserinde) önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir. Fare cilt kanseri modelinde, TNF- α 'nın hem tümör oluşumunu teşvik ettiği hem de AP-1 aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir. TNFR1 ve TNFR2'nin her ikisi de tümör gelişiminde önemli rol oynar, ancak TNFR1'in daha baskın bir role sahip olduğu gözlemlenmiştir. TNF- α ve onun reseptörleri TNFR1 ve TNFR2, cilt kanseri gelişiminde önemli roller oynar. TNFR1, TNF- α 'nın tümör teşvik edici etkisinde daha baskın bir rol oynarken, TNFR2 destekleyici bir rol üstlenir. Her iki reseptör de ciltte ifade edilir ve tümör promasyonu sırasında TNFR2'nin ifadesi artar. AP-1 komplekslerinin düzenlenmesi ve TNFR1 ile TNFR2 arasındaki işbirliği, TNF- α 'nın tümör oluşumu ve gelişimindeki karmaşık etkileşimleri yansıttığı tespit edilmiştir.

TNF- α 'nın KKK ile olan ilişkisi, IBH ve kolit ile ilişkili kanser patogenezindeki rolüyle yakından bağlantılıdır. TNF- α , hem epitel hem de bağışıklık hücreleri tarafından salınan ve kolit ile ilişkili kanserin patogenezinde rol oynayan çeşitli sitokinler arasında öne çıkar. Bu sitokinler, aktive olmuş bağışıklık hücreleri ile epitel ve mezenkimal hücreler gibi bağışıklık dışı hücreler arasındaki etkileşimlerin temel araçlarıdır. TNF- α , güçlü bir pro-inflamatuar sitokin olarak kabul edilir ve özellikle IBD'nin patogenezinde etkili olduğu düşünülür. Son veriler, TNF- α 'nın deneysel kolit modellerinde tümör gelişimini teşvik ettiğini göstermektedir (Kraus ve Arber 2009). Bu bağlamda, Popivanova ve ark (2008)'nin yaptıkları çalışmada, farelerde kolorektal kanser oluşumunu azaltmak için TNF- α 'nın bloke edilmesi incelenmiştir. Ülseratif kolit hastalarının kolon karsinomları geliştirmesine yönelik mekanizmaları anlamak için, farelerde AOM ve DSS (dekstran sülfat sodyum) uygulanarak ciddi kolonik inflamasyon ve ardından çoklu tümörlerin geliştiği bir model kullanılmıştır. Bu modelde, TNF- α ekspresyonu ve TNF- α 'nın ana reseptörü p55'i (TNF-Rp55) ifade eden lökositlerin infiltrasyonu artmıştır. Bu durum, kolonik tümörlerin gelişimini takip etmiştir. TNF-Rp55 eksik farelerde, makrofaj ve nötrofil infiltrasyonu azalmış ve sonraki tümör oluşumu hafiflemiştir. TNF- α , hücrelerde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma kapasitesine dayalı olarak güçlü bir mutajen olarak önerilmiştir. TNF- α 'nın bloke edilmesinin ROS üretimini engelleyebileceği ve böylece kolon kanseri başlangıcını azaltabileceğini gözlemlenmiştir.

De Simone ve ark (2015) tarafından yapılan çalışmada TNF- α 'nın KKK hücre

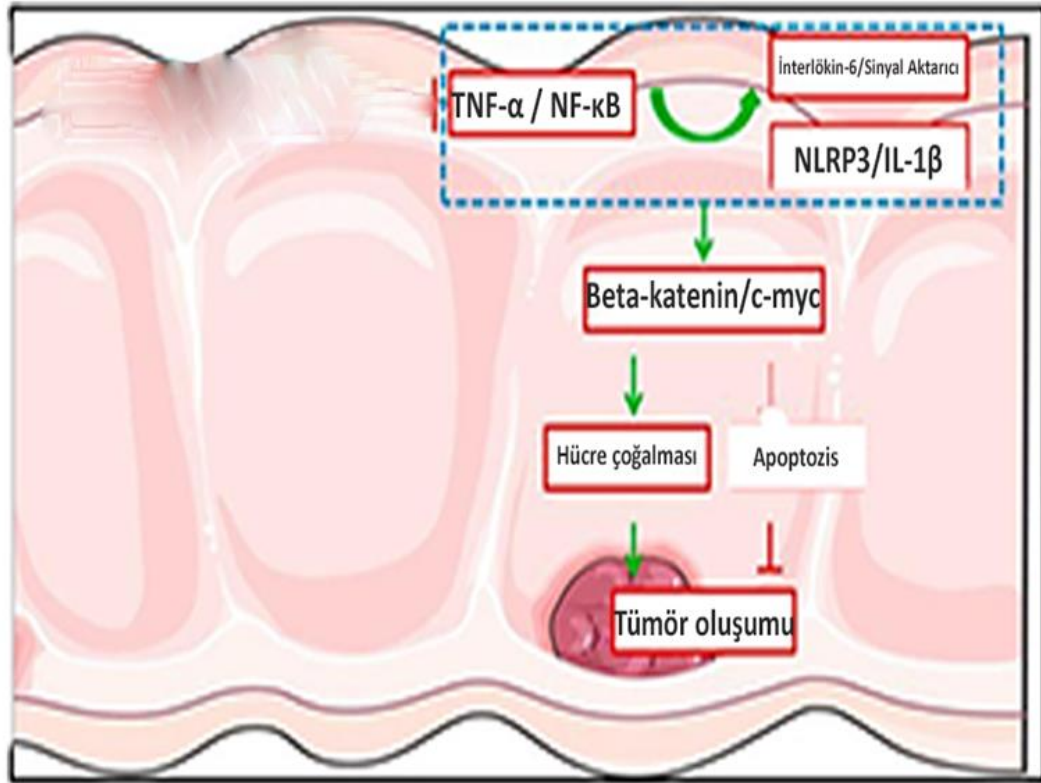
büyümesinin desteklenmesinde ve inflamatuvar yanıtların modülasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. TNF- α , tümör mikroçevresindeki immün/inflamatuvar hücreler tarafından üretilir. Bu hücreler tümör büyümesini ve metastazı etkileyen çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri salgılar. TNF- α , tümör içi lökositler (TIL'ler) ve diğer immün hücreler tarafından üretilerek tümör büyümesini ve yayılımını teşvik edebildiğini göstermişlerdir. TNF- α , NF- κ B ve STAT3 gibi onkogenik transkripsiyon faktörlerini aktive ederek KRK hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını destekler. Bu sinyal yollarının tümör hücrelerinin büyümesinde ve hayatta kalmasında kritik rol oynadığı tespit edilmiştir. Xu ve ark (2022) tarafından yapılan çalışmada roburik asit, TNF ve TNF reseptörü TNF-R1 arasındaki etkileşimi engelleyerek TNF tarafından uyarılan NF- κ B aktivasyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir. Bu inhibisyon, HCT-116 ve HCT-15 insan kolorektal kanser hücre hatlarında G0/G1 hücre döngüsü duraklamasını ve apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir. Gong ve ark (2020) tarafında yapılan çalışmada ise TNF- α ve KRK arasındaki ilişki, hipertermik intraperitoneal kemoterapi (HIPEC) ile incelenmiştir. Çalışmada rekombinant mutant insan TNF- α (rmhTNF) ve raltitreksed (RTX)'in farelerde kolorektal-periton karsinomatozisi modeli üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. TNF- α , NF- κ B ve STAT3 gibi onkogenik transkripsiyon faktörlerinin aktive olarak KRK hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını destekleyebileceği ve bu sinyal yollarının tümör hücrelerinin büyümesinde ve hayatta kalmasında kritik rol oynadığı belirtilmiştir.

TNF- α ve KRK arasındaki ilişki hem immünolojik hem de moleküler düzeyde karmaşık etkileşimler içerir. TNF- α 'nın hedef alınması, KRK tedavisinde potansiyel bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Bu durumun TNF- α 'nın tümör büyümesi ve inflamasyonu teşvik eden etkileri düşünülerek yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yol açabileceği değerlendirilmektedir.



Azoksimetan Uygulaması

Kolon



İnhibisyon — Artış Etkisi — Dolaylı Artış Etkisi

Şekil 1.2. Azoksimetan ile ratlarda deneysel kolon kanseri oluşumu ve mekanizması. [Yao ve ark (2018)'dan düzenlenerek alınmıştır.]

1.5. Diällil Disülfid'in TNF-a Üzerindeki Etkisi

Diällil disülfid (DADS), sarımsakta bulunan başlıca organokükürt bileşenidir ve çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir. Bu bileşen, özellikle antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleriyle dikkat çeker. TNF- α bir sitokin olarak, vücutta inflamatuvar süreçlerde önemli bir rol oynar. TNF- α , özellikle immün sistemin hücreleri tarafından üretilir ve inflamasyon, hücre ölümü (apoptozis), ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik bir mediyatördür. TNF- α 'nın aşırı üretimi çeşitli inflamatuvar hastalıklarla ve bazı kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir (Zhang ve ark 2020).

DAS'nin TNF- α veya histaminle uyarılmış rat aortik düz kas A7r5 hücrelerindeki etkilerini ve moleküler mekanizmasının incelendiği bir çalışmada (Ho ve ark 2014) TNF- α tedavisi sonrası, A7r5 hücrelerinde p65 proteininin (NF- κ B'nin bir alt birimi) nükleer seviyelerinin arttığı ve DAS ön muamelesinin bu artışı önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Histamin tedavisi sonucunda PI3K/Akt yolunun aktivasyonu ve NF- κ B ve AP-1'in aktivasyonları gözlemlenmiş, DAS ve NAC tedavilerinin bu aktivasyonları inhibe ettiği bildirilmiştir. İlgili çalışma, DAS'nin inflamatuvar ve oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavisinde potansiyel bir diyet ajanı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Bai ve ark (2005) tarafından yapılan çalışmada, ülseratif kolit hastalarından alınan kolon biyopsilerinde DADS'nin TNF- α üretimine etkileri ve bu etkinin potansiyel mekanizması araştırılmıştır. DADS'nin, TNF- α üretimini azaltarak ve lamina propriya mononükleer hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek inflamasyonu baskılayabildiği gözlenmiştir. Bu durum DADS'nin NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu ve aktivasyonunu inhibe ederek, TNF- α döngüsünü kırması ve ülseratif kolit tedavisinde potansiyel bir ilaç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Sigara dumanı (CS)-kaynaklı hava yolu inflamasyonu indüklenen sıçanlarda DADS tedavisinin TNF- α , iNOS ve IL-6 gibi pro-inflamatuar mediyatörlerin etkilerini baskıladığı gözlenmiştir. Sigara dumanı ve LPS ile tedavi edilen sıçanlarda TNF- α ve diğer pro-inflamatuar mediyatörlerin seviyeleri artarken, DADS ön tedavisinin bu artışları önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir (Ko ve ark 2018).

DADS'nin siklofosamid (CP) kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruyucu

potansiyelinin araştırıldığı çalışmada (Hasan ve ark 2020), CP'nin tek doz uygulamasının sıçanlarda karaciğer fonksiyonları ve oksidatif stres üzerinde önemli bir bozulmaya neden olduğu ve ayrıca inflamatuvar biyobelirteçlerde artışa yol açtığı gözlenmiştir. TNF- α 'nın yüksek doz CP ile tetiklenen akut inflamatuvar yanıtları şiddetlendirdiği anlaşılmaktadır. DADS'nin CP öncesi uygulanması, bu değişiklikleri belirgin bir şekilde azaltmış ve böylece antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikleriyle inflamatuvar süreci engellediği gözlemlenmiştir.

DADS'nin mide ülseri üzerindeki koruyucu etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada (Lee ve ark 2014) alkole (EtOH) indüklenen akut mide mukozal hasarına sahip sıçanlar kullanılmıştır. Alkol (EtOH)'ün, mide lezyonlarında TNF- α ve interleukin 6 (IL-6) seviyelerinde artışa neden olduğu gözlenmiş ve proinflamatuvar sitokinlerin EtOH tarafından indüklenen akut mide hasarının patogenezi üzerinde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. DADS'nin EtOH tedavisinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu ve glutatyon (GSH) tükenmesini engellediği ve antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir.

Kolon kanseri hücrelerinde (Caco-2) yapılan başka bir çalışmada (Altonsy ve ark 2013) DADS'nin Caco-2 hücrelerine uygulanmasının bu hücrelerin TNF- α aracılı apoptoza duyarlılığını artırdığı bildirilmiştir. FAS reseptörü, normal insan kolonik epitelyal hücrelerinde yüksek oranda ifade edilirken, kanser progresyonu sırasında azalır veya tamamen kaybolur. DADS tedavisi, hücre membranında FAS reseptör ifadesini hem protein hem de RNA düzeyinde artırmıştır. DADS tedavisinden sonra TNF- α uygulanan hücrelerde, kontrol ve yalnızca DADS tedavisi gören hücrelere kıyasla, ölü hücre sayısı önemli ölçüde artmıştır. Bu sonuçlar, DADS'nin kolon kanseri hücrelerinde apoptozu sadece intrinsik yollarla değil, aynı zamanda ekstrinsik yolu güçlendirerek de indükleyebileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmada AOM ile deneysel olarak oluşturulan kolon kanseri modelinde DADS uygulamalarının kolon dokusunda TNF- α ekspresyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada 12-16 haftalık, 50 adet Wistar Albino ırkı erkek rat kullanılmıştır. Deney süresince hayvanlar, %40 nem ve 20°C sıcaklıkta bulunan kafeslerde 12 saat gece, 12 saat gündüz koşullarında altışarlı gruplar halinde tutulmuştur ve toplam deney süresi 18 haftada gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından 20/10/2021 tarih ve 2021/105 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (SÜBAP) birimi (Proje No: 21202135) tarafından finanse edilmiştir.

2.1. Hayvan Grupları ve Uygulamaları

Çalışma kullanılan ratlar 5 farklı gruba ayrıldı.

1. Kontrol Grubu (K, n:10): Bu grup, deney süresince yiyecek ve suya serbest erişim sağlayan kontrol grubudur. Negatif kontrol grubu olarak kullanıldı ve deney süresince herhangi bir müdahale yapılmadı.
2. AOM Grubu (n:10): Bu grup, kontrol grubu ile aynı barınma ve besleme koşullarına sahipti. Azoksimetan, bu gruba deri altı enjeksiyonlarla uygulandı. Toplamda 2 enjeksiyon, bir haftalık aralıklarla yapıldı. Bu grup pozitif kontrol grubu olarak hizmet etti.
3. DADS Grubu (n:10): Bu grup, kontrol grubu ile aynı koşullarda bakıldı. Ancak, 15. haftadan itibaren 3 hafta boyunca haftada 5 gün olmak üzere vücut ağırlığına göre 50 mg/kg DADS gavaj uygulaması yapıldı. Diallyl Disülfid, mısır yağında çözündürüldü.
4. AOM ve DADS Grubu (AOM + Diallyl Disülfid, n:10): Bu grup, kontrol grubu ile aynı koşullarda bakıldı. İlk olarak, azoksimetan deri altı enjeksiyonlarla uygulandı. Ardından, 15. haftadan itibaren 3 hafta boyunca haftada 5 gün olmak üzere vücut ağırlığına göre 50 mg/kg Diallyl Disülfid gavaj uygulaması yapıldı.
5. Mısır Yağı Grubu (n:10): Bu grup, kontrol grubu ile aynı koşullarda bakıldı. 15. haftadan itibaren 3 hafta boyunca haftada 5 gün olmak üzere vücut ağırlığına göre 1 ml/kg mısır yağı gavaj uygulaması yapıldı.

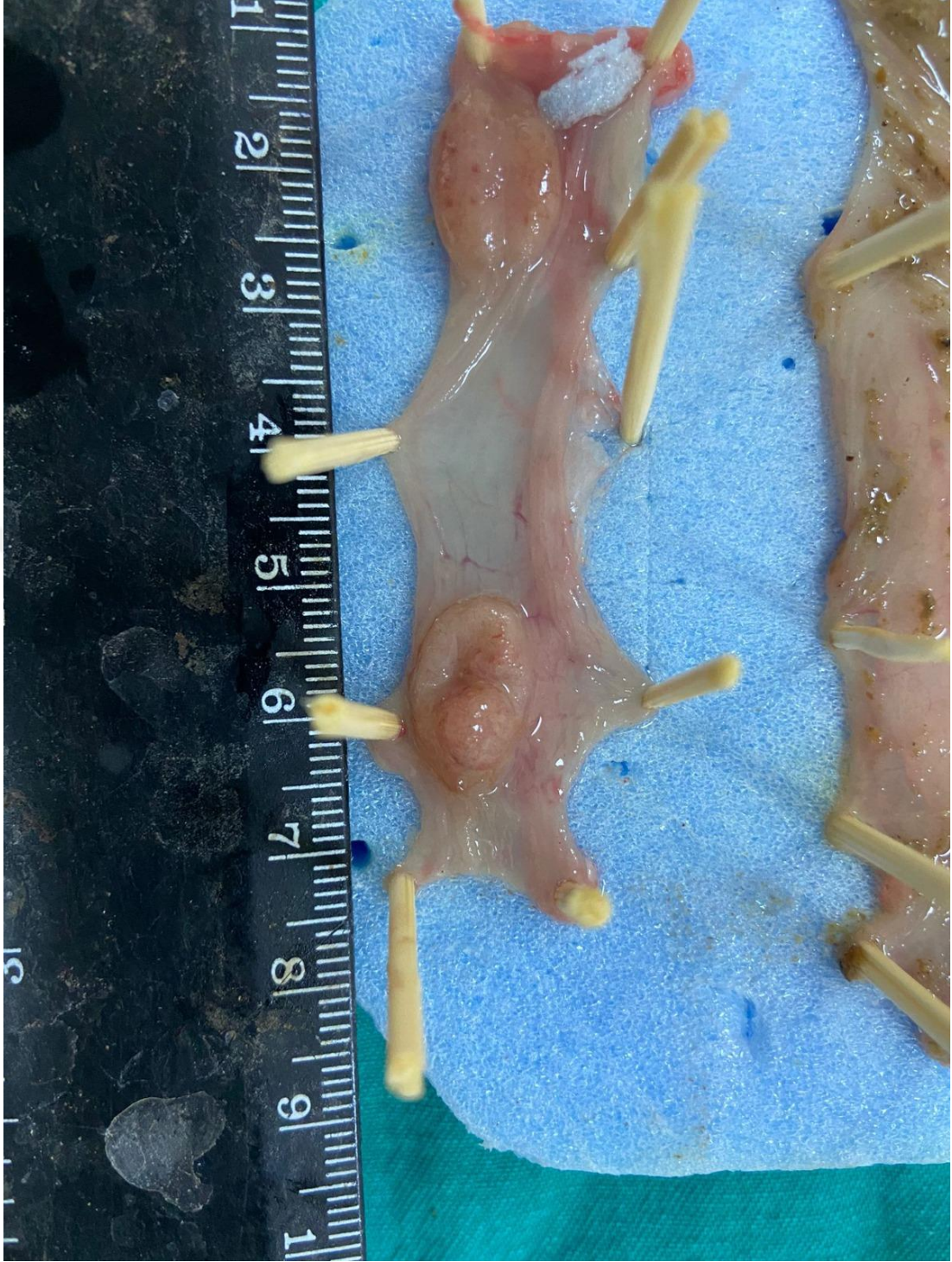
Hayvan Uygulamaları:

Tüm gruplardaki hayvanlar, son uygulamanın ardından bir gün sonra ketamin (95 mg/kg, SC) + ksilazin (5 mg/kg, SC) ile anestezi altına alındı. Daha sonra servikal dislokasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edildi.

2.2. Azoksimetanın Hazırlanması ve Uygulanması

Azoksimetanın kanserojen madde olması nedeniyle potansiyel kontaminasyonu önlemek için bütün önlemler alınmıştır.

Azoksimetan Hazırlığı: Azoksimetan hazırlama işlemi çeker ocak ortamında gerçekleştirildi. Azoksimetan için çözücü olarak %0,9'luk tuzlu su çözeltisi kullanıldı. Bu işlem, maddenin uygun şekilde çözünmesini sağlar ve hayvanlara enjekte edilmesini kolaylaştırır. Uygulamadan önce tüm hayvanlar tartıldı ve kiloları kayıt altına alındı. Azoksimetan çözeltisi hazırlandıktan sonra enjeksiyonlar hemen uygulandı. Her bir enjeksiyon, hayvanların vücut ağırlığına göre 15 mg/kg dozunda yapıldı. Azoksimetanın hazırlanması ve enjeksiyonu sırasında kullanılan tüm atık malzemeler, atık poşetlerine konularak uygun şekilde imha edildi.



Şekil 2.1. AOM uygulaması yapılan ratlardan elde edilen kolon dokusu.

2.3.DADS'ın Hazırlanması ve Uygulama

DADS, keskin kokusu nedeniyle çeker ocak altında hazırlandı. DADS hayvan başına 50 mg/kg dozunda hazırlandı. Mısır yağında çözündürüldü. DADS uygulaması gavaj yoluyla yapıldı. DADS uygulaması, haftada 5 gün boyunca 3 hafta boyunca yapıldı.

2.4. Doku Örnekleri Eldesi

Elde edilen sonuçların güvenilirliğini sağlamak amacıyla, deney süresi sona erdikten sonra hayvanlardan doku örnekleri alınmak üzere steril bir ortamda ve steril malzemelerle işlem yapıldı. Hayvanlar anestezi kullanılarak etik kurallar çerçevesinde sakrifiye edildi ve iç organlar derhal çıkarıldı. Bu çıkarılan organlar, patolojik ve moleküler analizler için kullanılmak üzere toplandı. Kolon dokuları uygun koşullarda muhafaza edildi.

Doku örnekleri patolojik inceleme için hazırlandı; bu amaçla doku örnekleri önce uzunlamasına kesildi, ardından serum fizyolojik ile yıkandı. Daha sonra %10 formaldehit ile fikse edilip %0,2 metilen mavisi ile boyandı. Anormal kripterler olarak adlandırılan ACF'ler ışık mikroskopunda incelendi. Rastgele seçilen 15 mikroskopik alanda ACF'lerin sayısı belirlendi ve skorlandı. Skor 1: 1-3 kripter, skor 2: 4-6 kripter, skor 3: 7-9 ve skor 4: >10 kripter olarak değerlendirildi. Bu adım, kolon dokusunun morfolojik değişikliklerini değerlendirmek için yapıldı.

Ayrıca, moleküler analizler için kullanılacak doku örnekleri sıvı azot içerisine dondurularak muhafaza edildi. Doku örnekleri, çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

2.5. Yapılan Analizler

Elde edilen doku örnekleri, kullanıma kadar -80°C'de saklandı.

2.5.1. RNA izolasyonu ve Elde Edilen RNA'ların Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Total RNA İzolasyonu işlemi şu adımlarla gerçekleştirildi:

- 1) Kolon doku örnekleri (~50 mg), 1 ml Trizol Reagent (TRI Reagent 'Sigma') içinde homojenize edildi ve bu karışım bir ependorf tüpe aktarıldı.
- 2) Karışım, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca bekletildi.
- 3) Karışıma 200 µl kloroform eklenerek iyice karıştırıldı.
- 4) Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- 5) +4°C sıcaklıkta 12000 rpm hızında 15 dakika boyunca santrifüj edildi.

- 6) Santrifüj sonucunda oluşan iki fazlı karışımda, üstte bulunan süpernatant kısmı başka bir ependorf tüpe aktarıldı.
- 7) Yaklaşık 500 µl süpernatant üzerine 500 µl isopropanol eklenerek iyice karıştırıldı.
- 8) Karışım, 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
- 9) +4°C sıcaklıkta 12000 rpm hızında 10 dakika boyunca santrifüj edilerek RNA peleti taban kısmında çöktürüldü.
- 10) Süpernatant dikkatlice tüpten uzaklaştırıldı.
- 11) Peleti temizlemek için pelet, 3 defa soğuk etanol ile +4°C'de 7500 rpm hızında 5 dakika boyunca yıkandı.
- 12) Pelet kurutulduktan sonra 50 µl nükleazdan arındırılmış su (NFW- nuclease-free water) içinde çözüldü.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofik yöntemle (NanoDrop 2000 UV Visible Spectrophotometer) belirlendi. Bu işlem, izole edilen RNA'nın kalitesini ve miktarını değerlendirmeye yardımcı olur. İşlem aşamaları şu şekildedir:

- 1) Her bir RNA örneği, Nanodrop cihazına ayrı ayrı
- 2) Ölçümler, OD260 (nükleik asit optik yoğunluğu) ve OD280 (protein optik yoğunluğu) dalga boylarında gerçekleştirildi.
- 3) Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre, RNA konsantrasyonu ng/µl cinsinden hesaplandı.
- 4) Ölçüm sonuçlarına göre RNA'nın saflığını değerlendirmek için A260/A280 oranı hesaplandı. Bu oranın 1,8-2,0'den düşük olmamasına dikkat edildi. Protein kirliliği varsa A260/A280 oranı düşük olacaktır.
- 5) Ayrıca, A260/A230 oranı da değerlendirildi. Bu oranın 2,0 ile 2,2 arasında olması RNA örneğinin diğer kirleticilerden arındırıldığını göstermesi bakımından tercih edildi.

Bu ölçümler, izole edilen RNA'nın kalitesini ve kullanılabilirliğini belirlemek için kritiktir. Kaliteli RNA örnekleri, moleküler çalışmalar için daha güvenilir ve

güçlü sonuçlar üretir.

2.5.2. Elektroforez İşlemi

Agaroz jel elektroforezi, izole edilen RNA'nın kalitesini ve boyutunu değerlendirmek için sıkça kullanılan bir yöntemdir.

- 1) Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu hazırlandı.
- 2) 1 gr agaroz tartılır ve bir erlenmeyer flaskına konarak, 100 ml %0,5 TBE tamponu, agarozla birlikte erlenmeyer flaskına eklendi.
- 3) Karışım mikrodalga fırında kaynamaya bırakılarak ve agaroz tamamen eriyene kadar karıştırılması sağlandı.
- 4) Sonra 2 mikrolitre etidyum bromür (Et-Br) eklendi.
- 5) Karışım tekrar mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale getirildi.
- 6) Hazırlanan agaroz karışımı oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve jel sertleşmesi için beklendi.
- 7) Jel tankı hazırlandı ve soğuyan agaroz karışımı tanka döküldü.
- 8) Jel donduktan sonra izole edilen RNA örnekleri özel kuyucuklara yüklendi.
- 9) Elektroforez cihazı, genellikle 60V gibi düşük bir gerilimle çalıştırılır ve yaklaşık 1 saat boyunca çalışır. Bu işlem sırasında, RNA örnekleri boyutlarına göre ayrılır.
- 10) Elektroforez işlemi sona erdikten sonra, jel UV ışığı altında görüntülendi.

Bu adımlar, izole edilen RNA'nın kalitesini ve boyutunu belirlemek için önemlidir ve moleküler çalışmalarda kullanılacak RNA'nın uygunluğunu sağlar.

2.5.3. Temin Edilen Primerlerin Verimliliği

Primerlerin etkinliğini belirlemek amacıyla RT-qPCR yöntemi kullanıldı. Primerlerin etkinliği, hedef nükleik asidin verimli bir şekilde çoğaltılmasını değerlendirmek için kritik öneme sahiptir.

Elde edilen RT-qPCR sonuçlarına dayanarak, primerlerin etkinliği hesaplandı. Bu hesaplama, primerlerin hedef nükleik asidin çoğaltılmasındaki

performansını objektif bir şekilde değerlendirmemizi sağladı.

2.5.4. mRNA'dan cDNA Sentezi

mRNA'nın komplementer DNA (cDNA) formuna dönüştürülmesi işlemi için Bio-Rad'in iScript cDNA sentez kit'i kullanıldı. Bu işlem, kit prospektüsünde belirtilen yönergeler doğrultusunda gerçekleştirildi. Revers transkriptaz reaksiyonu için gerekli bileşenler ve 25 reaksiyonluk miktarlar aşağıda listelenmiştir:

- ✓ 5x iScript Reaksiyon Karışımı: 100 µl
- ✓ iScript Ters Transkriptaz: 25 µl
- ✓ Nükleazdan arındırılmış su: 1.5 ml
- ✓ RNA örneği: -

Reaksiyon Protokolü:

- 1) Reaksiyon, 25°C'de 5 dakika süresince başlatıldı.
- 2) Ardından, reaksiyon karışımı 46°C'de 20 dakika süresince devam etti. Bu adımda, RNA molekülleri iScript Ters Transkriptaz tarafından cDNA (komplementer DNA) haline getirildi.
- 3) Ters transkripsiyon işlemi tamamlandığında, reaksiyon karışımı 95°C'de 1 dakika süresince ısıtıldı. Bu adım, enzimleri inaktif hale getirerek ve reaksiyonu sonlandırarak işlemi tamamladı.
- 4) Son olarak, reaksiyon karışımı +4°C'de saklanabilir. Bu adımın amacı, reaksiyon karışımını soğutarak saklamadır.

2.5.5. Hedef mRNA'ların RT-qPCR ile Çoğaltılması

Elde edilen cDNA'nın çeşitli hedef mRNA'ları (Bax, Bcl-2 ve Ywhaz) çoğaltmak amacıyla RT-qPCR kullanıldı. Housekeeping olarak adlandırılan ve deneysel değişkenlerden etkilenmeyen, tüm hücrelerde ifade edilen ve sabit bir kopya sayısına sahip bir genin spesifik bir primeri tercih edildi. Bu analiz için Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR cihazı kullanıldı. Elde edilen cDNA, floresan özellik taşıyan SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (172-5271) kiti kullanılarak analiz edildi. Reaksiyonlar, 96 delikli bir plak içinde gerçekleştirildi.

Her kuyuya 5 µl SYBR Green, 300 nM ileri primer, 300 nM ters primer, 2 µl cDNA eklenerek toplam hacmi 10 µl olacak şekilde Nuklease-Free Su (NFW) eklendi.

Reaksiyonun örnek ısı profili şu şekilde ayarlandı:

- ✓ PCR aktivasyonu için 95°C'de 10 dakika
- ✓ 40 döngü:
 - 1) Denatürasyon için 95°C'de 10 saniye
 - 2) Primer bağlanması için 63°C'de 15 saniye
 - 3) Uzama için 72°C'de 30 saniye

Optik ölçümler, her döngünün 63°C'deki primer bağlanma işlemi sonrasında otomatik olarak gerçekleştirildi. Bu işlemden sonra 63°C'den 95°C'ye kadar saniyede 0,1°C artışla kademeli olarak ısıtılarak, her 1°C artışta optik ölçümler yapılarak melting curve analizi gerçekleştirildi.

Sonuçlar, Cycle threshold (Ct) olarak kaydedildi. Negatif kontrol olarak, olası kontaminasyonu gözlemlemek amacıyla cDNA yerine aynı miktarda ddH₂O kullanıldı. Ekspresyon seviyelerini hesaplamak için $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ yöntemi kullanıldı.

Tablo 2.1. Hedef mRNA'lar için primerler.

Gen İsmi	Gen		Oligonükleotid (5'-3')
Tümör nekroz faktörü alfa	TNF- α	F R	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC GTCGTAGCAAACCACCAAGCAGA

3. BULGULAR

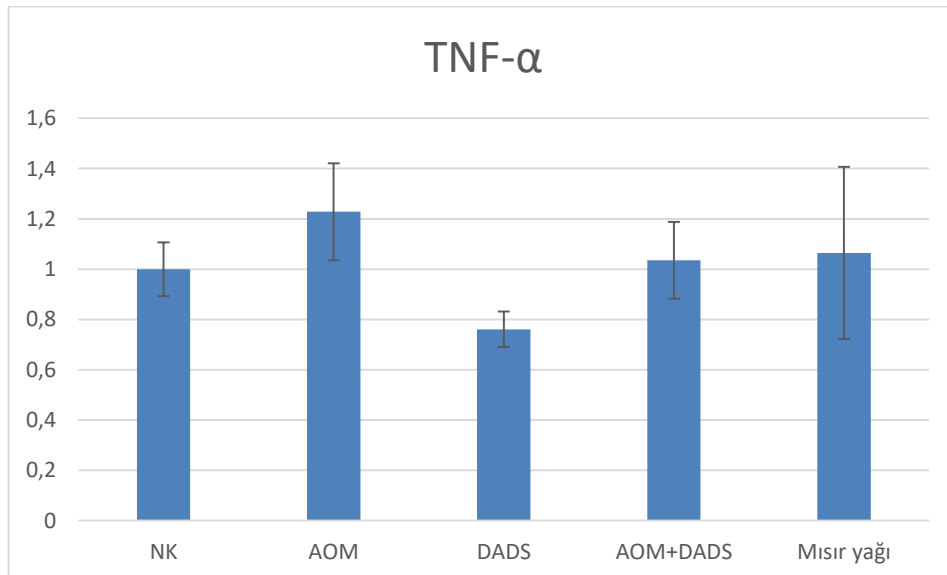
Bu çalışmada, "Deneysel Oluşturulan Kolon Kanseri Modelinde Dialil Disülfid'in TNF-a Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi" başlığı altında beş farklı grup üzerinde yapılan deneylerin sonuçları incelenmiştir. Gruplar şu şekilde tanımlanmıştır:

1. Grup: Negatif Kontrol
2. Grup: AOM ile işlem görmüş pozitif grup.
3. Grup: Dialil disülfid ile tedavi görmüş grup.
4. Grup: AOM ve DADS ile işlem görmüş grup.
5. Grup: Mısır Yağı ile işlem görmüş grup.

Her bir grup için TNF-a düzeyleri ölçülmüş ve istatistiksel analizler yapılmıştır. Bu analizlerin bir parçası olarak, gruplar arasındaki TNF-a düzeyleri farklılıklarının anlamlılığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır.

ANOVA sonuçlarına göre, gruplar arasında TNF-a düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Bu sonuç, Dialil Disülfid'in TNF-a üzerindeki etkisinin mevcut çalışma koşulları altında anlamlı bir fark yaratmadığına işaret etmektedir.

Şekil 3.1. RT-PZR sonuçlarına göre katlanma oranları ($2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SE$ of Mean of log).



İstatistiksel olarak sonuçlar anlamlı olmasa da ($p>0.05$) Şekil 3.1’de bulunan grafik incelendiğinde farklı grupların TNF-a düzeylerinde belirgin bir varyasyon olduğu görülmektedir. Grup 5 (Mısır Yağı ile işlem görmüş grup) en yüksek ortalama TNF-a düzeyine sahiptir. Bunu Grup 1 (Negatif Kontrol) ve Grup 4 (AOM ve DADS ile işlem görmüş grup) takip etmektedir. Grup 2 (AOM ile işlem görmüş pozitif grup) ve Grup 3 (DADS ile tedavi görmüş grup) ise daha düşük ortalama TNF-a düzeylerine sahip görünmektedir. Bu grafik her bir tedavi grubunun TNF-a düzeylerinin nasıl değiştiğini gözlemlemek için önemli bir araçtır. Ancak ANOVA testi sonuçlarına göre bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).



4. TARTIŞMA

KRK, dünya genelinde kanser kaynaklı ölümlerin önemli bir nedeni olup, erken teşhis ve etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Araştırmanın odaklandığı ana tema, doğal bir bileşen olan diallil disülfidin (DADS) bu hastalık üzerindeki potansiyel terapötik etkileridir.

KRK modellemesi hem genetik hem de çevresel modifikatörlerin KRK üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında değerli bir araç sunmaktadır. AOM modeli DNA hasarının kimyasal indüksiyonu ve ardından tekrarlanan kolitis döngüleri kullanılarak, inflamatuvar kolorektal kanserin modellenmesinde güçlü, tekrarlanabilir ve nispeten ekonomik bir yöntem sağlar. Bu model KRK'nin histopatolojisinin insan KRK'nin histopatolojisiyle önemli ölçüde örtüştüğü ve tümör gelişiminin 10 hafta gibi kısa bir sürede gerçekleşebildiği distal tümörler ve invazif adenokarsinomlar gibi insan KRK'nin kilit yönlerini başarılı bir şekilde temsil etmektedir (Parang ve ark 2016). AOM'un kolon kanseri üzerindeki etkisi, DNA'da mutasyonlara yol açarak ve K-ras, β -catenin ve TGF β gibi çeşitli sinyal yollarını etkileyerek gerçekleşir. Bu mutasyonlar hücre proliferasyonunu, büyümesini ve hayatta kalmasını destekleyen yolların aktivasyonuna yol açar ve sonuç olarak kanser gelişimini tetikler. Bu sinyal yollarının aktivasyonu, AOM modelinin insan sporadik kolon kanseri üzerine yapılan çalışmalarda kullanılmasının temelini oluşturur ve kolon kanserinin moleküler patogenezinin anlaşılmasında önemli bir rol oynar (Chen ve Huang 2009). DADS'ın TNF- α üzerindeki etkileri, AOM modeliyle elde edilen bulgularla birleştirilerek değerlendirilebilir. Sunulan çalışmada AOM kullanılarak kolon kanseri modeli oluşturulmuş ve DADS'ın TNF- α üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu, AOM tarafından indüklenen kolon kanseri modelinin, insan sporadik kolon kanseri üzerine yapılan çalışmalarda nasıl bir rol oynadığını ve DADS gibi bileşenlerin bu model üzerindeki etkilerinin kolon kanseri tedavisindeki potansiyel önemine katkı sunacağı düşünülmektedir.

Al Obeed ve ark (2014) 30 KRK hastasından toplanan arşiv dokuda yaptıkları çalışmada TNF- α mRNA ekspresyonunun, komşu normal kolorektal dokuya göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Kanser hücrelerinde artmış TNF- α gen ekspresyonunun varlığını ve bunun ileri tümör evreleriyle güçlü bir korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada ise DADS'ın TNF- α üzerindeki etkileri ve KRK'deki potansiyel rolü incelenmiştir. TNF- α 'yı bu tip

çalışmalarda kullanmanın KRK tedavisinde önemli bir strateji olabileceği ve TNF- α 'yı modüle edebilecek yeni terapötik ajanların geliştirilmesi için bir temel oluşturabileceği düşünölmektedir.

TNF- α 'nın pro-inflamatuar bir mediatör olarak KRK'nın ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını ortaya koyan başka bir çalışmada TNF- α 'nın serum ve tümör dokusunda bulunan konsantrasyonlarında miR-21 ekspresyonunu artırdığı ve bunun sonucunda KRK hücrelerinin metastatik fenotipinin desteklendiği belirtilmektedir (Alotaibi ve ark 2023).

Shen ve ark (2017)'nin yaptığı çalışmada TNF- α 'nın pro-inflamatuar bir sitokin olarak tümör mikroçevresinde malign tümör ilerlemesine katkıda bulunduğu ve KRK ilerlemesiyle ilişkili miR-105'in ekspresyonunun yükseldiği belirtilmiştir. TNF- α 'nın, KRK hücre hatlarında zaman bağlı olarak miR-105 ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığı ve miR-105'in baskılanmasının TNF- α 'nın agresif etkilerini, NF-kB sinyallemesinin aktivasyonunu ve epitelyal-mezankimal geçişin (EMT) başlatılmasını önleyerek azalttığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise TNF- α 'yı etkileyebilecek potansiyel bir bileşik olan DADS'ın bu süreçteki etkileri araştırılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Bu durumun çalışma süresinin kısa oluşu ile ilgili olduğu düşünölmektedir.

TNF- α -308 G>A polimorfizminin, özellikle Avrupalı ve Asyalı popölyasyonlarda IBD riskini artırdığı, ancak KRK riski üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı sonucuna varılmış, bu durumda TNF- α 'nın IBD'nin gelişiminde önemli bir rol oynadığını, ancak KRK ile doğrudan bir ilişkisinin olmayabileceğini düşünörmektedir (Fan ve ark 2011).

Altonsy ve ark (2013) yaptıkları çalışmada, Caco-2 hücrelerinin, membranlarında FAS reseptörü eksikliği nedeniyle TNF- α aracılı apoptozu başlatan faktörlere dirençli olduğunu, ancak DADS tedavisinin bu hücrelerde membran FAS ekspresyonunu hem protein hem de mRNA seviyesinde artırarak, Caco-2 hücrelerinin TNF- α 'ya duyarlılığını yeniden kazandırdığını gözlemlemişlerdir. DADS tedavisinin, Caco-2 hücrelerinde TNF- α 'nın neden olduğu apoptozu başlatmak için gereken ekstrasellöler sinyalleri sağlayarak hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptoz yollarını güçlendirdiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da KRK modelinde DADS'ın TNF- α üzerindeki etkileri incelenmiş ve etkinin anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak grafiksel analizler DADS'ın TNF- α ile ilişkili

yollar üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. DADS'ın TNF- α aracılı apoptotik mekanizmalar üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu durumun daha kesin veriler ile doğrulanabilmesi için oluşturulan kanser modelinde etken maddenin daha fazla grup ve daha uzun sürelerde denenmesi ile anlaşılabilmesi düşünülmektedir.

Sülfid bileşiklerinden DAS'nin TNF- α veya histaminle uyarılmış rat aortik düz kas A7r5 hücrelerindeki etkilerinin ve moleküler mekanizmasının incelendiği bir çalışmada (Ho ve ark 2014) TNF- α tedavisi sonrası, A7r5 hücrelerinde p65 proteininin (NF- κ B'nin bir alt birimi) nükleer seviyelerinin arttığı ve DAS ön muamelesinin bu artışı önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da DADS'ın TNF- α üzerindeki etkileri ve kolon kanseri modelindeki potansiyel etkilerini incelenmiş ve DADS uygulanan kanserli grupta TNF- α seviyelerindeki düşüş istatistik olarak anlamsız bulunsada grafiksel olarak doğrulanmıştır. Bu durum sülfid bileşiklerinin (DAS ve DADS) inflamatuvar mediatörler (TNF- α , histamin) üzerinde modüle edici etkilerinin doğrulanması açısından önem arz etmektedir.

Doymamış yağ asitlerinin (PUFA), özellikle de balık yağının, lipopolisakkaritler (LPS) tarafından indüklenen karaciğer hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu öne sürülmektedir. Balık yağı ile zenginleştirilmiş diyetin karaciğer morfolojisini iyileştirdiği ve TNF- α , IL-1 β ve IL-6 üretimini azalttığı bildirilmektedir (Zhang ve ark 2019). Sunulan çalışmada da mısır yağı verilen grup incelendiğinde sonuçlar istatistik olarak anlamsız ($p > 0.05$) bulunmuştur. Ancak grafik düzeyinde bakıldığında gruplar arası varyasyon dikkati çekmektedir. AOM uygulanan kanserli grupta TNF- α düzeyleri en yüksek düzeyde, mısır yağı verilen grupta ise TNF- α düzeyleri ikinci sırada gözlemlenmiştir. Sonuçlar istatistik olarak anlamlı olmadığından bu durum hakkında kesin bir ifade kullanılamamaktadır. Ancak grafiksel varyasyondan hareketle daha ileri analizler yapılmasının konu ile ilgili daha net sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Sunulan çalışma genel olarak değerlendirildiğinde DADS'ın kanser modellerinde uygulandığı diğer çalışmalara benzer sonuçlar vermektedir. İstatistiksel analizler anlamsız ($p > 0.05$) bulunmuştur. Bu durum DADS'ın KRK üzerindeki etkisinin sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak grafiksel varyasyon diğer çalışmalara benzerlik göstermektedir. DADS'ın KRK tedavisinde uygulanabilirliği için daha fazla parametre ile test edilmesi daha fazla yol gösterici olacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan kolon kanseri modelinde diallil disülfidin (DADS) TNF- α üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışma, beş farklı grupta gerçekleştirilmiş olup, bu gruplar negatif kontrol, AOM ile işlem görmüş pozitif grup, DADS ile tedavi görmüş grup, AOM ve DADS ile işlem görmüş grup ve mısır yağı ile işlem görmüş grup olarak tanımlanmıştır.

Analiz sonuçlarına göre, gruplar arasında TNF- α düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Ancak bu durum DADS'in TNF- α düzeyleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı anlamına gelmemektedir. Çalışmanın sınırlılıklarının sonuçlar üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Şekillerde ve tablolarda gösterilen verilere dayanarak, DADS tedavisi altındaki gruplarda TNF- α düzeylerinde belirgin değişiklik gözlemlenmiştir. Bu durum, DADS'in TNF- α üzerindeki etkisinin daha geniş parametreler ve daha geniş bir örneklem seti ile değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Özellikle farklı dozajlar, uygulama süreleri ve koşulları altında yapılacak denemeler, bu bileşenin potansiyel terapötik etkilerini daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Al-Badran SS, Grant L, Campo MV, Inthagard J, Pennel K, Quinn J, Konanahalli P, Hayman L, Horgan PG, McMillan DC, Roxburgh CS, Roseweir A, Park JH, Edwards J, 2021. Relationship between immune checkpoint proteins, tumour microenvironment characteristics, and prognosis in primary operable colorectal cancer. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 7, 2, 121-34.
- Al Obeed OA, Alkhayal KA, Al Sheikh A, Zubaidi AM, Vaali-Mohammed MA, Boushey R, McKerrow JH, Abdulla MH, 2014. Increased expression of tumor necrosis factor- α is associated with advanced colorectal cancer stages. *World J Gastroenterol*, 20, 48, 18390-6.
- Alotaibi AG, Li JV, Gooderham NJ, 2023. Tumour Necrosis Factor-Alpha (TNF- α)-Induced Metastatic Phenotype in Colorectal Cancer Epithelial Cells: Mechanistic Support for the Role of MicroRNA-21. *Cancers*, 15, 3, 627.
- Altonsy MO, Madkour HI, Yousef RS, Andrews SC, 2013. Diallyl disulfide, from garlic oil, synthesizes human colonic adenocarcinoma cell line (Caco-2) to TNF-alpha-mediated apoptosis through up-regulation of membrane FAS levels. *J Am Sci*, 9, 3, 173-80.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y, 2001. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *The Journal of Nutrition*, 131, 3, 955S-62S.
- Arif AA, Chahal D, Ladua GK, Bhang E, Salh B, Rosenfeld G, Loree JM, Donnellan F, 2021. Hereditary and Inflammatory Bowel Disease-Related Early Onset Colorectal Cancer Have Unique Characteristics and Clinical Course Compared with Sporadic Disease. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 30, 10, 1785-91.
- Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, Robinson SC, Thompson RG, Balkwill FR, 2004. Expression of both TNF- α receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene*, 23, 10, 1902-10.
- Arvelo F, Sojo F, Cotte C, 2015. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*, 9, 520.
- Attarabeen OF, Sambamoorthi U, Larkin KT, Kelly KM, 2018. Colon Cancer Worry in Appalachia. *J Community Health*, 43, 1, 79-88.
- Bai A-P, Ouyang Q, Hu R-W, 2005. Diallyl Trisulfide Inhibits Tumor Necrosis Factor- α Expression in Inflamed Mucosa of Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 50, 8, 1426-31.
- Berry M, Brightling C, Pavord I, Wardlaw AJ, 2007. TNF- α in asthma. *Current Opinion in Pharmacology*, 7, 3, 279-82.
- Biller LH, Syngal S, Yurgelun MB, 2019. Recent advances in Lynch syndrome. *Fam Cancer*, 18, 2, 211-9.
- Bissahoyo A, Pearsall RS, Hanlon K, Amann V, Hicks D, Godfrey VL, Threadgill DW, 2005. Azoxymethane Is a Genetic Background-Dependent Colorectal Tumor Initiator and Promoter in Mice: Effects of Dose, Route, and Diet. *Toxicological Sciences*, 88, 2, 340-5.
- Bosman FT, Yan P, 2014. Review paperMolecular pathology of colorectal cancer. *Polish Journal of Pathology*, 65, 4, 257-66.
- Calvert PM, Frucht H, 2002. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*, 137, 7, 603-12.
- Cawthorn WP, Sethi JK, 2008. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Letters*, 582, 1, 117-31.
- Chen J, Huang XF, 2009. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biol Ther*, 8, 14, 1313-7.
- Cho YA, Lee J, Oh JH, Chang HJ, Sohn DK, Shin A, Kim J, 2019. Genetic Risk Score, Combined Lifestyle Factors and Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Res Treat*, 51, 3, 1033-40.
- Chottanapund S, Chamroonsawasdi K, Tunyasitthisundhorn P, Aekplakorn W, Silpasuwan P, Anantachoti P, Rojroongwasinkul N, Damapong S, Sornpaisarn B, Rojanapithayakorn W, Ungchusak K, 2021. Modifiable Factors and Colon Cancer Risk in Thai Population. *Asian Pac J Cancer Prev*, 22, 1, 37-43.
- De Simone V, Franzè E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini MC, Di Fusco D, Sica GS, Sileri P, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G, Stolfi C, 2015. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, 34, 27, 3493-503.
- Dong M, Yang G, Liu H, Liu X, Lin S, Sun D, Wang Y, 2014. Aged black garlic extract inhibits HT29 colon cancer cell growth via the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomed Rep*, 2, 2, 250-4.
- Fan W, Maoqing W, Wangyang C, Fulan H, Dandan L, Jiaojiao R, Xinshu D, Binbin C, Yashuang Z, 2011. Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor- α -308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis. *European Journal of Human Genetics*, 19, 4, 432-7.

- Francavilla A, Turoczi S, Tarallo S, Vodicka P, Pardini B, Naccarati A, 2019. Exosomal microRNAs and other non-coding RNAs as colorectal cancer biomarkers: a review. *Mutagenesis*, 35, 3, 243-60.
- Gao R, Gao Z, Huang L, Qin H, 2017. Gut microbiota and colorectal cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 36, 5, 757-69.
- Gong Q, Song C, Wang X, Wang R, Cai G, Liang X, Liu J, 2020. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with recombinant mutant human TNF- α and raltitrexed in mice with colorectal-peritoneal carcinomatosis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245, 6, 542-51.
- Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, Barrera-Mera B, Herrera Enríquez M, Uriarte-Ruíz K, Ceballos-Villalba JC, Estrada-Mata AG, Alvarado Rodríguez C, Arauz-Peña G, 2017. Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci*, 5, 11, 4667.
- Hansen IO, Jess P, 2012. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Dan Med J*, 59, 6, A4444.
- Hasan HF, Abdel-Hamid GR, Ebrahim SI, 2020. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Diallyl Disulfide on Hepatotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats. *Natural Product Communications*, 15, 10, 1934578X20969083.
- He H, Ma Y, Huang H, Huang C, Chen Z, Chen D, Gu Y, Wang X, Chen J, 2021. A comprehensive understanding about the pharmacological effect of diallyl disulfide other than its anti-carcinogenic activities. *European Journal of Pharmacology*, 893, 173803.
- Ho C-Y, Weng C-J, Jhang J-J, Cheng Y-T, Huang S-M, Yen G-C, 2014. Diallyl sulfide as a potential dietary agent to reduce TNF- α - and histamine-induced proinflammatory responses in A7r5 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58, 5, 1069-78.
- Hsieh P, 2001. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutation Research/DNA Repair*, 486, 2, 71-87.
- Idriss HT, Naismith JH, 2000. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, 50, 3, 184-95.
- Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C, 2023. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Kaunas)*, 59, 9.
- Jin ZY, Wu M, Han RQ, Zhang XF, Wang XS, Liu AM, Zhou JY, Lu QY, Zhang ZF, Zhao JK, 2013. Raw garlic consumption as a protective factor for lung cancer, a population-based case-control study in a Chinese population. *Cancer Prev Res (Phila)*, 6, 7, 711-8.
- Kheirelseid EAH, Miller N, Kerin MJ, 2013. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology*, Vol.03No.02, 9.
- Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N, Sung MK, 2015. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol*, 21, 17, 5167-75.
- Kimura S, Tung YC, Pan MH, Su NW, Lai YJ, Cheng KC, 2017. Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application. *J Food Drug Anal*, 25, 1, 62-70.
- Ko JW, Jeong SH, Kwon HJ, Shin NR, Seo YS, Kim JC, Shin IS, Kim JS, 2018. Preventive Effect of Garlic Oil and Its Organosulfur Component Diallyl-Disulfide on Cigarette Smoke-Induced Airway Inflammation in Mice. *Nutrients*, 10, 11.
- Krasteva N, Georgieva M, 2022. Promising Therapeutic Strategies for Colorectal Cancer Treatment Based on Nanomaterials. *Pharmaceutics*, 14, 6.
- Kraus S, Arber N, 2009. Inflammation and colorectal cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 4, 405-10.
- Kudryavtseva AV, Lipatova AV, Zaretsky AR, Moskalev AA, Fedorova MS, Rasskazova AS, Shibukhova GA, Snezhkina AV, Kaprin AD, Alekseev BY, Dmitriev AA, Krasnov GS, 2016. Important molecular genetic markers of colorectal cancer. *Oncotarget*, 7, 33, 53959-83.
- Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, van de Velde CJ, Watanabe T, 2015. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15065.
- Lai C-S, Wu J-C, Yu S-F, Badmaev V, Nagabhushanam K, Ho C-T, Pan M-H, 2011. Tetrahydrocurcumin is more effective than curcumin in preventing azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 12, 1819-28.
- Lannagan TR, Jackstadt R, Leedham SJ, Sansom OJ, 2021. Advances in colon cancer research: in vitro and animal models. *Curr Opin Genet Dev*, 66, 50-6.
- Lee IC, Baek HS, Kim SH, Moon C, Park SH, Kim SH, Shin IS, Park SC, Kim JC, 2014. Effect of diallyl disulfide on acute gastric mucosal damage induced by alcohol in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 34, 3, 227-39.
- Machado VF, Parra RS, Leite CA, Minto SB, Cunha TM, Cunha FQ, Garcia SB, Feitosa MR, da Rocha JJR, Feres O, 2020. Experimental Model of Rectal Carcinogenesis Induced by N-

- Methyl-N-Nitrosoguanidine in Mice with Endoscopic Evaluation. *Int J Med Sci*, 17, 16, 2505-10.
- Mardis ER, 2012. Genome sequencing and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 22, 3, 245-50.
- Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JKV, 2002. Focus on colon cancer. *Cancer Cell*, 1, 3, 233-6.
- Michielsen AJ, Hogan AE, Marry J, Tosetto M, Cox F, Hyland JM, Sheahan KD, O'Donoghue DP, Mulcahy HE, Ryan EJ, O'Sullivan JN, 2011. Tumour Tissue Microenvironment Can Inhibit Dendritic Cell Maturation in Colorectal Cancer. *PLOS ONE*, 6, 11, e27944.
- Mitra S, Das R, Emran TB, Labib RK, Noor ET, Islam F, Sharma R, Ahmad I, Nainu F, Chidambaram K, Alhumaydhi FA, Chandran D, Capasso R, Wilairatana P, 2022. Diallyl Disulfide: A Bioactive Garlic Compound with Anticancer Potential. *Front Pharmacol*, 13, 943967.
- Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, 2012. An overview of colorectal cancer survival rates and prognosis in Asia. *World J Gastrointest Oncol*, 4, 4, 71-5.
- Muller AWJ, 2017. Cancer is an adaptation that selects in animals against energy dissipation. *Medical Hypotheses*, 104, 104-15.
- Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ, 2016. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 469, 2, 125-34.
- Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y, 2014. Mesenchymal Stem Cells Cancel Azoxymethane-Induced Tumor Initiation. *Stem Cells*, 32, 4, 913-25.
- O'Toole A, Michielsen AJ, Nolan B, Tosetto M, Sheahan K, Mulcahy HE, Winter DC, Hyland JM, O'Connell PR, Fennelly D, O'Donoghue D, O'Sullivan J, Doherty GA, Ryan EJ, 2014. Tumour microenvironment of both early- and late-stage colorectal cancer is equally immunosuppressive. *British Journal of Cancer*, 111, 5, 927-32.
- Pan Z, Lin H, Fu Y, Zeng F, Gu F, Niu G, Fang J, Gu B, 2023. Identification of gene signatures associated with ulcerative colitis and the association with immune infiltrates in colon cancer. *Front Immunol*, 14, 1086898.
- Parang B, Barrett CW, Williams CS, 2016. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol*, 1422, 297-307.
- Pellat A, Netter J, Perkins G, Cohen R, Coulet F, Parc Y, Svrcek M, Duval A, André T, 2019. Syndrome de Lynch : quoi de neuf ? *Bulletin du Cancer*, 106, 7, 647-55.
- Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, Mukaida N, 2008. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 2, 560-70.
- Pourhoseingholi MA, 2012. Increased burden of colorectal cancer in Asia. *World J Gastrointest Oncol*, 4, 4, 68-70.
- Reardon JT, Sancar A, 2005. Nucleotide Excision Repair. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Eds: Academic Press, p. 183-235.
- Reddy BS, 2004. Studies with the azoxymethane-rat preclinical model for assessing colon tumor development and chemoprevention. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 1, 26-35.
- Reddy BS, Narisawa T, Wright P, Vukusich D, Weisburger JH, Wynder EL, 1975. Colon Carcinogenesis with Azoxymethane and Dimethylhydrazine in Germ-free Rats¹. *Cancer Research*, 35, 2, 287-90.
- Ricciardiello L, Ahnen DJ, Lynch PM, 2016. Chemoprevention of hereditary colon cancers: time for new strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13, 6, 352-61.
- Rouf R, Uddin SJ, Sarker DK, Islam MT, Ali ES, Shilpi JA, Nahar L, Tiralongo E, Sarker SD, 2020. Antiviral potential of garlic (*Allium sativum*) and its organosulfur compounds: A systematic update of pre-clinical and clinical data. *Trends Food Sci Technol*, 104, 219-34.
- Roy PS, Saikia BJ, 2016. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 53, 3.
- Sameer AS, 2013. Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. *Front Oncol*, 3, 114.
- Sancar A, 1996. DNA EXCISION REPAIR. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 1, 43-81.
- Schmitt M, Greten FR, 2021. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*, 21, 10, 653-67.
- Schottelius AJG, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards III CK, 2004. Biology of tumor necrosis factor- α – implications for psoriasis. *Experimental Dermatology*, 13, 4, 193-222.
- Shah SC, Itzkowitz SH, 2022. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology*, 162, 3, 715-30.e3.

- Shang A, Cao SY, Xu XY, Gan RY, Tang GY, Corke H, Mavumengwana V, Li HB, 2019. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*, 8, 7.
- Shen Z, Zhou R, Liu C, Wang Y, Zhan W, Shao Z, Liu J, Zhang F, Xu L, Zhou X, Qi L, Bo F, Ding Y, Zhao L, 2017. MicroRNA-105 is involved in TNF- α -related tumor microenvironment enhanced colorectal cancer progression. *Cell Death & Disease*, 8, 12, 3213.
- Song X, Yue Z, Nie L, Zhao P, Zhu K, Wang Q, 2021. Biological Functions of Diallyl Disulfide, a Garlic-Derived Natural Organic Sulfur Compound. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 5103626.
- Taketo MM, Edelmann W, 2009. Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology*, 136, 3, 780-98.
- van Horssen R, ten Hagen TLM, Eggermont AMM, 2006. TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The Oncologist*, 11, 4, 397-408.
- van Loo G, Bertrand MJM, 2023. Death by TNF: a road to inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 23, 5, 289-303.
- van Wyk HC, Park JH, Edwards J, Horgan PG, McMillan DC, Going JJ, 2016. The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 115, 2, 156-63.
- Venning F, Claesson M, Kissow H, 2013. The carcinogenic agent azoxymethane (AOM) enhances early inflammation-induced colon crypt pathology. *J Cancer Sci Ther*, 5, 11, 377-83.
- Wajant H, 2009. The Role of TNF in Cancer. In: *Death Receptors and Cognate Ligands in Cancer*. Eds: Kalthoff H. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 1-15.
- Wang J, Song Y-X, Ma B, Wang J-J, Sun J-X, Chen X-W, Zhao J-H, Yang Y-C, Wang Z-N, 2015. Regulatory Roles of Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 8, 19886-919.
- Wang X, Jiao F, Wang Q-W, Wang J, Yang K, Hu R-R, Liu H-C, Wang H-Y, Wang Y-S, 2012. Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Med Rep*, 5, 1, 66-72.
- Wang X, Lin Y, 2008. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin*, 29, 11, 1275-88.
- Xu H, Liu T, Li J, Chen F, Xu J, Hu L, Jiang L, Xiang Z, Wang X, Sheng J, 2022. Roburic Acid Targets TNF to Inhibit the NF- κ B Signaling Pathway and Suppress Human Colorectal Cancer Cell Growth. *Front Immunol*, 13, 853165.
- Yao A-J, Chen J-H, Xu Y, Zhang Z-W, Zou Z-Q, Yang H-T, Hua Q-H, Zhao J-S, Kang J-X, Zhang X-H, 2018. Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids prevent azoxymethane-induced colon tumorigenesis in mice fed a high-fat diet. *Journal of Functional Foods*, 48, 439-47.
- Yoshimi K, Hashimoto T, Niwa Y, Hata K, Serikawa T, Tanaka T, Kuramoto T, 2012. Use of a chemically induced-colon carcinogenesis-prone Apc-mutant rat in a chemotherapeutic bioassay. *BMC Cancer*, 12, 448.
- Yurgelun MB, Hampel H, 2018. Recent Advances in Lynch Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Cancer Prevention. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38, 101-9.
- Zhang H, Shang C, Tian Z, Amin HK, Kassab RB, Abdel Moneim AE, Zhang Y, 2020. Diallyl Disulfide Suppresses Inflammatory and Oxidative Machineries following Carrageenan Injection-Induced Paw Edema in Mice. *Mediators of Inflammation*, 2020, 8508906.
- Zhang J, Xu X, Zhu H, Wang Y, Hou Y, Liu Y, 2019. Dietary fish oil supplementation alters liver gene expressions to protect against LPS-induced liver injury in weanling piglets. *Innate Immunity*, 25, 60-72.
- Zidi I, Mestiri S, Bartegi A, Amor NB, 2010. TNF- α and its inhibitors in cancer. *Medical Oncology*, 27, 2, 185-98.

7. EKLER

EK A: Turnitin Raporu

Deneyisel Oluşturulan Kolon Kanseri Modelinde Diallil Disülfid'in TNF-a Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

ORJİNALLİK RAPORU

%3 BENZERLİK ENDEKSİ	%3 İNTERNET KAYNAKLARI	%1 YAYINLAR	%1 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
2	webadmin.selcuk.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	avesis.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<%1
6	www.researchsquare.com İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Yildirim Beyazit Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
8	acikerisim.selcuk.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1