

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CAPPARIS OVATA'NİN ANTİKANSEROJEN VE ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN KOLON VE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA
ARAŞTIRILMASI

Selma ÇETİNKAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

ARALIK-2021
KARS



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



***CAPPARIS OVATA*'NİN ANTİKANSEROJEN VE ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN KOLON VE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA
ARAŞTIRILMASI**

**Selma ÇETİNKAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özkan ÖZDEN**

Aralık-2021

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Selma ÇETİNKAYA'nın Doç. Dr. Özkan ÖZDEN danışmanlığında Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “Capparis ovata'nın antikanserojen ve antioksidan özelliklerinin kolon ve meme kanser hücre hatlarında araştırılması” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarında değerlendirilerek oy ile kabul edilmiştir.

.../.../20...

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan : Doç. Dr. Can Ali AĞCA

Üye : Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Pınar Aksu KILIÇLE

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .. / .. / 20.. gün ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fikret AKDENİZ

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

Selma ÇETİNKAYA

29/12/2021

ÖZET

(Yüksek Lisans Tezi)

***CAPPARIS OVATA*'NIN ANTİKANSEROJEN VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN KOLON VE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI**

Selma ÇETİNKAYA

Kafkas Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

Metabolik yollarda yer alan birçok mitokondriyal enzimin aktivitesini deasetilasyonla düzenleyen sirtuin 3; yaşlanma ve reaktif oksijen türlerinin üretimi gibi fizyolojik olaylarla ilişkili olması nedeniyle kanser tedavisinde potansiyel bir hedef olarak görülmektedir. *Capparis ovata*, tüm kıtaların doğal florasında kendiliğinden yetişmekte olan tropik/subtropik kökenli bir bitkidir. Anti-kanser özelliklere sahip olabileceğiyle ilgili çalışmalar bu bitkiyi son yıllarda ön plana çıkarmakla birlikte, *C. ovata*'nın kanser hücrelerindeki mekanizmalarıyla ilgili bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, DLD-1 kolon ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatlarında *C. ovata* ekstraktının sirtuin 3 ve piruvat dehidrogenaz ekspresyonları üzerindeki etkileri, COLO-205 kolon kanser hücrelerinde koloni formasyonu üzerine etkileri, ve HCT116 kolon kanser hücrelerinde DNA kırık oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde etmiş olduğumuz verilere göre, *C. ovata* metanol ekstraktı uygulanan DLD-1 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında, ekstrat verilmeyen kontrol grubu hücreleriyle kıyaslandığında, hücrelerin canlılık seviyelerinde anlamlı bir düşüşe sebep olduğu görülmüştür. DLD-1 hücrelerine 100 µg/mL'lik konsantrasyonda ekstrakt uygulandığında, hücre canlılığı kontrol hücrelere göre yaklaşık %20 oranında, aynı şekilde MDA-MB-231 hücrelerinin 500µg/mL'lik konsantrasyonlarında ise kontrol hücrelere kıyasla yaklaşık %24 oranında azalma olduğu gözlemlenmiştir. *C. ovata*

ekstraktının 500 µg/mL’lik konsantrasyonunun COLO-205 hücrelerinde koloni koloni oluşturma potansiyelini önemli ölçüde azalttığı da tespit edilmiştir. Western blot sonuçlarına göre, DLD-1 hücrelerinde PDH proteininin ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 100 ug/ml konsantrasyonunda arttığı, MDA-MB-231 hücrelerinde ise PDH ekspresyonunun 500 ug/ml konsantrasyonunda arttığı gözlemlenmiştir. İmmunofloresan boyama sonucunda ise HCT116 hücrelerinde 500µg/mL’lik konsantrasyonunda, *C. ovata* uygulanmasının DNA çift zincir kırıkları aracılığıyla DNA hasarına yol açtığı belirlenmiştir.

C. ovata kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etki göstererek, kolon ve meme kanseri hücreleri üzerinde anti-kanser özellik sergilemiştir. Bütün bu veriler, *C. ovata*’nın kanser tedavisi için umut vaat eden doğal bir ilaç kaynağı olarak düşünülebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Sirtuin, Kanser, *C. ovata*

ABSTRACT

(M. Sc. Thesis)

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCEROGEN AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *CAPPARIS OVATA* IN COLON AND BREAST CANCER CELL LINES

Selma CETİNKAYA

Kafkas University
Faculty of Science and Literature
Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. Ozkan OZDEN

Sirtuin 3, which regulates the activity of many mitochondrial enzymes in metabolic pathways by deacetylation, is seen as a potential target in cancer treatment because it is associated with various physiological events, such as aging and production of reactive oxygen species. *Capparis ovata* is a plant of tropical/subtropical origin that grows spontaneously in the natural flora of all continents. Although studies on its anti-cancer properties have brought this herb to the fore in recent years, our knowledge about the mechanisms of *C. ovata* in cancer cells is quite limited. In this study, the effects of *C. ovata* extract on sirtuin 3 and pyruvate dehydrogenase expressions in DLD-1 colon and MDA-MB-231 breast cancer cell lines, its effects on colony formation in COLO-205 colon cancer cells, and DNA break formation in HCT116 colon cancer cellshas been investigated. According to the data we obtained, it was observed that there was a significant decrease in the viability levels of the cells in DLD-1 and MDA-MB-231 cell lines, which were treated with *C. ovata* methanol extract, when compared to the control group cells that did not receive the extract. When the extract was applied to DLD-1 cells at a concentration of 100 µg/mL, it was observed that cell viability decreased by about 20% compared to control cells.

Similarly, at 500µg/mL concentration, there was a decrease of about 24% in MDA-MB-231 cells compared to control cells. It was also determined that the concentration of 500 µg/mL of *C. ovata* extract significantly reduced the colony-forming potential in COLO-205 cells. According to our Western blotting results, it was observed that the expression of PDH protein in DLD-1 cells increased at a concentration of 100 µg/ml compared to the control group, while the expression of PDH increased at a concentration of 500 µg/ml in MDA-MB-231 cells. As a result of immunofluorescence staining, it was determined that the application of *C. ovata* at a concentration of 500µg/mL in HCT116 cells caused DNA damage through DNA double strand breaks. *C. ovata* showed antiproliferative effect against cancer cells and exhibited anti-cancer properties on colon and breast cancer cells. All these data show that *C. ovata* can be considered as a promising natural drug source for cancer treatment.

Key words: Sirtuin, Cancer, *C. ovata*

ÖNSÖZ

2021 Mayıs'ında kaybettiğim,
özlemle andığım babaannem Leyla ÇETİNKAYA'nın anısına...

Öğrencisi olduğum için her zaman onur duyacağım; hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Özkan ÖZDEN'e, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca değerli tecrübeleriyle bana kattıkları değerler için her daim minnettarım.

Bilgilerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Pınar AKSU KILIÇLE'ye, tezimin her aşamasında büyük emekleri olan, hakkını asla ödeyemeyeceğimi bildiğim kıymetli hocam Dr. Barış YILDIZ'a, hayata dair bana çok şey öğreten, ilgi ve yardımlarını eksik etmeyen değerli hocalarım Dr. Öğrencisi Pelin TOKALI ve Dr. Öğrencisi Tarık MECİT'e, tüm laboratuvar çalışmalarım sırasında benim kadar emek veren, yoğun mesai arkadaşım Ramazan DEMİREL'e, destekleriyle beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım Meryem İÇEN ve İlknur BOZYEL'e, en zor zamanlarımda güç veren dostum Tansu GENÇ'e, ve elbette ki; her zaman yanımda olan sevgili aileme; tüm kalbimle teşekkür eder, sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Selma ÇETİNKAYA

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	IV
ABSTRACT	VI
ÖNSÖZ.....	VIII
İÇİNDEKİLER	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Kanser	5
1.2.1. Kolon Kanseri	10
1.2.2. Kolon Kanseri Moleküler Mekanizması	12
1.2.3. Meme Kanseri	16
1.2.4. Meme Kanseri Moleküler Mekanizması	17
1.2.5. Kanser Tedavi Yöntemleri	19
1.3. <i>Capparis ovata</i>	19
1.3.1. <i>Capparis</i> Türlerinde Görülen Önemli Bazı Biyolojik Aktiviteler	24
1.4. Sirtuin Proteinleri	26
1.4.1. Sirtuin Ailesinin Üyeleri	29
1.4.2. SIRT3	32
1.4.3. SIRT3'ün Kanserdeki Rolü.....	37
2. MATERYAL ve METOT	42
2.1. Materyal	42
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	42
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Saf Malzemeler ve Kimyasallar	42

2.2. Metot	43
2.2.1. <i>C. ovata</i> Ekstraktının Hazırlanması	43
2.2.1.1. <i>C. ovata</i> Ekstraktının Uygulanması	44
2.2.2. Hücre Kültür Çalışmaları	44
2.2.2.1. Hücre Hattının Çözülmesi	45
2.2.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması	45
2.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	45
2.2.2.4. Hücrelerin Toplanması.....	45
2.2.2.5. Hücrelerin Dondurulması.....	46
2.2.3. Hücre Canlılığı ve Sayımı	46
2.2.4. Protein Konsantrasyonu Tayini.....	47
2.2.5. Western Blot analizi.....	48
2.2.5.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	49
2.2.5.2. Protein Örneklerinin Western Blotlama için Hazırlanması	49
2.2.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	49
2.2.5.4. Membrana Transfer ve Bloklama.....	50
2.2.5.5. Birincil ve İkincil Antikor ile İnkübasyon	52
2.2.5.6. Bantların Görüntülenmesi ve Analizi.....	52
2.2.6. Koloni Formasyon Deneyi	52
2.2.7. İmmüno Floresan Analizi.....	52
2.2.8. İstatiksel analiz.....	53
3. BULGULAR.....	55
3.1. <i>C. ovata</i> 'nın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	55
3.2. Western Blot Analiz Bulguları.....	57
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	62
5. KAYNAKLAR	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Hücrenin kontrolsüz çoğalması	5
Şekil 1.2: Hanahan ve Weinberg'a göre kanserin on temel özelliği.....	8
Şekil 1.3: GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında dünyada her iki cinsiyette toplam yeni kanser ve ölüm vakaları.....	9
Şekil 1.4: Türkiye'nin özet kanser istatistiği	9
Şekil 1.5: GLOBOCAN verilerine göre hazırlanmış, 2040 yılına kadar dünyada beklenen kanser insidansları	10
Şekil 1.6: Kolonun bölümleri	13
Şekil 1.7: Adenoma-karsinoma sekansı.....	13
Şekil 1.8: Kolonik adenoma-karsinoma yolağı	15
Şekil 1.9: Meme kanseri risk faktörleri	16
Şekil 1.10: Meme yapısı, LCIS ve DCIS oluşumu.....	18
Şekil 1.11: <i>Capparis</i> taksonlarının ülkemizde varyete dağılımları	21
Şekil 1.12: <i>C. ovata</i> bitkisi.	21
Şekil 1.13: <i>Capparis</i> türlerinin dünya üzerinde yayıldığı bölgelerin haritası	22
Şekil 1.14: Sirtuinlerin enzimatik aktivitesi	28
Şekil 1.15: SIRT1 fonksiyonları	30
Şekil 1.16: SIRT3 yapısı.....	33
Şekil 1.17: SIRT3'ün etki ettiği mitokondriyal fonksiyonun anahtar yönleri	34
Şekil 1.18: SIRT3 aracılı SOD2 aktivasyonu	35
Şekil 1.19: SIRT3 asetilasyonu ve MnSOD detoksifikasyon enzimatik aktivitesinin düzenlenmesi.....	37
Şekil 1.20: SIRT3, kanserde onkojenik veya tümör baskılayıcı bir role sahiptir	39
Şekil 2.1: BioTek ELx800 TM Microplate Reader plaka okuyucu	46
Şekil 2.2: Thermo Scientific TM µDrop TM Duo Plakasında protein konsantrasyon ölçümü.....	48
Şekil 2.3: Western blot deney adımları.....	48
Şekil 2.4: Semi-Dry (Yarı-kuru) transfer düzeneği	51
Şekil 2.5: Elektroforez düzeneği.....	51
Şekil 3.1: 100, 500 ve 1000 µg/mL dozlarında <i>C. ovata</i> metanol ekstraktına maruz bırakılan DLD1 kolon kanser hücrelerinin 36 saat sonunda hücre sağ kalım değerleri.....	55

Şekil 3.2: 100, 500 ve 1000µg/mL dozlarında <i>C. ovata</i> metanol ekstraktına maruz bırakılan MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin 36 saat sonunda hücre sağ kalım değerleri	56
Şekil 3.3: Farklı <i>C. ovata</i> konsantrasyonlarının DLD-1 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki 36 saatteki morfolojileri	57
Şekil 3.4: DLD-1 hücre hattında SIRT3,PDH ve LDHA proteinlerine ait Western Blot bantları.....	58
Şekil 3.5: MDA-MB-231 hücre hattında SIRT3,PDH ve LDHA proteinlerine ait Western Blot bantları	59
Şekil 3.6: Colo-205 hücrelerinde koloni sayısı analiz sonuçları	59
Şekil 3.7: Colo-205 hücrelerine <i>C. ovata</i> ekstraktı uygulanması sonrası analiz görüntüleri... ..	60
Şekil 3.8: HCT116 kolon kanseri hücrelerinin 48 boyunca 500µg/mL <i>C. ovata</i> metanol ekstraktına maruz bırakılması sonucu oluşan DNA kırıklarının kontrol grubu ile kıyaslanması	61
Şekil 3.9: HCT116 kolon kanseri hücrelerinin 48 boyunca 500µg/mL <i>C. ovata</i> metanol ekstraktına maruz bırakılması sonucu oluşan DNA kırıklarının phospho-histone γH2AX DSB markeri ile belirlenmesi	61

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1.1: Bazı kanser tipleri ve onkogenler tarafından kodlanan proteinler.....	6
Tablo 1.2: Tümör baskılayıcı genler.	7
Tablo 1.3: Kolorektal kanser oluşumunda risk faktörleri	11
Tablo 1.4: Meme kanseri oluşumunda risk faktörleri	17
Tablo 1.5: <i>C. spinosa</i> ve <i>C. ovata</i> bitki türlerinin temel içerikleri	23
Tablo 1.6: <i>C. spinosa</i> ve <i>C. ovata</i> bitki türlerinin yapısında yer alan fitokimyasallar.....	24
Tablo 1.7: Sirtuinler: lokalizasyonu ve fonksiyonları.....	29
Tablo 1.8: Farklı kanserlerde SIRT3'ün işlevi.....	40
Tablo 2.1: DLD-1 ve MDA-MB-231 hücre hatları için tasarlanan deney grup planı.....	44

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Derece santigrat
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
AceCS2	: Asetil-CoA sentetaz 2
ADP	: Adenosine diphosphate
AMPK	: 5'-adenozin monofosfat ile aktive edilmiş protein kinaz
APC	: Adenomatosis poliposis coli
ATP	: Adenosine triphosphate
BAX	: Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	: B-Hücre lösemi 2
BRCA1	: Meme kanseri yatkınlık geni
BRCA2	: Meme kanseri yatkınlık geni
CO ₂	: Karbondioksit
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DCC	: Kolorektal kanserde silinen bölge
dH ₂ O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal geçiş
ETS	: Elektron transfer sistemi
FAB	: Ailesel adenomatöz polip
FOXO	: ForkHead/Winged Helix Box Class O
HNPCC	: Kalıtsal nonpoliposis kolorektal kanser
HIF1α	: Hipoksi-indüklenebilir faktör 1α
KRK	: Kolorektal kanser
LCAD	: Uzun zincirli asetil CoA dehidrogenaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MnSOD	: Manganez süperoksit dismutaz
Myc	: Miyelositomozis proto-onkogeni
NaCl	: Sodyum klorür

NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikodinamid adenin dinükleotid'in indirgenmiş formu
NADPH	: Nikodinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κb	: Nükleer Faktör kappa B
NO	: Nitrik oksit
IARC	: Uluslararası kanser araştırma ajansı
IDH ₂	: İzositrat dehidrogenaz
p53	: p53 proteini
PBS	: Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon
PDH	Piruvat dehidrogenaz
PGC-1α	: Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör-γ koaktivatör 1α
PVDF	: Polivinilidin difluorid
RAS	: Rat sarkoma onkogeni
ROT	: Reaktif oksijen türleri
Rpm	: Dakikada dönüş
SDH	: Süksinat dehidrogenaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SIRT	: Sirtuin proteini
Sir2	: Sessiz bilgi düzenleyici 2
SOD2	: Süperoksit dismutaz 2
TBS	: Tris-tamponlu tuz çözeltisi
TCA	: Trikarboksilik Asit
TEMED	: Tetra metil etilen diamin
TGFβ	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kanser vücuttaki hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile kendini gösteren, ölüme sonuçlanabilen bir durumdur. Kanser hücreleri, karsinogenez sürecinde bazı temel özellikler kazanmaktadır. Hanahan ve Weinberg tarafından bu özellikler; mutasyonlar, kendi kendine büyüme faktörlerine ve sürekli bölünme potansiyeline sahip olma, apoptozdan kaçma, anjiyogenez, invazyon ve metastaz yapma gibi başlıklar altında tanımlanmıştır [1]. Kontrolsüz çoğalma yeteneği, kanser hücrelerinin en kritik özelliğini temsil eder. Bu hiperproliferatif durum, enerji metabolizmalarının yeniden ayarlanması ile ilişkilidir. Kanser hücrelerinde yeniden metabolik programlamanın en iyi örneği, glikolizis metabolizmasında gerçekleşmektedir [2]. Kanser hücreleri oksijen varlığında dahi aerobik glikolizisi tercih ederler ve bu durum “Warburg etkisi” olarak bilinmektedir. Bu normal olmayan metabolik değişiklik yalnızca ATP vermekle kalmayıp, kanser hücrelerinin büyüüp ilerlemesi için gerekli olan yapı taşlarının çoğunu da sağlamaktadır. Warburg etkisini tersine çevirme potansiyeli ile SIRT3 proteini, kansere karşı terapötik bir strateji olarak görülmektedir [3].

Sirtuinler NAD^+ bağımlı, protein deasetilaz ve ADP-ribozil transferaz aktivitesi gösteren; bakterilerden memelilere kadar hemen hemen tüm türlerde bulunan bir protein ailesidir. Sirtuinler metabolizmanın düzenlenmesi, DNA onarımı, hücre yaşamı gibi birçok biyolojik faaliyetin yanı sıra, yaşlanma, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çok sayıda fizyolojik olay ile de ilişkilidirler. Bu aileden biri olan SIRT3, yaşlanma, metabolizma ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçleri kontrol eden önemli bir mitokondriyal deasetilazdır. Mitokondriyal metabolizmanın ana düzenleyicileri olan; glutamat dehidrogenaz (GDH), trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne ve oksidatif fosforilasyona katılan süksinat dehidrogenaz (SDH) ve majör antioksidan süperoksit dismutaz 2 (SOD2) gibi enzimler, SIRT3 tarafından deasetile edilerek aktiviteleri regüle edilmektedir [4,5,6].

Mitokondriyal metabolizmadaki anormallikler kanser hücrelerinde artan reaktif oksijen türleri (ROT) seviyesi olarak gözlemlenir. Mitokondriyal matrikste lokalize olan mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) enzimi süperoksit radikallerini

temizleyeleterek, oksidatif strese karşı savunma sağlamaktadır. SIRT3, MnSOD enzimini hedefleyerek, ROT üretimini azaltıp, kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir [7].

HIF1 α , Warburg etkisini destekleyen, glikolitik genleri aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür. SIRT3, hipoksi ile indüklenen faktör1- α aktivitesini baskılayarak ROT seviyesinin düşürülmesini ve böylelikle oksidatif strese karşı dirençli olmayı sağlamaktadır. HIF1 α piruvatı sınırlayıp, piruvat dehidrojenaz kinaz 1'i (PDK1) arttırmaktadır. HIF1 α aracılı PDK1 ekspresyonu da, yeniden metabolik programlamayı işaret eder. Piruvat dehidrojenaz (PDH) pirüvatın asetil-KoA'ya dönüşümünü dekarboksilasyon yoluyla katalize edip, karbonhidrat ve yağ metabolizmasını düzenleyebilen bir multienzim kompleksidir. PDH'nin temel bileşenlerinden biri olan PDHA1, PDK1 tarafından fosforilasyonu sağlanarak, inaktive edilmektedir. Fosforile edilmiş PDHA1, TCA döngüsüne giren piruvatı azaltarak; tüm piruvat dehidrojenaz kompleksini (PDC) inaktive eder. PDH aktivitesinde meydana gelen bir azalma, yüksek glikolitik değerlere sebep olurken, sonuç olarak Warburg etkisi artar ve kanser hücrelerinde oksidan üretimi azalarak, tümör gelişimi desteklenir [8,9]. Antioksidan savunma sistemini geliştirip, hücrel ROT seviyesini koruyarak SIRT3, kanser hücrelerinde PDH aktivitesini arttırarak Warburg etkisini azaltmaktadır [3, 7].

SIRT3'ün inaktivasyonu çeşitli dokularda tümör oluşumu oranını arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda SIRT3 defekti olan farelerin kansere karşı daha duyarlı hale geldikleri ve insan meme kanserleri ile diğer bazı tümörlerin de sağlıklı dokulara nazaran azalmış SIRT3 seviyeleri içerdiği belirtilmiştir [3,4]. Tüm insan kanseri örneklerinin yaklaşık %20'si, meme ve yumurtalık kanseri örneklerinin ise %40'ı SIRT3 delesyonları içerdiği bilinmektedir. Enerji metabolizmasının düzenlenmesi ve oksidatif strese yanıtın oluşmasında önemli bir etken olan SIRT3, bir tümör baskılayıcı olmanın yanısıra, karsinogeneze karşı da yeni terapötik stratejiler geliştirilmesi için olası bir hedef olarak görülmektedir.

Kanser üzerinde yürütülmekte olan çok sayıdaki araştırmalara rağmen, halen dünya çapında önemini korumaktadır. Dünya geneline bakıldığında, 2020 yılında 19,2 milyon kişiye kanser tanısı konulmuş ve bu vakaların 9,9 milyonu ise kanser nedeniyle

hayatlarını kaybetmişler. Türkiye de ise 2020 yılı verilerine göre, 233,834 tanı almış kanser vakası ve 126,335 kansere bağlı ölüm görülmüştür [6]. Dünya çapında ölüm nedenlerine bakıldığında, kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada karşımıza kanser çıkmaktadır. Giderek artan dünya nüfusu ile birlikte 2040 yılına kadar kanserin ilk sıraya yerleşmesi beklenmektedir. Tüm dünyada akciğer, meme ve kolon kanseri en sık görülen kanser türleri olarak sıralanmaktadır. Kolorektal kanser, gastrointestinal sistemin en yaygın görülen kanseridir [6]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan verilere göre kolorektal kanser dünya genelinde üçüncü en sık karşılaşılan kanser türüdür. Tüm dünyada her yıl bir milyon kişide kolorektal kanser gelişmekte ve 500.000 hasta kolorektal kanser nedeniyle hayatlarını kaybetmektedir. [10]. Meme kanseri ise özellikle kadınlarda en çok tanı alan ve kansere bağlı ölüm sebeplerinde birinci sırada yer alan kanser türüdür. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 yılı verilerinde, meme kanserinin kadınlar da en sık gözlemlenen malign tümörlerden biri olduğu ve bütün kanser çeşitleri içinde görülme oranının %24.2 olduğu açıklanmıştır [11]. Kanser hastalarındaki belirtiler, tümörün konumuna ve diğer organlara yayılıp yayılmadığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [12]. Kanser prognozunun anahtar belirleyicisi tümörün evresidir. Çevresel ve genetik faktörler kanser gelişim riskini arttırmaktadır. Bununla birlikte yaş, beslenme alışkanlıkları, alkol-sigara kullanımı, fiziksel aktivite azlığı ve bazı metabolik sendromlar da risk faktörlerini oluşturmaktadır [13]. Kanser tedavisinde tümörün organizmadaki konumuna ve evresine bağlı olarak cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve gen terapisi gibi birçok tedavi yöntemine başvurulmaktadır. Tedavide öncelikli amaç, tümör hücrelerinin sağlıklı çevre dokuya minimum derecede hasar vererek öldürülmesidir. Cerrahi rezeksiyon tercih edilen en temel yaklaşımdır. Tümörün ilaçla tedavi edilmesi anlamına gelen kemoterapi ise en sık kullanılan yöntemdir. Bütün bu yöntemlerin tedavi edici yönlerinin dışında dezavantajları da bulunmaktadır [14]. Ayrıca bu tedavi yöntemleri için, uzun zaman ve yüksek maliyet gerekmektedir. Bütün bu etkenlerde hastaları başka arayışlara yönlendirmektedir. Son zamanlarda alternatif tedavi yöntemi olarak bitki özütleri kullanımı, hem yeni tedavilerin geliştirilmesi açısından hem de ekonomik olmasından dolayı büyük ilgi uyandırmaktadır.

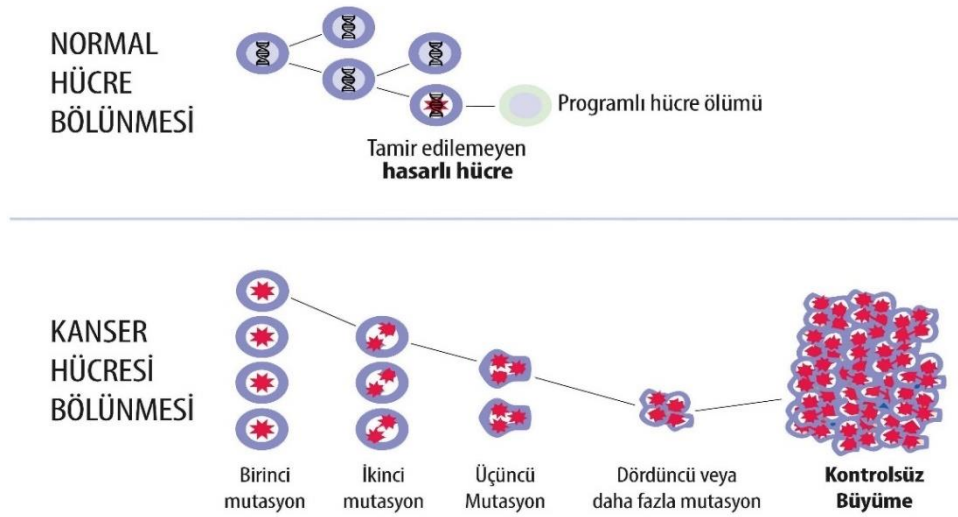
Fenolik bileşiklerce zengin olan bitkilerin, tümör oluşumu ve kanserleşmede önemli rolü olan serbest radikallerin süpürülmesinde terapötik ajan olarak işlevlendikleri

bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada, bitki özütlerinin ve/veya bileşenlerinin antitümöral aktiviteye sahip olduklarını kanıtlamaktadır. Bu çalışmada kullanılan *C. ovata* bitkisi bütün kıtaların doğal florasında kendiliğinden yetişmekte olan tropik/subtropik kökenli bir bitkidir [15]. Yüksek antioksidan içeriğine sahip olan kapari türlerinin, oksidatif stres kaynaklı kansere karşı koruyucu olduğu da bildirilmiştir [16]. Bilhassa çiçek tomurcuğu, kanserli hücrelerin baskı altına alınmasında ve antitümöral aktivite sağlayan ekstraktların hazırlanmasında kullanılmaktadır [16,17]. Ayrıca kapari, kök ve yapraklarında bulunan indol-3-metil glikozinolat ve bunların hidroliz ürünlerine, kanser tedavilerinde sıklıkla yer verilmektedir. [17]. Yapılan literatür taramalarına göre, *C. ovata* daha önce insan kanserleri üzerinde sirtuin ve piruvat dehidrogenaz enzim düzeylerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bilgi açığına katkıda bulunmak amacıyla bu tez çalışmasında, kapari bitkisinin DLD-1, COLO-205, HCT-116 kolon kanseri ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında antikanser ve antioksidan özellikleri ile SIRT3 ve piruvat dehidrogenaz enzim düzeylerine etkileri araştırılmıştır. *C. ovata* bitkisinin antikanser ve antioksidan aktivite potansiyelinin çalışılması ve literatüre kazandırılması yeni projelerin üretilmesine ve kanser tedavilerinde ilaç etken maddesi araştırmaları için önem arz etmektedir.

1.2. Kanser

Kanser terimini ilk kez tıbbın babası olarak bilinen Hipokrat, milattan önce 460-370 yılları arasında ‘carcinoma’ adıyla, iyileşmeyen yaralar için kullanmıştır. İnsanlık tarihi kadar eski bir hastalık olan kanser, ismini solid bir tümörün yengece benzetilmesiyle almıştır. Daha sonra ünlü bir hekim ve filozof olan Galen (M.S. 130-210) yengeç ısırtığı ağrısı ile kanser ağrısının benzerliğinden yola çıkarak latince yengeç anlamına gelen “cancer” kelimesini kullanarak, tümörleri de özelliklerine göre sınıflandırmıştır [2]. Türk tıp tarihinde ise ilk kez 13. yüzyılda “seratan” kelimesi ile tanımlanan kanser kavramı, ağrılı şişlikler olarak tanımlanmaktadır [18].

Kanser, organizmaya ait hücrelerin farklı sebeplerden ötürü kontrolsüz ve düzensiz bir şekilde çoğalmaları ile tanımlanır (Şekil 1.1). Genel olarak bakıldığında kanser, hücrede ortaya çıkan fiziksel ya da biyolojik faktörler sebebiyle kontrolsüz bölünen hücrelerin aşırı çoğalması veya hücre ölüm programının bozulması sonucu oluşan multifaktöriyel bir hastalık olarak nitelendirilmektedir [4].



Şekil 1.1: Hücrenin kontrolsüz çoğalması [19]

Kanser teriminin antik yunan mitolojisinde kök anlamına gelen ‘genesis’ sözcüğüyle birleşiminden karsinogenez ifadesi doğmuştur. Karsinogenez, biyolojik olaylara etki eden mutasyonların kademeli olarak bir araya gelmesi sonucu ortaya çıkan kronik bir

süreçtir. Söz konusu genetik hasar, hücre çoğalmasını destekleyen; proto-onkogenler, hücre çoğalmasını baskılayan tümör supresör genler, programlı hücre ölümünü kontrol edip düzenleyen genler ve gen replikasyon hatalarını onaran DNA tamir genlerinden oluşmaktadır. Tümör gelişimine katkı sağlayan bir diğer etken ise, telomerin sabit kalmasını sağlayarak tümöre 'ölümsüzlük' kazandıran telomerez aktivitesidir [20,21]. Proto-onkogenler, normal hücrelerde proliferasyon ve farklılaşmayı düzenleyen genlerdir (Tablo 1.1). Bir proto-onkogen, mutasyona uğradığında aktivasyon kazanırsa onkogen adını almaktadır [22].

Tablo 1.1: Bazı kanser tipleri ve onkogenler tarafından kodlanan proteinler [23]

Onkogen	Fonksiyonel Karakteri	Kanser Tipi
N-MYC	Transkripsiyon faktörü	Nöroblastoma, akciğer
BCL-2	Anti-apoptotik	B-hücre lenfoma
ALL1	Kromatin modifikasyonu	Akut myeloid lösemi
HST	Fibroblast büyüme faktörü	Gastrik karsinoma
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü	Skvamöz hücre karsinoma
SRC	Reseptör olmayan protein tirozin kinaz	Kolon kanseri
H-RAS	GTPaz aktivitesi	Kolon, akciğer ve pankreas kanseri

Tümör supresör genler ise, hücre büyümesini regüle ederek tümör gelişimini önleyen genlerdir (Tablo 1.2). Bu genlerin mutasyonlar sonucu heterozigot olma durumunu kaybetmesi; kontrolsüz hücre bölünmesine, anormal hücre büyümesine ve apoptozise sebebiyet vermektedir [24].

Tablo 1.2: Tümör supresör genler [23,24]

Gen	Kanser Türü
APC	Kolon/rektum karsinomu
Smad2	Kolon/rektum karsinomu
Smad4	Kolon/rektum, pankreas karsinomu
BRCA1	Meme ve over karsinomlar
BRCA2	Meme karsinomu
p53	Beyin tümörleri, meme, kolon/rektum, özofagus, karaciğer ve akciğer karsinomları, sarkomlar, lösemi ve lenfomalar
Rb	Retinoblastom, sarkomlar, mesane, meme ve akciğer
TßRII	Kolon/rektum, mide karsinomu
PTEN	Beyin tümörleri, melanom, prostat, endometrium, böbrek ve akciğer karsinomları
NF1	Nörofibrosarkom
NF2	Meningiom
INK4	Melanom, akciğer karsinomu, beyin tümörleri, lösemiler, lenfomalar
WT1	Wilms tümörü
PTC	Bazal hücreli karsinom
VHL	Renal hücreli karsinom

DNA tamir genleri replikasyon sırasında; DNA polimerazın kusurlu baz eklediği an, o hatalı baza müdahale edip düzelden genlerdir. Bu genlerde mutasyonların meydana gelme durumlarında, hücre tamir yapamaz ve bu durumda mikrosatellit instabilitesi olarak bilinen genomik kararsızlıklar ortaya çıkmaktadır [19,25].

Karsinogenez, kanser hücrelerine kontrolsüz bir şekilde düzensiz olarak çoğalma, diğer bir deyişle kontrolsüz proliferasyon, ve diğer hücrelerin yaşam alanlarına yayılıp, yerleşebilme, diğer bir deyişle metastaz gibi iki farklı özellik vermektedir [26]. Normal şartlarda hücrelerin sahip olduğu çeşitli sinyal düzenekleri, hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını dengede tutmaktadır. Fakat kanserleşme sürecinde, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarında ortaya çıkan kusurlar ve hasarlar sonucu hücreler, ölüm sinyallerine duyarsızlaşarak sürekli bölünme eğilimi gösterirler. Sonuç olarak apoptozdan kaçarak, invazyon ve metastaz yeteneği kazanıp çevre dokulara ve uzak organlara yayılarak genişlerler. Hücre döngüsü kontrol mekanizmalarındaki denetimlerden kaçan hücreler, istemsiz ve hızlı bölünmeyle tümör veya neoplazma denilen anormal hücre kitlesi oluşturur. Bu hücreler, oluştukları bölgelerde tek bir kitle olarak kalıp, diğer bölgelere yayılmıyorsa iyi huylu tümör (benign tümör) olarak adlandırılırlar. Fakat sürekli bölünerek, kan ve lenf dolaşımı ile invazyon ve metastaz özelliği taşırlarsa, kanser (malign tümör) olarak kabul edilmektedirler [1,27].

Kanserleşme sürecinde ilk hedef hücre DNA'sı olup süreci başlatan faktörler ise mutajeniktir. Öncelikle meydana gelen hasarlar, DNA tamir enzimleri tarafından onarılır. Şayet onarım gerçekleşmezse tümör baskılayıcı ve apoptotik genler devreye sokularak, hücre apoptoza yönlendirilmektedir [27].

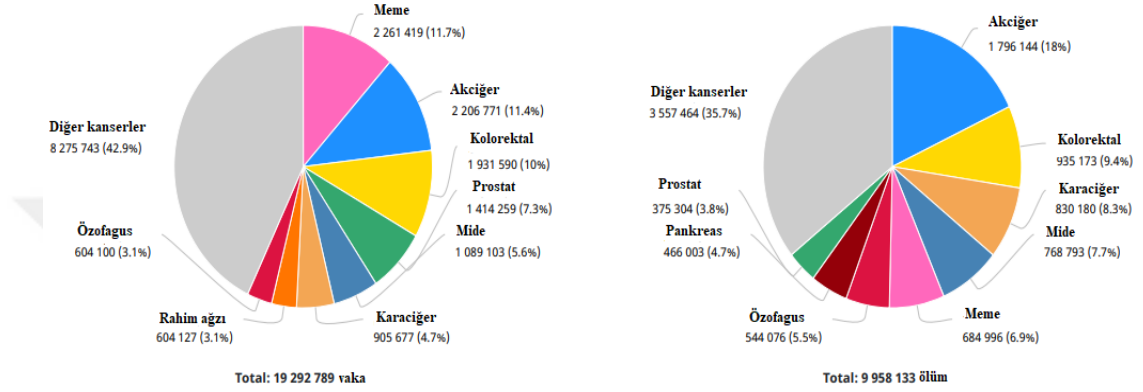
Bilim insanları tarafından kanserleşme sürecinde hücrede oluşan genetik değişiklikler 10 temel özellik olarak belirlenmiştir (Şekil 1.2). Bunlar [1];

1. Kendi büyüme faktörlerine sahip olma,
2. Büyüme engelleyici faktörlerden kaçış,
3. Hücre ölüm mekanizmasından kaçış (apoptoz),
4. Sürekli bölünme potansiyeli,
5. Yeni damar oluşturma (anjiyogenez),
6. Bağışıklık sisteminden kaçış,
7. Kanserleşmeyi destekleyen iltihaplanma (inflamasyon),
8. Mutasyonlar (gen yapısında hatalar),
9. Genetik kararsızlık,
10. İnvazyon ve metastaz (başka doku ve organlara göç etme) özelliğidir.



Şekil 1.2: Hanahan ve Weinberg'a göre kanserin 10 temel özelliği [1]

Dünyada son yıllarda insidansı ve mortalitesi hızla artmakta olan kanser, dünya çapında genel ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alır. Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) verilerine göre, dünya üzerinde 2020 yılında toplam 19,2 milyon kanser vakasına ek olarak 9,9 milyon da kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir (Şekil 1.3).



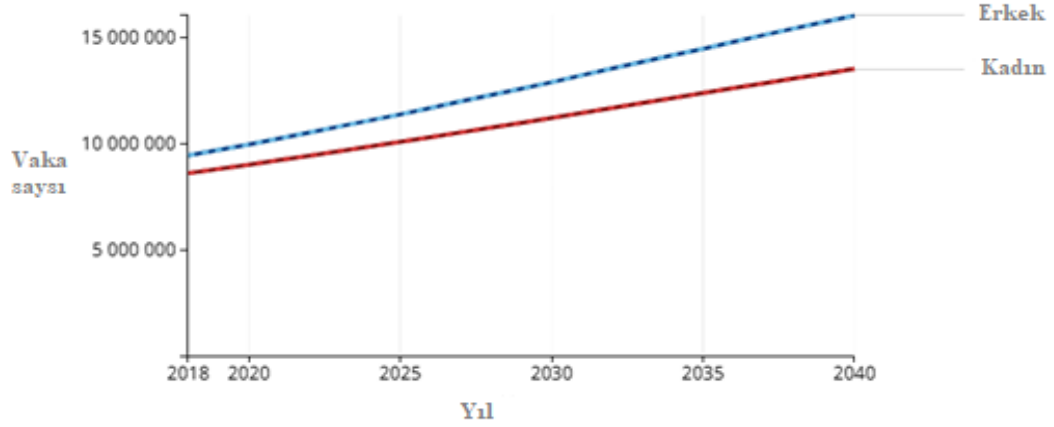
Şekil 1.3: GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında dünyada her iki cinsiyette toplam yeni kanser ve ölüm vakaları [28]

Dünyada en yüksek prevalansa sahip kanser çeşitleri: akciğer (%11,6), meme (%11,6), kolon (%10,2) ve prostat (%7,1) kanserleri olarak sıralanmaktadır, kansere bağlı ölüm oranları ise akciğer (%18,4), kolon (%9,2) mide (%8,2) ve karaciğer (%8,2) kanserleri şeklinde devam etmektedir. Türkiye'deki kanser insidansı, erkeklerde dünya insidansının üzerinde seyretmektedir (Şekil 1.4). Erkeklerde sıklıkla rastlanılan kanser türü akciğer kanseriyken, kadınlarda ise meme kanseri ilk sırada yerini almaktadır [28].

	Erkekler	Kadınlar	Her iki cinsiyette
Nüfus	40 371 479	41 545 387	81 916 866
Yeni vaka	118 882	91 655	210 537
Yaşa göre standardize edilmiş insidans oranı	284.2	182.3	225.1
75 yaşından önce kansere yakalanma riski (%)	28.6	17.9	22.8
Kanser ölümlerinin sayısı	74 542	42 168	116 710
Yaşa göre standardize edilmiş ölüm oranı	177.4	78.2	121.5
75 yaşından önce kanserden ölmek riski (%)	18.6	8.3	13.1
5 yıllık yaygın vakalar	231 591	239 260	470 851
En sık görülen 5 kanser türü	Akciğer Prostat Kolorektal Mesane Mide	Meme Tiroid Kolorektal Rahim ağzı Akciğer	Akciğer Meme Kolorektal Prostat Tiroid

Şekil 1.4: 2019 yılı Türkiye özet kanser istatistiği [28]

Günümüzdeki kanser verileri demografik olarak değerlendirildiğinde, gelecek yıllarda kanser insidansının ve ölüm oranlarının hem Türkiye’de hem de dünya çapında artarak devam edeceği düşünülmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5: GLOBOCAN verilerine göre hazırlanmış, 2040 yılına kadar dünyada beklenen kanser insidansları [28]

Hücrelerde gen hasarlarına sebep olan, kanserleşme sürecine zemin hazırlayan maddelere ve maruziyetlere karsinojen denilmektedir. Kanser yapıcı maddeler olarak bilinen karsinojenlerin de, kanser oluşumunda büyük payı vardır. Karsinojenlerin sınıflandırması, aşağıdaki gibidir [29];

- Fiziksel karsinojenler (güneş ışınları, UV, radyasyon vb.),
- Kimyasal karsinojenler (polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler, alkol, sigara vb.),
- Biyolojik karsinojenler (virüsler, hormonal bozukluklar, ailesel genetik yatkınlık, mutasyonlar vb.).

1.2.1. Kolon Kanseri

Dünya genelinde her iki cinsiyette de en çok rastlanılan üçüncü kanser türü olup, her yıl yaklaşık bir milyondan fazla yeni kolon kanser vakası olduğu bildirilmekte ve bunların da yaklaşık olarak yarısı hayatlarını kaybetmektedir. Tüm dünyada en sık görülen malignansilerden olan kolon kanseri, genel kanser çeşitleri arasında görülen üçüncü kanser türü olarak rapor edilmiştir [30]. İleri yaş hastalığı olarak bilinen kolon

kanserinde tanı yaşı ortalama 62’dir. Nadir olarak 40 yaş altında görülse de, hastalığın insidansı 50–75 yaş arasında değişmektedir. Cinsiyet açısından bakıldığında, bariz bir fark olmamakla birlikte erkeklerde biraz daha sık görüldüğü bilinmektedir [31].

Kolon kanseri gelişiminde çevresel unsurlar kadar genetik unsurlarda risk taşımaktadır. Kalıtsal yatkınlık, kanser oluşumunda en yüksek risk olarak görülsede vakaların büyük çoğunluğu sporadiktir [32]. Bununla birlikte %2-4’ü Familyal Adenomatöz Poliposis (FAP) ve Herediter Non-poliposis Kolorektal Kanser (HNPCC) olmak üzere herediter sendromlarla ilişkilidir [33]. Bunlardan FAP sendromu, Adenomatöz Poliposis Koli (APC) gen mutasyonları ile bağlantılıdır. HNPCC de ise, DNA yanlış eşleşme onarım genlerinde üreme hücrelerini ilgilendiren ve nesilden nesile aktarılan mutasyonlar görülmektedir. Kolorektal kanserli hastaların %25’inde kalıtsal bir yatkınlık olmasa da aile öyküsü vardır. Diğer risk faktörleri ise, beslenme alışkanlıkları ve diyet (hayvansal yağdan zengin, düşük lifli besinler), fiziksel aktivite azlığı, fazla kilo, tütün (sigara) kullanımı, non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçların kronik kullanımı ve bazı metabolik sendromlar olarak sayılabilmektedir (Tablo 1.3) [34,35].

Tablo 1.3: Kolorektal kanser oluşumunda risk faktörleri

Kontrol edilebilir risk faktörleri	Kontrol edilemez risk faktörleri
✓ Diyet (yağdan zengin posadan fakir)	✓ Yaş (50 ve üzeri)
✓ Hareketsiz yaşam	✓ Kişisel kanser öyküsü (KR adenom ve KRK)
✓ Sigara, alkol kullanımı	✓ Aile öyküsü (Poliposis Sendromları, HNPCC, Birincil dereceden KRK’li aile yakınları)
✓ Aşırı kilo	✓ İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (Crohn hastalığı vb.)

Hastalık çoğunlukla kolon ve rektum duvarında meydana gelen benign poliplerin zaman geçtikçe malignant hale gelmesiyle kendini gösterir. Hastalığın ilk zamanlarında belirli bir belirti görülme de, teşhis fiziksel muayene ve tanısal testler ile tespit edilmektedir. Hastalığın ilerleyen aşamalarda ise dışkılama alışkanlığında

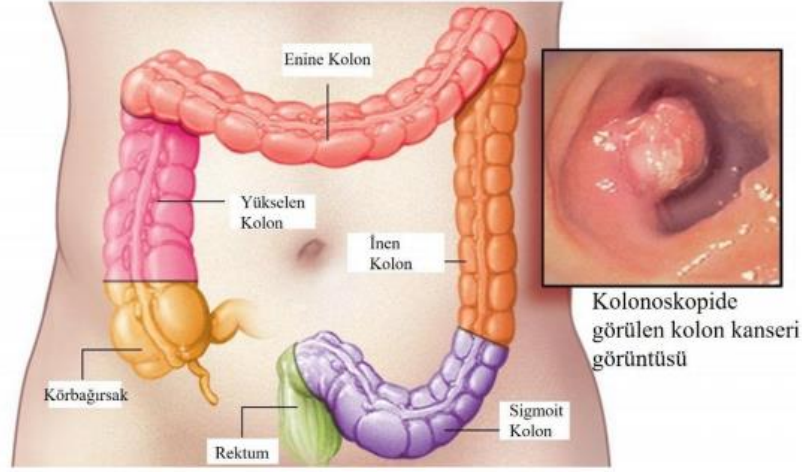
değişiklikler, rektal kanama, kilo kaybı ve karın ağrısı gibi belirtilerle kendini göstermektedir. Kolon kanserli hastalardaki semptomlar, Rahman ve ark. (1990) tarafından şu şekilde sıralanmıştır [36].

- Rektal kanama%78
- Bağırsak alışkanlığında farklılık%20
- Kilo kaybı.....%17
- Konstipasyon ve diyare%28
- Diyare%11
- Konstipasyon%5,5
- Tenesmus%17

Temel tedavi yaklaşımı, hastalığın derecesine göre cerrahi rezeksiyon ile malignant dokunun alınmasıyla başlar. Radyoterapi ve/veya kemoterapi uygulamasıyla da takibe devam edilir [14]. Tümörün yayılım derecesi, büyüklüğü, lokalizasyonu, evresi ve genel durumu tedaviye yönelik uygulanacak stratejileri belirlemektedir. Hastalığın prognozu teşhis edildiğindeki evreye bağlı olup, bes yıllık sağ kalım oranları %40 civarındadır [37].

1.2.2. Kolon Kanseri Moleküler Mekanizması

Kalın bağırsak; ileoçekal valvden anüse kadar uzanan kolon, rektum ve anal kanal olarak bölümlere ayrılan sindirim sistemi organıdır (Şekil 1.6). Kolon ise ileoçekal valv ile rektosigmoid köşe arasında kalan bölümdür. Ortalama uzunluğu, kişiden kişiye değişmekle birlikte yaklaşık olarak 150 cm'dir. Karın boşluğundaki ince bağırsak kıvrımlarını çerçeveleyen kolon, rektumda sona ermektedir [38].



Şekil 1.6: Kolonun bölümleri [39]

Hastalık çoğunlukla kolon ve rektum duvarında oluşan iyi huylu poliplerin zamanla malignant hale dönüşmesiyle meydana gelir (Şekil 1.7). Polipler, mukozadan gelişen bağırsak lümenine doğru çıkıntı yapan yapılardır. Zamanla meydana gelen genetik ve çevresel faktörlerden dolayı oluşan değişiklikler sonucunda, hücrelerde değişimler gözlenir. Bu durumda, bulundukları bölgede ufak bir polip (hiperplastik ve adenomatöz polipler) şeklinde ortaya çıkıp, gelişip büyürler. Kalıtsal değişiklikten ötürü ortaya çıkan kanser yapıcı genler aracılığıyla adenomatöz polipler yer aldıkları organlarda kanser yaparlar ve diğer çeşitli organlara yayılırlar. Genellikle kolon kansinomalara, adenomatöz poliplerden oluşur. Bu dönüşümü gerçekleştiren bir takım olaylar dizisine, adenoma-karsinom dizisi denilmektedir [40,41].



Şekil 1.7: Adenoma-karsinoma sekansı [41]

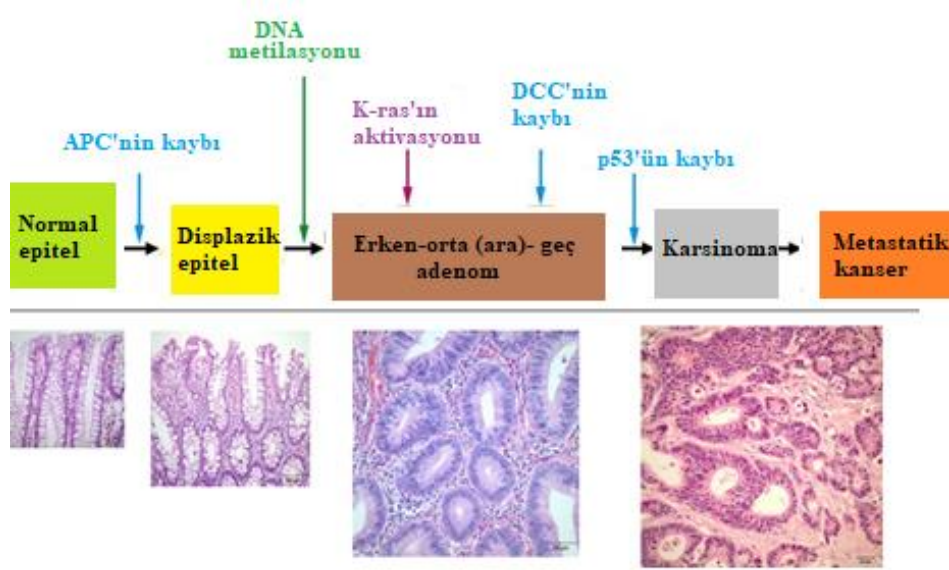
Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler, adenom-karsinom sekansında bulunan, bağlantılı genlerdir. Kolon tümörlerinde en sık görülen onkogen mutasyonlara c-myc ve c-Ki-ras; sık görülen tümör supresör gen mutasyonlara 17 p'deki p53, SMAD-4, 5q'daki DCC ve APC; sık görülen DNA tamir gen mutasyonlarına ise BRCA1 ve BRCA2 örnek verilebilir. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %13'ünde mikrosatellit instabilite, %40'ında epigenetik değişiklikler, son olarak %47'sinde kromozomal dengesizlikler etkindir [20,21,42].

Fearon ve Vogelstein, 1990 yılında yapmış oldukları çalışmalar sonucunda kolorektal karsinogenezin moleküler mekanizmasını açıklayan bir model oluşturmuşlardır [43].

Bu prototipe göre;

- Kolorektal tümörler, onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyonel inaktivasyonu neticesinde oluşurlar.
- Malign tümör oluşumu için minimum dört ya da beş genin mutasyonu gerekmektedir. Daha az sayıdaki değişiklikler sadece benign tümör oluşumuyla sonuçlanır.
- Kalıtsal değişikliklerin birbirini izleyen bir dizi şeklinde ortaya çıktığı kabul edilse de tümörün biyolojik özelliklerinin saptanması için bu kalıtsal değişikliklerin birikimi, oluş sırasından daha önemlidir.
- Mutant tümör baskılayıcı genler, heterozigot bir çevrede bulunduğu dahi fenotipik etkilerini gösterebilmektedirler.

Fearon ve Vogelstein'in ortaya koyduğu adenoma-karsinoma prototipine göre, adenom gelişiminde ilk erken dönemde öncelikle APC tümör baskılayıcı gen mutasyonları gözlenir (Şekil 1.8). Sonraki aşamada ise K-ras mutasyonları, maligniteye geçiş evresinde ise p53 mutasyonu ile 18q delesyonu gerçekleşmektedir [43].



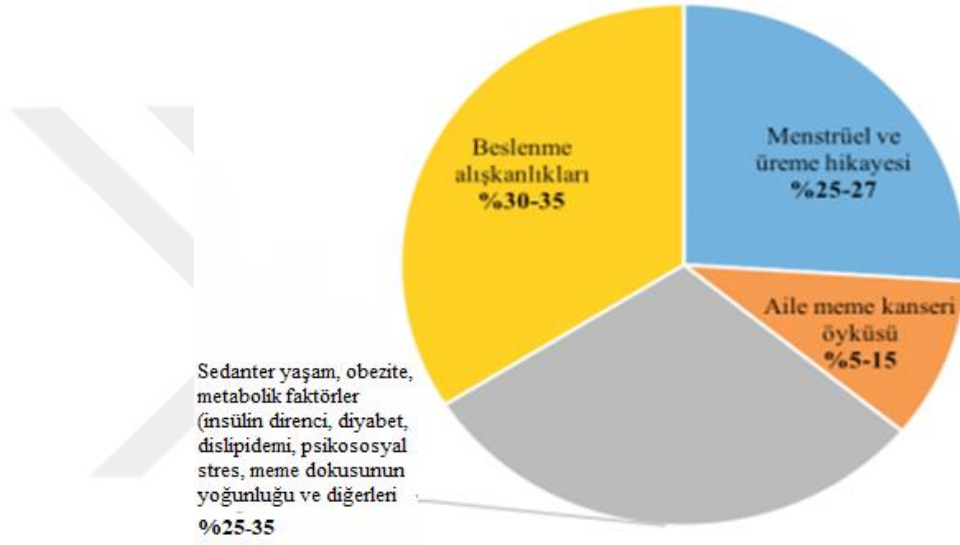
Şekil 1.8: Kolonik Adenoma-Karsinoma Yolağı [6]

APC genindeki mutasyonlar adenom oluşum sürecinin ilk ayağıdır. Kolorektal kanserlerin çoğunda APC gen kaybı gözlenmektedir. APC geni normal hücrelerde β -katenini azaltarak, yıkımını düzenleyen hücre içi bir protein kompleksinin parçasıdır. Mutant hücreler hücre iskeletinin aktin yapısına E-kadherin yapısının bağlanması β -katenin aracılığı ile gerçekleşmektedir. APC geni aynı zamanda kolorektal karsinogeneizde kromozomal stabilitenin devamlılığını sağlamaktan da sorumludur.

APC proteini ve β -katenin, önemli bir role sahip olan Wnt sinyal yolunun bileşenleridir. APC mutasyonlarından dolayı her iki allele de kayıplar olursa APC geni, β -katenini baskılayamaz ve Wnt sinyal yolağındaki düzenleyici işlevini yerine getiremez. Böylelikle sitoplazmada β -katenin seviyesi artar ve hücre bölünmesi kontrol edilemez duruma gelir. İlk olarak APC'de mutasyon veya aşırı metillenme gerçekleşir. Bunu K-Ras onkogen mutasyonları izler ve süreci bir sonraki aşamaya taşır. 12p üzerinde yer alan K-Ras mutasyonu ile, polip daha da belirginleşir ve bu durum ara (intermediate) adenom evresi olarak adlandırılır. Ara adenom aşamasından sonra ise 18. kromozomun uzun kolunda yer alan TGF- β ve DCC arayolu üzerinde etkiye sahip olan SMAD2, SMAD4 genlerinde kayıplar gözlemlenir, bu durumda geç dönem adenomlar evresine geçiş yapar. Son olarak 17p13 üzerinde bulunan p53 geninin her iki alleli üzerinde etkili olan kayıplarla süreç hız kazanmaktadır [21,44].

1.2.3. Meme Kanseri

Meme kanseri bilhassa kadınlarda, en çok tanı alan ve kansere bağlı ölüm sebeplerinde birinci sırada yer alan kanser türüdür. Dünya çapında kadınlarda, teşhis edilen her dört kanser çeşidinden biri olarak meme kanseri karşımıza çıkmaktadır. Yalnızca 2020 yılında dünyada meme kanserinden 684 bin kişinin hayatını kaybettiği tespit edilmiştir [11]. Meme kanserinin etiyolojisinde birden çok risk etkeni bulunur (Şekil 1.9). En önemli risk etkenleri öncelikle cinsiyet ve yaştır [45].



Şekil 1.9: Meme kanseri risk faktörleri [46].

Meme kanserinin %99'u kadınlarda, %1'i de erkeklerde görülmektedir. %1'lik kısımda ise aile öyküsünde meme kanseri olan kadınların olmasından kaynaklanmaktadır [45]. Meme kanserinin görülme sıklığı, yaşla orantılıdır (Tablo 1.4). Meme kanseri tanısı konulan hastaların %75'i postmenopozal (menopoz sonrası) dönemde oldukları rapor edilmiştir. Bunların yanı sıra 30 yaşından sonra ilk hamilelik, erken menstürasyon, geç menapoz da meme kanserini tetikleyen etkenlerdir [47]. Üreme ve menstrüel faktörler vakaların %25'inden sorumludur. Aynı şekilde aile geçmişi de meme kanseri riskini arttırarak, vakaların %5-15'ini kapsar. Yaşam tarzı gibi kontrol edilebilir çevresel faktörler de vakaların %60-70'ini oluşturmaktadır. Özellikle yüksek kalorili beslenme alışkanlığı vakaların %30-35'i ile ilişkilendirilmiştir [48].

Tablo 1.4: Meme kanseri oluşumunda risk faktörleri

Kontrol edilebilir risk faktörleri	Kontrol edilemez risk faktörleri
✓ İlk Doğum Yaşı	✓ Cinsiyet
✓ Oral Kontraseptif Kullanımı	✓ Yaş
✓ Emzirme	✓ Aile Öyküsü
✓ Alkol-Sigara	✓ Menarş-Menopoz Yaşı
✓ Beslenme	✓ Yoğun Meme Dokusu
✓ Aktivite	✓ Irk
✓ Radyasyon	✓ Benign Meme Hastalıkları
✓ HRT	✓ Hormonlar
	✓ Radyasyon Alınması
	✓ Genetik Mutasyon

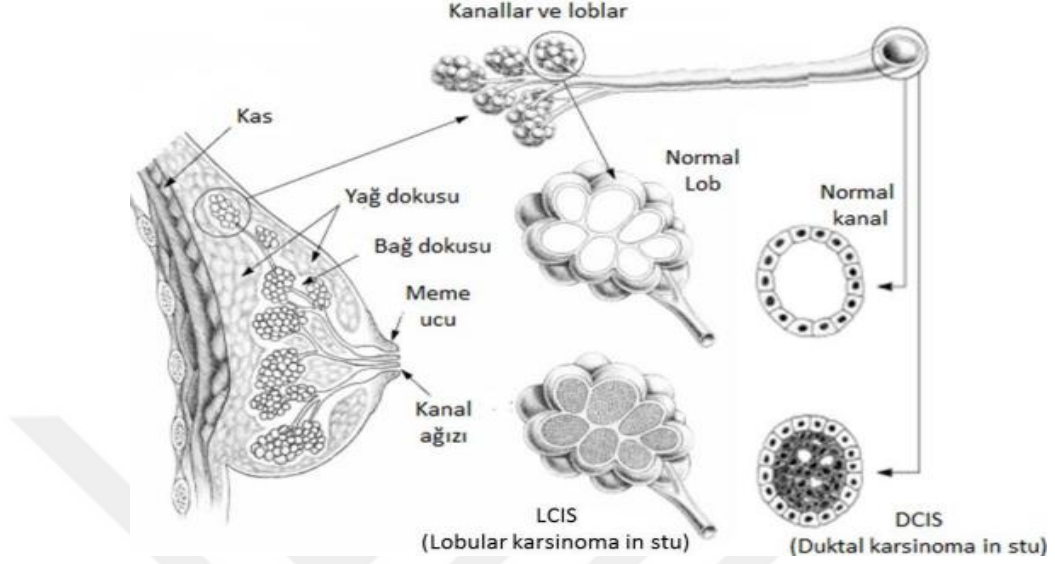
1.2.4. Meme Kanseri Moleküler Mekanizması

Meme süt salgılayan modifiye bir ter bezidir. Meme; fibröz bağ, glandüler ve yağ dokusundan oluşmaktadır (Şekil 1.10). Her memede lob olarak adlandırılan 15-25 adet süt üretiminin gerçekleştiği bölüm bulunmaktadır. Bu loblarda bir alt birimi olan lobüllerden 20-40 tane, her bir lobül ise 10-100 adet alveol (asinus) içermektedir. Her alveol kendi içinde birleşip, terminal duktusa açılmaktadır. Lobül denilen süt bezleri duktus adı verilen süt kanallarıyla birbirlerine bağlı bir şekildedir. Her bir duktus meme başına doğru birleşerek gelir ve memenin tam orta kısmında bulunan meme başına üretilen sütün transferini sağlar. Meme kanseri, meme dokusunda yer alan lobüllerin ve duktusları oluşturan hücrelerin kontrol dışı bölünüp, çoğalmasıyla oluşmaktadır. Süt kanallarında ortaya çıkan meme kanseri duktal karsinom, lobüllerde görülürse eğer lobüler karsinom olarak isimlendirilir [49].

Meme kanser hücreleri, malignitenin yayılış biçimine ve hangi yapıdan kaynaklandığına göre başlıca iki ana gruba ayrılırlar [49].

1. *In situ* karsinomada, kanser hücreleri herhangi bir yayılma göstermeden yalnızca süt kanalları içinde büyüyüp çoğalırlar.

2. *İnvaziv* karsinoma da ise, kanser hücreleri çevre dokulara yayılma potansiyeli gösterir ve metastaz yaparlar [50].



Şekil 1.10: Meme yapısı, LCIS ve DCIS oluşumu [50].

- **Duktal Karsinoma in situ (DCIS):** Malign hücreler süt kanallarında (duktus) gelişir ve çevre dokuya yayılmamıştır.
- **Lobüler Karsinoma in situ (LCIS):** Malign hücreler lobüllerde gelişir ve lobülün dış çevresine yayılmamıştır.
- **İnvaziv Duktal Karsinom (IDC):** Malign hücreler süt kanallarında gelişir ve çevre dokulara doğru ilerleyerek invazyon gösterir. İnvaziv Duktal Karsinom bütün meme kanserlerinin %80'ini karşılar.
- **İnvaziv lobüler Kanser (ILC):** Malign hücreler lobüllerde gelişir ve meme dokusu ve çevre dokuları istila etmiştir [51].

Meme kanseri sınıflandırması, hormonlara göre de alt birimlere ayrılmaktadır. Hormon Reseptör (+) meme kanserinde, östrojen ve progesteron reseptörleri pozitifdir. Meme kanserlerinin yaklaşık olarak %60-70'ini oluşturur. Luminal grup olarak da adlandırılmaktadır. HER2 (+) meme kanserinde, yoğun miktarda 'Human Epidermal Growth Factor Receptor 2' proteinine rastlanır. HER2 proteinin çok fazla bulunması da, malign hücre gelişmesini hızlandırır. Meme kanserlerinin %20-25'ini oluşturmaktadır. Triple (-) meme kanserinde ise, hem östrojen ve progesteron

reseptörleri hem de HER2 proteini yer almamaktadır. Meme kanserlerinin %10-15'ini kapsar [52].

1.2.5. Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinde; hastalığın biyolojisi, teşhis ve tanı prosedürlerinin doğruluğu, tedavi sürecinin etkinliği, hastanın klinik başarı ve dayanıklılığı önemli etkenlerdir. Uygun tedavi stratejisinin sağlanması mortaliteyi azaltmak için etkili bir yoldur. Kanser tedavisinde cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, gen terapisi ve monoklonal antikor terapileri gibi yöntemler kullanılmaktadır. Temel tedavi yaklaşımı ise, cerrahi rezeksiyon ve sonrasında radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarıdır. Tedavi de öncelikli amaç, tümör hücrelerinin sağlıklı çevre dokuya minimum derecede hasar vererek öldürülmesidir. Cerrahi rezeksiyon, tercih edilen en temel yaklaşımdır. Hastalığın yeniden tekrarlaması durumunda, hastalar radyoterapi yöntemiyle takip altına alınır. Tümörün ilaçla tedavi edilmesi anlamına gelen kemoterapi ise en sık kullanılan yöntemdir. Bütün bu yöntemlerin tedavi edici yönlerinin dışında dezavantajları da (kemoterapide kullanılan ilaçların toksik etkisi malign hücreler üzerinde işe yararken, sağlıklı hücrelerde toksik etki göstererek, normal hücreleri tahrip etmesi) bulunmaktadır [14]. Ayrıca bu tedavi yöntemleri için, uzun zaman ve yüksek maliyet gerekmektedir. Bütün bu etkenlerde hastaları başka arayışlara yönlendirmektedir. Son zamanlarda alternatif tedavi yöntemi olarak bitki özütleri kullanımı, yan etki potansiyelinin daha düşük olmasının yanı sıra hem yeni tedavilerin geliştirilmesi açısından hem de ekonomik olmasından dolayı büyük ilgi uyandırmaktadır [18,23,27].

1.3. *Capparis ovata*

Capparaceae familyasından *C. ovata*, bütün kıtaların doğal florasında kendiliğinden yetişmekte olan tropik/subtropik bir cinstir [11]. Dünyanın birçok bölgesinde doğal olarak yetişebilen *C. ovata*, 350'den fazla tür ile temsil edilmektedir [53].

Capparis cinsinin sistematikteki yeri ise aşağıdaki gibidir [54]:

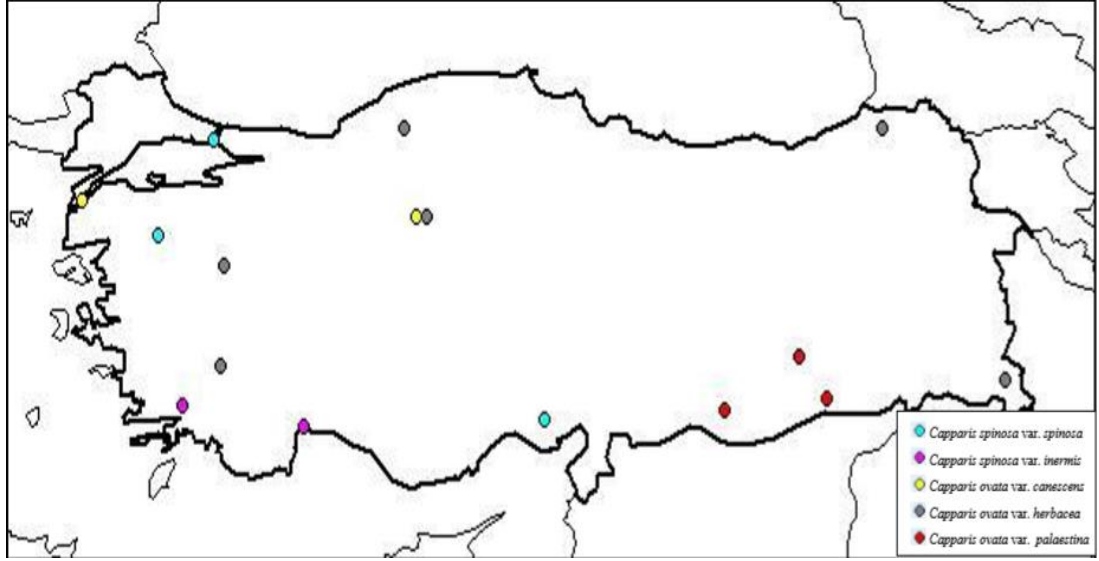
- Alem : Plantae
- Alt Alem : Tracheobionta

- Şube: Magnoliophyta
- Sınıf : Magnoliopsida
- Alt Sınıf : Dilleniidae
- Takım : Capparales
- Familya : Capparaceae
- Cins : *Capparis*
- Tür 1: *Capparis spinosa*
- Tür 2: *Capparis ovata*

Ülkemizde yalnızca *C. ovata* ve *C. spinosa* türleri ve bu iki türün de üç varyetesi bulunmaktadır (Şekil 1.11). Bunlar;

- *C. spinosa* L. var. *intermis* Turra.
- *C. spinosa* L. var. *spinosa* Zoh.
- *C. spinosa* L. var. *aegyptia* Lam.
- *C. ovata* Desf. var. *palaestina* zoh.
- *C. ovata* Desf. var. *canescens* (coss.) heywood.
- *C. ovata* Desf. var. *herbacea* willd.

Türkiye florasında yetişen bu iki tür arasında bazı morfolojik farklar görülmektedir. *C. spinosa* L. varyeteleri, çoğunlukla deniz seviyesinde ya da 200-300m rakımlı yükseklikte bulunmaktadır. Genellikle batı ve güneyde kıyı kesimlerde yetişen *C. spinosa*, 2,5 m'ye kadar uzayabilmektedir. *C. ovata* varyeteleri ise *C. Spinosa*'ya göre, fazla boylanmayan yerde yatay kümeler şeklinde bulunan 1500-2000m rakımlı yüksekliklerde yetişebilen bir formdur [55].



Şekil 1.11: *Capparis* taksonlarının ülkemizde varyete dağılımları [56].

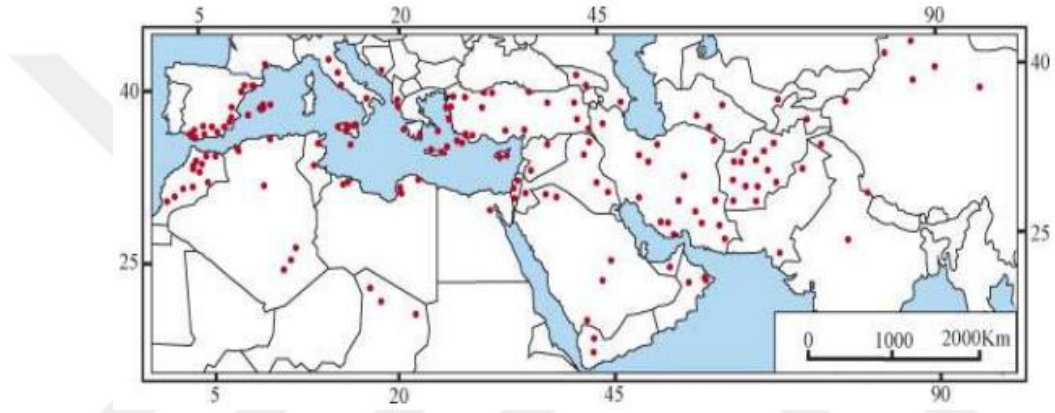
Çok yıllık çalı formunda olan *C. ovata*, kalın ve derin köklere sahiptir. Kökleri genellikle 20cm derinlere inebilen kazık köktür. Bu derin kök sistemi, bitkiyi elverişsiz çevre koşullarına ve kuraklığa karşı dayanıklı kılmaktadır. Güneş seven bir bitki olan *C. ovata*, en sıcak ve kurak bölgelerde de kolaylıkla yetişebilmektedir. Yarı odunsu yapıdaki gövdesi, 50-100cm yüksekliğinde yatık ve çok sayıda dallıdır (Şekil 1.12). Bitkinin oval veya yuvarlak şekilli olan yaprakları koyu renkli, düz kenarlı ve yüzeyi tüylüdür. Pembe, beyaz ve menekşe renkli çiçekleri genellikle büyük ve gösterişli olmakla birlikte dörder tane çanak ve taç yaprak bulundurur. Meyveleri üzüm, çokça tohumlu ve karpuzcuk şeklinde etli oval bir kapsül görünümündedir [53,57].



Şekil 1.12: *C. ovata* bitkisi [54].

Dünya üzerinde oldukça geniş bir yayılış gösteren *C. ovata*, başta Akdeniz ve Batı Asya ülkeleri olmak üzere, doğuda Hazar Denizi, kuzeyde Ermenistan ve Kırım, batıda

ise Kanarya Adalarına kadar dağılım gösteren bir bitki olup [58-60] Türkiye’de başta Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu illerinde görülse de nem seviyesinin az olduğu hemen hemen her yerde yetişebilmektedir (Şekil 1.13) [15,61,62]. Dünyada; Kapernbaum veya Capern (Almanya), Kabra (Bangladeş), Capres, Fabagelle, Tapan, Caprier, Taperier veya Tapenier (Fransa), Kappertjes, Kappernboom veya Kaperstruik (Hollanda), Caper Plant (İngiltere), Alcaparra, Cappara veya Alcaparrón (İspanya) ve Capper, Capparo, Cappara veya Caper-plant (İtalya) gibi farklı isimlerle anılmaktadır [54]. Ülkemizde ise bölgesel olarak değişik isimlerle adlandırılan bu bitki, çoğunlukla ‘kapari’, ‘gebre otu’ veya ‘kebere’ diye bilinmektedir [15].



Şekil 1.13: *Capparis* türlerinin dünya üzerinde yayıldığı bölgelerin haritası [60].

Adını eski Yunancadan alan *C. ovata*, ilk çağlardan bu yana gıda ve tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır [53]. Uluslararası ölçekte önemli ticari bir değeri olan *C. ovata*’nın özellikle çiçek tomurcukları ve meyveleri, hem protein hem de mineral yönünden zengin ve besleyici içeriğe sahiptir [56,61,62]. Antik çağlardan bu yana halk arasında özellikle meyveleri ve tomurcukları antiinflamatuvar, antioksidan, antitümöral, analjezik, antialerjik, antiromatizmal, antimikrobiyal, antifungal, antihipertansif, antihiperlipidemik ve diüretik etkilerinin yanı sıra balgam söktürücü, ağrı giderici olarak da kullanılmaktadır [63,64]. Çin, İran, ve Yunanistan gibi bir çok ülkenin tıp sistemlerinde de, *C. ovata* bitkisi önemli bir tedavi kaynağı olarak değerlendirilip, antispazmodik, antihelmintik, diüretik, ve ekspektoran olarak kullanılmıştır [57,65]. Yüksek antioksidan içeriğine sahip olan *Capparis* metanolik ekstralarının, demir oto-oksidasyonunu yükselterek ferröz demiri ferrik şekle çevirip, hidroksil radikal oluşumunu azalttığı ve sahip olduğu fenollere bağlı olarak antioksidan özellik gösterdiği bilinmekle birlikte [17] oksidatif stres kaynaklı kansere karşı koruyucu

olduğu da ileri sürülmüştür [16]. Bilhassa çiçek tomurcuğu, kanserli hücrelerin baskı altına alınmasında ve antitümöral aktivite sağlayan ekstraktların hazırlanmasında kullanılmaktadır [16,17]. İlaç kaynağı olarak kullanımının yanı sıra yaşlanma karşıtı etkisiyle de ortaya çıkartılan *Capparis*, kozmetik sektöründe de yer edinmektedir. İçeriğinde bulunan E vitamini sebebiyle yaşlanmayı geciktirici ve cildi gençleştirici yönüyle ön plana çıkmıştır. Bu bağlamda birçok kozmetik ürünün içerisine girmeyi başaran kaparinin, saç dökülmelerine karşı birçok merhem yapımında da kullanılmaktadır [15].

Sağlık açısından oldukça faydalı bir bitki olan *Capparis*; zengin besleyici bir değere sahiptir. Yaygın bulunan *C. spinosa* ve *C. ovata*'nın içerikleri Tablo 1.5' te verilmiştir.

Tablo 1.5: *C. spinosa* ve *C. ovata* bitki türlerinin temel içerikleri [66].

İçerik	Birim	<i>C. spinosa</i>	<i>C. ovata</i>
Su	%	6,50	8,60
Protein	%	20,23	19,55
Yağ	%	27,74	28,66
Selülöz	%	28,24	29,67
Karbonhidrat	%	71,00	-
C vitamini	mg/100 g	0,54	8,80
Ca	mg/kg	2100	-
Fe	mg/kg	60	-
Zn	mg/kg	40	-

C. ovata'nın içerdiği başlıca yağ asitleri miktarları ise, oleik (39,64%), palmitik (9,85%), stearik (2,38%), linoleik (21,38%) ve linolenik asit (0,43%) şeklinde tayin edilmiştir [56]. *C. ovata*'nın tomurcuklarındaki başlıca uçucu bileşikler benzil alkol (% 20,4), furfural (% 7,4), etanol metil pentil asetal (% 5,9), 4-vinil guaiacol (%5,3), timol (% 5,1), octanoik asit (% 4,8) ve metil isotiosiyanat (% 4,5), yapraklarında ise metil isotiosiyanat (% 20,0), timol (% 15,5), 4-vinil guaiacol (% 4,3), hekzil asetat (% 3,6) ve trans-theaspiran (% 2,6) olarak bildirilmektedir [67].

Capparis çiçek tomurcukları, kök kabukları ve meyvesi türlere göre farklılık gösteren miktarlarda protein, lipid, alkaloid, polifenol, glukosinolat, flavonoid içermektedir (Tablo 1.6). Bitkinin kök kısımları alkaloid olan isokodonokarpin ve capparispin, linoleik ve oleik asit gibi şeker türevleri içerirken tohumlarında oleik ve linoleik asitin yanı sıra, yüksek oranda sterol ve tokoferol bulunmaktadır. Son olarak toprak üstü kısımları ise kalsiyum, fosfor, potasyum gibi mineraller, glukosinolatlar, alkaloidler ve kuaterner amonyum bileşikler içermektedir [68,69]. Özellikle flavonoidler bitkiye tıbbi ve aromatik etkilerini veren, antioksidan ve antienflamatuar özellikleriyle bilinen ve kansere karşı potansiyel etki taşıyan ana bileşenlerdir. Bu flavonoidlere örnek olarak quercetin 7-rutinoside, quercetin 3-glucoside-7-rhamnoside, kaempferol-3-rutinoside, kaempferol-3-glucoside ve kaempferol-3-rhamnorutinoside verilebilir. Çiçek tomurcuklarında yer alan fenolik bileşenler arasındaki ana bileşen, rutin (quercetin 3-rutinoside), ikincil olarak da kaempferol-3-rutinoside gelmektedir. Toplam flavonoid içeriğinin %86,5'i rutin (quercetin 3-rutinoside) dir [70-72].

Tablo 1.6: *C. spinosa* ve *C. ovata* bitki türlerinin yapısında yer alan fitokimyasallar [66,68,69].

İçerik	Birim	<i>C. Spinosa</i>	<i>C. Ovata</i>
Total Fenol	mg/100g	1,98	1,76
Total Karetenoid	mg/100g	3,91	-
Total	%	83,43	83,72
Rutin	mg/100g	1352,71	-
Tokoferol	mg/100g	40,48	-

Ayrıca kapari kök ve yapraklarında bulunan indol-3-metil glukosinolat ve bunların hidroliz ürünleri, kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Zengin selenyum miktarına sahip olmasıyla, bazı kanser formlarını engelleme potansiyeline sahiptir. Uluslararası birçok çalışma sonucunda, kanser araştırma enstitüsü *Capparis*'in antitümöral etkisini kanıtlamıştır [71].

1.3.1. *Capparis* Türlerinde Görülen Önemli Bazı Biyolojik Aktiviteler

Antioksidan aktivite: *Capparis* bitkisinin tomurcuklarında lipid, alkaloid, ve glukokaperin gibi glukosinolatlar ve antioksidan aktivitesine sahip olan flavonoid ve

çeşitli polifenoller mevcuttur. Çokça bulunan flavonoidin rutin olduğu bilinmektedir. *Capparis* özütlerinin hidrojen donörü olarak görev aldığı ve lipid radikallerle tepkimeye girerek antioksidan özellik sergilediği bildirilmiştir. Aynı zamanda metanolik ekstrelerinin de demir oto-oksidasyonunu yükselterek ferröz demiri ferrik şekile çevirip, hidroksil radikal oluşumunu azalttığı ve sahip olduğu fenollere bağlı olarak antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir. *C. ovata*'nın antioksidan özelliğinin 4-vinil guaiakol, guaiakol, vanillin ve timol gibi fenolik bileşiklerden kaynaklandığı söylenebilir [56,73]. Elde edilen veriler 100 ve 1000 g/ml konsantrasyonundaki ekstrelerinin lipid peroksidasyonunu %90 oranına kadar azaltabildiğini göstermektedir [74]. Metanol ekstresinin sahip olduğu bu antioksidan etki, içerdiği yüksek orandaki fenolik bileşiklerden gelmektedir. Diğer yandan etanol ekstresinde yer alan quercetin ve kaempferol da güçlü birer antioksidandır [74].

Antitümöral ve immünostimülan aktivite: *Capparis*'in içeriğinde yer alan biyolojik olarak aktif maddelerden karotenoidler, tokoferoller ve fenolik bileşikler antitümöral etkiye sahiptirler. Bazı glukozinolatların (benzyl-,p-hydroxybenzyl-, ve 2-hidroxybut-3-enyl glukosinolat) antikanser aktivite gösterdiği bilinmektedir [75]. Yine farklı *Capparis* türlerinden izole edilen 6-methoxy-2methyl-4-carbaldehyde, 2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one ve *Cappamensin A*, tümör hücrelerini inhibe ettiği bildirilmiştir. *Cappamensin A*'nın meme, akciğer, ovaryum, nazofarengeal ve ileoçekal tümör hücre gruplarında antitümöral etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir [76]. *C. spinosa* meyve ekstraktının hepatoma HepG2 hücrelerinde antikanser aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Yine *C. spinosa* tohumlarının antifungal ve HIV-1 reverse transkriptazı inhibe ettiği ve tümör hücrelerine karşı antiproliferatif etki gösterdiği bilinmektedir [77]. *C. sikkimensis*'in de bitki köklerinin tümör inhibitörü olarak etki ettiği bildirilmiştir [78]. *Capparis* de bulunan bazı karotenoidler, hamsterlerin ağız mukozasında oluşturulan karsinogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir [79]. *C. spinosa* tomurcuklarının metanol ekstresinin, herpes simplex virüs Tip 2'nin yayılmasını baskıladığı ve interferon- γ , interleukin-12 ve TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu arttırdığı ortaya çıkartılmıştır. Analjezik ve antipiretik etkiye sahip olan *C. zeylanica* yaprak ekstresi de immünostimülan etki göstermektedir [80].

Antimikrobiyal ve antibakteriyel aktivite: Bazı *Capparis* türleriyle hazırlanan çeşitli ekstraktların bir takım antimikrobiyal aktiveye sahip olduğu bilinmektedir.

Bunlardan *C. spinosa* ekstreleri, Plasmodium falciparum'a karşı potansiyel etkilere sahiptir. Kültür ortamına ekilen *C. spinosa* ekstraktı *Dermococcus radophilus* popülasyonunda büyük ölçüde azalmaya yol açarken, *E. Coli* üzerine yapılan testlerde antibakteriyel etkinin görülmediği bildirilmiştir. Yine *C. spinosa*'nın timol içeren yaprak yağının antibakteriyel etkisi bildirilmiştir. Ayrıca antiseptik ve antiplak özellik gösteren timol güçlü bir fungusit olarak da değerlendirilmektedir [74,81]. *C. grandiflora* köklerinin; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumillus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* gibi farklı türde birçok mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi rapor edilmiştir [82]. *C. decidua*'nın da, *E.Coli*, *Proteus mirabilis*, *S. Aureus* ve *C. Albicans*'a karşı antimikrobiyal etkileri bildirilmiştir. *C. decidua* bitki tohumlarının; *Vibrio cholera*'ya karşı engelleyici olduğu görülmektedir [83]. *C. tomentosa* ekstresi de, *S. Aureus* ve *Streptococcus pyogenes*'e karşı inhibitör etkilere sahiptir [84]. *C. zeylanica*'nın eter ekstresi de *Stafilococcus aeurus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* türü bakterilerin büyümesini önlediği gösterilmiştir [70]. Genel olarak *Capparis* türlerinin ekstraktlarının trikofiton türü mantarlara karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [85].

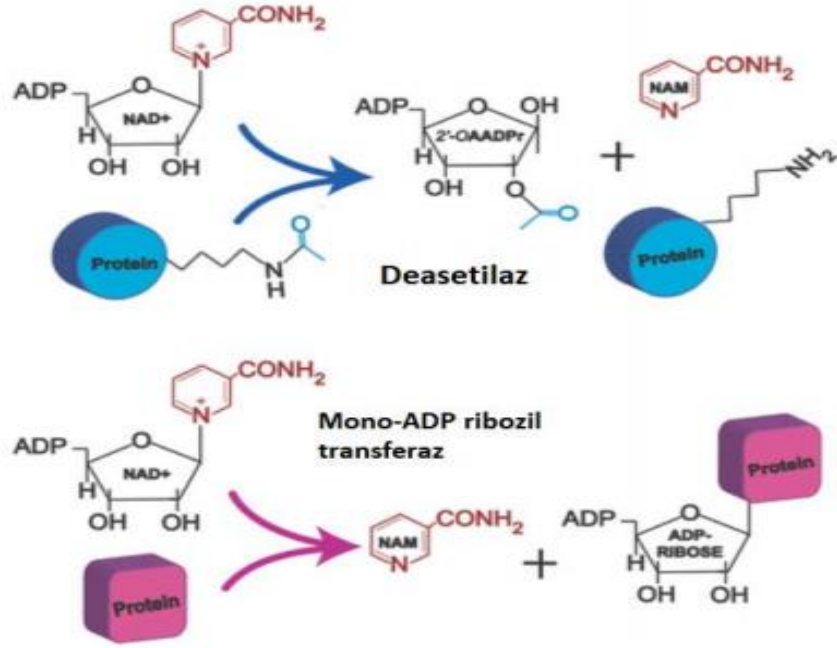
Anti-inflamatuar, antipiretik, analjezik ve antitrombotik etkileri: Önemli oranda anti-inflamatuar etkinliği olan *Capparis* türlerinin, bu etkiyi siklooksijenaz yolağında prostoglandin ve diğer yangı yapıcı mediyatörlerin oluşumunu inhibe ederek aldıkları bildirilmektedir. *Capparis*'in yapısında bulunan biyoflavanoidlerin, Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB) aktivasyonunu engelleyerek antiinflamatuvar aktivite sergilediği gözlemlenmiştir [86]. *C. ovata*'nın metanol ekstreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda analjezik etkisi ile anti-inflamatuar ve antitrombotik etkileri ispatlanmıştır [87,88]. Aynı şekilde *C. spinosa* ve *C. decidua* ekstrelerinin antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir. *C. zeylanica* yaprak ekstreleri de analjezik ve antipiretik etkiye sahiptir [80].

1.4. Sirtuin Proteinleri

Sirtuinler her deasetilasyon döngüsünde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) molekülünü kullanan sınıf III histon deasetilaz proteinleridir. İlk kez Klar ve ark. (1979) tarafından *Saccharomyces cerevisiae* adlı mayada keşfedilip, *silent*

information regulator 2 (Sessiz bilgi düzenleyici 2) (Sir2) olarak adlandırılmıştır [89]. Sir2 türdeşi olan sirtuin genleri, mayaların replikatif ömürlerini arttıran bir gen ve bakterilerden memelilere kadar birçok organizmada homolog olarak tanımlanmıştır [5,89,90]. Memeli sirtuin ailesi; hücre içi lokalizasyonu, doku dağılımı ve protein substratları farklılık gösteren yedi sirtuinden (SIRT 1-7) oluşmaktadır. Bu yedi izoformun her biri korunmuş 273 aminoasit katalitik çekirdek alanına sahiptir. Bu katalitik alanı çevreleyen N-terminal ve C-terminal sekanslarının uzunlukları değişen sirtuin üyeleri içinde farklılık gösterir [91]. Farklı dokularda, çeşitli miktarlarda bulunan sirtuinlerin hücre içi lokalizasyonunda da farklılık vardır. SIRT-1,-2, -6 ve -7 çoğunlukla nükleusta, SIRT-3, -4, ve -5 mitokondride, SIRT-1 ve -2 ise hem nükleus hem de sitoplazmada lokalizedir (Tablo 1.7) [92].

Sirtuinler, ayrıca histon III deasetilazı (HDAC-III) olarak tanımlanırlar. Histon deasetilazlar, histonların amino kuyruklarındaki lizin ve asetil gruplarını (Histon olmayan proteinlerden) çıkartan enzimler olarak bilinmektedir. Histonların deasetilasyonu, kromatin etkinliğinin durmasını ve akabinde genleri downregülasyonuna neden olurken, histon olmayan proteinlerin deasetilasyonu ise hücre döngüsü ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesinden sorumludur [93]. Sirtuinler hücre yaşamı, transkripsiyon, DNA onarımı, genom stabilitesi, inflamasyon ve uzun ömürlülük gibi birçok biyolojik faaliyetin yanı sıra kanser, diyabet, karaciğer yağlanması, yaşlanmaya bağlı hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıklarda da önemli düzenleyiciler olup strese bağlı sinyal yollarında yer alan enzimlerdir [1]. Sirtuinler lizin kalıntılarının ϵ -amino grubundan bir asetil grubunun deasetilasyonunu uzaklaştırırlar (Şekil 1.14). Sirtuinler, NAD^+ kullanarak ve nikotinamid (NAM) ve 2'-O-asetil-ADP-riboz oluşturarak değişik birçok proteinlerin deasetilasyonunu katalize ederler. Nikotinamid (NAM), nikotinamid mononükleotid adeniltransferaz (NMNAT), nikotinamid fosforiboziltransferaz (NAMPT) enzimleri ve nikotinamid mononükleotid (NMN) ara molekülü ile bu döngü sürdürülmektedir [94]



Şekil 1.14: Sirtuinlerin enzimatik aktivitesi [91].

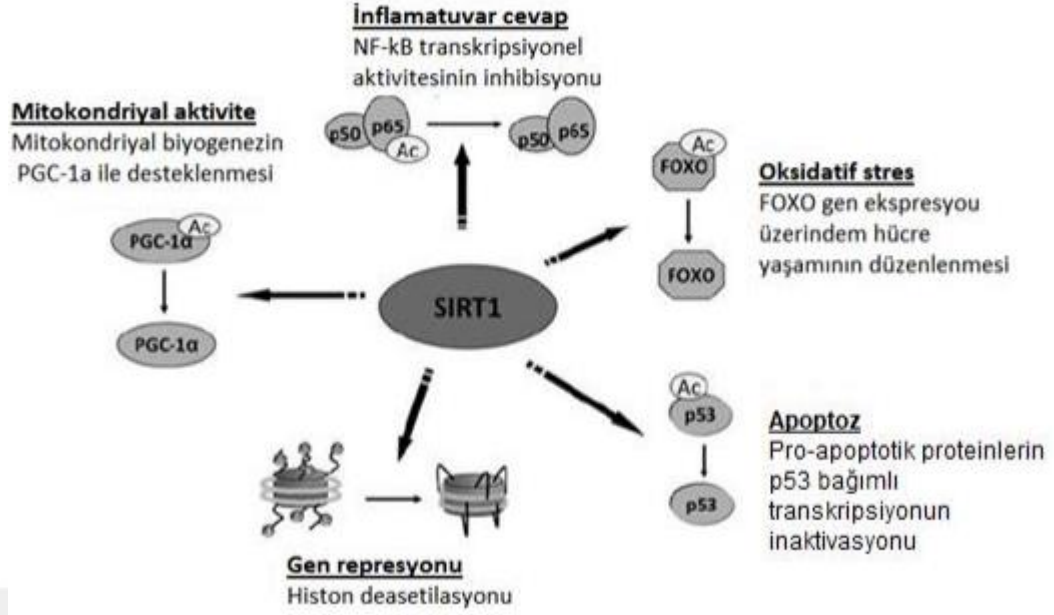
Hücrenin sitolojik enerji durumu NAD⁺'a bağlıdır. Yağların β-oksidasyonu, glikolizis, protein degradasyonu ve TCA siklusu gibi katabolik tepkimeler NAD⁺'ı NADH'a çevirir. Hücrede yüksek enerji durumunda NADH seviyesi artar, NAD⁺ azalır. Metabolizma ile bağlantılı olan sirtuinlerin enzimatik aktiviteleri için doğrudan NAD⁺ gerekmektedir. Herhangi bir hücresel stres veya düşük enerji hali hücredeki NAD⁺/NADH oranını yükseltir, NAM seviyesini düşürür ve sirtuinleri çalıştırır [95,96].

Tablo 1.7: Sirtuinler: lokalizasyonu ve fonksiyonları [97].

Sirtuin	Hücre içi Lokalizasyon	Enzimatik Aktivite	Fonksiyonları
SIRT 1	Çekirdek Sitoplazma	Deasetilaz	Fakültatif ve yapısal kromatin oluşumu Mitokondrial biyogenez Yağ asidi oksidasyonu Kolesterol ve safra asidi homeostazının düzenlenmesi
SIRT2	Sitoplazma Çekirdek	Deasetilaz	Hücre döngüsü düzenleme Adipositlerde lipolizi arttırma Tümörbaskılama/arttırma Nörodejenerasyon
SIRT3	Mitokondri	Deasetilaz	Mitokondriyal aktivitenin düzenlenmesi Oksidatif strese karşı koruma Tümör baskılama
SIRT4	Mitokondri	ADP-ribozilaz Deasetilaz	Glukoz metabolizması Amino asit katabolizması Tümör baskılama
SIRT5	Mitokondri Sitoplazma Çekirdek	Deasetilaz Demalonilaz Desüksinilaz Deglutarilaz	Üre döngüsü Yağ asidi metabolizması Amino asit metabolizması
SIRT6	Çekirdek	ADP-ribozilaz Deasetilaz	Genomik stabilite/ DNA onarımı Glukoz ve lipit metabolizması İltihap

1.4.1. Sirtuin Ailesinin Üyeleri

Güçlü bir deasetilasyon aktivitesi gösteren SIRT1 en çok araştırılan ve en iyi karakterize edilen sirtuindir. SIRT1; p53, FOXO, Ku70, P300, Rb, E2F1, NF- κ B, p73, PGC-1 α ve PPAR γ gibi çoklu proteinleri hedefleyerek hücrel yaşlanma, hücre döngüsü progresyonu ve apoptoz süreçlerinde yer alan proteinleri deasetile etmektedir (Şekil 1.15) [98]. Karaciğer, beyin, kas, pankreas, testis, over ve adipoz dokularında bol miktarda sentezlenmektedir [99]. Çeşitli etkilere sahip olan SIRT1 özellikle onkogenik olmasıyla ön plana çıkmaktadır. Onkogen mekanizması multi-faktöriyel olan SIRT1, kanser hücrelerinde hipermetile olan genlerin epigenetik susturulmasında büyük bir paya sahiptir [100].



Şekil 1.15: SIRT1 fonksiyonları [99].

SIRT1, p53'ü deasetilize ederek transkripsiyonel etkinliği düşürür, oksidatif strese ve DNA hasarına karşı apoptozisi baskılar [100]. DNA onarım elemanı olan Ku70'i deasetile ederek apoptozis aktiviteyi inhibe eder. SIRT1, DNA replikasyonunda görevli üç FOXO proteinini (FOXO1, FOXO3a ve FOXO4) deasetilize eder. SIRT1 apoptozise sebebiyet veren stresi azaltarak, yani DNA tamirini regüle ederek, fibroblastlarda ile nöronlardaki FOXO3a'yı regüle etmektedir [101]. FOXO4 ile beraber çalışarak da malignan hücrelerde apoptozu indükleyici proteaz kaspaz-3 ve 7'yi baskılamaktadır [102].

Özellikle kolon kanserlerinde prognozu belirleyen molekül olarak p53'ün dışında, SIRT1'in önemli bir yeri vardır. SIRT1 ekspresyonunun, HCT116 hücrelerinde koloni oluşumunu engellediği bildirilmiştir [103]. Kabra ve ark. (2009) tarafından yapılan yine aynı çalışmada SIRT1'in siRNA ile susturulmasının ksenograft modelinde tümör oluşumunu arttırdığı fakat SIRT1 inhibisyonu ile hücrelerin kemoterapi ilaçları tarafından apoptozu duyarlı hale gelebileceği belirtilmektedir [103]. Kolon mukozası, normal mukoza ve benign adenomalarda immünohistokimyasal boyama ile yapılan çalışmalar sonucunda, yüksek SIRT1 düzeyinin var olduğu, SIRT1 ekspresyonun evre I/II/III kolorektal adenokarsinomaların yaklaşık olarak %25'inde ve ileri evre IV tümörlerinde de seyrek olduğu raporlanmıştır. Karsinomaların %30'unda da normalden daha az seviyede SIRT1 ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle

kolon kanseri tedavisinde, SIRT1 aktivatörleri ve inhibitörlerinin önemli bir yere sahip olduğu desteklenmektedir [103].

Diyet değişikliklerine cevaben enerji metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar bir role sahip olan, peroksizom proliferatörü ile aktive edilmiş reseptör- γ koaktivatör 1 α (PGC-1 α); karaciğerde glukoneogenezin düzenlenmesinde ve yağ asidi oksidasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir [9]. SIRT1, yetişkin beyninde sinaptik plastisite ve hafıza oluşumunu düzenleme yetisine de sahiptir. Ayrıca alzheimer, parkinson, huntington hastalığı, motor nöron hastalıkları ve multipl skleroz gibi çeşitli nörodejeneratif rahatsızlığı iyileştirme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir [104]. Sitoplazmik bir protein olan SIRT2 ise oksidatif stresi modüle etme ve yağ hücresi proliferasyonunu inhibe etmede görevli sirtuindir. SIRT2 geni ayrıca FOXO3a'yı deasetile ederek hücre stres altındayken antioksidan moleküllerin ekspresyonunu desteklemektedir. Sitoplazmik bir deasetilaz olan SIRT2, genel olarak tümör supresör olarak da kabul edilir. SIRT2 geni çıkarılmış erkek farelerde yaşlandıkça hepatosellüler karsinom gelişirken, dişilerde meme dokusunda tümörler gelişmektedir. SIRT2 ekspresyonu gliomalarda azalır ve SIRT2 glioma hücre hatlarının koloni oluşumunu inhibe eder. Aynı şekilde SIRT2 ekspresyonu özofagus adenokarsinomlarda, gastrik adenokarsinoma ve HNSCC' de azalır. SIRT2 ayrıca FOXO1 deasetilasyonu yoluyla yağ hücresi farklılaşmasını düzenlemektedir. Bunların yanı sıra α -tubulin'i deasetile ederek, oligodendroglial farklılaşmada da rolü bulunmaktadır [105-107].

Mitokondriyal protein olan SIRT4 bütün dokularda eksprese edilir. Pankreas ve karaciğerin β hücrelerinde, intrasellüler düzenleyici olarak çalışır. Aktivitesini ADP-ribozilleyerek gösterir [108]. Ayrıca hepatosit ve miyositlerdeki yağ asidi oksidasyonunu ve mitokondriyal gen ekspresyonunu regüle ettiği de bildirilmiştir [5]. SIRT4 de genellikle tümör baskılayıcı olarak kabul edilir. SIRT4'ün aşırı ekspresyonu glutamin metabolizmasını inhibe ederek, HeLa ve Myc aracılı Burkitt lenfoma hücrelerinin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir. SIRT4 ekspresyonunun normal dokulara göre insan mesane, meme, kolon, gastrik, yumurtalık ve tiroid karsinomlarında önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur [109].

Çok zayıf deasetilasyon aktivitesine sahip bir mitokondriyal protein olan SIRT5 geni, yalnızca deasetilaz değil, desüksinilaz ve demalonilaz etkinliklere de sahiptir [5]. PGC-1 α ve AMPK'nin kontrolü altında olan SIRT5, mitokondriyal enerji metabolizmasının düzenlenmesinden sorumludur. Elektron taşıma zinciri (ETC), TCA döngüsü ve glikolizisin bulunduğu çoklu enzimlerin etkinliğini organize ettiği ve mitokondriyal kaynaklı ROT seviyelerinin engellenmesinde büyük payı olduğu bilinmektedir [110].

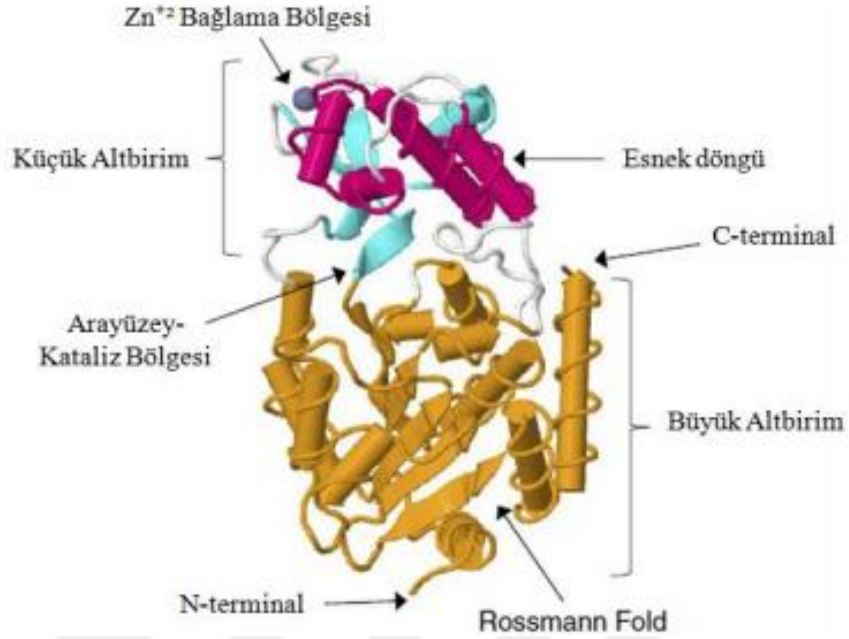
Nükleer bir protein olan SIRT6 geni öncelikle transkripsiyonel düzenlemeyi etkilemektedir. Hücresel düzeyde stres-yanıtı ve metabolizma ile alakalı genlerin ekspresyonundan sorumlu olan SIRT6 ayrıca DNA tek zincir ve çift zincir kırıkları onarım yollarını düzenleyerek, telomerleri korur ve böylelikle genomik kararlılığı sağlamaktadır [111]. Bunların yanı sıra farklı prensiplerle metabolizmayı da desteklemektedir. SIRT6 hem deasetilaz hem de monoADP-riboziltransferaz gibi davranır. Kanseri patogenezinde tartışmalı bir role sahip olan SIRT6, genellikle tümör baskılayıcı olarak kabul edilmektedir [106].

SIRT7 hakkında enzimatik ve fizyolojik aktiviteleri ile ilgili araştırmaların sayısı oldukça az olsa da, son yapılan çalışmalar SIRT7'nin biyolojik aktivitelerinin önemini vurgulamaktadır. RNA polimeraz I transkripsiyonunu etkinleştirip p53'ü deasetile ettiği bilinmektedir [5]. Barber ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada SIRT7'nin histon H3'ün (H3K18) asetile edilmiş lizin 18 için yüksek seçiciliği olan bir NAD⁺ bağımlı deasetilaz olduğu ve tümör baskılayıcı genlerin (örneğin, NME1 ve COPS2) transkripsiyon faktörü ELK4'e bağlı bir şekilde transkripsiyonunu kısıtladığını bildirmişlerdir [112]. Tüm bunların yanında, son yıllarda SIRT7'nin kalp üzerindeki önemi de anlaşılmaya başlanmıştır. SIRT7 nakavt farelerde, p53 hiperasetilasyonu ile ilişkili kardiyak hipertrofi görülmüştür [113,114].

1.4.2. SIRT3

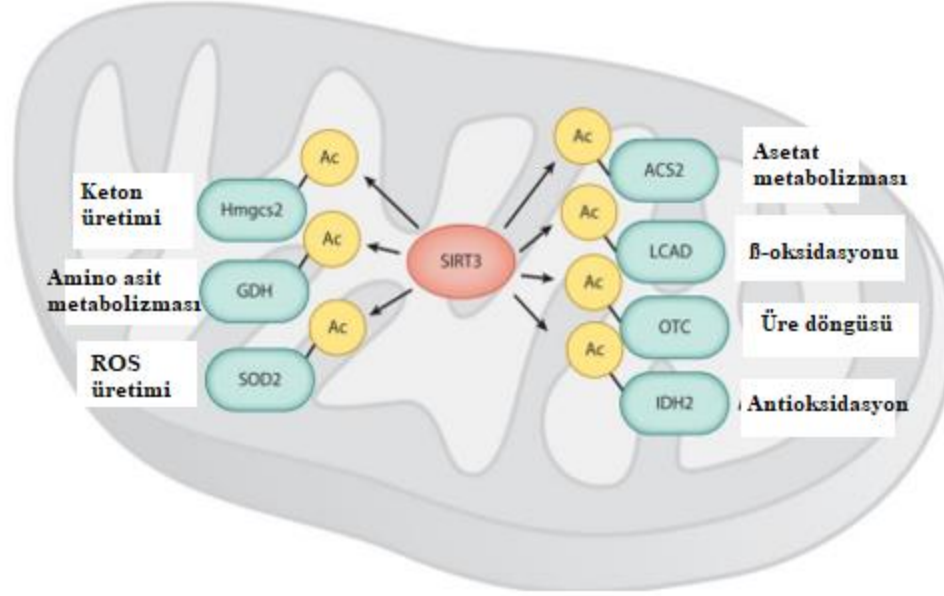
Temel mitokondriyal deasetilaz olan SIRT3 geni, metabolik homeostazdan sorumludur. Çözünür bir mitokondriyal matriks proteini olan SIRT3, Şekil 1.16'da görülen iki alt birimden oluşur ve korunmuş bir enzimatik çekirdek içermektedir. Rossmann fold domaini olarak isimlendirilen büyük alt birim NAD⁺ bağlar. Küçük alt

birim ise, çinko bağlama bölgesi ve büyük alt birim tarafından oluşturulan sarmal bir demete sahiptir. Tepkime için, asetillenmiş substrat peptidi ve NAD⁺ yeterlidir [115].



Şekil 1.16: SIRT3 proteinin konformasyonel yapısı [95].

Birçok mitokondriyal proteininin tersinir bir deasetilasyon işlemiyle aktivitesini kontrol eden SIRT3, önemli bir metabolizma düzenleyicisidir (Şekil 1.17) [116]. SIRT3 ekspresyonu beyin, böbrek, kalp, karaciğer, kahverengi yağ dokusu ve iskelet kasında yüksek seviyede bulunurken plasenta, ovaryum ve akciğerde ise daha az seviyede olduğu saptanmıştır [117,118].



Şekil 1.17: SIRT3'ün etki ettiği mitokondriyal fonksiyonun anahtar yönleri [116]. Mitokondride lokalize olan SIRT3'ün ilk protein substratı, asetattan asetilCoA sentezleyen Asetil-CoA sentetaz 2 (ACS2) enzimidir. SIRT3, ACS2 enzimini deasetile ederek etkinliğini arttırmaktadır. Kalp ve kasta fazlaca bulunan ACS2'nin açlık ve ketogenez sürecinde ekspresyonu artmaktadır [119,120].

Hidroksi metil glutaril CoA sentaz 2 (HMGCS2), β -hidroksibutirat sentezinde hız sınırlamadan sorumlu enzimdir. Açlık ve glikoz seviyesinin düşük olduğu durumlarda keton cisimlerin üretimini indüklemek için SIRT3 bağlantılı HMGCS2 aktivasyonu gerekmektedir. SIRT3, HMGCS2 enzimini deasetilleyerek etkinliğini desteklemektedir [5,121].

TCA siklusunun en önemli düzenleyici olan izositrat dehidrogenaz 2 (IDH2) enzimi, antioksidanların NADPH'a bağlı olarak rejenerasyonuna yardımcı olmaktadır. SIRT3, IDH2 enzimini deasetile ederek etkinliğini yükseltir; böylelikle artan IDH2 antioksidanların yenilenmesini destekleyerek TCA siklusunu hızlandırır. Aynı şekilde mitokondriyal metabolizmanın anahtar düzenleyicisi olan glutamat dehidrogenaz enzimi de SIRT3 tarafından deasetillenerek etkinliği artmaktadır [5,122].

Ornitin transkarbomoylaz (OTC) aminoasit yıkımı sırasında açığa çıkan amonyağı detoksifiye ederek üre döngüsünde önemli rol oynar. Kalori kısıtlaması durumunda, SIRT3 direkt OTC enzimini deasetilleyerek etkinliğini çoğaltır ve üre döngüsünü artırır [123].

Süksinat dehidrogenaz (SDH) enziminin, mitokondriyal metabolizmada oksidatif fosforilasyona katılmasının yanı sıra TCA siklusunda da büyük payı vardır. SIRT3, SDH enziminin SdhA alt birimini deasetile ederek enzimin aktivitesini yükseltir ve aynı zamanda oksidatif fosforilasyonu regüle eder [124].

Uzun zincirli açıl-CoA dehidrogenaz (LCHAD), doymamış yağ asitlerinin β -oksidasyonunda önemli görevi olan mitokondriyal enzimlerden biridir. LCHAD enziminin lizin 42'de hiper-asetillenmesi durumunda enzimatik aktivitesinde gerileme olmaktadır. Bu durumda SIRT3, LCHAD enziminin etkinliği deasetilleyerek düzene koyar [125].

Ayrıca elektron transport zincirindeki Kompleks I'ı deasetile ederek etkinliğini arttıran SIRT3'ün, mitokondride ATP sentezini regüle ettiği ve böylelikle mitokondriyal enerji metabolizmasında fonksiyonel bir düzenleyici olduğu bilinmektedir [126].

Mitokondriyal enerji metabolizmasındaki bozukluklar genellikle hücrel oksidatif stres ile bağdaştırılır. Sirtuin aracılı deasetilasyon; oksidatif stres bağımlı pnömoni, yaşlanma, kanser, kardiyak disfonksiyon, nöral dejenerasyon gibi hastalıklara karşı koruyucu olarak ROT'u düşürmek için sorumlu enzimleri aktive etmektedir [127]. SIRT3, antioksidan savunma sistemini geliştirerek hücrel ROT seviyesini koruyan önemli bir deasetilazdır. SOD2 ve IDH2 enzimlerinin aktivitelerini yükselterek, hipoksi ile indüklenen faktör1- α aktivitesini ise baskılayarak ROT seviyesinin düşürülmesini ve böylelikle oksidatif strese karşı dirençli olmayı sağlamaktadır (Şekil 1.18). SIRT3 defekti olan farelerde, kalori kısıtlaması durumunda oksidatif stresin düşürülmesi için SIRT3'ün gerekliliği Şekil 1.18'de gösterilmiştir [128].

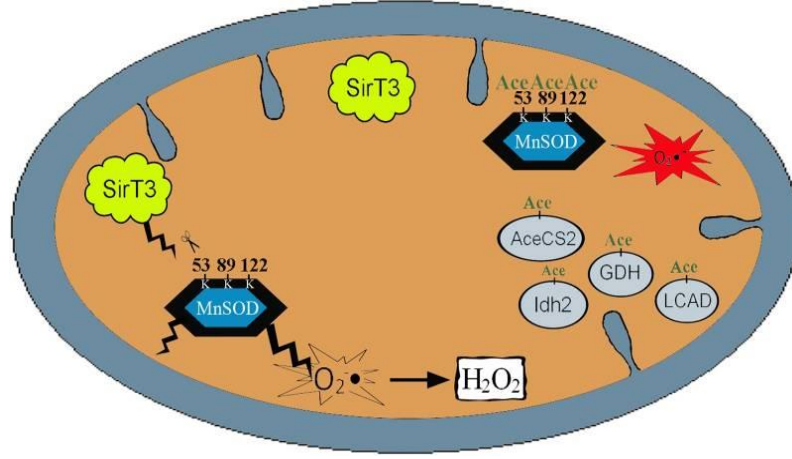


Şekil 1.18: SIRT3 aracılı SOD2 aktivasyonu [128]

Bir diğ er önemli faktör de ROT düzeyinin nükleik asitlere hasar vererek, oksidatif stresin t m rigeneze sebep olmasıdır. Yapılan  alışmalar sonucunda SIRT3 defekti olan farelerin kansere karşı daha duyarlı hale geldikleri ve insan meme kanserleri ile diğ er bazı tümörlerin de sağlıklı dokulara nazaran azalmış SIRT3 seviyeleri içerdiği belirtilmiştir. SIRT3 mitokondriyal metabolizmayı, oksidatif stresi ve ROT üretimini düzenleyen proteinlerin asetilasyon durumunu kontrol ederek, kanser h creti çoğalmasının önüne geçmektedir [3,4].

Mitokondriyal matrikste lokalize olan MnSOD ise süperoksit radikallerini temizleyebilen önemli bir enzimdir ve oksidatif strese karşı esas savunmayı sağlamaktadır. MnSOD enzimatik aktivitesinin proteinlerdeki spesifik evrimsel olarak korunmuş lizinlerin, reversibl asetilasyonu ile düzenlendiği gösterilmiştir.

Özden ve ark. (2011)  alışmalarında, SIRT3' n MnSOD ile fiziksel olarak etkileşime girdiğini ve lizin 122'nin deasetile edildiğini göstermişlerdir [7]. Lizin 122, arginin (deasetile edilmiş halde) olarak değiştirildiğinde aktivite artışı gösterdiği bir MnSOD mutanıtı tarafından doğrulanmıştır. MnSOD^{K122-R}, MnSOD içermeyen fare embriyonik fibroblast hücrelerinde (MEF) süperoksit seviyelerini düşürürken; MnSOD^{-/-} nakavt fare embriyonik fibroblastlarının (MEF) radyasyon kaynaklı dönüşümünü engellemektedir [7]. Böylelikle SIRT3 oksidatif strese yanıt olarak MnSOD aktivitesi için gerekli olan lizin 122'nin deasetilasyonuna aracılık ederek, hücreleri stres aracılı hasardan korumuş olur. İ  mitokondriyal membrana lokalize olan SIRT3' n, iyonlaştırıcı radyasyon gibi oksidatif stresi indükleyen ajanlar veya kalori kısıtlaması, oruç gibi hücresel besin durumundaki değişiklikler nedeniyle aktifleştirildiği görülmektedir [7]. MnSOD enzimatik aktivitesi, SIRT3 aktivasyonu yoluyla açlık veya radyasyona maruz kaldıktan sonra lizin 122 asetilasyonu ile yönlendirildiği gösterilmektedir [130]. SIRT3' n, AceCS2 [119,123], GDH [122,123], LCHAD [125] ve İDH2 dahil olmak üzere mitokondriyal proteinlerin aktivitesini de düzenlediği gösterilmiştir (şekil 1.20) [7].



Şekil 1.19: SIRT3 asetilasyonu ve MnSOD detoksifikasyon enzimatik aktivitesinin düzenlenmesi [7].

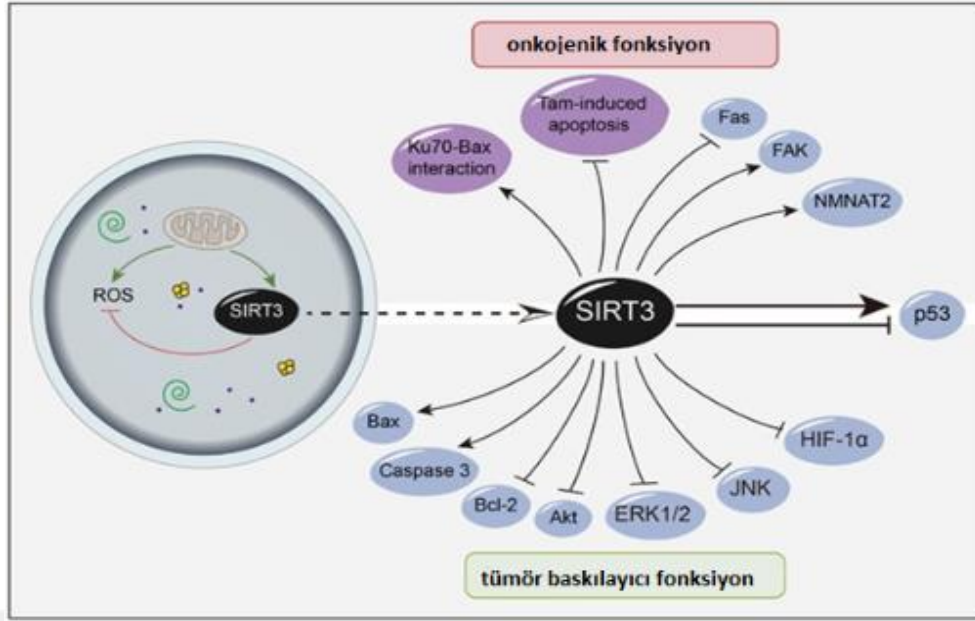
SIRT3 geni, ayrıca katalitik etkinliğinin artması için önemli bir mitokondriyal antioksidan enzim olan MnSOD'un iki önemli lizin kalıntısını da (lizin 53 ve lizin 89) deasetile etmektedir. SIRT3 deasetilasyonu ile MnSOD'a bağlı olarak hücrel ROT seviyesi azalır. Böylelikle SIRT3, MnSOD'un anti oksidatif stres etkinliğini ve direncini arttırmıştır [128]. SIRT3 olmadığında asetillenmiş MnSOD seviyelerinin arttığı ve bu duruma ilişkili olarak MnSOD aktivitesinin ise azaldığı gözlemlenirken; SIRT3 eksprese edildiğinde ise asetillenmiş MnSOD düzeylerinin azaldığı ve aktivitesinin arttığı açıktır. SIRT3 ile artan MnSOD düzeyinin ve MnSOD deasetilasyonunun, ROT seviyelerinin düşürülmesinde sinerjik bir etki içinde oldukları göz önündedir [131,132]. SIRT3'ün, FOXO3a'yı deasetilleyerek proteinin etkinliğini arttırdığı da bilinmektedir [133]. Bu durumda FOXO3a bağlı olduğu transkripsiyon genlerinden MnSOD ve katalazın transkripsiyonunu artırarak, hücrel ROT seviyesini düşürüp farelerde kardiyak hipertrofiyi önlediği açıklanmıştır. SIRT3 mitokondriyal metabolizmayı, oksidatif stresi ve ROT üretimini düzenleyen proteinlerin asetilasyon durumunu kontrol ederek, kanser hücresi çoğalmasının önüne geçmektedir [132, 133].

1.4.3. SIRT3'ün Kanserdeki Rolü

Mitokondride ana protein deasetilaz olan SIRT3, kanser hücresi büyümesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Yaşlandıkça insan malignitelerinin insidansı artmaktadır, bu durum yaşlanma ve karsinogenez arasında mekanik bir bağlantı olduğunu gösterir [3]. Mitokondriyal metabolizmadaki anormallikler hem yaşlanan

hücrelerde hem de kanser hücrelerinde artan ROT olarak gözlenir. SIRT3 eksikliği ROT'u arttırır, artan ROT seviyeleri ise yaşlanma ve apoptozla ilişkilendirilmektedir [3,127]. SIRT3, ROT metabolizmasını modüle ederek hem yaşlanmayı hem de karsinogenezi yöneten birincil mitokondriyal protein deasetilazdır (şekil 1.21). Birçok  alışma SIRT3' n, antioksidan savunma sisteminin aktivitesini arttırarak hücreleri ROT'a karşı koruduğunu desteklemektedir. Normal şartlar altında SIRT3 eksikliği genç farelerde iyi tolere edilirken, bir yaşından büyük SIRT3 nakavt farelerinde ise karaciğer mitokondriyal DNA'sın da bozulmalar, düşük seviyede ATP  retimi ve artan ROT sonucunda östrojen/progesteron (ER/PR) pozitif meme maligniteleri geliştirdiği gözlenmiştir [7]. Bu bağlamda, SIRT3 eksikliği veya fonksiyon kaybı oksidatif stres ve karsinogeneze sebebiyet veren anormal mitokondriyal metabolizma için hücresel ortamı oluşturmaktadır [3,7].

SIRT3, nakavt olan MEF hücreleri oksidatif stres ve radyasyon gibi çeşitli stres faktörlerine maruz bırakıldığında mitokondriyal süperoksit seviyelerinde önemli bir artış ve değişmiş metabolizma gözlemlenir ve temas inhibisyonu kaybı yaşanmaktadır [3]. Kim ve ark. (2006) yapmış oldukları çalışmada, farelerin arka bacak bölgelerine Myc veya Ras eksprese etmişlerdir. Üç hafta sonra Myc ve Ras eksprese edilen SIRT3^{-/-} MEF'lerde tümörler geliştiğini gözlemlemişlerdir. Yalnız bir onkogen (Myc/Ras) ekspresyonu SIRT3^{-/-} MEF'lerde *in vitro* dönüşüme ve metabolizmanın değişmesine neden olduğu bildirilmiştir [129]. Ayrıca SIRT3^{-/-} farelerde ER/PR-pozitif invaziv duktal karsinom geliştiği bilinmektedir [129,134]. Bu sonuçlar SIRT3'  karsinogeneze karşı mitokondriyal bütünlüğü ve oksidatif metabolizmayı koruyan önemli bir tümör baskılayıcı olarak da tanımlanmaktadır. Ayrıca dönüştürülmüş SIRT3^{-/-} Myc/Ras MEF'lerin glikoz metabolizmasında, süperoksit ve toplam hücresel ATP seviyelerinde önemli artışlara sahip olduğunu, oksidatif fosforilasyonda ise azalma olduğu gösterilmiştir [3,7,134].



Şekil 1.20: SIRT3, kanserde onkojenik veya tümör baskılayıcı bir role sahiptir [135].

SIRT3 geni meme kanseri, metastatik yumurtalık kanseri, hepatoselüler karsinom, B hücre maligniteleri ve lösemide tümör baskılayıcı olarak tanımlanır fakat kanser türü ile hücre içi sinyal yollarının durumlarına dayanarak, bir tümör promotörü veya bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir (Tablo1.8) [136]. Son çalışmalar SIRT3 aracılı deasetilasyonun p53, GSK-3 β , PDHA1, IDH2 ve NMNAT2 gibi çeşitli substratların aktivitesini düzenlediğini bildirmektedir [136,137]. SIRT3'ün Myc onkoproteininin ubiquitinasyonunu arttırabileceği ve hem *in vitro* hem de *in vivo* prostat kanseri ilerlemesini inhibe edebileceği bildirilmiştir [138]. SIRT3'ün, epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) baskılayarak prostat kanseri hücrelerinin göçünü ve metastazını önleyebileceği açıklanmıştır. Aynı anda SIRT3 Wnt/ β -katenin yolunu baskılayabildiği ve böylece EMT ile ilişkili süreçleri tetiklediği de gösterilmiştir [139]. Buna ek olarak, SIRT3 hepatoselüler karsinom ve pankreatik duktal adenokarsinomda hücrelerin yayılmasını baskılama yeteneğine sahiptir [140,141]. Çeşitli biyokimyasal aktivitelere ve substrat spesifikliklerine sahip olan SIRT3'ün anormal ekspresyonu, lösemi ve akciğer kanseri hücrelerinde BAX, BCL2 ve p53'ü etkileyerek apoptozu indükler [142,143]. Aynı şekilde SIRT3, kemoterapötik ajanlara yanıt olarak AGFG1 proteinini deasetile edip, negatif olarak düzenleyerek apoptozu bloke eder [144].

Tablo1.8: Farklı kanserlerde SIRT3'ün işlevi [145-151].

Kanser türü	Kullanılan hücre tipi	SIRT3 aktivite
Ağız kanseri	Oral skuamöz hücreli karsinom hücre hattı (OSSC)	Hücre büyümesi ve çoğalması, SIRT3'ün OSSC hatlarına nakledilmesi ile inhibe edilir.
Meme kanseri	Tamoksifene maruz bırakılan MCF - 7 hücre hattı	SIRT3, tamoksifene karşı hücreSEL duyarlılığı ve apoptozu azaltır.
Hepatoselüler karsinoma	Hepatom hücreleri	SIRT3'ün aşırı ekspresyonu JNK aktivasyonuna ve sonuçta apoptoza neden olur.
Yemek borusu kanseri	Özofagus kanseri olan hastalar	SIRT3'teki artış ROS seviyelerini düşürerek hayatta kalma oranını uzatır.
Akciğer kanseri	Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu	Düşük SIRT3 düzeyi kanser hücresi büyümesini azaltır.
Mide kanseri	MGC - 803 mide kanseri hücreleri	SIRT3'ün varlığı kanseri azaltır
Mesane kanseri	p53 mesane karsinom hücreleri	SIRT3 kanser hücrelerinin yayılmasını önler.

SIRT3 aynı zamanda hücreSEL metabolizmayı yeniden programlama özelliğine sahiptir. Tümör hücrelerinin aerobik ortamda glikozu laktik aside dönüştürmesi Warburg etkisi olarak tanımlanmaktadır. Yani kanser hücrelerinde glikolizisin sonucu olarak meydana gelen pirüvat, mitokondriye uğramaz doğrudan sitoplazmada kalır ve glikoliz yolağındaki NADH, pirüvatı indirgeyerek laktik aside çevirir. Tümör hücreleri içindeki çoğu metabolik yolak arasında ana rolü Warburg etkisi oynamaktadır [7]. Bu bağlamda, Finley ve ark. (2011) SIRT3 tarafından anormal ROT düzenlemesini Warburg etkisi ile ilişkilendirmişlerdir. SIRT3 içermeyen hücrelerde artan glikoz tüketiminin, hem *in vitro* hem de *in vivo* tümör oluşumuna izin veren bir fenotipi teşvik ettiği gösterilmiştir [152]. Bell ve ark. (2011) ise, SIRT3'ün aşırı ekspresyonunun, hipoksida HIF-1 α proteininin stabilizasyonunu inhibe ederek HIF-1 α transkripsiyonel aktivitesindeki artışları azalttığını söylemişlerdir. SIRT3, ROT üretimini inhibe ederek HIF-1 α ve tümör büyümesini baskılamaktadır bu nedenle

SIRT3 aktivitesi mitokondri homeostazını korumak ve kanser başta olmak üzere yaşa bağlı çeşitli hastalıkları kontrol eden metabolik hedefleri dengelemek için oldukça büyük bir öneme sahiptir [153].

Son olarak, SIRT3'ün Skp2 proto-onkogenini deasetile ettiği de bildirilmiştir. Skp2 çok çeşitli kanserlerde aşırı eksprese edilir ve ekspresyon seviyeleri kötü bir klinik prognozu önceden gösterir. Skp2, biyokimyasal olarak bir E3 ubiquitin ligaz olarak işlev görür ve proteazom aracılı bozunma için p21 ve p27 gibi sayısız tümör baskılayıcıyı hedeflemekten sorumludur. SIRT3'ün inaktive olması Skp2 asetilasyonuna yol açar bu da Skp2 stabilitesini artırır. Artan Skp2 de hücre çoğalması, tümör oluşumu ve metastaz ile sonuçlanır [154].

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

- -80, -20 ve +4°C Buzdolapları (Panasonic, Japan)
- CO₂ inkübatör (Panasonic, Japan)
- Inverted Mikroskop (Evos, U.S.A)
- Santrifüj (Hermle, Germany)
- Spektrofotometre (*Multiskan skyHigh*, ThermoFisher, U.S.A.)
- Vorteks (Velp Scientifica, U.S.A.)
- Hassas Terazı (Ohaus, U.S.A.)
- Buz makinası (Hermle, Germany)
- Distile su cihazı (GFL, Water Stills 2004)
- Dikey elektroforez sistemi (Bio-Rad, U.S.A.)
- Güç kaynağı (Bio-Rad, U.S.A.)
- Görüntüleme sistemi (iBright CL1000, ThermoFisher, U.S.A.)
- Pipet takımı (Eppendorf, Germany)
- Steril ve Non-steril pipet Uçları (Eppendorf, Germany)
- Plate/Mikroplak (Isolab, Germany)
- 15 ml ve 50 ml'lik falkon tüpler (Isolab, Germany)
- Cam malzemeler (Isolab, Germany)
- Kurutma kağıdı, Cryo tüpler, Steril hücre kültürü gereçleri (Bio-Rad, U.S.A.)
- Öğütme cihazı (Fakir, Germany)

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Saf Malzemeler ve Kimyasallar

- Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Dimetil sülfoksit (DMSO)

- Marker (Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standarts, Bio-Rad, U.S.A.)
- Amonyum persülfat (APS) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- B-Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Anti-SIRT3 Rabbit mAb (C73E3) (Cell Signaling, USA)
- Anti-PDH Rabbit mAb (D8Y6L) (Cell Signaling, U.S.A.)
- Anti-LDH Rabbit mAb (C4B5) (Cell Signaling, U.S.A.)
- Mouse anti-rabbit IgG-HRP (L27A9) (Cell Signaling, U.S.A.)
- NP-40 (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye)
- BSA (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- PVDF (poliviniliden fluorid) membran
- SDS (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Tris baz (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Tween 20
- PMSF

2.2. Metot

2.2.1. *C. ovata* Ekstraktının Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan *C. ovata* bitkisinin çiçek tomurcukları, tıbbi aromatik bitki satışı yapan bir işletmeden 50 g'lık paketlenmiş şekilde temin edilmiştir. *C. ovata* çiçek tomurcukları ilk olarak 40°C'de etüvde kurutuldu. Kuruyan bitki örnekleri, öğütme cihazı yardımıyla toz haline getirildikten sonra whatman filtre kağıdından oluşan kartuşa alınarak, 650 ml metanol içerisinde yaklaşık sekiz saat boyunca soxhlet ekstraktörüne tabi tutuldu. Elde edilen karışım 40°C'de etüvde, çözücü uçuncaya kadar, kontrollü şekilde bekletildi. Oluşan ekstrakt, ependorf tüpleri içerisinde konularak, -20°C'de saklandı [155].

2.2.1.1. *C. ovata* Ekstraktının Uygulanması

Tablo 2.1’de belirlenen dozlar hazırlanarak, plakalardaki tüm hücre hatlarına eklendi ve 36 saat muamele edildi.

Tablo 2.1: MDA-MB-231 ve DLD-1 hücre hatları için tasarlanan deney grup planı.

<u>Gruplar</u>	<u>36 Saat uygulama</u>	
Grup 1	DLD-1 Kontrol	MDA-MB-231 Kontrol
Grup 2	DLD-1 DMSO kontrol (1000:1 DMSO)	MDA-MB-231 DMSO kontrol (1000:1 DMSO)
Grup 3	DLD-1 100 µg/mL kapari ekstraktı	MDA-MB-231 100 µg/mL kapari ekstraktı
Grup 4	DLD-1 500 µg/mL kapari ekstraktı	MDA-MB-231 500 µg/mL kapari ekstraktı
Grup 5	DLD-1 1000 µg/mL kapari ekstraktı	MDA-MB-231 1000 µg/mL kapari ekstraktı

2.2.2. Hücre Kültür Çalışmaları

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi merkezi araştırma laboratuvarında *in vitro* şartlarda yapılmıştır. Deneyler, hücre kültürü laboratuvar olanakları kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmada DLD-1, COLO-205 ve HCT116 kolon karsinoma hücre hatları ile MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Çalışma boyunca hücre hatları %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 antibiyotik karışımı içeren DMEM besiyerinde, 90 mm’lik petri kaplarına ekilerek 37°C, %5 CO₂ ve serbest nem içeren ortamda inkübe edildi. Deneysel çalışmaların yapılacağı hücre kültürü laboratuvarında bulunan bütün cihazlar ve yüzeyler %70’lik alkol çözeltisi ile temizlendi, kontaminasyon riski en aza indirilerek sterilizasyon sağlandı. Tüm çalışmalar CLASS-II biyogüvenlik kabini içerisinde yapılmıştır. Her çalışmanın ardından biyogüvenlik kabini ultraviyole ışığa maruz bırakıldı. Kullanılan tüm malzemeler %70 alkolle silinerek kabin içerisine alındı. İnkübatörde çoğalmaya bırakılan hücrelerin, günlük olarak inverted mikroskopta mikroskobik morfolojik kontrolleri yapıldı. Hücreler petri yüzeyini

yaklaşık %70 oranından fazla üremelerine fırsat verilmeden haftada 2-3 kez pasajlama işlemi yapıldı.

2.2.2.1. Hücre Hattının Çözülmesi

Hücreler sıvı azot stoğundan alınıp çözünmesi sağlanana kadar 37°C'lik su banyosunda bekletildi. Çözünen hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpüne alındı %10 serumlu medyum ilave edilerek hücreler seyreltildi ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atıldı, kalan pellet üzerine az miktarda %10 serumlu medyum eklenip pellet pipetajlanarak homojen hale getirildi ve medyum konulmuş flasklara ekim yapılarak kültürün devamı sağlandı.

2.2.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler, 90 mm'lik petrilere %10 FBS ve %1 antibiyotik DMEM içerisinde ~%70 yoğunluğa geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretildi.

2.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlama işlemi, petrilere çoğalan hücrelerin belirli bir yoğunluğa ulaştığında dilüe edilerek yeni bir petriye ekilmesidir. Pasajlama işlemi için öncelikle plakanın içerisindeki eski besiyeri cam pipet ile çekilip atıldı. Petri yüzeyinden hücrelerin üzerine 2 mL %0,25'lik Tripsin-EDTA eklendi ve 37°C'de 3-6 dakika inkübe edilerek petri zemininden kalkmaları sağlanarak pasajlandı. Elde edilen hücre süspansiyonu önceden içerisine taze medyum konulmuş petrilere bölünerek 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. Pasajlanan hücrelerin petrilereki yoğunlukları inverted mikroskopta günlük olarak takip edildi.

2.2.2.4. Hücrelerin Toplanması

Hücre toplama işlemi için öncelikle, petrilereki medyum uzaklaştırıldı ve 3 ml PBS ile hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. Yaklaşık 1 dk hafif hareketlerle çalkalanan petri kabının içerisindeki medyum çekilip atılarak, 1,5-2 ml taze medyum eklendi ve kaldırma işlemi yapıldı. Yüzeyden ayrılan hücreler, ependorf tüplerine

alınarak 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücre peleti 80°C’de muhafaza edildi.

2.2.2.5. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere yeterli hücre sayısı ve yoğunluğuna ulaşan hücrelerin bir kısmı dondurma tamponu ile yedeklendi. Hücreleri dondurmak için 15 ml’lik falkonda önce 7 ml DMEM, 2 ml FBS ve son olarak da 1 ml DMSO kullanılarak dondurma tamponu hazırlandı. Dondurulacak hücreler, 1000 rpm’ de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılarak üzerlerine dondurma tamponu eklenerek kriyo tüpler içerisinde yavaş dondurma prensibine uygun olarak önce -80 °C’de bir gece muhafaza edildi ve ardından sıvı azot tankının içerisine bırakıldı.

2.2.3. Hücre Canlılığı ve Sayımı

Hücre canlılığı ve sayımı, Ecotech Biotechnology *Cell Viability Detection Kit-8* (CVDK-8) kiti kullanılarak ThermoFisher Scientific Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer cihazı ile belirlendi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer cihazı.

Her bir kuyucukta yaklaşık 1000 hücre, 100 µL hacim olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kabına ekilerek 36 saat yaklaşık %70 konfluent olması için inkübasyona bırakıldı. Hücrelere test edilecek çeşitli konsantrasyonlarda kapari 36 saat boyunca uygulandı. Süre sonunda plakanın her kuyucuğuna 10 µl CVDK-8 eklendi. Daha sonra plaka 1 saat 37 °C'de %5 CO₂ ve nem içeren ortamda inkübe edildi ve spektrofotometre kullanılarak 450 nm'de absorbansı ölçüldü. Ortalamalar hesaplandı ve Microsoft Excel programı yardımıyla ortalama absorpsiyon ± standart sapma baz alınarak grafikler çizildi.

2.2.4. Protein Konsantrasyonu Tayini

Çalışmamızda protein konsantrasyonları Bradford protein analizi hesaplandı. Kısaca örnekler 10 kat sulandırılarak her bir kuyucuğa 10 µL eklendi ve üzerlerine 190 µL Bradford Reagent (Eco-tech, BR05) eklenerek 10 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. Süre sonunda mikro plaka spektrofotometrede 595 nm'de okutuldu. Standart eğrinin oluşturulması için ise 1,5 mg/ml BSA'dan başlayarak 1:1 seyreltme yöntemiyle hazırlanan 6 seri standart kullanılmıştır. Konsantrasyonu bilinmeyen protein miktarlarının ölçümünde bu eğri kullanılmıştır.

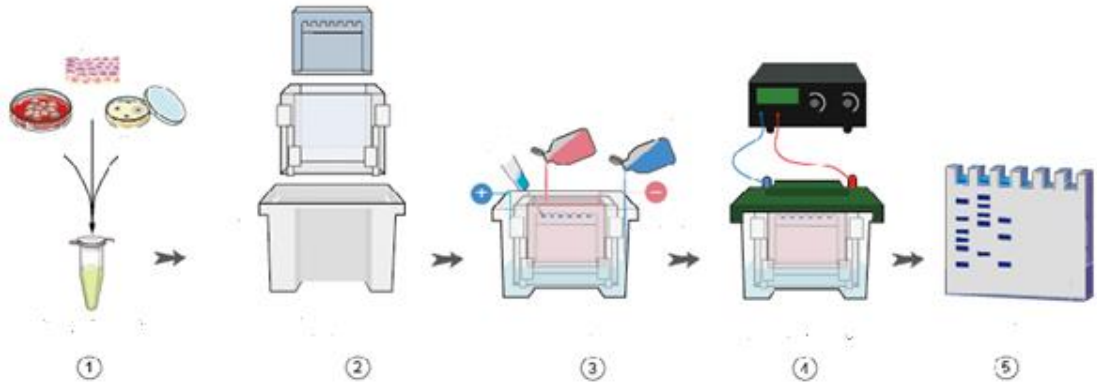
Bradford protein konsantrasyon ayrıca, Thermo Scientific™ µDrop™ Duo Plakası kullanılarak, Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer cihazıyla da belirlendi. Örneklerin her birinden 2 µl alınarak, 32 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna konulup 450 nm de okutularak, çıkan sonuçlar kayıt edildi.



Şekil 2.2: Thermo Scientific™ µDrop™ Duo (Thermo Fisher, U.S.A.) Plakasında protein konsantrasyon ölçümü

2.2.5. Western Blot analizi

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile çalışmamızda proteinleri molekül ağırlıklarına göre kompleks bir karışım içinde hedeflenen bir proteini özgün bir şekilde ayırmak için kullanılan en genel metot Western Blot yöntemidir (Şekil 2.3). Membran üzerindeki 1-5 µg'a kadar az miktardaki proteinleri saptamaya elverişli bir yöntem olan Western Blot yöntemi iki basamaktan oluşmaktadır. İlk olarak jel üzerindeki bütün proteinler, bir membran yüzeye aktarıldıktan sonra hedeflenen bir protein, bu proteine özgü bir antikor kullanılarak belirlenir [156].



Şekil 2.3: Western Blot deney adımları [157].

Western Blot tekniği; örneklerin hazırlanması, jel elektroforezi, proteinlerin membrana transferi, immunblotlama (antikor inkübasyonu), görüntüleme ve analiz olmak üzere altı basamaktan oluşmaktadır [156]. %10'luk PAGE kullanıldı.

2.2.5.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

- PBS (Phosphate Buffered Salline-1 lt) için; 8 gr NaCl + 200 mg KCl + 3,58 g Na₂HPO₄ + 245 mg KH₂PO₄ tartıldı üzerine 1 lt dH₂O eklenerek çözündürüldü.
- Yıkama Tamponu (Wash Buffer-TBS+%0,1 Tween20) için; 1000 ml TBS çözeltisine 100 ml Tween20 eklenerek karıştırıldı.
- 10X Transfer Tamponu (Transfer Buffer-1 lt) için; 30,4 g Tris-Base + 144,2 g glycine + 2 ml %10 SDS tartılıp, üzerine 1000 ml'ye kadar dH₂O eklendi.
- 1X Transfer Tamponu için; 100 ml 10x transfer tamponu + 700 ml distile su +200 ml methanol eklenerek çözünmesi sağlandı.
- 10X Yürütme Tamponu (10X Running Buffer) 1 lt için; 30,3 gr Tris-Base, 144 gr glisin ve 10 gr SDS alınıp, son hacim 1 lt olacak şekilde dH₂O'da çözündürüldü.
- 1X Yürütme Tamponu (1X Running Buffer) 1 lt için; 100 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 900 ml dH₂O eklenerek hazırlandı.

2.2.5.2. Protein Örneklerinin Western Blotlama için Hazırlanması

Eppendorf tüplerine yükleme hacmi toplamda 20 µg olacak şekilde; değişen oranlarda örnek ve her bir örnek için 5 µl 4x laemmli örnek tamponu konuldu. Akabinde bir dakika vortekslenen örnekler, 95 °C'de 5 dk süre ile kaynatılarak denatüre edildi ve hemen buz içine alındı.

2.2.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid (SDS-PAGE) jel elektroforezi, bir protein karışımında proteinleri büyüklüklerine göre ayırır. Bu tekniğın temeli yüklü moleküllerin elektrik alanda yüklerinin zıt yönüne doğru göç etmesine dayanmaktadır.

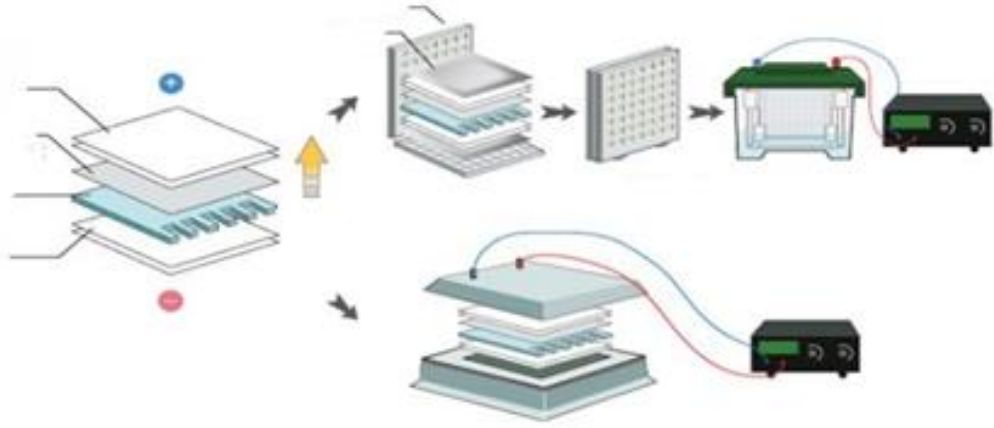
Elektroforez işlemine başlamadan önce, kullanılacak olan camlar ilk olarak distile su ile sonrasında %70'lik alkol ile yıkandı ve hiç leke kalmayacak şekilde kurutuldu. SERVA Acrylamide/Bis solutions protokolüne göre hazırlanan ayrıştırıcı jel için 15 ml'lik falkona sırasıyla,

- 3,33 ml Akrilamid/Bis solüsyonu,
- 2,50 ml separating buffer(ayırma jeli),
- 4,03 ml ddH₂O,
- 0,1 m %10 SDS,
- 0,015 TEMED ve
- 0,03 ml APS konuldu.

APS polimerizasyon katalizörü olduğu için jel dökülmeden hemen önce ilave edildi. APS ilave edilir edilmez, jel iki cam arasına bir pipet yardımıyla hava kabarcığı oluşturulmasına dikkat edilerek dolduruldu. Ardından kuyucukları oluşturmak için jelin içine tarak yerleştirildi ve jelin donması için yaklaşık olarak 25 dakika beklendi. Jel tam olarak donduğu zaman, tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve cam kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Cam kaset yerleştirilirken, yükleme yapılacak kısmın kabın ön haznesine bakacak şekilde olmasına dikkat edildi. Cam kaset yerleştirildikten sonra iç haznenin ağzına kadar, dış haznenin ise üçte ikisi dolacak şekilde yürütme tamponu eklendi. Örnekler yüklenmeden önce jelin ısınması için tank sistemi 10 dakika 90 Watt`da çalıştırıldı. Sonra jelin başına denk gelen ilk kuyucuğa 5 µl marker ve sırasıyla 20 µl örnekler yerleştirildi. Son olarak tank 120 V`da 90 dakika olarak ayarlandı ve yürütme işlemi başlatıldı.

2.2.5.4. Membrana Transfer ve Bloklama

Bu yöntem, jel yüzeyine dik bir elektrik akımı uygulanarak eksi yüklü proteinlerin jelden hemen üzerinde bulunan pozitif yüklü membrana adsorbe olmalarını sağlayan elektroforetiktrans ilkesine dayanmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Semi-Dry (yarı-kuru) transfer düzeneği [157].

Elektroforez aşamasından sonra, membrana transfer edilmek üzere jeller dikkatli bir şekilde kasetlerden çıkarıldı. Jelin yırtılmaması için iki cam arasına bir miktar yürütme tamponu dökülerek işlem kolaylaştırıldı. PVDF (poliviniliden florid) membran kullanılmadan önce 5 dakika metanolla inkübe edilerek, aktifleştirildi. Geniş bir kaba bir miktar transfer tamponu konuldu ve kabın içerisinde sırasıyla negatif yüklü kaset, sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı, sünger ve pozitif yüklü kaset yerleştirilerek; sandviç aparatı hazırlandı. Her katmanda hava kalmamasına dikkat edildi. Oluşturulan sandviç aparatı, içinde transfer tamponu bulunan tankın içerisine konuldu ve güç kaynağı 120 dakika / 150 amper'e ayarlanarak transfer işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 2.5: Elektroforez düzeneği.

Transfer sonrası proteinleri bağlamış olan membran %5'lik süt içerisine alınarak, oda sıcaklığında 60 dakika dairesel karıştırıcı (shaker) üzerinde çalkalanmaya bırakıldı. Bu

basamak ile proteinin özgün olmayan bağlanma noktaları engellendi. Bloklama yapıldıktan sonra membran üç kez 5 dk PBS-T ile yıkandı.

2.2.5.5. Birincil ve İkincil Antikor ile İnkübasyon

Yıkama işleminden sonra membran, %2'lik süt tozu içeren PBS içerisinde 1:1000 oranında seyreltilmiş birincil antikorlarla 4°C'de bir gece çalkalanarak bekletildi. Süre sonunda membran PBS-T çözeltisi ile üç kez 15 dakika süre ile yıkandı. Ardından aynı işlemler ikincil antikorlar içinde gerçekleştirildi. İkincil antikorlar ise, bir saat boyunca karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında inkübe edildi. İşlem sonunda yine PBS-T çözeltisi ile üç kez 15 dakika boyunca yıkanma işlemi yapıldı. Son olarak ECL ile görüntüleme yapıldı.

2.2.5.6. Bantların Görüntülenmesi ve Analizi

TBS-T yıkama işlemi sonrası, görüntüleme için Immobilon® ECL Ultra Western HRP Substrate (Sigma-Aldrich, U.S.A.) tamponu hazırlanarak, membran bu solüsyon içinde bir dakika bekletildi. İnkübe sonunda, membran şeffaf poşet dosya arasına yerleştirildi ve IBright CL1000 Görüntüleme cihazıyla görüntüleme yapıldı.

2.2.6. Koloni Formasyon Deneyi

Koloni formasyon deneyi, yalnızca tek bir kanser hücresinin koloni oluşturabilme yeteneğinin belirlenmesi esasına dayanır. Deneyde öncelikle 6-kuyucuklu steril plakaya her kuyucuğa 200 hücre gelecek şekilde COLO-205 hücrelerinin ekimi yapıldı. Hücrelerin petri tabanına yapışalarının ardından besiyerleri atılarak 500µg/ml *C. Ovata* metanol ekstrakt konsantrasyonu içeren besiyeri kuyucuklara ilave edildi. Kuyucuklardaki besiyeri üç günde bir değiştirilerek deney 14. günde tamamlandı. Süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri çekilerek 2'şer ml PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından her kuyucuğa 1ml fiksatif (1 asetik asit:7 etanol) eklenmiş ve iki dakika boyunca oda sıcaklığında inkü edildikten sonra fiksatif kuyucuklardan çekilerek üzerlerine kistal viyoleto çözeltisi (0,5g kistal viyoleto+25ml metanol+75ddH₂O) eklenmiştir. Plakalar 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra çeşme suyu altında hücreler zeminden kaldırılmadan yıkanmış ve bir gece boyunca kurumaya

bırakılmıştır. Kuruyan plakalar beyaz zeminli protein görüntüleme sisteminde fotoğraflandırılmış ve oluşan koloniler ImageJ 1.53m programında yer alan Analyze Particle Tool yardımıyla sayısal verilere dönüştürülmüştür.

2.2.7. İmmüno floresan Analizi

HCT-116 hücrelerine *C. ovata*'nın uygulaması ile meydana gelen hücre sağ kalımı, ölümü ve apoptotik değişimlerin tespiti için floresan mikroskopunda sırası ile aşağıdaki boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 24 kuyucuklu bir plakaya ekimi yapılan HCT-116 hücreleri %70 yoğunluğa ulaştığında, 500 µg/mL *C. ovata* ekstraktı uygulanarak 48 saat boyunca inkübe edilmeleri sağlandı. Daha sonra hücreler PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi ardından HCT-116 hücreleri oda sıcaklığında 10 dakika %4 paraformaldehit ile fikse edildi ve daha sonra iki kez PBS ile yıkandı. Yıkanan hücreler, 0,1 Tripton X-100 içeren 500 µl PBS ile 15 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi ve tekrar üç kez yıkama yapıldı. Hücreler daha sonra bloklama tamponu ile bir saat boyunca bloklandı. Bloklama işleminden sonra yıkama yapılmadan, 1:200 oranında PBS ile seyreltilen γH2AX antikor eklendi. Ardından, örnekler gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, üç kez 5'er dakika boyunca PBS ile yıkama işlemi yapıldı. İkinci antikorla muamele edilirken, öncelikle ortamın karanlık olmasına dikkat edildi. Örnekler 1:200 oranında seyreltilen Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody (Thermo Fisher, U.S.A.) antikoruyla 60 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, örnekler altı kez 7 dakika boyunca 50 rpm'de çalkalanarak, PBS ile yıkandı. DAPI boyama işlemi için, 10 µl DAPI lamin üzerine eklendi cover slip üzerine kapatıldı. Ardından, örnekler gece boyunca 4°C'de saklandı. Daha sonra floresan mikroskop altında görüntüleme yapıldı.

2.2.8. İstatiksel analiz

Veriler SPSS 26.0.0 yazılımına aktararak veri seti oluşturuldu. Oluşturulan veri setine öncelikle Shapiro-Wilk normallik testi uygulandı ve test sonuçları doğrultusunda parametrik veriler One-Way ANOVA, non-parametrik verilere ise Mann-Whitney U testi uygulandı. Parametrik verilere uygulanan test sonucunda istatistiksel olarak anlamlılığın olduğu belirlenen verilere aynı zamanda Levene

Varyans Homojenlik testi uygulanarak homojen değerlere Bonferroni PostHoc testi uygulandı. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde $p<0,05$ anlamlı kabul edildi ve parametrelerin ortalamaları, standart sapmaları ile birlikte değerlendirildi.

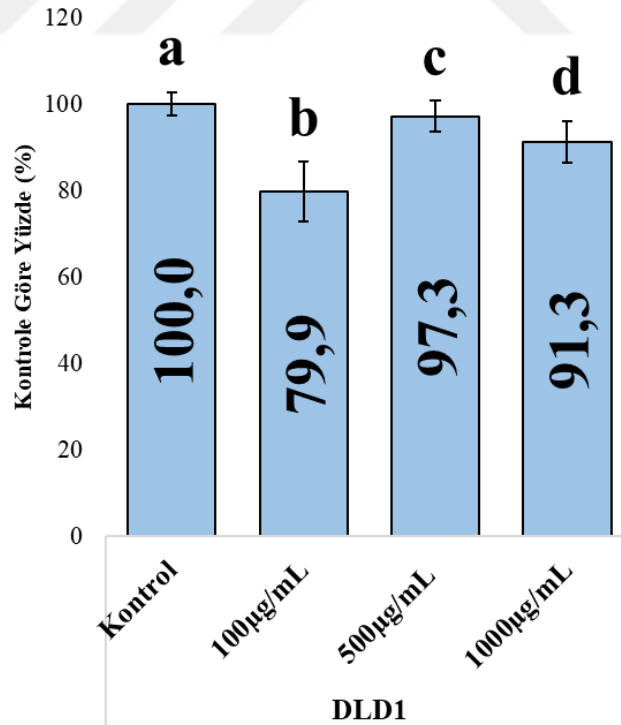


3. BULGULAR

3.1. *C. ovata*'nın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

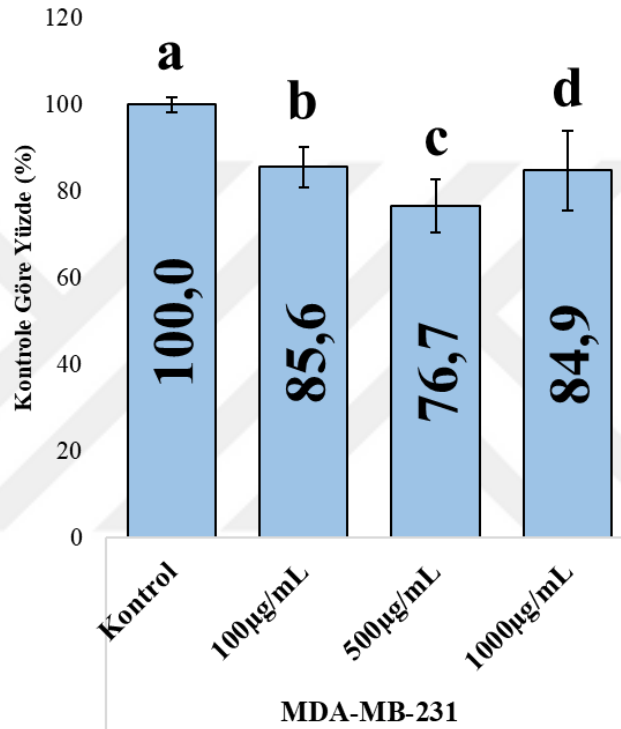
Her kuyucukta 100 µL hacimli ve 1000 hücre olacak şekilde DLD-1 ve MDA-MB-231 hücreleri, 100, 500 ve 1000 µg/ mL kapari ekstraktı ile 36 saat muamele edildi. İnkübasyonun ardından, her bir kuyucuğa üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda 10 µl CVDK-8 solüsyonu ilave edildi ve bir saat inkübasyon sonunda mikro plaka okuyucuda (Multiskan FC, Thermo, U.S.A.) 450 nm absorbansta okuma yapıldı.

C. ovata metanol ekstraktının DLD-1 hücre canlılığında meydana getirdiği değişiklikler Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda DLD-1 hücrelerinde, *C. ovata* metanol ekstraktının kontrole göre yalnızca 100 µg/mL'lik konsantrasyonunun hücre canlılığını önemli düzeyde, yaklaşık %20 oranında azalttığı tespit edildi. İlâveten, 100µg/ml ile 500 µg/ml ve 100 µg/ml ile 1000 µg/ml arasında da istatistiksel değişim gözlemlenmiştir.



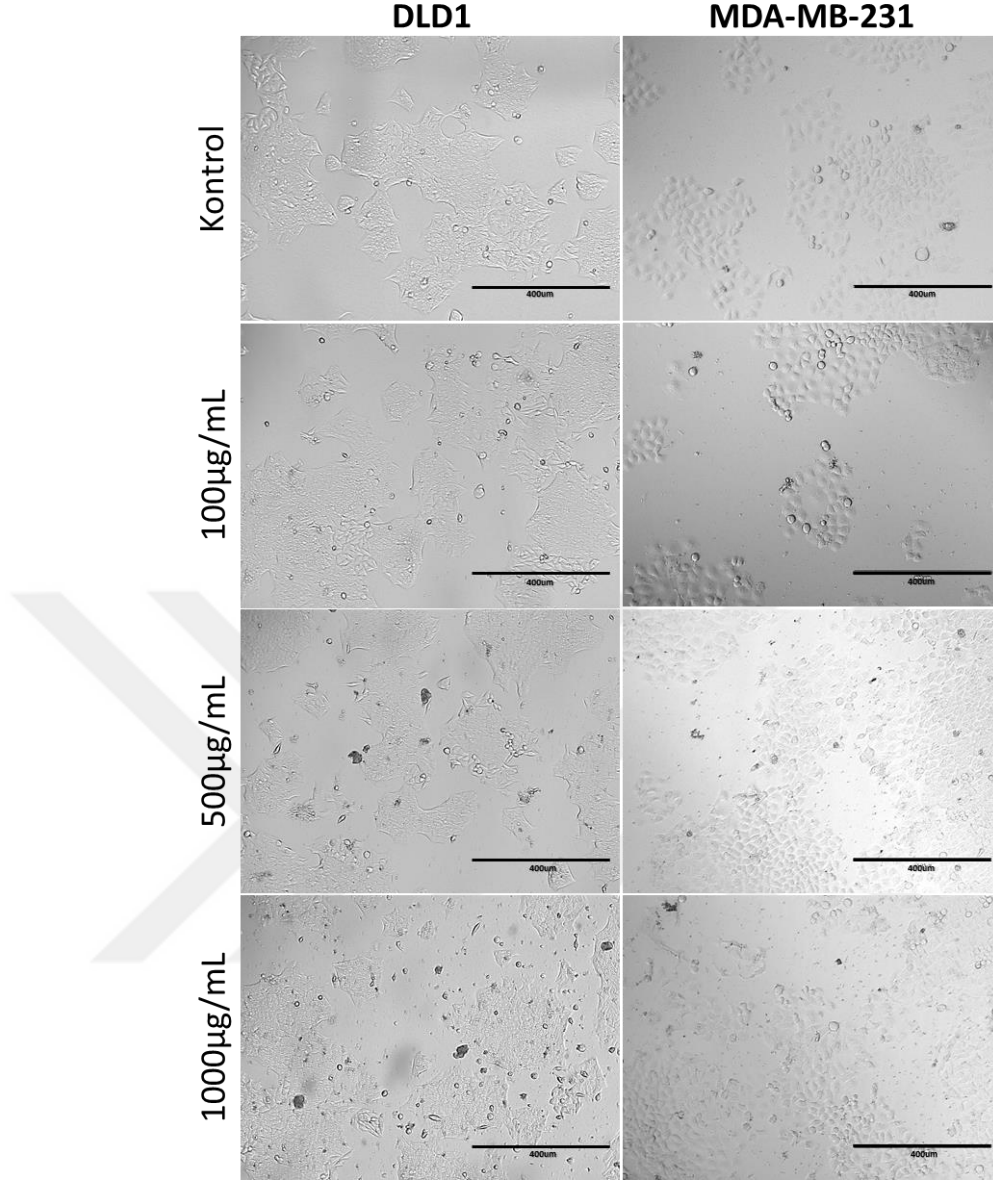
Şekil 3.1: 100, 500 ve 1000 µg/mL dozlarında *C. ovata* metanol ekstraktına maruz bırakılan DLD1 kolon kanser hücrelerinin 36 saat sonunda hücre sağ kalım değerleri (ANOVA: $p < 0.001$. PostHoc^{Bonferroni}: ^{ab, bc} $p < 0.001$, ^{bd} $p < 0.05$).

Aynı şekilde, *C. ovata* ekstraktının MDA-MB-231 hücre canlılığında meydana getirdiği değişiklikler Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. Değerlendirme sonucunda MDA-MB-231 hücrelerine 500 ve 1000 µg/mL'lik dozlarında ekstrakt verildiğinde kontrole göre anlamlı olarak bir düşüş gözlemlenmiştir. 500µg/mL'lik dozlarında hücre sağ kalım oranı kontrole göre yaklaşık %24 azalma gözlemlenmiştir. 100µg/mL doz uygulandığında kontrole göre hücre sayısında yaklaşık %15'lik azalma meydana gelmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı olmayıp sınırda kalmıştır (p=0,05).



Şekil 3.2: 100, 500 ve 1000µg/mL dozlarında *C. ovata* metanol ekstraktına maruz bırakılan MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin 36 saat sonunda hücre sağ kalım değerleri (ANOVA: $p<0.01$. PostHoc^{Bonferroni}: ^{ab} $p<0.001$, ^{ac} $p<0.05$).

Kapari ekstraktı verilen hücreler mikroskop altında da incelenmiştir. Hücre yoğunluklarının CVDK-8 deneyiyle tutarlı bir şekilde ekstrakt verildikçe azaldıkları görülmüştür (Şekil 3.4).



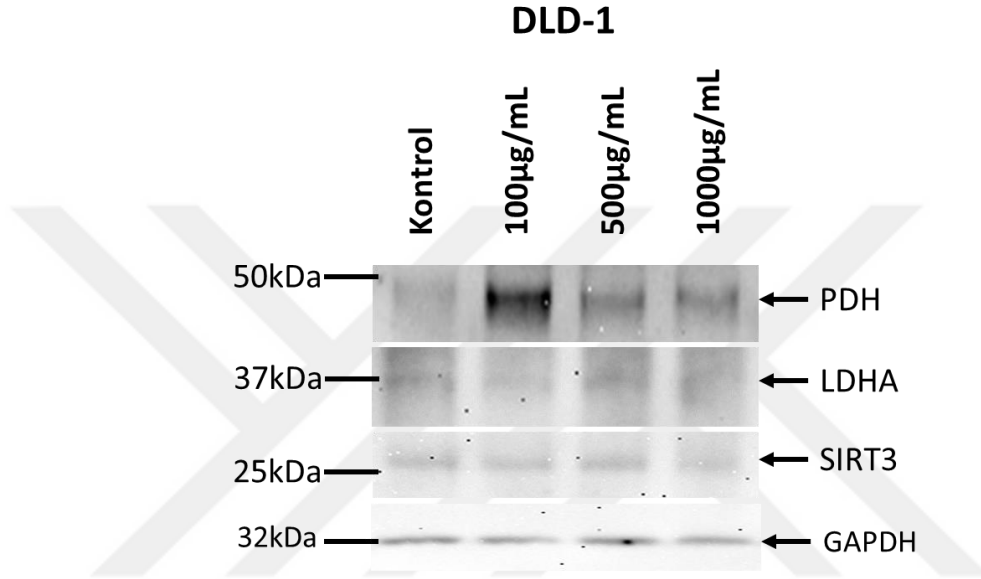
Şekil 3.3: Farklı *C. ovata* konsantrasyonlarının DLD-1 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkisinin 36 saatteki morfolojileri.

3.2. Western Blot Analiz Bulguları

C.ovata'nın SIRT3, PDH ve LDH proteinlerinin ekspresyonları üzerindeki etkilerini DLD-1 ve MDA-MB-231 hücrelerinde belirlemek amacıyla western blot analizi yapıldı (Şekil 3.5).

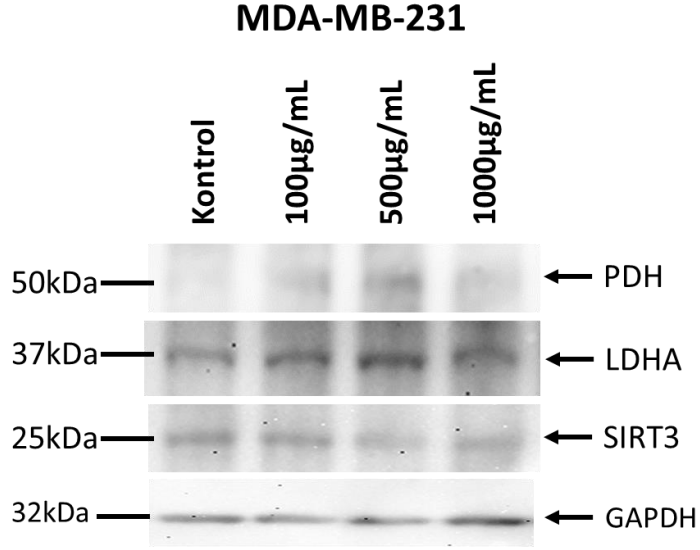
Farklı dozlarda *C. ovata* ekstraktına maruz bırakılan DLD-1 kolon kanser hücrelerinin PDH, SIRT3 ve LDHA proteinin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Elde etmiş olduğumuz bulgular DLD-1 hücrelerinin PDH

protein miktarlarının 100, 500 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında kontrole oranla bir artış trendinde olduğunu göstermekle birlikte en yüksek artışın 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda olduğunu ortaya koymuştur. Bunun yanında LDHA protein seviyesinin de DLD-1 kolon kanser hücrelerinde 100 $\mu\text{g/ml}$ *C. ovata* uygulanan doz grubunda kontrol kontrol grubuna kıyasla hafif bir azalma meydana geldiği görülmüştür. Grupların SIRT3 protein miktarlarında ise belirgin bir azalma olmadığı bulunmuştur.



Şekil 3.4: DLD-1 hücre hattında SIRT3, PDH ve LDHA proteinlerine ait Western Blot bantları.

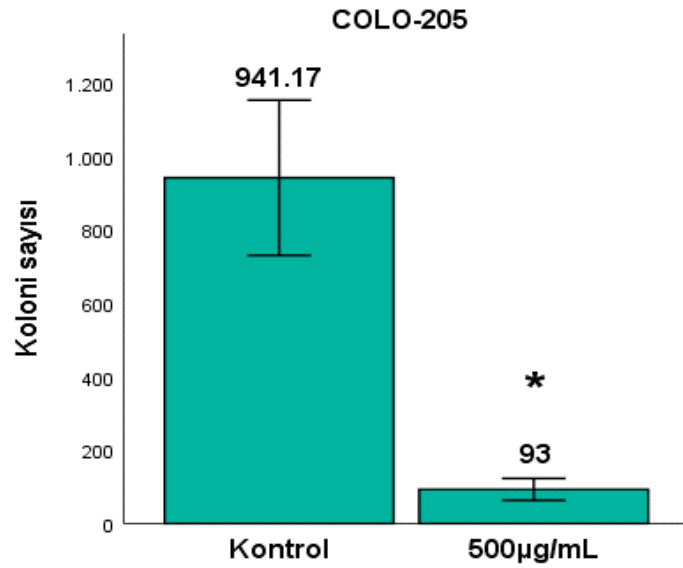
MDA-MB-231 meme kanser hücrelerine uygulanan farklı *C. ovata* ekstrakt dozlarının PDH, LDHA ve SIRT3 protein miktarları üzerine etkileri ise Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Uygulama sonunda PDH proteinin ifade düzeyi 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda kontrole göre bir artış gözlemlenirken, 100 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarında ise kontrole kıyasla herhangi bir değişiklik izlenmemiştir. LDHA ve SIRT3 protein miktarlarının ise tüm gruplarda aynı ifade düzeylerini korudukları görülmüştür.



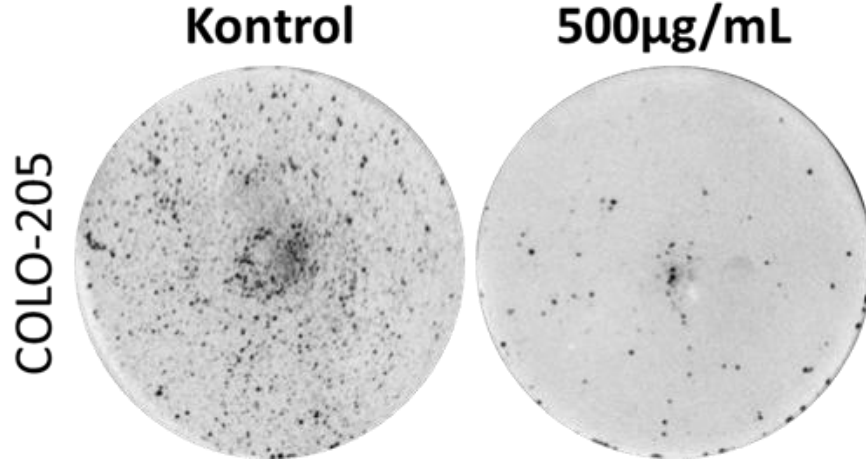
Şekil 3.5: MDA-MB-231 hücre hattında SIRT3, PDH ve LDHA proteinlerine ait Western Blot bantları.

3.3. Koloni Formasyon Analiz Bulguları

C. ovata ekstraktının COLO-205 hücreleri üzerine etkisi koloni formasyon testi ile analiz edilmiştir. COLO-205 hücrelerinde koloni sayısında doza bağımlı bir azalma olduğu Şekil 3.7 ve 3.8’de görülmüştür.



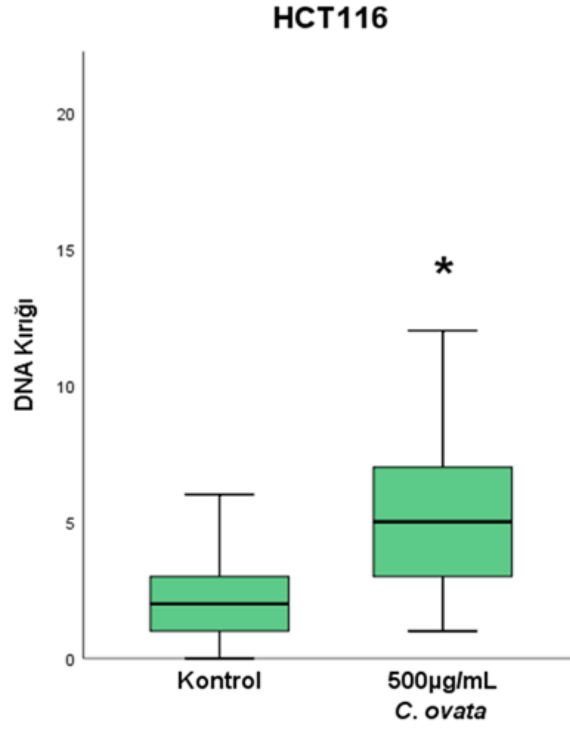
Şekil 3.6: COLO-205 hücrelerinde Koloni Sayısı Analiz sonuçları (Independent Samples T-test: $p < 0.001$).



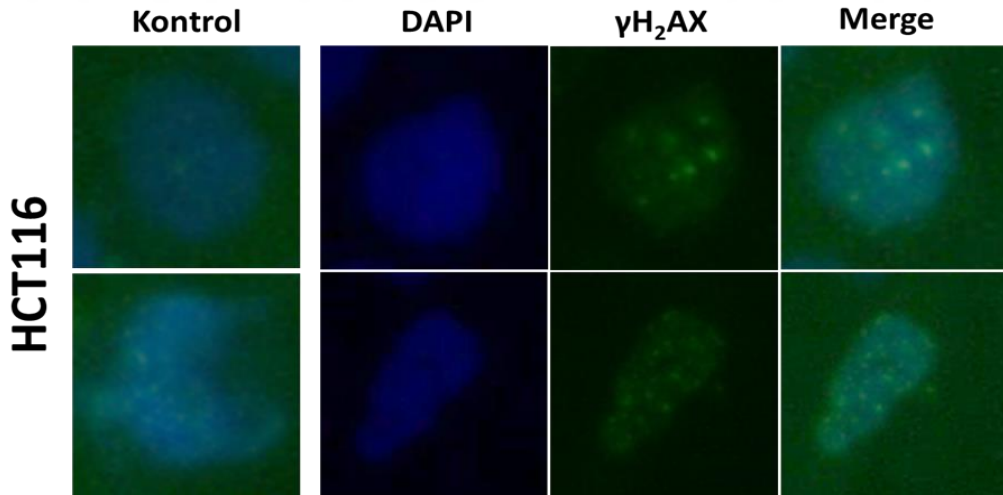
Şekil 3.7: COLO-205 hücrelerine *C. ovata* ekstraktı uygulanması sonrası analiz görüntüleri.

3.4. İmmunofloresan Analiz Bulguları

Kırk sekiz saat boyunca, 500 µg/mL konsantrasyonunda ekstrakt uygulanan HCT116 kolon kanser hücrelerinde, DNA kırıkları gözlemlenmiştir (Şekil 3.9 ve 3.10). DNA çift zincir kırılmaları, en zararlı DNA hasar çeşitlerinden biridir ve uygun şekilde tamir edilmediğinde mutasyonlara, genomik kararsızlığa ve kanser gelişimine yol açmaktadır. Fosforile olmuş H2AX antikoru, γ H2AX adını alarak, DNA çift zincir kırılmaların tespitinde önemli bir indikatör görevi üstlenmektedir.



Şekil 3.8: HCT116 kolon kanseri hücrelerinin 48 saat boyunca 500µg/mL *C. ovata* metanol ekstraktına maruz bırakılması sonucu oluşan DNA kırıklarının kontrol grubu ile kıyaslanması (Mann-Whitney U: *p<0.001).



Şekil 3.9: HCT116 kolon kanseri hücrelerinin 48 saat boyunca 500µg/mL *C. ovata* metanol ekstraktına maruz bırakılması sonucu oluşan DNA kırıklarının phospho-histone γ H₂AX DSB markeri ile belirlenmesi.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser, farklı sebeplerden ötürü kontrolsüz ve düzensiz çoğalan hücrelerin oluşturduğu multifaktöriyel bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin metabolizması, normal hücreler ile kıyaslandığında arada belirgin farklar görülmektedir. Bu farklardan biri de kanser hücrelerinin, enerji üretimi için aerobik glikolizisi tercih etmelerinden dolayı kaynaklanmaktadır. Normal hücrelerde aerobik şartlarda glikoz, glikolizis basamağıyla pirüvata dönüştürülür ve oluşan pirüvatin da büyük bir bölümü mitokondride CO₂'e çevrilmektedir. Bu döngünün sonucunda net 36 ATP molekülü üretilmektedir. Oksijensiz ortamda ise glikolizisten elde edilen pirüvat, laktat dehidrogenaz (LDH) enzim kompleksi yardımıyla laktata dönüştürülmektedir [158]. Yüksek proliferasyon yeteneğine sahip olan kanser hücreleri de, oksijensiz koşullarda bir molekül glikolizden elde ettikleri düşük ATP miktarına rağmen glikozu laktat molekülüne sentezleyebilmektedirler. Alman fizyolog Otto Heinrich Warburg, kanser hücrelerinin glikolizisin sonucu olarak meydana gelen pirüvatin, mitokondriye uğramadan doğrudan sitoplazmada kaldığını ve glikolizis yolağındaki NADH'ın, pirüvatu indirgeyerek laktik aside dönüştürdüğünü gözlemlemiştir. Tümör hücrelerinin enerji üretimi için aerobik ortamlarda dahi glikozu laktik aside dönüştürmesi "Warburg etkisi" ya da "aerobik glikolizis" olarak bilinmektedir [159]. Tümör hücrelerinin enerji üretimi için verimsiz bir tepkime olan glikolizisi tercih etmelerinin nedenleri arasında, düşük oksijen varlığında hücrelerin hızlıca büyümelerini ve prolifere olmalarını destekleme amacıyla metabolik son ürünlerini üretmek ve apoptoza neden olan uyarıcı ajanlardan kaçışı sağlamaktır [160]. Aerobik glikolizisi seçen tümör hücrelerinin mikroçevrelerinde, laktik asit artışıyla birlikte asidik bir ortam oluşmaktadır. Bu durum da anti-kanser immun efektör mekanizmaları baskılanarak, tümör yayılımı kolaylaşacaktır [161,162]. Kanser mekanizmasında ki çoğu metabolik yolak arasında ana rolü Warburg etkisinin oynadığı görüşü desteklenmektedir [7].

Sirtuinler NAD⁺ bağımlı sınıf III histon deasetilaz proteinleridir. Diğer histon deasetilazlardan farklı olarak transkripsiyon faktörleri, metabolik enzimler ve histonlara kadar çeşitli substratları deasetile etme potansiyeline sahiptirler. Sirtuinler metabolizmanın düzenlenmesi, DNA onarımı, hücre yaşamı gibi birçok biyolojik faaliyetin yanı sıra yaşlanma, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çok sayıda fizyolojik rol ile de ilişkilidirler. Metabolik bir sensör görevi gören sirtuinler, tüm

enzimatik aktivitelerini gerçekleştirmek için kofaktör olarak doğrudan NAD^+ 'ı kullanırlar. Hücrelerin sitolojik enerji halini yöneten NAD^+ ; glikolizis, protein degradasyonu ve TCA döngüsü gibi katabolik tepkimelerde NADH 'a dönüştürülür. Herhangi bir düşük enerji durumunda hücrelerde ki NADH seviyesi artarak, NAD^+ azalır ve sirtuinler aktive edilir. Warburg etkisi ise PDH, SDH ve sirtuinlerin işlevlerini inaktive eden NAD^+ 'ı azaltmaktadır. Yapılan bir çalışmada azalan NAD^+ seviyesi, SIRT1'in enzimatik aktivitelerini olumsuz yönde etkileyerek karsinogenezi desteklediği bildirilmiştir [95,96,163]. Bu bağlamda, Finley ve ark. (2011) SIRT3 tarafından anormal ROT düzenlemesini Warburg etkisi ile ilişkilendirmişlerdir. SIRT3 içermeyen hücrelerde artan glikoz tüketiminin, hem *in vitro* hem de *in vivo* tümör oluşumuna izin veren bir fenotipi teşvik ettiği gösterilmiştir [152].

Bu aileden biri olan SIRT3 yaşlanma, metabolizma ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçleri kontrol eden önemli bir mitokondriyal deasetilazdır. Yaşlandıkça insan malignitelerinin insidansının arttığı bilinir, bu durumda yaşlanma ve karsinogenez arasında doğrudan bir bağlantı olduğu çıkarımı yapılabilmektedir [7]. Brown ve ark. (2013) ilerleyen yaşla birlikte murin kemik iliğinde yer alan hematopoietik kök hücrelerde, SIRT3 ekspresyonunun azaldığını ve buna bağlı olarak yaşlı farelerde SIRT3 eksikliğinde; ROT seviyesinin artıp, hematopoietik kök hücre sayısının ise azaldığını bildirmişlerdir [164]. Metabolizmanın doğal bir yan ürünü olan ROT, hücresel hasarın temel kaynağıdır. Yüksek ROT seviyeleri hücresel bütünlüğü zayıflatarak, DNA hasarına neden olmanın yanı sıra hem karsinogenez hem de yaşlanmaya etken olan "oksidatif stres" olarak adlandırılan bir duruma yol açmaktadır. Kim ve ark. (2010) yüksek oksidatif stresin, insanlarda meme kanserlerine ve yaşlı SIRT3 nakavt farelerde meme malignitelerinin gelişmesinde kritik bir rol oynadığını bildirmişlerdir. SIRT3 oksidatif strese karşı sorumlu enzimleri aktive edip, ROT seviyelerini modüle ederek yaşlanma ve karsinogenez süreçlerini yönetmektedir [134]. SIRT3; manganez süperoksit dismutaz (MnSOD), süperoksit dismutaz 2 (SOD2), izositrat dehidrogenaz (IDH) ve piruvat dehidrogenaz (PDH) gibi oksidatif strese duyarlı enzimleri hedefleyerek, önemli bir ROT süpürücüsü olarak kabul edilmektedir. MnSOD, reaktif süperoksit iyonlarını hidrojen peroksit'e dönüştüren ve sonunda katalaz tarafından suya nötralize edilen bir detoksifikasyon enzimidir. SIRT3 deasetilasyonu ile MnSOD'a bağlı olarak hücresel ROT seviyesi azalmaktadır. MnSOD'un asetillenmiş lizin kalıntıları içerdiği ve bu durumda kalori kısıtlaması

veya 36 saat açlık gibi aktivitelemlerle giderilebildiği bilinmektedir. Tao ve ark. (2010) SIRT3^{-/-} hücrelerinde, MnSOD asetilasyonunun önemli düzeyde arttığını, enzimatik aktivitesinin ise azaldığını belirtmişlerdir. Böylelikle SIRT3, MnSOD'un anti oksidatif stres etkinliğini ve direncini arttırdığı çıkarımı yapılabilmektedir. Aynı şekilde ROT seviyelerinin düşürülmesinde SIRT3 ile MnSOD deasetilasyonunun sinerjik bir etki içinde oldukları da söz konusudur [4,130]. İlâveten Chen ve ark. (2011), SIRT3'ün oksidatif stres altında insan embriyonik böbrek 293 hücrelerin de (HEK293) MnSOD'u deasetile edip, aktive ederek ROT seviyelerin düşürülmesini desteklediğini göstermişlerdir [132]. Ayrıca SIRT3 eksikliğinde piruvat dehidrogenazın (PDH) hiperasetillendiği ve glikolizis metabolizmasında değişikliklere yol açtığıda bilinmektedir. Piruvat dehidrogenaz (PDH) pirüvatın asetil-KoA'ya dönüşümünü dekarboksilasyon yoluyla katalize edip, karbonhidrat ve yağ metabolizmasını düzenleyen bir multienzim kompleksidir. Piruvat dehidrogenaz kompleksi (PDC), üç alt birimden oluşmaktadır. PDC aktivitesi, PDH kinazlar (PDHK'ler) ve PDH fosfatazlar yoluyla E1 α alt ünitesinin serin kalıntılarının tersinir fosforilasyonu ile düzenlenmektedir [8]. PDH'nin ana bileşenlerinden biri olan PDHA1 veya E1 α , PDK1 tarafından fosforile edilip; tüm piruvat dehidrogenaz kompleksini inaktive ederek, oksidatif fosforilasyon için trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne giren piruvatı azaltır, Warburg etkisini artırır ve tümör oluşumunu teşvik etmektedir [9]. Özden ve ark. (2014) çalışmalarında SIRT3 deasetilasyonunun kanser hücrelerinde piruvat dehidrogenaz aktivitesini artırarak Warburg etkisini azalttığını göstermişlerdir. SIRT3, PDHA1 lysine 321 (K321)'i deasetiller ve deasetile edilmiş bir PDHA mutanlığı (PDHA1^{K321R}) PDH aktivitesini artırır. Aynı şekilde asetillenmiş bir PDHA mutanlığı (PDHA1^{K321Q}) ise, PDH aktivitesini azaltmaktadır [3]. Yüksek PDH aktivitesi, glikolizisi azaltarak ROT üretimini ve oksidatif fosforilasyonu arttıracaktır. Göğüs tümörleri gibi birçok kanser hücresinde SIRT3 ekspresyonu önemli ölçüde azalmaktadır. Bu durum, lizin kalıntıların (K321, K336 gibi) hiperasetilasyonuna ve PDH aktivitesinde bir azalmaya neden olur. PDH aktivitesinde meydana gelen bir azalma, yüksek glikolitik değerlere sebep olurken, sonuç olarak Warburg etkisi artar ve kanser hücrelerinde oksidan üretimi azalmaktadır [3,7].

Bell ve ark. (2011) da SIRT3'ün aşırı ekspresyonunun, hipokside HIF-1 α proteininin stabilizasyonunu inhibe ederek HIF-1 α transkripsiyonel aktivitesindeki artışları azalttığını saptamışlardır. SIRT3 proteini, ROT üretimini inhibe ederek HIF-1 α ve

tümör büyümesini baskılamaktadır bu nedenle SIRT3 aktivitesi mitokondri homeostazını korumak ve metabolik hedefleri dengelemek için oldukça büyük bir öneme sahiptir [153]. Kim ve ark. (2010) çalışmalarında, SIRT3 defekti olan farelerin kansere karşı daha duyarlı hale geldiklerini ve insan meme kanserleri ile diğer bazı tümörlerin de sağlıklı dokulara nazaran azalmış SIRT3 seviyeleri içerdiğini belirtmişlerdir [134]. Alhazzazi ve ark. (2011) SIRT3'ün OSCC hücrelerinde hücre büyümesini ve proliferasyonunu inhibe ettiğini ve böylelikle SIRT3'ü ağız kanseri tedavisinde potansiyel terapötik bir hedef olacağını saptamışlardır [145]. SIRT3 mitokondriyal metabolizmayı, oksidatif stresi ve ROT üretimini düzenleyen proteinlerin asetilasyon durumunu kontrol ederek, kanser hücresi çoğalmasının önüne geçmektedir [2,3,134].

Kanserin üzerinde yürütülmekte olan çok sayıdaki araştırmalara rağmen, halen önemini koruyan ölümcül bir patoloji olduğu herkesçe kabul edilmektedir. Dünya çapında ölüm nedenlerine bakıldığında, kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada karşımıza kanser çıkmaktadır. Giderek artan dünya nüfusu ile birlikte 2040 yılına kadar kanserin ilk sıraya yerleşmesi beklenmektedir [6]. Kanser tedavisine bakıldığında ise, öncelikle tümörün organizmada ki konumuna ve evresine bağlı olarak cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve gen terapisi gibi birçok tedavi yöntemine başvurulduğu görülmektedir [14]. Bütün bu tedavi yöntemleri için, uzun zaman ve yüksek maliyet gerektiği bilinir. Bütün bu etkenlerde insanları, başka arayışlara yönlendirmektedir. Son zamanlarda alternatif tedavi yöntemi olarak bitki özütleri gibi doğal biyoaktif maddelerin kullanımı, hem toksisitesi daha az olması açısından hem de ekonomik olmasından dolayı büyük ilgi uyandırmaktadır.

Bitkilerin yapısında yer alan bazı biyoaktif maddelerin, tümör oluşumu ve kanserleşmede önemli rolü olan serbest radikallerin süpürülmesinde terapötik ajan olarak işlevlendikleri bilinmektedir. Flavonoidler meyve, sebze ve bitkilerde bulunan belirgin etkileri olan bilhassa antioksidan ve antienflamatuar özellikleriyle bilinen ve kansere karşı potansiyel etki taşıyan organik bileşiklerdir. Fenolik birleşikler ise, yine bitkilerde yaygın olarak bulunan antioksidan özelliğe sahip sekonder metabolitlerdir. Yapılan çeşitli çalışmalar fenolik bileşiklerce zengin olan bitkileri, birçok kronik ve dejeneratif hastalıkların yanı sıra kanser riskini azaltma potansiyeliyle ilişkilendirmişlerdir [69-73]. Bu bitkilerden biri olan kapari olarak da bilinen *C. ovata*

bitkisinin çiçek tomurcukları, kök kabukları ve meyvesi türlere göre farklılık gösteren miktarlarda protein, lipid, alkaloid, polifenol, glukosinolat ve flavonoid içermektedir. Germano ve ark. (2002), Matthaus ve Özcan (2005), Tlili ve ark. (2010) yaptıkları çalışmalarda kaparinin yaprak ve tomurcuklarının fenolik birleşiklerce güçlü olduğunu, bu birleşiklerin de serbest radikal süpürücü aktivitesine sahip olan önemli birer antioksidan grubunu oluşturduğunu göstermişlerdir [17,69,70]. Yine Germano ve ark. (2002) aynı çalışmada *Capparis* metanolik ekstraktlarının demir otoksidasyonunu yükselterek ferröz demiri ferrik şekle çevirip, hidroksil radikal oluşumunu azalttığını ve kaparinin sahip olduğu fenollere bağlı olarak antioksidan özellik gösterdiğini bildirmişlerdir [17].

Özellikle flavonoidler bitkiye tıbbi ve aromatik etkisini vermenin yanı sıra antikanser aktiviteye sahip olmalarıyla da adından söz ettirmektedir. Çiçek tomurcuklarında yer alan fenolik bileşenler arasındaki ana bileşen, rutin (quercetin 3-rutinoside) dir. İkincil olarak da kaempferol-3-rutinoside yer alır. Toplam flavonoid içeriğinin %86.5'i rutinden (quercetin 3-rutinoside) gelmektedir [71-73]. Bilhassa rutin, antikanser etkisiyle ilgi gören fonksiyonel bir diyet flavonoidi olarak bilinmektedir. Yine bitkinin, kök ve yapraklarında bulunan indol-3-metil glukosinolat ve bunların hidroliz ürünlerine de, kanser tedavilerinde sıklıkla yer verilmektedir [72].

Vücutta meydana gelen metabolik tepkimeler beraberinde serbest radikalleri oluşturur, oluşan bu serbest radikaller hücre membranlarında yer alan lipid ve proteinleri parçalayarak, hücrelerin işlevlerini engelleyip, hücre ölümüne sebebiyet vererek, immun sistemini zayıflatırlar. Bu olumsuz etkilerinde, antioksidatif etkiye sahip bileşenler ve fenolik bileşikler ile birlikte önüne geçilerek etkileri azaltılabilmektedir. Birçok fitokimyasal içeriğe sahip olan kapari, zengin antioksidan içeriği ile analjezik, antienflamatuar antibakteriyel, antialerjik, antihipertansif, antifungal etkilerinin yanı sıra antitümöral etkilere sahip olduğu ve kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmesi yönüyle son zamanlarda doğal ilaç kaynağı olarak ön plana çıkmaktadır [63,64]. Moghaddasian ve ark. (2013) çalışmalarında, *C. spinosa* hidroalkolik ekstraktının HeLa, MCF7, Saos ve Fibroblast kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır [71]. *C.spinosa* hidroalkolik ekstraktının, kanser hücrelerini etkili bir şekilde azalttığını ve kanserin engellenmesi için quercetin gibi zengin bileşikler içerdiğini rapor etmişlerdir [71]. Benzer şekilde Özkan ve ark. (2018)

yaptıkları çalışmada, *C. ovata* metanol ekstraktının antioksidan ve antifungal etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Doza bağlı olarak kapari ekstraktının, NO radikallerini engellediğini ve oksidatif stres kaynaklı kanser gibi birçok hastalığa karşı da koruyucu olduğunu belirtmişlerdir [165]. Gull ve ark. (2015) yaptıkları çalışma sonucunda *C. spinosa* meyve ekstraktının human hepatoma HepG2 hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir [76]. Kulisic-Bilusic ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *Capparis* bitkisinden elde ettikleri uçucu yağ ve sulu infüzyonunun insan kolon karsinoma hücre hattı olan HT-29 hücrelerinin çoğalmasını, zamana ve doza bağlı olarak inhibe ettiğini göstererek; bitkinin kolon kanserine karşı potansiyel etkiye sahip bileşikler içerdiğini değerlendirmişlerdir [166].

Bu çalışmada ise DLD1, COLO-205, HCT116 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatları kullanılarak *C. ovata* ekstraktının sirtuin ve piruvat dehidrogenaz ekspresyonları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Literatüre baktığımızda ise, kapari ekstraktının daha önce insan kanserleri üzerinde sirtuin ve piruvat dehidrogenaz enzim düzeylerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu amaç doğrultusunda DLD-1, COLO-205, HCT116 ve MDA-MB-231 hücre hatları uygun koşullarda büyütülüp ve sonrasında ise hücre canlılık deneyleri ile bu hücrelere uygulanacak *C. ovata* ekstraktının anti kanser analizleri gerçekleştirilmiştir.

CVDK-8 kiti kullanılarak gerçekleştirilen hücre canlılık testinin sonucunda DLD-1 hücrelerinde, ekstraktının kontrole göre 100 µg/mL'lik konsantrasyonunun hücre canlılığını önemli düzeyde, yaklaşık %20 oranında azalttığı, MDA-MB-231 hücrelerine 500 µg/mL'lik dozlarında ekstrakt verildiğinde kontrole göre anlamlı olarak bir düşüş gözlemlendiği, hücre sağ kalım oranı kontrole göre yaklaşık %24 azaldığı ve son olarak COLO-205 hücrelerine 500 µg/mL'lik dozlarında ekstrakt verildiğinde kontrole göre %28 oranında bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda mikroskop altında incelenen hücrelerin, CVDK-8 deneyiyle tutarlı bir şekilde ekstrakt verildikçe azaldıkları görülmüştür. Çalışmamızda COLO-205 hücrelerine, hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi amacıyla koloni formasyon deneyi yapılmıştır. Ekstraktın 500 µg/mL'lik konsantrasyonunun COLO-205 hücrelerinde koloni formasyonunu istatistiksel olarak azalttığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, *C.ovata*'nın kanser hücrelerinde proliferasyonu engelleme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Antikanser özelliğe sahip olduğu bilinen *C. ovata*'nın, kanser mekanizmasındaki yerinin pekişmesi için Western blotlama ve immüno Floresan boyama olmak üzere iki farklı immünolojik yöntem kullanıldı. Öncelikle Western blot yöntemiyle, DLD-1 ve MDA-MB-231 hücrelerinde SIRT3, PDH ve LDHA proteinlerinin ekspresyon düzeylerine bakıldı. Elde ettiğimiz ekspresyon düzeyleri analiz sonuçlarına göre, DLD-1 hücrelerinde, PDH proteini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 µg/ml konsantrasyonunda arttığı, öte yandan 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Aynı şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinde ise, PDH proteini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece 500 µg/ml konsantrasyonunda arttığı, öte yandan 100 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Son olarak, 48 saat boyunca 500µg/mL *C. ovata* metanol ekstraktına maruz bırakılan HCT116 kolon kanseri hücrelerinde oluşan DNA kırıklarının analizi immüno Floresan boyama tekniğiyle yapıldı. γ-H2AX antikoru, DNA hasarlarının göstergesi olan çok önemli bir biyobelirteçtir. DNA hasarıyla birlikte ortaya çıkan γ-H2AX antikoru DNA çift zincir kırıklarının tespitinde nicel bir indikatör ve karsinogenezlik riskinin değerlendirmesinde kullanılan çok önemli bir platformdur. İmmüno Floresan boyama sonucumuzda ise, HCT116 hücrelerinde kontrole göre γH2AX odaklarında önemli derecede DNA kırıkları gözlemlenmiştir. HCT116 kolon kanseri hücrelerinde 500µg/mL *C. ovata* uygulanmasının tüm hücrelerin etkilendiği ve DNA çift zincir kırıkları aracılığıyla DNA hasarına yol açtığı belirlenmiştir.

Mevcut sonuçlar, yenilebilir bir bitki olan *C. ovata* 'nın kansere karşı potansiyel etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar, *C. ovata* metanol ekstraktının önemli bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu ve DLD-1, COLO-205, HCT116 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. *C. ovata* bitkisinin antikanser ve antioksidan aktivite potansiyelinin çalışılması ve literatüre kazandırılması yeni projelerin üretilmesine ve kanser tedavilerinde ilaç etken maddesi araştırmaları için önem arz etmektedir. Ayrıca sonraki çalışmalarda *C. ovata*'nın kanser hücrelerine etkisini, ileri moleküler tekniklerle daha detaylı bir şekilde aydınlatılması gerektiği düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Hanahan, D. and Weinberg, R. A., (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-74.
- [2] Sudhakar, A., (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 1(2), 1-4.
- [3] Ozden, O., Park, S. H., Wagner, B. A., Song, H. Y., Zhu, Y., Vassilopoulos, A., Jung, B., Buettner, G. R. and Gius, D., (2014). SIRT3 Deacetylates and Increases Pyruvate Dehydrogenase Activity in Cancer Cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 76, 163-172.
- [4] Merksamer, P. I., Liu, Y., He, W., Hirschey, M. D., Chen, D. and Verdin, E., (2013). The Sirtuins, Oxidative Stress and Aging: an Emerging Link. *Aging*, 5(3), 144-50.
- [5] Houtkooper, R. H., Pirinen, E. and Auwerx, J., (2012). Sirtuins as Regulators of Metabolism and Healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 225-38.
- [6] Weinberg, R., (2013). *The Biology of Cancer*. Taylor and Francis Group, 31-71.
- [7] Ozden, O., Park, S. H., Kim, H. S., Jiang, H., Coleman, M. C., Spitz, D. R. and Gius D., (2011). Acetylation of MnSOD Directs Enzymatic Activity Responding to Cellular Nutrient Status or Oxidative Stress. *Aging*, 3(2), 102-7.
- [8] Linn, T. C., Pettit, F. H. and Reed, L. J., (1969). Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes. X. Regulation of the Activity of the Pyruvate Dehydrogenase Complex from Beef Kidney Mitochondria by Phosphorylation and Dephosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 62(1), 234-41.
- [9] Xu, L., Li, Y., Zhou, L., Dorfman, R. G., Liu, L., Cai, R., Jiang, C., Tang, D., Wang, Y., Zou, X., Wang, L. and Zhang, M., (2019). SIRT3 Elicited an Anti-Warburg Effect Through HIF1 α /PDK1/PDHA1 to Inhibit Cholangiocarcinoma Tumorigenesis. *Cancer Medicine*, 8, 2380-2391.
- [10] Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H. J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B. and Starling, N., (2010). Colorectal Cancer. *Lancet*, 375(9719), 1030-47.

- [11] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A., (2018). Global Cancer Statistics. GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer Journal of Clinicians*, 68(6), 394-424.
- [12] McPhee, S. J. and Papadakis, M. A., (2010). *Güncel Tıbbi Tanı ve Tedavi*, Müftüoğlu, E. (Ed.). Nobel Tıp Kitapevleri, Adana, 1465-1485.
- [13] Espina, C., Céspedes, M. V., García-Cabezas, M. A., del Pulgar, M. T. G., Boluda, A., Oroz, L. G., Cejas, P., Nistal, M., Mangues, R. and Lacal, J. C., (2008). A Critical Role for Rac1 in Tumor Progression of Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. *The American Journal Of Pathology*, 172(1), 156-66.
- [14] Cai, Y., Ma, W., Huang, X., Cao, L., Li, H., Jiang, Y., Lu, N. and Yin, Y., (2015). Effect of Survivin on Tumor Growth of Colorectal Cancer in vivo. *International Journal of Clinica and Experimental Pathology*, 8(10), 13267-72.
- [15] Bilgin, M., (2004). *Kapari, Yurtiçi Piyasa ve Ürün Araştırması*, İTÜ Dış Ticaret Şubesi Araştırma Servisi, Haziran, 23s.
- [16] Zia-Ul-Haq, M., Cavar, S., Qayum, M., Imran, I. and De Feo, V., (2011). Compositional Studies: Antioxidant and Antidiabetic Activities of Capparis Decidua (Forsk.) Edgew, *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (12), 8846-8861.
- [17] Germano, M. P., De Pasquale, R., D'Angelo, V., Catania, S., Silvari, V. and Costa, C., (2002). Evaluation of Extracts and Isolated Fraction from Capparis Spinosa L. Buds as an Antioxidant Source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1168-71.
- [18] Atıcı, E., (2007). Tıp Tarihinde Kanser ve Lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 22(4), 197- 204.
- [19] <https://www.drozdogan.com/kanser>, (16.16.2019).
- [20] Brock, D. J. H., (1993). *Molecular Genetics Fort He Clinician*. Cambridge University Press.
- [21] Rodriguez Bigas, M. A., Stoler, D. L., Bertario, L., Anderson, R. G. and Baba, S., (2000). Colorectal Cancer: How Does it Start? How Does it Metastasize? *Surgical Oncology Clinics of North America*, 9(4), 643-652.
- [22] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition. New York.

- [23] Taşkın, A., (2017). Akut Promyelositik Lösemi Hücre Hattı (HL-60) ve Normal İnsan Lenfosit Hücre Kültüründe İdarubisin Sitotoksitesine Karşı Bromelainin Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gaziantep.
- [24] Cooper, G. M. and Hausman, R. E., (2004). A Molecular Approach. Hücre: Moleküler Yaklaşım, Sakızlı, M., Atabey, N., İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 541-669.
- [25] Nicolai, S., Rossi, A., Di Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M. and Raschella, G., (2015). DNA repair and Aging: the Impact of the P53 Family. Aging, 7(12), 1050-1065.
- [26] Vogelstein, B. and Kinzler, K. W., (2002). The Genetic Basis of Human Cancer. Second Edition, 43- 57.
- [27] Lüleyp, H. Ü., (2008). Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel Kitapevi, Adana, 88- 120.
- [28] <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (28.11.2019)
- [29] Clavel, J., (2007). Progress in the Epidemiological Understanding of Gene-Environment Interactions in Major Diseases: Cancer. Comptes Rendus Biologies, 330(4), 306-17.
- [30] Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J. and Thun, M. J., (2007). Cancer Statistic. Cancer Journal for Clinicians, 57(1), 43-66.
- [31] Hawk, E. T., Limburg, P. J. and Viner, J. L., (2002). Epidemiology and Prevention of Colorectal Cancer. Surgical Clinics of North America, 82(5), 905-41.
- [32] Wei, F., Zhang, T., Yang, Z., Wei, J. C., Shen, H. F., Xiao, D., Wang, Q., Yang, P., Chen, H. C., Hu, H., Chen, Z. P., Huang, Q., Li, W. L. and Cao, J., (2018). Gambogic Acid Efficiently Kills Stem-Like Colorectal Cancer Cells by Upregulating ZFP36 Expression. Cellular Physiology and Biochemistry, 46, 829-846.
- [33] Burt, R. W., DiSario, J. A. and Cannon-Albright, L., (1995). Genetics of Colon Cancer: Impact of Inheritance on Colon Cancer Risk. Annual Review of Medicine, 46, 371.

- [34] Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., Braud, F. D. and Wils, J., (2010). Colon Cancer. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 74(2), 106-33.
- [35] Jameson, J. L., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L. and Loscalzo, J., (2018). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw Hill Medical Books, 538.
- [36] Rahman, S. M., Mckibben, B., Hardy, T. G., Schloss, C. D., Cho, C. C., Hartmann, R. F., Aguilar, P. S., Khanduja, K. S. and Stewart, W. R., (1990). Preoperative versus Postoperative Adjuvant Radioterapy for Surgically Curable Carcinoma of them Rektum and Distal Sigmoid Colon. *Southern Medical Journal*, 83, 774-7.
- [37] Aakif, M., Balfe, P., Elfaedy, O., Awan, F. N., Pretorius, F., Silvio, L., Castinera, C. and Mustafa, H., (2016). Study on Colorectal Cancer Presentation, Treatment and Follow-Up. *International Journal of Colorectal Disease*, 31(7), 1-3.
- [38] Buğra, D., (2004). Genel Konular. Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. 2.Baskı: 17-20, İstanbul.
- [39] <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer> (20 Haziran 2020).
- [40] Dusak, A., (2015). Kolon Kanserli Hastalarda Bazı Antioksidan Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, 1-20.
- [41] Mitchell, R., Kumar, V., Fausto, N., Abbas, A. and Aster, J., (2010). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Elsevier Saunders, 817-825.
- [42] Ashktorab, H., Schaffer, A. A., Daremipouran, M., Smoot, D. T., Lee, E. and Brim, H., (2010). Distinct Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Plos One*, 5(1), 8879.
- [43] Fearon, E. R. and Vogelstein, B., (1990). a Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.
- [44] Sachse, C., Smith, G., Wilkie, M. J. V., Barrett, J. H., Waxman, R., Sullivan, F., Forman, D., Bishop, D. T. and Wolf, C. R., (2002). a Pharmacogenetic Study to Investigate the role of Dietary Carcinogens in the Etiology of Colorectal Cancer. *Carcinogenesis*, 23,1839-1845.
- [45] Breast Cancer in Men, (2007). Cancer Research UK.

- [46] Glade, M. J. (2008). World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective 2007, American Institute for Cancer Research, Washington.
- [47] Box, B. A. and Russel, C. A., (2004). Breast Cancer, Manual of Clinical Oncology, Casciato, D. A., (eds.). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 233-253.
- [48] Ronco, A. L. and De Stéfani, E., (2011). Nutritional Epidemiology of Breast Cancer: Springer Science and Business Media.
- [49] Dey, B. and Kumar, A., (2018). A Review Article on Breast Cancer. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research, 11(2), 284-298.
- [50] <https://www.kanser.org> (28.11.2019)
- [51] Buckley, E. S., W, F., Hiller, J. E., Roder, D. M. and Farshid, G., (2014). a Systematic Review of Surgical Biopsy for LCIS Found at Core Needle Biopsy e Do We Have the Answer Yet? European Journal of Surgical Oncology, 40, 168-175.
- [52] <https://www.turkcerrahi.com>, (20.06.2019)
- [53] Akgül, A., (1996). Yeniden Keşfedilen Lezzet: Kapari (*Capparis* spp.). Gıda, 21(2), 119-128.
- [54] <http://tubives.ibu.edu.tr>, 14.01.2020.
- [55] Söyler, D. ve Arslan, N., (2002). Değişik ortamların kebere (*Capparis ovata* Desf.) bitkisinin gövde çeliklerinin köklenmesi üzerine etkisi. Ekin, 6(19), 70-73.
- [56] Özcan, M. and Akgül, A., (1999a). Influence of Species, Harvest Date and Size on Composition of Capers (*Capparis* Spp.) Flower Buds, 42(2), 102-105.
- [57] Arslan, R., Bektaş, N. and Öztürk, Y., (2010). Antinociceptive Activity of Methanol Extract of Fruits of *Capparis Ovata* in Mice. Journal Ethnopharmacol, 131, 28-32.
- [58] Fici, S., (2004). Micromorphological Observations on Leaf and Pollen of *Capparis* L. Section *Capparis* (Capparaceae). Plant Biosyst, 138, 125-134.

- [59] Romeo, V., Ziino, M. and Giuffrida, D., (2007). Flavour Profile of Capers (*Capparis Spinosa* L.) From the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC-MS. *Food Chemical*, 101, 1272-1278.
- [60] Inocencio, C., Rivera, D., Obón, M. C., Alcaraz, F. and Barreña, A., (2006). a Systematic Revision of *Capparis* Section *Capparis* (Capparaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93(1), 122-149.
- [61] Baytop, T., (1984). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları, 3255, İstanbul.
- [62] Özcan, M., (1998). Physical and Chemical Properties and Fatty Acid Compositions of Raw and Brined Caperberries (*Capparis* Spp.). *Journal of Agriculture and Forestry*, 23(3), 771-776.
- [63] Al-Said, M. S., Abdelsattar, E. A., Khalifa, S. I. and El-Feraly, F. S., (1988). Isolation and Identification of an Anti-Inflammatory Principle from *Capparis Spinosa*, *Pharmazie*, 43, 640-641.
- [64] Barbera, G., Di Lorenzo, R. and Barone, E., (1991). Observation on *Capparis* Populations Cultivated in Sicily and on their Vegetative and Productive Behaviour. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 121, 32-39.
- [65] Sher, H. and Alyemeni, M. N., (2010). Ethnobotanical and Pharmaceutical Evaluation of *Capparis Spinosa* L, Validity of Local Folk and Unani System of Medicine. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 1751-1756.
- [66] Kart, A., (2019). Kapari Bitkisinin Bioaktif, Farmakolojik Etkileri ve Nörodejeneratif Hastalıklarda Kullanımı, *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 4(2), 101-107.
- [67] El-Ghorab, A., Shibamoto, T. and Özcan, M. M., (2007). Chemical Composition Andantioxidant Activities of Buds and Leaves of Capers (*Capparis Ovata* Desf. Var. *Canescens*) Cultivated İn Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 19, 72-77.
- [68] Tlili, N., Khaldi, A., Triki, S. and Munné-Bosch, S., (2010). Phenolic Compounds and Vitamin Antioxidants of Caper (*Capparis spinosa*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 260-265.
- [69] Matthäus, B. and Özcan, M., (2005). Glucosinolates and Fatty Acid, Sterol and Tocopherol Composition of Seed Oils from *Capparis Spinosa* Var. *Spinosa* and *Capparis Ovata* Desf. Var. *Canescens* (Coss.) Heywood, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7136-7141.

- [70] Tlili, N., Elfalleh, W., Saadaoui, E., Khaldi, A., Triki, S. and Nasri, N., (2011). the Caper (*Capparis L.*): Ethnopharmacology, Phytochemical and Pharmacological Properties. *Fitoterapia*, 82: 93-101.
- [71] Moghaddasian, B. E. A. and Davood, A. A., (2013). Simultaneous Determination of Rutin and Quercetin in Different Parts of *Capparis Spinosa*. *Bull Environ Pharmacol Life Science*, 2, 35-8.
- [72] Tesoriere, L., Butera, D., Gentile, C. and Livrea, M. A., (2007). Bioactive Components of Caper (*Capparis Spinosa L.*) from Sicily and Antioxidant Effects in a Red Meat Simulated Gastric Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8465-8471.
- [73] Proestos, C. and Boziaris, I. S., (2006). Analysis of Flavonoids and Phenolic Acids in Greek Aromatic Plants: Investigation of their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Food Chemistry*, 664-671.
- [74] Arena, A., Bisignano, G., Pavone, B., Tomaino, A., Bonina, F., Saija, A., Cristani, M., D'Arrigo, M. and Trombetta, D., (2008). Antiviral and Immunomodulatory Effect of Alyophilized Extract of *Capparis Spinosa L.* Buds. *Phytotherapy Research*, 22, 313-317.
- [75] Rathee, S., Rathee, P., Rathee, D. and Rathee, D. V. K., (2011). Phytochemical and Pharmacological Potential of Kair (*Capparis Decidua*). *International Journal of Phytomedicine*, 2, 10-7.
- [76] Gull, T., Anwar, F., Sultana, B., Alcaide, M. A. C. and Nouman, W., (2015). *Capparis* Species: a Potential Source of Bioactives and High-Value Components: a Review. *Industrial Crops and Products*, 67, 81-96.
- [77] Lam, S. K. and Ng, T. B., (2009). a Protein with Antiproliferative, Antifungal and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from Caper (*Capparis Spinosa*) Seeds. *Phytomedicine*, 16, 444-445.
- [78] Wu, J. H., Chang, F. R., Hayashi, K., Shiraki, H., Liaw, C. C. and Nakanishi, Y., (2003). Cappamensin A, a New in vitro Anticancer Principle, from *Capparis Sikkimensis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13, 2223-2225.
- [79] Chang, J. M., Chen, W. C., Hong, D. and Lin, J. K., (1995). The Inhibition of DMBA-Induced Carcinogenesis by Neoxanthin in Hamster Buccal Pouch. *Nutritional Cancer*, 24, 325-333.

- [80] Ghule, B. V., Muruganathan, G., Nakhat, P. D. and Yeole, P. G., (2006). Immunostimulant Effects of *Capparis Zylanica* Linn Leaves. *Journal Ethnopharmacol*, 08, 311-331.
- [81] Dorman, H. and Deans, S., (2000). Antimicrobial Agents from Plants: 122 Antibacterialactivity Of Plant Volatile Oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
- [82] Sini, K., Sinha, B. N., Rajasekaran, A., Thorakkattil, M., Krishnan, D. and Jose, M. K., (2011). Antimicrobial Activity of the Dried Root Powder of *Capparis Grandiflora* Wall. Exhook. *Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research*, 4, 360-374.
- [83] Sharma, B. and Kumar, P., (2008). Extraction and Pharmacological Evaluation of Someextracts of *Tridax Procumbens* and *Capparis Decidua*. *International Journal of Applied Research National Products*, 1, 5-12.
- [84] Steenkamp, V., Mathivha, E., Gouws, M. and Van Rensburg, C., (2004). Studies Onantibacterial, Antioxidant and Fibroblast Growth Stimulation of Wound Healingremedies from South Africa. *Journal Ethnopharmacol*, 95, 353-357.
- [85] Ali-Shtayeh, M. S. and Abu Ghdeib, S. I., (1999). Antifungal Activity of Plant Extracts Against Dermatophytes. *Mycoses*, 42(11-12), 665- 72.
- [86] Zhou, H. F., Xie, C. H., Jian, R. J., Kang, J., Li, Y., Zhuang, C. L., Yang, F., Zhang L., Lai, L., Wu, T. and Wu X., (2011). Biflavonoids from Caper (*Capparis Spinosa* L.) Fruits and their Effects in Inhibiting NF-Kappa B Activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3060-5.
- [87] Bektas, N., Arslan, R., Goger, F., Kirimer, N. and Öztürk, Y. (2012). Investigation for Anti-Inflammatory and Anti-Thrombotic Activities of Methanol Extract of *Capparis Ovata* Buds and Fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 48-52.
- [88] Arslan, R., Bektaş, N. and Öztürk, Y., (2010). Antinociceptive Activity of Methanol Extract of Fruits of *Capparis Ovata* in Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 28-32.
- [89] Klar, A. J., Fogel, S. and Macleod, K., (1979). MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 93(1), 37-50.
- [90] Park, S. H., Ozden, O., Jiang, H., Cha, Y. I., Pennington, J. D., Aykin-Burns, N., Spitz, D. R., Gius, D. and Kim, H. S., (2011). Sirt3, Mitochondrial ROS, Ageing, and Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 6226-39.

- [91] Haigis, M. C. and Sinclair, D. A., (2010). Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annual Reviews of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 253-95.
- [92] Baur, J. A., Ungvari, Z., Minor, R. K., Le Couteur, D. G. and de Cabo, R., (2012). Are Sirtuins Viable Targets for Improving Healthspan and Lifespan? *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(6), 443-61.
- [93] Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C. and Horikawa, I., (2005). Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 4623-35.
- [94] Sauve, A. A., (2010). Sirtuin Chemical Mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804, 1591-603.
- [95] Nogueiras, R., Habegger, K. M., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A. S., Dietrich, M. O., Horvath, T. L., Sinclair, D. A., Pfluger, P. T. and Tschöp, M. H., (2012). Sirtuin 1 and Sirtuin 3: Physiological Modulators of Metabolism. *Physiological Reviews*, 92(3), 1479-514.
- [96] Kincaid, B. and Bossy-Wetzel, E., (2013). Forever Young: SIRT3 a Shield Against Mitochondrial Meltdown, Aging, and Neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 1–13.
- [97] Kupis, W., Pałyga, J., Tomal, E. and Niewiadomska, E., (2016). The Role of Sirtuins in Cellular Homeostasis. *Journal Physiology of Biochemistry*, 72(3), 371-80.
- [98] Kozako, T., Suzuki, T., Yoshimitsu, M., Arima, N., Honda, S. I. and Soeda, S., (2014). Anticancer Agents Targeted to Sirtuins. *Molecules*, 19: 20295-313.
- [99] Morris, K. C., Lin, H. W., Thompson, J. W. and Perez-Pinzon, M. A., (2011). Pathways for Ischemic Cytoprotection: Role of Sirtuins in Caloric Restriction, Resveratrol, and Ischemic Preconditioning. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31, 1003-1019.
- [100] Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng-Eaton, E., Imai, S., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L. and Weinberg, R. A., (2001). hSIR2(SIRT1) Functions as an NAD-Dependent P53 Deacetylase. *Cell*, 107: 149-59.
- [101] Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W. and Greenberg, M. E., (2004). Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science*, 303(5666), 2011-2015.

- [102] Ford, J., Jiang, M. and Milner, J., (2005). Cancer-Specific Functions of SIRT1 Enable Human Epithelial Cancer Cell Growth and Survival. *Cancer Research*, 65, 10457-63.
- [103] Kabra, N., Li, Z., Chen, L., Li, B. Zhang, X., Wang, C., Yeatman, T., Coppola, D. and Chen, J., (2009). SirT1 is an Inhibitor of Proliferation and Tumor Formation in Colon Cancer. *Journal of Biology Chemistry*, 284, 18210-7.
- [104] Herskovits, A. Z. and Guarente, L., (2014). SIRT1 in Neurodevelopment and Brain Senescence. *Neuron*, 81, 471-483.
- [105] Wang, F., Nguyen, M., Qin, F. X. F. and Tong, Q., (2007). SIRT2 Deacetylates FOXO3a in Response to Oxidative Stress and Caloric Restriction, *Aging Cell*, 6, 505-514.
- [106] Nakagawa, T. and Guarente, L., (2011). Sirtuins at a Glance. *Journal of Cell Science*, 124, 833-838.
- [107] Hiratsuka, M., Inoue, T., Toda, T., Kimura, N., Oshimura, M. and Shirayoshi, Y., (2003). Proteomics-Based Identification of Differentially Expressed Genes in Human Gliomas: Down-Regulation of SIRT2 Gene. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 309(3), 558-66.
- [108] Ahuja, N., Schwer, B., Carobbio, S., Waltregny, D., North, B. J. and Castronovo, V., (2007). Regulation of Insulin Secretion by SIRT4, a Mitochondrial ADP-Ribosyltransferase. *Journal of Biology Chemistry*, 282, 33583-92.
- [109] Csibi, A., Fendt, S. M., Li, C., Poulogiannis, G., Choo, A. Y., Chapski, D. J., Jeong, S. M., Dempsey, J., Parkhitko, A., Stephanopoulos, T., Yu, J. and Blenis, J., (2013). The mTORC1 Pathway Stimulates Glutamine Metabolism and Cell Proliferation by Repressing SIRT4. *Cell*, 153(4), 840-854.
- [110] Guedouari, H., Daigle, T., Scorrano, T. and Hebert-Chatelain, E., (2017). Sirtuin 5 Protects Mitochondria from Fragmentation and Degradation During Starvation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1864, 169-76.
- [111] Kawahara, T. L., Michishita, E., Adler, A. S., Damian, M., Berber, E. and Lin, M., (2009). SIRT6 Links Histone H3 Lysine 9 Deacetylation to NF-KappaB-Dependent Gene Expression and Organismal Life Span. *Cell*, 136, 62-74.
- [112] Barber, M. F., Michishita-Kioi, E., Xi, Y., Tasselli, L., Kioi, M., Moqtaderi, Z., Tennen, R. I., Paredes, S., Young, N. L., Chen, K., Struhl, K., Garcia, B. A., Gozani, V., Li, W. and Chua, K. F., (2012). SIRT7 Links H3K18 Deacetylation to Maintenance of Oncogenic Transformation. *Nature*, 487, 114-118.

- [113] Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Brown, K., Luo, H. and Xi, Y., (2015). Stem Cell Aging. a Mitochondrial Upregulated Metabolic Checkpoint Regulates Hematopoietic Stem Cell Aging. *Science*, 347, 1374-7.
- [114] Araki, S., Izumiya, Y., Rokutanda, T., Ianni, A., Hanatani, Y. and Kimura, Y., (2015). Sirt7 Contributes to Myocardial Tissue Repair by Maintaining Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway. *Circulation*, 132, 1081-93.
- [115] Jin, L., Wei, W., Jiang, Y., Peng, H., Cai, J., Mao, C., Dai, H., Choy, W., Bemis, J. E., Jirousek, M. R., Milne, J. C., Westphal, C. H. and Perni, R. B., (2009). Crystal Structures of Human SIRT3 Displaying Substrate-Induced Conformational Changes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24394-405.
- [116] Libert, S. and Guarente, L., (2013). Metabolic and Neuropsychiatric Effects of Calorie Restriction and Sirtuins. *Annual Reviews of Physiology*, 75(1), 669-84.
- [117] Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H. L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., Mostoslavsky, R. Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschey, M. D., Bronson, R. T., Haigis, M., Guarente, L. P., Farese, R. V., Weissman, S., Verdin, E. and Schwer, B., (2007). Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(24), 8807-14.
- [118] Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J. M., Boeke, J. D. and Feinberg, A. P., (2002). SIRT3, a Human SIR2 Homologue, is an NAD- Dependent Deacetylase Localized to Mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99(21), 13653-8.
- [119] Schwer, B., Bunkenborg, J., Verdin, R. O., Andersen, J. S. and Verdin, E., (2006). Reversible Lysine Acetylation Controls the Activity of the Mitochondrial Enzyme Acetyl-CoA Synthetase 2. *Proceedings of the National Academy of Science*, 103(27), 10224-9.
- [120] Huang, J. Y., Hirschey, M. D., Shimazu, T., Ho, L. and Verdin, E., (2010). Mitochondrial Sirtuins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 1645-1651.
- [121] Shimazu, T., Hirschey, M. D., Hua, L., Dittenhafer-Reed, K. E., Schwer, B., Lombard, D. B., Li, Y., Bunkenborg, J., Alt, F. W., Denu, J. M., Jacobson, M. P. and Verdin, E., (2010). SIRT3 Deacetylates Mitochondrial 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA Synthetase 2 and Regulates Ketone Body Production. *Cell Metabolism*, 12(6), 654-61.

- [122] Schlicker, C., Gertz, M., Papatheodorou, P., Kachholz, B., Becker, C. F. W. and Steegborn, C., (2008). Substrates and Regulation Mechanisms for the Human Mitochondrial Sirtuins Sirt3 and Sirt5. *Journal of Molecular Biology*, 382(3), 790-801.
- [123] Hallows, W. C., Yu, W., Smith, B. C., Devires, M. K., Ellinger, J. J., Someya, S., Shortreed, M. R., Prolla, T., Markley, J. L., Smith, L. M., Zhao, S., Guan, K. L. and Denu, J. M., (2011). Sirt3 Promotes the Urea Cycle and Fatty Acid Oxidation During Dietary Restriction. *Molecular Cell*, 41(2), 139-49.
- [124] Cimen, H., Han, M. J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H. and Koc, E. C., (2010). Regulation of Succinate Dehydrogenase Activity by SIRT3 in Mammalian Mitochondria. *Biochemistry*, 49(2), 304-11.
- [125] Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., Grueter, C. A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Li, Y., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Alt, F. W., Kahn, C. R. and Verdin, E., (2010). SIRT3 Regulates Mitochondrial Fatty-Acid Oxidation by Reversible Enzyme Deacetylation. *Nature*, 464(7285), 121-5.
- [126] Ahn, B. H., Kim, H. S., Song, S., Lee, I. H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C. X. and Finkel, T., (2008). A Role for the Mitochondrial Deacetylase Sirt3 in Regulating Energy Homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105(38), 14447-52.
- [127] Ansari, A., Rahman, M. S., Saha, S. K., Saikot, F. K., Deep, A. and Kim, K. H., (2017). Function of the SIRT3 Mitochondrial Deacetylase in Cellular Physiology, Cancer, and Neurodegenerative Disease. *Aging Cell*, 16(1), 4-16.
- [128] Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E. and Chen, D., (2010). Calorie Restriction Reduces Oxidative Stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation. *Cell Metabolism*, 12(6), 662-7.
- [129] Kim, S. C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N. V., White, M., Yang, X. J. and Zhao, Y., (2006). Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey. *Molecular Cell*, 23(4), 607-18.
- [130] Tao, R., Coleman, M. C., Pennington, J. D., Ozden, O., Park, S. H., Jiang, H., Kim, H. S., Flynn, C. R., Hill, S., Hayes McDonald, W., Olivier, A. K., Spitz, D. R. and Gius, D., (2010). Sirt3-Mediated Deacetylation of Evolutionarily Conserved Lysine 122 Regulates MnSOD Activity in Response to Stress. *Molecular cell*, 40, 893-904.

- [131] Someya, S., Yu, W., Hallows, W. C., Xu, J., Vann, J. M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J. M. and Prolla, T. A., (2010). Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss Under Caloric Restriction. *Cell*, 143, 802-812.
- [132] Chen, Y., Zhang, J., Lin, Y., Lei, Q., Guan, K. L., Zhao, S. and Xiong, Y., (2011). Tumour Suppressor SIRT3 Deacetylates and Activates Manganese Superoxide Dismutase to Scavenge ROS. *EMBO Reports*, 12(6), 534-41.
- [133] Sundaresan, N. R., Gupta, M., Kim, G., Rajamohan, S. B., Isbatan, A. and Gupta, M. P., (2009). Sirt3 Blocks the Cardiac Hypertrophic Response by Augmenting Foxo3a-Dependent Antioxidant Defense Mechanisms in Mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2758-71.
- [134] Kim, H. S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Pennington, J. D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K. M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S. H., Singh, K. K., Abdulkadir, S. A., Spitz, D. R., Deng, C. X. and Gius, D., (2010). SIRT3 is a Mitochondria-Localized Tumor Suppressor Required for Maintenance of Mitochondrial Integrity and Metabolism During Stress. *Cancer Cell*, 17(1), 41-52.
- [135] Chen, Y., Fu, L. L., Wen, X., Wang, X. Y., Liu, J., Cheng, Y. and Huang, J., (2014). Sirtuin-3 (SIRT3), a Therapeutic Target with Oncogenic and Tumor-Suppressive Function in Cancer. *Cell Death and Disease*, 5, e1047.
- [136] Li, S., Banck, M., Mujtaba, S., Zhou, M. M., Sugrue, M. M. and Walsh, M. J., (2010). p53-Induced Growth Arrest is Regulated by the Mitochondrial Sirt3 Deacetylase. *Plos ONE*, 5, e10486.
- [137] Torrens-Mas, M., Oliver, J., Roca, P. and Sastre-Serra, J., (2017). SIRT3: Oncogene and Tumor Suppressor in Cancer. *Cancers*, 9, 90.
- [138] Quan, Y., Wang, N., Chen, Q., Xu, J., Cheng, W., Di, M., Xia, W. and Gao, W. Q., (2015). SIRT3 Inhibits Prostate Cancer by Destabilizing Oncoprotein C-MYC Through Regulation of the PI3K/Akt Pathway. *Oncotarget*, 6, 26494-26507.
- [139] Li, R., Quan, Y. Z. and Xia, W. L., (2018). SIRT3 Inhibits Prostate Cancer Metastasis Through Regulation of FOXO3A by Suppressing Wnt/Beta-Catenin Pathway. *Experimental Cell Research*, 364, 143-151.
- [140] Dong, X. C., Jing, L. M., Wang, W. X. and Gao, Y. X., (2016). Down-Regulation of SIRT3 Promotes Ovarian Carcinoma Metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 475, 245-250.

- [141] Zeng, X., Wang, N., Zhai, H., Wang, R., Wu, J. and Pu, W., (2017). SIRT3 Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma. *Tumor Biology*, 39(5), 3933-3948.
- [142] Xiao, K., Jiang, J., Wang, W., Cao, S., Zhu, L., Zeng, H., Ouyang, R., Zhou, R. and Chen, P., (2013). Sirt3 is a Tumor Suppressor in Lung Adenocarcinoma Cells. *Oncology Reports*, 30, 1323-1328.
- [143] Marfe, G., Tafani, M., Indelicato, M., Sinibaldi-Salimei, P., Reali, V., Pucci, B., Fini, M. and Russo, M. A., (2009). Kaempferol Induces Apoptosis in Two Different Cell Lines via Akt Inactivation, Bax and SIRT3 Activation, and Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Cell Biochemical* 106, 643-650.
- [144] Kamarajan, P., Alhazzazi, T. Y., Danciu, T., D'Silva, N. J., Verdin, E. and Kapila, Y. L., (2012). Receptor-Interacting Protein (RIP) and Sirtuin-3 (SIRT3) are on Opposite Sides of Anoikis and Tumorigenesis. *Cancer*, 118, 5800-5810.
- [145] Alhazzazi, T. Y., Kamarajan, P., Joo, N., Huang, J. Y., Verdin, E., D'Silva, N. J. and Kapila, Y. L., (2011a). Sirtuin-3 (SIRT3), a Novel Potential Therapeutic Target for Oral Cancer. *Cancer* 117, 1670-1678.
- [146] Zhang, L., Ren, X., Cheng, Y., Huber-Keener, K., Liu, X., Zhang, Y., Yuan, Y. S., Yang, J. W., Liu, C. G. and Yang, J. M., (2013b). Identification of Sirtuin 3, a Mitochondrial Protein Deacetylase, as a New Contributor to Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Cells. *Biochemical Pharmacology*, 86, 726-733.
- [147] Zhang, Y. Y. and Zhou, L. M., (2012). Sirt3 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cell Growth Through Reducing Mdm2-Mediated P53 Degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423, 26-31.
- [148] Zhao, Y., Yang, H., Wang, X., Zhang, R., Wang, C. and Guo, Z., (2013). Sirtuin-3 (SIRT3) Expression is Associated with Overall Survival in Esophageal Cancer. *Annals of Diagnostic Pathology*, 17, 483-485.
- [149] Li, H., Feng, Z., Wu, W., Li, J., Zhang, J. and Xia, T., (2013). SIRT3 Regulates Cell Proliferation and Apoptosis Related to Energy Metabolism in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Through Deacetylation of *NMNAT2*. *International Journal of Oncology*, 43, 1420-1430.
- [150] Huang, K. H., Hsu, C. C., Fang, W. L., Chi, C. W., Sung, M. T., Kao, H. L., Li, A. F. Y., Yin, P. H., Yang, M. H. and Lee, H. C., (2014). SIRT3 Expression as a Biomarker for Better Prognosis in Gastric Cancer. *World Journal of Surgery*, 38, 910-917.

- [151] Li, S., Banck, M., Mujtaba, S., Zhou, M-M., Sugrue, M. M. and Walsh, M. J., (2010). p53-Induced Growth Arrest is Regulated by the Mitochondrial Sirt3 Deacetylase. *Plos One*, 5, e10486.
- [152] Finley L. W., Carracedo, A., Lee, J., Souza, A., Egia, A., Zhang, J., Teruya – Feldstein, J., Moreira, P. I., Cardoso, S. M., Clish, C. B., Pandolfi, P. P. and Haigis, M. C., (2011). SIRT3 Opposes Reprogramming of Cancer Cell Metabolism Through HIF1 α Destabilization. *Cancer Cell*, 19, 416-28.
- [153] Bell, E. L., Emerling, B. M., Ricoult, S. J. and Guarente, L., (2011). SirT3 Suppresses Hypoxia Inducible Factor 1 α and Tumor Growth by Inhibiting Mitochondrial ROS Production. *Oncogene*, 30, 2986-96.
- [154] Inuzuka, H., Gao, D., Finley, L. W., Yang, W., Wan, L., Fukushima, H., Chin, Y. R., Zhai, B., Shaik, S., Lau, A. W., Wang, Z., Gygi, S. P., Nakayama, K., Teruya-Feldstein, J., Toker, A., Haigis, M. C., Pandolfi, P. P. and Wei, W., (2012). Acetylation-Dependent Regulation of Skp2 Function. *Cell*, 150(1), 179-193.
- [155] Uğan, R. A., Yayla, M., Ün, H., Civelek, M. S., ve Kılıç, P. A., (2020). Nar Kabuğu Ekstresinin Sıçanlarda Diyabetik Şartlarda Sepsis ile İndüklenen Akciğer Hasarına Karşı Etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*, 47(3), 678-686.
- [156] Ozden, O., Bishehsari, F., Bauer, J., Park, S. H., Jana, A., Baik, S. H., Spom, J. C., Staudacher, J. J., Yazici, C., Krett, N. and Jung, B., (2016). Expression of an Oncogenic BARD1 Splice Variant Impairs Homologous Recombination and Predicts Response to PARP-1 Inhibitor Therapy in Colon Cancer. *Scientific Reports*, 6, 26273.
- [157] <https://www.creative-diagnostics.com/Sample-Gel-Preparation.htm>, (29.12.2020)
- [158] Kroemer, G. and Pouyssegur, J., (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*, 13(6), 472-482.
- [159] Warburg, O., (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123, 309-314.
- [160] Fadaka, A., Ajiboye, B., Ojo, O., Adewale, O., Olayide, I. and Emuowhochere, R., (2017). Biology of Glucose Metabolization in Cancer Cells. *Journal of Glucose Metabolism*, 3(2), 45-51.

- [161] Bonuccelli, G., Tsirigos, A., Whitaker-Menezes, D., Pavlides, S., Pestell, R. G., Chiavarina, B., Frank, P. G., Flomenberg, N., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F. and Lisanti, M. P., (2010). Ketones and Lactate 'Fuel' Tumor Growth and Metastasis: Evidence that Epithelial Cancer Cells Use Oxidative Mitochondrial Metabolism. *Cell Cycle*, 9, 3506-3514.
- [162] Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Harris, A. L. and Sivridis, E., (2006). Comparison of Metabolic Pathways Between Cancer Cells and Stromal Cells in Colorectal Carcinomas: a Metabolic Survival Role for Tumor-Associated Stroma. *Cancer Research*, 66 (2), 632-637.
- [163] Icard, P., Shulman, S., Farhat, D., Steyaert, J. M., Alifano, M. and Lincet, H., (2018). How the Warburg Effect Supports Aggressiveness and Drug Resistance of Cancer Cells? *Drug Resistance Updates. Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 38,1-11.
- [164] Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Zhang, D., Scadden, D. T. and Chen, D., (2013). SIRT3 Reverses Aging-Associated Degeneration. *Cell Reports*, 3(2), 319-27.
- [165] Özkan, O., Erdağ, D., Atila, G., Metiner, K., Çelik, B., Kart, A., Uslu, H. and Kırık, F. E., (2018). Investigation of Antifungal and Antioxidant Properties of Capparis Ovata Methanolic Extracts, *Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute* 6(2), 60-66.
- [166] Kulisic-Bilusic, T., Schmöller, I., Schnäbele, K., Siracusa, L. and Ruberto, G. (2012). The Anticarcinogenic Potential of Essential Oil and Aqueous Infusion from Caper (*Capparis Spinosa* L.) *Food Chemistry*, 132, 261-267.