

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**RATLARDA YENİ BİR GÜMÜŞ (Ag) KARBEN
KOMPLEKSİNİN KOLON KANSERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mustafa Yunus EMRE

Doktora Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ARALIK 2022

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

RATLARDA YENİ BİR GÜMÜŞ (Ag) KARBEN KOMPLEKSİNİN
KOLON KANSERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tez Yazarı
Mustafa Yunus EMRE

Danışman
Doç. Dr. Mehmet TUZCU

ARALIK 2022
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Başlığı:	Ratlarda Yeni Bir Gümüş (Ag) Karben Kompleksinin Kolon Kanseri Üzerine Etkilerinin Araştırılması
Yazarı:	Mustafa Yunus EMRE
İlk Teslim Tarihi:	30.11.2022
Savunma Tarihi:	26.12.2022

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

İmza

Danışman: Doç. Dr. Mehmet TUZCU
Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi

Başkan: Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ
Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Cemal Georg ORHAN
Fırat Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

Üye: Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN
Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza

Prof. Dr. Burhan ERGEN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Ratlarda Yeni Bir Gümüş (Ag) Karben Kompleksinin Kolon Kanseri Üzerine Etkilerinin Araştırılması” Başlıklı Doktora Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

26.12.2022

Mustafa Yunus EMRE



ÖNSÖZ

Kanser, günümüzde hem kadınlar da hem de erkeklerde en önemli sağlık sorunlarından biridir ve kanserden ölenlerin sayısı hem Türkiye’de hem de dünyada her yıl artarak devam etmektedir. Kolorektal kanser, dünyadaki en yaygın kanserlerden biridir. Kolorektal kanserin tedavisinde ve ilerlemesinin kontrolünde büyük gelişmeler kaydedilmiş olsa da, iyileştirilmesi gereken çok şey bulunmaktadır. Kansere karşı etkin bir ajanın geliştirilebilmesi için öncelikle etki mekanizmasının açığa çıkarılması gerekmektedir. Bu doktora çalışmasında, yeni bir gümüş karben kompleksinin kolorektal kanser oluşturulmuş ratlarda yapacağı etkinin histopatolojik, makroskobik ve moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, desteğini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Mehmet TUZCU’ ya ve çalışmalarım boyunca destek veren hocam Prof. Dr. Kazım ŞAHİN’e teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda histopatoloji görüntülerinin teşhisinde yardımını esirgemeyen Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN hocam’a, etken maddenin sentezlenmesini sağlayan Prof. Dr. İsmail ÖZDEMİR hocama, laboratuvar çalışmalarına katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Füsün ERTEN’e ve doktora tez sürecime destek ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Cemal Georg ORHAN hocam’a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve yardımcı olan değerli eşim Dr. Öğr. Üyesi Ümmügülsüm TÜKENMEZ EMRE’ye, ağabeyim Prof. Dr. İrfan EMRE’ye ve hayatım boyunca destek olan aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışmamı, doktora eğitim sürecimde dünyaya gelen, varlığıyla huzur bulduğum oğlum Yusuf Selim EMRE’ye ithaf ediyorum.

Mustafa Yunus EMRE
ELAZIĞ, 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
TABLolar LİSTESİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.1.1. Büyüme sinyalleri	5
1.1.2. Doku İnvazyonu ve Metastaz	5
1.1.3. Anjiyogenez	6
1.1.4. Sınırsız Replikasyon Yeteneği	6
1.1.5. Enerji Metabolizmasının Yeniden Programlanması	6
1.1.6. İmmün Sistemden Kaçış	7
1.2. Apoptozis	7
1.2.1. Apoptotik Markerlar	8
1.2.2. Kanserde Apoptozis	9
1.2.3. Apoptozis ve Kansere Tedavisi	9
1.2.4. Apoptozis Mekanizmaları	10
1.3. Kaspazlar	12
1.3.1. Bcl-2 ailesi	14
1.3.2. PI3K-AKT-mTOR Sinyal Yolağı	15
1.4. Kolonun Anatomisi	16
1.5. Kolon Kanseri	17
1.5.1. Kolon Kanseri Risk Faktörleri	18
1.5.2. Kolon Kanseri Polipleri	20
1.5.3. Kolon Kanseri Genetiği	21
1.6. Karbenler	23
1.6.1. N-Heterosiklik Karbenler (NHC)	24
1.6.2. Gümüş Karben	25
1.7. Dimetil Hidrazin	26
2. MATERYAL VE METOT	28
2.1. Hayvan Materyali	28
2.2. Araştırma Grupları	28
2.3. Laboratuvar Analizleri	29
2.3.1. Gümüş Karben Kompleksinin Apoptotik Yoldaki Bazı Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerine Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi	30
2.3.2. Kolon Dokusuna Ait Örneklerinin Homojenizasyonu	30
2.3.3. Kolon Dokularına Ait Örneklerin Total Protein Miktarının Belirlenmesi	30
2.3.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)	31
2.4. Western Blot	34
2.5. Kolon Histopatolojisi	36

2.6. İstatistiksel Analizler	36
3. BULGULAR	37
3.1. Makroskopik Bulgular	37
3.2. Histopatolojik Görüntüler	45
3.3. Ratlarda Oluşan Kript Sayıları ve Anormal Hücre Gelişimi (ACF)	51
3.4. Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz -9, Akt 1, P Akt 1, PI3K, P PI3K, mTOR, P mTOR Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri	53
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	64
ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ	



ÖZET

Ratlarda Yeni Bir Gümüş (Ag) Karben Kompleksinin Kolon Kanseri Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Mustafa Yunus EMRE

Doktora Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2022, Sayfa: xiv + 90

Kanser, büyük terapötik zorluklarla birlikte önemli bir küresel sağlık sorunudur. Kolorektal kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri arasındadır. Kolorektal kanser (CRC) insidansı hızla artmaktadır. CRC insidansının dünya çapında 2035 yılına kadar iki katına çıkması öngörülmektedir. CRC' nin yüksek ölüm oranına sebep olması nedeniyle ve CRC tedavisi için etkili ancak daha az toksik olan kemoterapötik ajanların geliştirilmesi amacıyla sürekli olarak yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Günümüzde ise gümüş (Ag) bileşenleri ile elde edilen kemoterapik ilaçların kanser üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Bu tez kapsamında kolorektal kansere karşı potansiyel antikanser ajan olarak yeni bir gümüş bileşeni olan Gümüş Karben (AgC) kompleksinin kolorektal kanser üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 90 adet *Sprague dawley* ırkı rat 6 gruba ayrılarak kullanılmıştır. Bunlar i. Kontrol; haftada 1 kez 3 hafta %0.9 steril serum fizyolojik uygulanan, ii. Gümüş Karben I (AgC I); DMSO da çözülüp içme suyu ile seyreltilen gümüş karben kompleksi (1 mg / kg, 1 mL / rat) gün aşırı oral gavaj ile uygulanan, iii. Gümüş Karben II (AgC II); DMSO da çözülüp içme suyu ile seyreltilen gümüş karben kompleksi (2 mg / kg, 1 mL / rat) gün aşırı oral gavaj ile uygulanan, iv. Dimetil Hidrazin (DMH); haftada 1 kez 15 mg / kg canlı ağırlığı olarak uygulanan, v. Dimetil Hidrazin + Gümüş Karben I (AgC I); DMH (haftada 1 kez 15 mg / kg canlı ağırlığı) + DMSO da çözülüp içme suyu ile seyreltilen gümüş karben kompleksi (1 mg/kg, 1 mL / rat) gün aşırı oral gavaj ile uygulanan, vi. Dimetil Hidrazin + Gümüş Karben II (AgC II); DMH (haftada 1 kez 15 mg / kg canlı ağırlığı) + DMSO da çözülüp içme suyu ile seyreltilen gümüş karben kompleksi (2 mg/kg, 1 mL / rat) gün aşırı oral gavaj ile uygulanan gruplardır. Toplamda 24 hafta süren çalışma sonunda Kontrol, AgC I ve AgC II gruplarının kolon dokularında herhangi bir kript oluşmadığı, DMH uygulanan grupta; 78 adet, DMH + AgC I grubunda; 29 adet ve DMH + AgC II grubunda; 20 adet kript oluştuğu tespit edilmiştir. Gümüş Karben kompleksinin uygulandığı gruplarda sadece DMH ın uygulandığı gruba göre kolon dokularında meydana gelen kript sayılarında belirgin bir düşüşün olduğu belirlenmiştir. Western blot çalışmasından elde edilen sonuçlar, gümüş karben uygulanan tedavi gruplarının kolon dokularındaki Bax, Kaspaz -3 ve Kaspaz-9 protein ekspresyonlarının DMH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını ($p<0.0001$), Bcl-2, Akt1, p-Akt1, PI3K, p-PI3K, mTOR, p-mTOR protein ekspresyonlarının ise azaldığını göstermektedir ($p<0.0001$). Bu sonuçlar, gümüş karben kompleksinin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının inhibisyonu ve apoptotik yolağın aktivasyonu ile anti kolon kanser aktivitesi sergilediğini göstermektedir. Bu nedenle Gümüş Karben kompleksinin kolorektal kanseri üzerinde iyileştirici etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Gümüş Karben, Kolorektal Kanser

ABSTRACT

Investigation of the Effects of a Novel Silver (Ag) Carbene Complex on Colon Cancer in Rats

Mustafa Yunus EMRE

Ph.D. Thesis

FIRAT UNIVERSITY
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

December 2022, Pages: xiv + 90

Cancer is a major global health problem with major therapeutic challenges. Colorectal cancer is among the leading causes of death worldwide. The incidence of colorectal cancer (CRC) is increasing rapidly. The incidence of CRC is predicted to double worldwide by 2035. Due to the high mortality rate of CRC and the development of effective but less toxic chemotherapeutic agents for the treatment of CRC, new treatment methods are constantly being researched. Today, it is seen that chemotherapeutic drugs obtained with silver (Ag) components are effective on cancer. In this thesis, the effects of Silver Carbene (AgC) complex, a new silver component, on colorectal cancer as a potential anticancer agent against colorectal cancer have been investigated. For this purpose, 90 Sprague dawley type rats were divided into 6 groups and used. These groups are i. Control; 0.9% sterile saline is applied once a week for 3 weeks, ii. Silver Carben I (AgC I); Silver carbene complex (1 mg / kg, 1 mL / rat) dissolved in DMSO and diluted with drinking water, administered by oral gavage every other day, iii. Silver Carben II (AgC II); Silver carbene complex (2 mg / kg, 1 mL / rat) dissolved in DMSO and diluted with drinking water, administered by oral gavage every other day, iv. Dimethyl Hydrazine (DMH); administered at 15 mg/kg body weight once a week, v. Dimethyl Hydrazine + Silver Carben I (AgC I); DMH (15 mg/kg body weight once a week) + silver carbene complex (1 mg/kg, 1 mL/rat) dissolved in DMSO and diluted with drinking water, administered by oral gavage every other day, vi. Dimethyl Hydrazine + Silver Carben II (AgC II); DMH (15 mg/kg body weight once a week) + silver carbene complex (2 mg/kg, 1 mL/rat) dissolved in DMSO and diluted with drinking water applied by oral gavage every other day. At the end of our study, which has lasted for 24 weeks in total, no crypts have been formed in the colon tissues of the Control, AgC I and AgC II groups; It has been determined that in the DMH applied group 78, in the DMH + AgC I group; 29 and in the DMH + AgC II group; 20 crypts have been formed. It has been determined that there has been a significant decrease in the number of crypts in the colon tissues in the groups in which the Silver Carbene complex has been applied, compared to the group in which only DMH has been applied. The results obtained from the western blot study show that Bax, Caspase-3 and Caspase-9 protein expressions in the colon tissues of the silver carbene treated treatment groups statistically increased significantly compared to the DMH groups ($p < 0.0001$), Bcl-2, Akt1, p-Akt1, PI3K, p-PI3K, mTOR, p-mTOR protein expressions show a statistically significant decrease ($p < 0.0001$). These results show that the silver carbene complex exhibits anti-colon cancer activity through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and activation of the apoptotic pathway. Therefore, it is thought that the Silver Carbene complex may have a curative effect on colorectal cancer.

Keywords: Apoptosis, Silver Carbene, Colorectal Cancer

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1.	Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları.....	3
Şekil 1.2.	Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları.....	3
Şekil 1.3.	Kanserin oluşum mekanizması	4
Şekil 1.4.	Kanserli hücrelerin moleküler özellikleri.....	5
Şekil 1.5.	Apoptozis oluşum aşamaları	8
Şekil 1.6.	Apoptotik yollar	11
Şekil 1.7.	Karbenin yapısı	23
Şekil 1.8.	N-heterosiklik karbenlerin elektronik konfigürasyonu (a) Singlet karben (b) Triplet karben	24
Şekil 1.9.	İlk serbest NHC ve ilk gümüş-NHC kompleksinin sentezlenmesi	25
Şekil 1.10.	Dimetil Hidrazin'in Moleküler Yapısı	27
Şekil 3.1.	Kontrol grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü.....	37
Şekil 3.2.	Kontrol grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü.....	37
Şekil 3.3.	Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü	38
Şekil 3.4.	Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü	38
Şekil 3.5.	Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü	38
Şekil 3.6.	Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü	38
Şekil 3.7.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler	39
Şekil 3.8.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler	39
Şekil 3.9.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık, yakından makroskopik görüntüsü.....	39
Şekil 3.10.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler	40
Şekil 3.11.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler	40
Şekil 3.12.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık yakından makroskopik görüntüsü.....	40
Şekil 3.13.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler	41
Şekil 3.14.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler	41
Şekil 3.15.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık yakından makroskopik görüntüsü.....	41
Şekil 3.16.	DMH grubuna ait ratlardan bazılarının kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık ve kapalı genel masroskopik görüntüleri.....	42

Şekil 3.17.	DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler.....	42
Şekil 3.18.	DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler.....	43
Şekil 3.19.	DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratların kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık yakından makroskopik görüntüsü	43
Şekil 3.20.	DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan bazılarının kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık ve kapalı genel makroskopik görüntüleri	43
Şekil 3.21.	DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler.....	44
Şekil 3.22.	DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler.....	44
Şekil 3.23.	DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler.....	44
Şekil 3.24.	DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan bazılarının kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık genel makroskopik görüntüleri	45
Şekil 3.25.	Kontrol grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun histopatolojik görüntüsü (HE x100).....	46
Şekil 3.26.	Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun histopatolojik görüntüsü (HE x100)	46
Şekil 3.27.	Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun histopatolojik görüntüsü (HE x100).....	47
Şekil 3.28.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi atipik kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200)	47
Şekil 3.29.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi atipik kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200)	48
Şekil 3.30.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi (taşlı yüzük hücreleri) kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200).....	48
Şekil 3.31.	DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x100)	49
Şekil 3.32.	DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200).....	49
Şekil 3.33.	DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x100).....	50
Şekil 3.34.	DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200).....	50
Şekil 3.35.	DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x100).....	51
Şekil 3.36.	Çalışılan gruplarda yer alan tümör ve polip sayıları	52
Şekil 3.37.	Tümör oluşumu gözlenen gruplardaki grade dereceleri.....	53
Şekil 3.38.	Kolon dokusu Bax protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi.....	54
Şekil 3.39.	Kolon dokusu Bcl-2 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi.....	55
Şekil 3.40.	Kolon dokusu Kaspaz -3 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi	56
Şekil 3.41.	Kolon dokusu Kaspaz-9 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi	57

Şekil 3.42.	Kolon dokusu Akt1 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi.....	58
Şekil 3.43.	Kolon dokusu p-Akt1 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi	59
Şekil 3.44.	Kolon dokusu PI3K protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi	60
Şekil 3.45.	Kolon dokusu p-PI3K protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi	61
Şekil 3.46.	Kolon dokusu mTOR protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi	62
Şekil 3.47.	Kolon dokusu p-mTOR protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi	63



TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Kaspaz ailesinin alt familya üyeleri	13
Tablo 2.1. Pelet rat yemi bileşenleri.....	28
Tablo 2.2. Araştırma grupları (n=15).....	29
Tablo 2.3. Kolon dokusu ile yapılan analizler	29
Tablo 2.4. Lowry metodu ile protein miktarının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler	31
Tablo 2.5. Ayırma (separating, resolving) jelinin (%12) içeriği	33
Tablo 2.6. Yükleme (stacking) jelinin (%4) içeriği	33



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
-	: Negatif
+	: Pozitif
°C	: Santigrat Derece
α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Delta
γ	: Gama

Kısaltmalar

μ M	: Mikromol
A	: Adenin
ACF	: Anormal Kript Odakları
Ag	: Gümüş
Ag ₂ O	: Gümüş Oksit
AgC	: Gümüş Karben
AOM	: Azoksimetan
APC	: Adenomatöz Polipozis Kolinin
APS	: Amonyum persulfat
Au	: Altın
BSA	: Bovin Serum Albumin
C	: Sitozin
CIMP	: CpG Adası Metilatör Fenotipi
CIN	: Kromozomal Kararsızlık
cm	: Santimetre
CRC	: Kolorektal Kanser
Cu	: Bakır
DD	: Ölüm Domaini
DMH	: 1,2-dimetilhidrazin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FADD	: Fas İlişkili Ölüm Domaini
FDA	: Food and Drug Administration
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi
FÜHADEK	: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
g	: Gram
G	: Guanin
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorik Asit
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
MAM	: Metilazoksi Metanol
MAP	: Muthy İlişkili Polipozis Sendromu
MDF	: Müsin Tükenmiş Odakları
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimol
MSI	: Mikro Uydu Kararsızlığı
MTS	: Muir- Torre Sendromu
N	: Azot
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NHC	: N- Heterosiklik Karben
Ni	: Nikel

nm	: Nanometre
Pd	: Paladyum
PJS	: Peutz – Jeghers Sendromu
PT	: Permeability Transition Pore
Pt	: Platin
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SAP	: Sporadik Adenomatöz Polipozis
SDS- PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
T	: Timin
TEMED	: Tetrametilendiamin
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TRAIL	: TNF-Related Apoptosis- _Inducing Ligand
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu



1. GİRİŞ

Vücuttaki hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize edilen kanserin dünyadaki her altı ölümden birinin sebebi olduğu belirtilmektedir [1]. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre bu hastalığın görülme sıklığının % 24.3 oranında olduğu ölüm oranının da % 22.9 olduğu ve erkeklerde kadınlara göre yüksek oranda görüldüğü belirtilmektedir [2-4] . Hem çevresel hem de genetik faktörlerle ilişkili olan ve dünya genelinde kanserin sebep olduğu ölümlerde ön sıralarda yer almakta olan kolon kanserleri karaciğere, akciğerlere, yumurtalıklara ve gastrointestinal sistemin diğer bölümlerine yayılan en tehlikeli malignitelerden biri olarak rapor edilmektedir [5,6]. Yaş, aile geçmişi, yaşam tarzı, kişisel geçmiş, ırk ve etnik köken kolorektal kanserin gelişimi için risk faktörleri arasında yer almaktadır [7] .

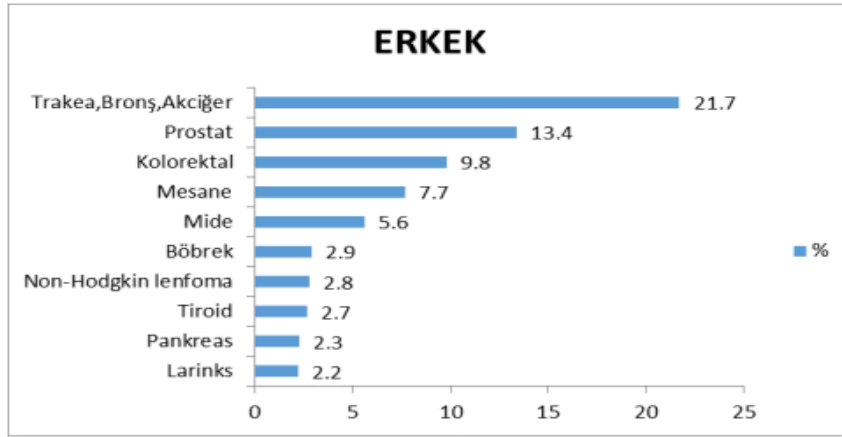
Kolorektal kanser hücreleri, çeşitli mekanizmalar yoluyla metastaz yapma ve apoptoztan kaçma yeteneğine sahiptirler [8]. Kolonda programlanmış hücre ölümü uygun şekilde gerçekleşmediğinde, elimine edilmesi gereken hücreler kalıcı olabilir, ölümsüzleşebilir ve daha sonra kolorektal tümörlere dönüşebilir [9] . Son zamanlarda, metal N-heterosiklik karben komplekslerinin (Ag, Au ve Cu) iyi birer antikanserojen ajan oldukları belirtilmiştir ve bu kompleksler içerisinde biyolojik sistemlere en uygun olanının gümüş karben bileşikler olduğu ifade edilmiştir [10]. Karben ligandları metal merkezleri ile etkileşime girmekte ve kuvvetli metalokarbon bağları oluşturarak stabil metal-N heterosiklik karbenler üretmektedirler [11]. Kimyasal çok yönlülükleri ve aynı zamanda farklı oksidasyon durumlarına sahip çok sayıda geçiş metali ile kararlı kompleksler oluşturma kabiliyetlerinin yanısıra güçlü metal-karbon bağları, dikkat çekici elektron verme özellikleri ve metal merkezin sterik koruması onların lider bir organometalik katalizör ailesi olmalarını sağlamaktadır [12]. N-heterosiklik karben komplekslerinin kovalent olmayan şekilde DNA ile etkileşime girdikleri ve bu komplekslerin DNA’da konformasyonel değişiklikler oluşturdukları belirtilmiştir [11]. Gümüş bazlı heterosiklik komplekslerin diğer karben öncüllerine göre daha fazla sitotoksit aktivite gösterdikleri ve bu durumun benzimidazol veya imidazol çekirdeği ihtiva etmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [10,13]. İmidazol ve benzimidazol gümüş karben komplekslerinin farklı kanser hücrelerine karşı kayda değer oranda antikanserojen aktivite sergiledikleri ifade edilse de bu bileşiklerin etkilerinin araştırılacağı çok sayıda çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [14]. Bu çalışmada sentezlenen Gümüş Karben (AgC)’ in iki farklı dozunun deneysel olarak oluşturulmuş kolorektal kansere karşı etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Kanser

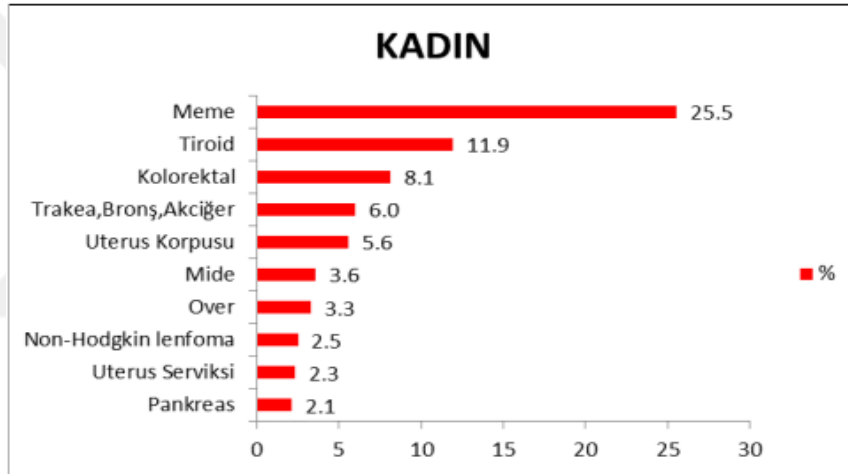
Kanserin, Latince de yengeç anlamına gelen “cancer” veya “carcinos” kelimelerinden kökenlendiği ifade edilmektedir [15]. İnsanlık tarihi boyunca var olduğu belirtilen bir rahatsızlık

olan kansere ait bilgilere M.Ö. 3000 yılına kadar ulaşılmaktadır ve kanser terimine ilk defa Hippokrat tarafından (M.Ö. 460-377) vücutta kırmızı, sıcak, büyüme özelliğinde olan ve diğer hücrelerden farklı yapılara “karkinos” veya “karkinoma” ismi verilmiştir [16]. Bununla beraber, Hippokrat tarafından tümör terimi bir yengecin ayaklarına benzetildiği için “carcinos” terimi kullanılmışken Galen de kanseri şişme anlamına gelen “oncos” ile ifade etmiştir [22] .

Hücreler yaşamları boyunca sınırlı sayıda bölünebilme özelliğine sahiptir ve normal şartlar altında hücrelerin çoğalması belirli bir düzen içerisinde gerçekleşmektedir [23]. Ancak kanserli hücrelerde vücuttaki iç dengede meydana gelen düzensizlikten dolayı kontrol altına alınamayan sınırsız bölünme özelliği görülmektedir [24]. Bu yüzden kanser stabil fonksiyonel yapılarını sürdüremeyen anormal hücrelerin sebep olduğu bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [25]. Bununla beraber, kanserin oluşması için kontrolsüz hücre bölünmesinin yanısıra hücrenin diğer normal dokuları istila etmesi (invazyon) ve metastaz gibi diğer özelliklerin de olması gerekmektedir [21]. Kanser hücrelerinin pek çoğu ortak özellikler taşımasına karşılık bir kısmında da sadece bazı tümör tiplerine özgü pek çok biyokimyasal ve biyolojik özellikler bulunmaktadır [26]. Genel olarak kanser hücreleri, farklılaşarak, kontrolsüz, anormal ve aşırı derecede büyüyüp bir kitle ya da tümör oluşturulmayla karakterize edilirler [27]. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansının yayınladığı 2018 küresel kanser raporunda kanserin artış hızının bu şekilde devam etmesi durumunda dünya nüfusu ve yaşlılığa endeksli olarak 2025’te toplamda 19,3 milyon kanserli olgunun olacağı belirtilmektedir [28]. Dünyada ölüm nedenleri arasında kanserin ikinci sırada yer aldığı belirtilmekte ve Türkiye’de 2009-2016 yılları arasındaki TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) verilerine göre dolaşım sistemi hastalıklarından sonra kanserin ikinci sırada yer aldığı görülmektedir [29]. Sağlık Bakanlığı tarafından 2016 yılında yayınlanan rapora göre ülkemizde de yaşa bağlı olarak kanser hızının erkeklerde yüz binde 267.9, kadınlarda ise yüz binde 186.5 olduğu görülmektedir [30]. Türkiye’de 2020-2030 yılları arasındaki kansere endeksli gerçekleşebileceği tahmini ölüm sayısının erkeklerde 2030 yılı için 89.117 olması beklenirken kadınlarda ise ölüm sayılarının 2030 yılı için 39.094 olması tahmin edilmektedir [31]. Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanmış olan 2017 Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre erkeklerde en çok görülen beş kanser türü, akciğer, mide, kolorektal, mesane ve prostat, kadınlarda ise meme, kolorektal, tiroit, uterus ve akciğer kanserleridir [32]. DNA dizilerindeki bozuklukla başlayan kanserin % 10-15’inin genetiksel olduğu, % 85-90’lık oranının ise DNA’nın mutajenlere maruziyeti, DNA’daki değişimler ve replikasyonda meydana gelen hatalar ile oluştuğu ifade edilmektedir [33]. Bununla beraber beslenme, obezite ve fiziksel aktivitelerin azlığı gibi nedenlerin yanı sıra, bakterilerin, hormonların, immün şartların, virüslerin, radyasyon gibi çeşitli etmenlerin kanserin gelişimine etki ettiğini göstermektedir [27,28,33]. Bu etmenler tek başlarına kansere sebep olabilecekleri gibi pek çoğu beraberinde kansere sebep olabilir [27]. Tüm yaş gruplarındaki erkek ve kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içerisindeki yüzde dağılımları Şekil 1.1 ve Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



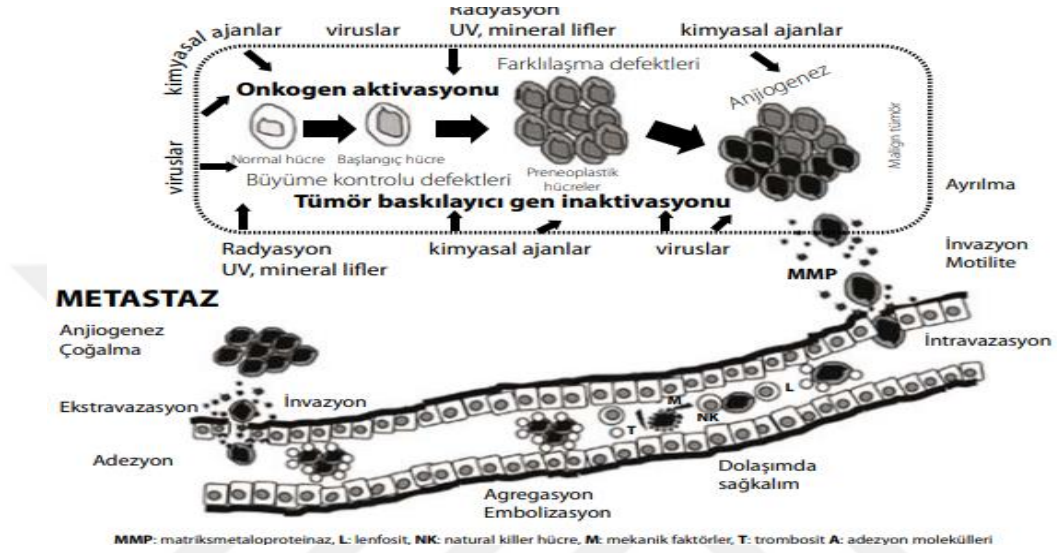
Şekil 1.1. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları [34]



Şekil 1.2. Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları [34]

Kanser biyolojisinde kanserin oluşumu, ilerlemesi ve metastatik yayılımında görev alan altı temel mekanizma bulunmaktadır [35]. Bunların, proliferatif sinyalleri sürdürme, apoptotik hücre ölümünde bozukluk, sınırsız replikasyon potansiyelleri, metastaz, invazyon ve anjiyogenez olduğu ifade edilmiştir [25]. Aynı zamanda son yıllarda bu altı önemli özelliğe ilave olarak enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immun sistemden kaçmanın da olduğu belirtilmiştir [24]. Kanserli hücrelerde meydana gelen bu türden farklılıkların sebebi hücrelerin genetik materyallerinde meydana gelen değişimlerdir [36]. Kanser oluşumu sırasında genel olarak genomik dayanıksızlık, kromozom kaybı, DNA dizilerine özellikle viral DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) dizilerinin eklenmesi ve kromozomların yeniden düzenlenmesi gibi değişimler meydana gelmektedir [37]. Kanserli hücrelerin şekil ve fonksiyonları normal hücrelerden farklılık göstermektedirler ve sonuçta normal olmayan tümör olarak isimlendirilen bir doku kitlesi

oluşmaktadır [18]. Tümör bölgesinde yer alan hücrelerin aşırı ve kontrolsüz olarak artışı sonucunda besin ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla kan ve lenf aracılığıyla diğer dokulara yayılırlar [17,18]. Tümörler şayet bulundukları alanlarla sınırlı kalıyorsa iyi huylu (benign) olarak isimlendirilirken sürekli olarak büyüme gösterip dolaşım sistemi aracılığıyla metastaz yaparak vücudun diğer kısımlarına gidiyorlarsa bu da kötü huylu (malign) tümörler olarak isimlendirilirler [19]. Kanserin oluşum mekanizması Şekil 1.3'te gösterilmiştir.

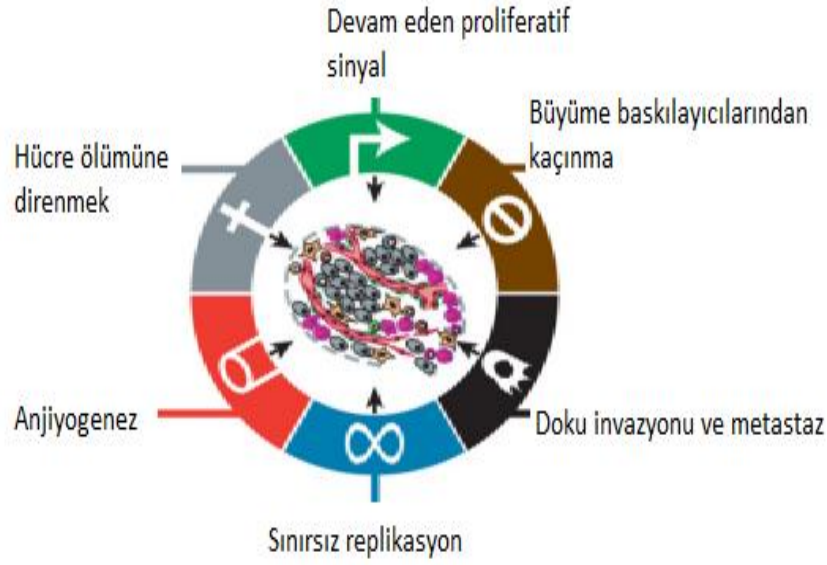


Şekil 1.3. Kanserin oluşum mekanizması [20,21]

Kanserli hücreler aşağıda verilen moleküler özellikleri göstermektedirler:

1. Büyüme sinyallerini sürdürme
2. Doku invazyon ve metastaz
3. Anjiyogenez
4. Sınırsız replikasyon
5. Enerji metabolizmasının yeniden programlanması
6. İmmun sistemden kaçış
7. Apoptozisten kaçış

Kanserli hücrelerin moleküler özellikleri Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Kanserli hücrelerin moleküler özellikleri [25]

1.1.1. Büyüme sinyalleri

Normal koşullarda hücrenin çoğalmasını sağlayan mekanizma birçok aşamadan oluşur ve bunları kontrol eden yollar; büyüme faktörleri ve besinlere ulaşılabilirlik, hücre içi ile hücreler arası geri bildirim mekanizmaları ve kontak inhibisyonu ile sıkı bir şekilde denetlenmektedir [38]. Hücrelerin çoğalabilmeleri için gerekli olan bu yapılardan birinin ya da birkaçının olmadığı durumlarda normal hücreler bölünemezler[39]. Kanserli hücreler ise bu büyüme sinyallerinin pek çoğunu kendileri üretirler ve böylece normal dokunun mikroçevresine olan bağımlılıklarını azaltırlar [25]. Kanser hücreleri tarafından üretilen bu sinyaller aracılığıyla hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerle etkileşim gerçekleşir ve böylece tümör büyümesi otokrin yollarla uyarılmış olur [38].

1.1.2. Doku İnvazyonu ve Metastaz

Metastaz gelişimi kanser hücrelerinin bulundukları bölgeden ayrılıp kan dolaşımı yardımıyla yeni bir bölgede yeni bir hücresel ortama adapte olmayı ve bağışıklık hücreleriyle ölümcül bir savaştan kaçınmayı gerektirmektedir [40]. Çevredeki dokulara yayılım, invazyon, yeni doku kısımlarına yapışma ve yeni damar oluşturabilme potansiyellerine sahip olan metastatik süreçteki hücreler, apoptozis direncini kapsayan mekanizmalar aracılığıyla hücrelerin çoğalmalarını önleyen yapılardan kaçabilme özelliğine sahiptirler [41]. Metastaz oluşumunda sırasıyla, bazal membranın proteolizini de epitelyal-mezenkimal dönüşüm, tümör hücrelerinin solid tümörden ayrılması, lokal invazyon ve hücre göçü, anjiyogenez ve intravazasyon, immün sistemden kaçma, damarlardan ekstravazasyon, yeni anatomik bölgelere yerleşme ve mikro ve makro metastazların oluşması

şeklinde bir dizi moleküler olaylar gerçekleşir [42] . Metastaz oluşumunda görevli cadherin ailesi, laminin bağlayıcı proteinler, integrinler ve hücre adezyon molekülleri, metalloproteinazlar ile sistein proteazlar gibi pek çok moleküler faktör belirlenmiştir [43].

1.1.3. Anjiyogenez

Kanser oluşumunda ve metastazda önemli bir mekanizma olan anjiyogenez var olan kan damarlarından yeni kapiller oluşumunu veya tümör hücrelerinin yeni kapiller damar oluşturmalarını ifade etmektedir [44,45]. Tümör hücreleri, kontrolsüz olarak çoğalmaya başladıktan sonra damarlanmayla birlikte hızlı ilerleme dönemine girerler ve bu tür hücrelerin daha fazla büyüebilmeleri için yeni damar oluşumlarına ihtiyaçları ortaya çıkar [46]. Tümör hücreleri, yeni damar oluşumunu uyaramadıklarında çevredeki damarlardan difüzyon yoluyla beslenirler ve en fazla 0,5-1 cm³'lük bir büyüklüğe kavuşurlar ancak bu aşamadan sonra çoğalmak ve metastaz yapabilmek amacıyla anjiyogenez gereklidir [47]. Anjiyogenez bir damardaki endotelial hücrelerini kuşatan bazal membranın enzimatik reaksiyonlarla dejenere olmasından sonra endotelial hücrelerin komşu stromaya göçünü ve proliferasyonu aşamalarını içerir [48] . Anjiyogenez baskı altına alındığında tümör hücrelerinin ihtiyaç duydukları besin ihtiyaçları ve atık maddelerin uzaklaştırılma basamakları gerçekleşmeyeceğinden tümörlerin büyümesi 1-2 mm ile sınırlı kalacaktır [49] .

1.1.4. Sınırsız Replikasyon Yeteneği

Normal hücreler sınırlı sayıda bölünebilme özelliğine sahiplerken kanser hücrelerinde bölünme sayısı sınırsızdır ve bu özellik "immortalite" olarak isimlendirilmektedir [50] . Normal hücreler farklılaşırken telomerleri giderek kısalırlar fakat kanser hücrelerinde ve kök hücrelerinde telomerase enziminin etkisiyle telomerler yenilenerek uzunlukları aynı kalır ve hücre sınırsız şekilde bölünür [51] . Sınırsız bölünme özelliği tümör hücrelerine yaşlanma, mitotik krizden kaçma ve kendini yenileyebilme yeteneği gibi birtakım avantajlar sağlar [52]. Normal şartlarda hücreler belirli bir sayıda bölünme geçirdikten sonra yaşlanma ve apoptozisle devam eden bir döngü ile ölürlər [53] . Ancak, aynı kültürde bırakılan kanserli hücreler sınırsız çoğalma potansiyeline sahip olurlar. Kanserli hücrelerle yapılan çalışmalar bu durumdan telomerase aktivitesinin sorumlu olduğunu göstermiştir ve kanserli dokuların neredeyse % 90'ında telomerase aktivitesi sonucunda telomerlerin korunduğu görülmüştür [39] .

1.1.5. Enerji Metabolizmasının Yeniden Programlanması

Kanser hücreleri hayatta kalmalarını, büyümelerini ve bölünmelerini devam ettirebilmek amacıyla enerji metabolizmalarını yeniden düzenlemek durumunda kalırlar. Değiştirilerek düzenlenen bu metabolizma ile glukoz alınımı artar ve glukoz laktata dönüştürülür [54]. Kanser

hücrelerinin normal hücrelere oranla daha fazla glukoz kullandıkları ve hızlı bir glikolitik metabolizmaya sahip oldukları 1920'li yıllarda Otto Warburg tarafından gösterilmiştir [55]. Warburg etkisi olarak isimlendirilen ve tümör hücrelerinin hücre içine yüksek düzeyde glukoz alıp glikolitik yol üzerinden glukozun laktoza dönüştürülmesini kapsayan bir süreç sonucunda enerji elde etmelerini açıklayan bu olay aerobik glikoliz olarak isimlendirilir [52]. Warburg etkisine göre normal hücreler yalnızca anaerobik şartların hüküm sürdüğü durumlarda glikoliz yolağını kullanırlar ve laktatı üretirler oysa tümör hücreleri oksijenden bağımsız biçimde glukozu temel bir besin olarak kullanırlar ve aerobik şartlarda glikolizis yaparak laktatı üretirler [56]. Kanserli hücrelerde enerji metabolizması için böyle bir yolun seçilmiş olması enerji yönünden azami faydayı sağlamaktan ziyade hücre popülasyonunun ve hâkimiyetinin sürdürülebilirliğini sağlamak amacıyla [57]. Kanserli hücrelerde artan glukoz alınımları ile nükleozidlerin ve aminoasitlerin üretimi artmakta ve hızlı bir enerji üretimi gerçekleşmektedir [58].

1.1.6. İmmün Sistemden Kaçış

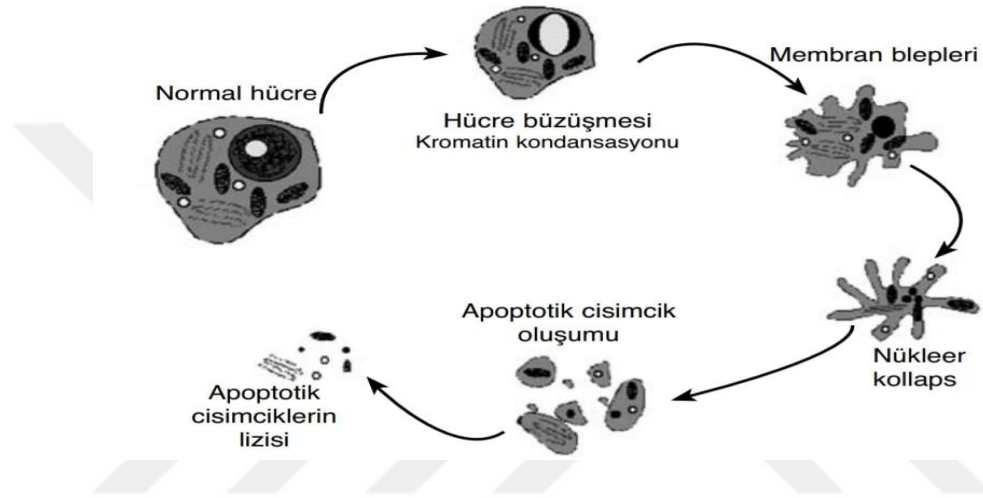
Tümör hücreleri başlangıçta immün sistem tarafından tanınan antijenlere sahiptirler ancak sonraki aşamalarda bu antijenler kaybolmaktadırlar ya da tümör hücreleri tarafından salgılanan çeşitli sitokin veya protein yapılarının etkisiyle kanserli hücreler immün sistemden kaçabilmektedirler [59]. Tümör hücresinin membranındaki antijenik değişimler, antijen-antikor kompleksleri, spesifik olan ve spesifik olmayan supressör, tümör tarafından oluşturulan supresyon ile immün sistemi etkileyen bazı genetik faktörler kanser hücrelerinin immün sistemden kaçmalarını sağlayan mekanizmalardır [60]. Kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışları üç aşamada gerçekleşir. İlk aşamada kanser hücrelerinin belirli bir düzeyde immün sistem tarafından eliminasyonu sağlanırken ikinci aşamada kanser hücrelerinin yüzey reseptörlerinde değişiklikler meydana gelmektedir. Kaçış aşaması olan son aşamada ise antijen tanıma mekanizmalarındaki değişimlerin gerçekleşmesi, kanser hücrelerinde immün baskılayıcı faktörlerin salgılanması gibi yollarla kaçış gerçekleşmektedir [61].

1.2. Apoptozis

Programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptozis, vücutta herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşturmada hücre ölümünün kontrolünü sağlayan sinyallerin ardı ardına aktifleştiği, kusursuz bir şekilde regüle edilen hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu mekanizma, doku veya organların oluşumu, gelişimi esnasında ve dokunun şekil alabilmesi için artık gereksinim duyulmayan hücrelerin yok edilmesini sağlayarak çalışmaktadır [62,63].

Apoptozis kavramının ortaya çıkışı 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür. Kerr ve arkadaşları apoptotik bir hücrenin küçük parçalara bölünmesini, bir ağacın yapraklarını dökmesine benzeterek Yunancada 'dökülmek' anlamına gelen apoptozisi

tanımlamışlardır [63]. Apoptozis kompleks sistemlerde hücrelerin hasar görmesi ve ihtiyaç duyulmaması sonucu makrofajlar tarafından fagosite edilir [64]. Kurbağaların erişkin evresine geçerken kuyruklarının kaybolması ve insan embriyosunun el ve ayak parmakları arasındaki perdelerin hücrelerinin intihar etmesi yani apoptoza yönlennmeleri sonucunda ölüme gitmeleri apoptoza örnek olarak verilebilir. Apoptoza yönlenen hücrelerde morfolojik olarak değişimler söz konusudur. Bu değişimler; hücrenin su kaybetmesi sonucu büzüşmesi, plazma ve çekirdeğin parçalanması, kromatin ve sitoplazmanın yoğunlaşması ve apoptotik cisimcik olarak adlandırılan küçük parçalara ayrılması olarak sıralanabilir [65,66]. Apoptozis' in oluşum aşamaları Şekil 1.5'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Apoptozis oluşum aşamaları [67].

1.2.1. Apoptotik Markerlar

Programlı hücre ölümünde bazı proteinler önemli rol oynamaktadır. Bu proteinler; kaspaz-3, kaspaz-9, P53, bax ve Bcl-2 protein aileleridir. Kaspaz ailesi, hücrede inaktif bir şekildedir ve birbirlerini proteolitik olarak aktif hale getirirler. Kaspazlar; NH-terminal kısım, 10kDa (Kilodalton) ağırlığında küçük alt ünite, 20 kDa ağırlığında geniş alt ünite olmak üzere 3 parçadan oluşmaktadır. Kaspazlar; başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2,8,9,10), efektör kaspazlar (kaspaz 3,6,7) ve inflamatuvar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14) olmak üzere 3 farklı tipte bulunur [68,69]. Hücrede meydana gelen anormal olaylar sonucunda hücre içinden gelen sinyaller kaspaz 8 ve 9'u aktive eder. Kaspaz aktivasyonunun artmasıyla apoptozis aktive edici faktör-1 (apaf-1) aktif hale gelir ve mitokondriden sitokrom c salınımı gerçekleşir. Daha sonra apaf-1, sitokrom c ve kaspaz-9 birleşerek apoptozom kompleksi oluşur ve bu kompleks sonucunda kaspaz-3 aktive edilerek hücrede apoptoz gerçekleşir [70]. Bcl-2 aile üyeleri, apoptozu indükleyen pro-apoptotik ve apoptozu baskılayan anti-apoptotik olarak isimlendirilen iki farklı gruba ayrılır. Bcl-2, mitokondride porların geçirgenliğini kontrol eder ve apoptozu baskılayan anti-apoptotik bir proteindir. Pro-apoptotik protein olan Bax, mitokondri organelinde bulunur ve programlı hücre ölümünün meydana

gelmesinde önemli rol oynar. P53 proteini genomun koruyucusu olarak bilinen transkripsiyon faktörü ve tümör süpresör genidir. Hücre döngüsünde DNA hasarı olduğunda hücre döngüsünü durdurur ve DNA tamirinde görevli olan proteinlerin ekspresyon seviyesini artırır. DNA tamir edilemezse pro-apoptotik proteinlerin ekspresyon düzeyini artırır ve hücreyi apoptoza yönlendirir [71-73].

1.2.2. Kanserde Apoptozis

Nedeni veya türü ne olursa olsun tüm kanser hücrelerinde bulunan ayırt edici özellikler; kontrolsüz büyüme, anjiyogenez ve apoptozisden kaçınmayı içerir [74,75]. Kanser önlenmesi, apoptozisin ana işlevlerinden biridir [76]. Tipik olarak, kanserde inhibe edilen içsel yoldur, ancak apoptozisi inhibe etmek için çok çeşitli araçlar vardır. Apoptotik kontrolün kaybı, kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmasına izin verir ve tümör ilerlemesi sırasında invazivliği artırabilen, anjiyogenezi uyarabilen, hücre proliferasyonunu düzensizleştiren ve farklılaşmaya müdahale edebilen mutasyonların birikmesi için daha fazla zaman verir [77].

Apoptozisten kaçan kanser hücrelerinin birçok yolu vardır: kaspaz işlevi engellenebilir veya apoptoz için tetikleyici devre dışı bırakılabilir [76]. Antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin yukarı regülasyonu ve Bax veya Bak kaybı, baskın kaçınma yöntemleridir. Bcl-2 bir onkogen olarak kabul edilmez, ancak içindeki mutasyonlar tümör başlangıcını artırır. Bcl-2 proteininin aşırı ekspresyonu, tipine bakılmaksızın tüm kanserlerin yarısından fazlasında mevcuttur [76]. Bu, bazı antikanser ilaçları içeren herhangi bir içsel apoptotik uyarıya dirençli tümör hücreleri ile sonuçlanır [77].

1.2.3. Apoptozis ve Kanser Tedavisi

Kanseri tedavi etmenin bir yolu, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini kontrol altına almak veya muhtemelen sonlandırmaktır. Ölüm için hücrenin kendi mekanizmasını kullanmak oldukça etkili bir yöntemdir. Ek olarak, apoptozisi hedeflemek en başarılı cerrahi olmayan tedavidir. Apoptozisten kaçınma, kanserin ayırt edici özelliği olduğundan ve kanserin nedeni veya türüne özgü olmadığı için, apoptozu hedeflemek tüm kanser türleri için de etkilidir. Hem içsel hem de dışsal yollarda çeşitli aşamaları hedef alan birçok antikanser ilacı vardır [78-80]. Terapötik hedefleme için iki yaygın strateji, proapoptotik moleküllerin uyarılması ve antiapoptotik moleküllerin inhibisyonudur [77]. Araştırılan hedeflerden bazıları, ölüm reseptörleri için ligandları [76], BCL-2 için inhibitörleri [81], XIAP inhibisyonunu [76] ve apoptotik sinyaller olarak hareket eden alkilfosfolipid analoglarını (APL) içerir [79]. Herhangi bir aşama tedavi için yollarda hedeflenebilir, fakat hangi hedefin en etkili olduğuna dair bir gösterge yoktur. Apoptozisi indükleyen antikanser ilaçları daha fazla tasarlandıkça, en etkili hedefler belirlenecektir [82].

1.2.4. Apoptozis Mekanizmaları

Hücrelerin apoptoza yönelmesi için hücrede belli başlı bazı olayların meydana gelmesi gerekmektedir [83]. Hücrelerin bölünmesi için gerekli olan büyüme faktörlerinin azalması, hücre bölünmesi esnasında meydana gelen DNA hasarı, hipoksi ve oksidatif stres gibi olaylar sonucunda hücrede apoptozis için ardı ardına sinyaller aktifleşir. Programlı hücre ölümünde görev alan primer üç protein: Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'dir [84,85]. Bu protein ailelerinin fonksiyonuyla apoptozisteki yapısal değişimler, mitokondriyal permabilitenin bozulması, nükleus membran ve kromozomal değişimler, DNA hasarı gibi reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Programlı hücre ölümünde iki biyokimyasal yolak bulunmaktadır. İlk biyokimyasal yolak, ölüm reseptörleri tarafından meydana gelen ekstrinsik (dışsal) yolak, ikinci biyokimyasal yolak ise Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığıyla meydana gelen intrinsik (içsel) yolaktır [83,86].

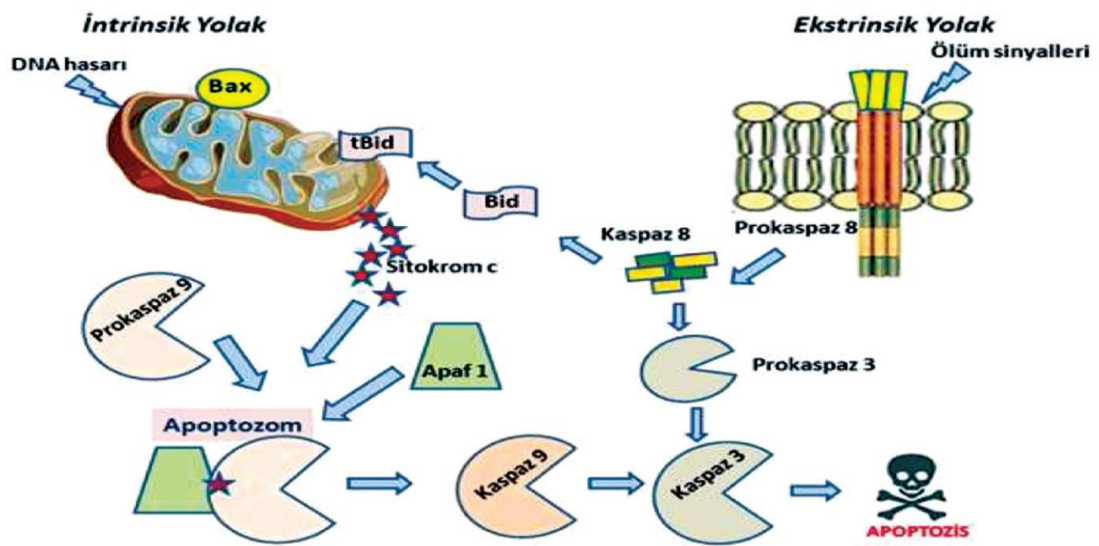
1.2.4.1 Ekstrinsik (Dışsal) Yolak

Ekstrinsik yolak, ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Ölüm reseptörleri ligandlara çok kısa sürede bağlanarak kaspaz kaskadının aktifleşmesini sağlayarak ekstrinsik yolağın çok hızlı gerçekleşmesine neden olur [87]. Hücre zarının dış kısmında var olan reseptörlere hücre dışından gelen ölüm sinyalleri bağlanır. Sitoplazmada reseptörlerin geriye kalan kısımları birleşir ve hücre ölümüne aracılık eden proteinlere bağlanırlar. Pro-kaspazların proteolitik görevini yerine getirmesini engelleyen kısımlar kesilmekte ve pro-kaspazlar aktif kaspazlara dönüşmektedirler [88]. Hücrelerin yüzeyinde olan reseptörler TNF (Tümör nekroz faktör) gen ailesi üyesidirler ve TNF gen ailesi üyelerinde ölüm domaini (Death domain; DD) adı verilen kısımlar bulunmaktadır. Ölüm domainleri, hücre dışından gelen ölüm sinyallerini hücre içine ileterek önemli bir rol üstlenir. TRAIL (TNF-related apoptosis- inducing ligand) DR4, DR5, CAR1, Fas, P75 ve TNF-R1 (Tumor necrosis factor Receptor-1) TNF gen ailesi üyeleridir. Bu ölüm ligantları, plazma zarındaki reseptörlere bağlanırlar ve bu bağlanma sonucunda ekstrinsik apoptotik yolak aktifleşmektedir. Reseptörlerin homotrimerizasyonu sonucu Fas ilişkili ölüm domaini (FADD: Fas-associated via death domain) ve prokaspaz-8 benzeri adaptör proteinler ölüm-indükleyen sinyal komplekslerine dönüşür [89]. Reseptörlere gelen sinyaller sonucunda adaptör proteinler kaspazlara bağlanırlar ve onların aktifleşmesini sağlarlar. Aktifleşmiş kaspazlar DNaz enzimi ile birlikte DNA yıkımına sebep olurlar [88,90,91].

1.2.4.2 İntrinsik (İçsel) Yolak

İntrinsik yolak, reseptöre bağlı olmayan mitokondrinin merkezi rol oynadığı hücre içi uyarılar sonucunda gerçekleşen apoptozis mekanizmasıdır. İç yolak, DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi hormon ve sitokinlerin hücreye ulaşmaması viral enfeksiyonlar gibi birçok hücresel

stres sinyalleri sonucunda aktifleşir [92]. Apoptozise giden bir hücrede mitokondri ihtiyaç olan enerjiyi üretir ve mitokondri dış zarında meydana gelen transmembran potansiyelin düşmesi sonucunda 'permeability transition pore (PT)' adı verilen por oluşumu gerçekleşir. Por oluşumunun gerçekleşmesi iki protein grubunun sitozole salınımına sebep olur. İlk protein grubu, sitokrom c, serin proteaz HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO'dur. Sitokrom, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) adı verilen proteine bağlanır ve apoptozom kompleksinin oluşmasında Apaf-1 ile birlikte kaspaz 9'un aktifleşmesinde görev alır [88]. HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO, IAP'lerin yani apoptozis inhibitörlerinin fonksiyonlarını inhibe ederek apoptozisi düzenlerler. İkinci protein grubu, endonükleaz G, AIF ve CAD'dır. Bu protein grubu da apoptozis sırasında mitokondri tarafından salınır. Hücre ölümünün meydana gelmesiyle bu proteinler salınır ve çekirdeği hedef alan AIF, DNA'yı küçük parçalara böler bunun sonucunda kromatin yoğunlaşır. Diğer bir protein olan endonükleaz G çekirdeğe giderek DNA'yı fragmentlere ayırır. Kaspaz-3 diğer bir protein olan CAD'ın aktifleşmesini sağlar ve CAD nükleozomlar arasından DNA'yı keser [90,93,94]. Bcl-2 protein ailesi apoptozisi düzenleyen, apoptozis üzerinde negatif ve pozitif etkinlik gösteren pro-apoptotik ve anti-apoptotik olarak isimlendirilen iki üyeye sahip bir onkogen sınıfıdır. Pozitif yönde etkileyen proteinler; Bax ve Bak iken negatif yönde etkileyen proteinler; Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-xL'dir. Proapoptotik protein olan Bax ve Bak etkilerini sitokrom c'nin sitoplazmaya geçişini sağlayarak gösterir. Antiapoptotik üyeler ise bu reaksiyonun gerçekleşmesini engellerler. Mitokondri, kaspazların fonksiyonel hale gelmesinde rol oynar ve kaspaz üyelerinin mitokondri zarından sitoplazmaya geçişini sağlar. Aktif kaspaz-9 Kaspaz-3'ü aktive eder ve kaspaz-3 kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı aktifleştirir. Özetle mitokondri dış zarının geçirgenliğinin artması ve bunu takip eden kaspaz kaskadı sayesinde içsel apoptozis yolağı tamamlanır [95,96]. Apoptotik mekanizmaların yolakları Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Apoptotik yolaklar [97].

Belirli durumlarda bir dizi sinyal kaskadı tarafından düzenli bir şekilde düzenlenen apoptozis, bir hücre ölümü türüdür. Apoptozis bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde, büyüme ve gelişmede, organizmalardaki gereksiz hücrelerin veya anormal hücrelerin temizlenmesinde rol oynayan önemli bir faktördür. Aynı zamanda apoptozis, organizmaların başarılı bir şekilde yaşamak için sabit miktarda hücreyi korumalarının önemli bir yoludur. Apoptozisin başlatılması ve yürütülmesi, sinyal molekülleri, reseptörler, enzimler ve gen düzenleyici proteinler dahil olmak üzere bir dizi molekülün işbirliğini gerektirir. Bunlar arasında, apoptozis proteini inhibitörü (IAP), Bcl-2 ailesi proteinleri ve kalpain gibi çeşitli moleküller tarafından düzenlenen kaspaz-kaskad sinyal sistemi, apoptozis sürecinde hayati öneme sahiptir [98].

Apoptozis, hedef proteinleri parçalayan bir sistein proteinleri sınıfı olan kaspazlar (sistein aspartil-spesifik proteazlar) tarafından gerçekleştirilir [81]. Kaspaz proteaz aktivitesi, yüzlerce çeşitli proteini parçaladıkları için başarılı apoptoz için gereklidir [76]. Dört başlatıcı kaspaz (kaspaz-2, -8, -9, 10) ve üç uygulayıcı kaspaz (kaspaz-3, -6, -7) vardır [81]. Cellat kaspazları, sonunda hücrenin ölümüne yol açan hedef proteinleri parçalar. Yollar yüksek düzeyde düzenlenir, böylece apoptozis yalnızca sinyal verilirse gerçekleşir. Özellikle içsel yol, proapoptotik efektör proteinleri, yalnızca proapoptotik BH3 proteinlerini ve antiapoptotik BCL-2 proteinlerini içeren B hücreli lenfoma-2 (BCL-2) protein ailesi tarafından düzenlenir [76]. Antiapoptotik BCL-2 proteinleri, proapoptotik BCL-2 proteinlerinin, BCL-2-ilişkili X proteininin (Bax) ve BCL-2 homolog antagonist öldürücünün (BAK) inhibisyonu yoluyla apoptozisi inhibe eder [81]. Yalnızca BH3 proteinleri, antiapoptotik BCL-2 proteinlerini inhibe eder [82].

1.3. Kaspazlar

İnterlökin-1 β -dönüştürücü enzim ailesi proteazları olan kaspazlar, *Caenorhabditis elegans* hücre ölümü geni *CED-3*' e oldukça benzerdir. Şimdiye kadar, tümü bazı ortak özellikleri paylaşan on dört kaspaz tanımlanmıştır. Bu özelliklerden biri hepsinin aspartata özgü sistein proteazlar olmalarıdır. Bir diğer ortak özellik de hepsinin koruyucu bir pentapeptit aktif bölgesine "QACXG" (X, R, Q veya D olabilir) sahip olmalarıdır. Diğer ortak özellik ise öncüllerinin tümünün prokaspaz olarak bilinen zimojenlerin olmasıdır. Prokaspazlardaki prodomainin N-terminali, kaspaz aktivasyonu için gereken oldukça çeşitli bir yapı içerir ve hepsi, bir büyük ve bir küçük alt birimi olan bir heterodimer üretmek için diğer kaspazları aktive etmenin yanı sıra otoaktive etme yeteneğine sahiptir ve iki heterodimer, bir enzimatik aktif heterotetramer oluşturur [95]. Aminoasit dizilerindeki homolojilerine göre kaspazlar Tablo 1.1.'de gösterildiği gibi üç alt aileye ayrılır [96].

Tablo 1.1. Kaspaz ailesinin alt familya üyeleri [96]

Alt Familya	Rol	Üyeler
I	Apoptozis aktivatörü (başlatıcı)	Kaspaz-2
		Kaspaz-8
		Kaspaz-9
		Kaspaz-10
II	Apoptozis infazcısı (cellat)	Kaspaz-3
		Kaspaz-6
		Kaspaz-7
III	İnflamatuar aracı	Kaspaz-1
		Kaspaz-4
		Kaspaz-5
		Kaspaz-11
		Kaspaz-12
		Kaspaz-13
		Kaspaz-14

Esas olarak apoptozis veya inflamasyondan ziyade epitel hücre farklılaşması ile ilişkilendirilen proteolitik işlemesi için benzersiz olan prokaspaz-14 dışında, inflammatuar mediatör kaspazlarının ve apoptozis aktivatör kaspazlarının prokaspazlarının tümü, prokaspazlarda uzun prodomainlere sahiptir [99,100]. Uzun prodomain, procaspaz-8 ve -10' daki ölüm efektör alanını (DED) veya procaspaz-2 ve procaspaz-9' daki kaspaz alım alanını (CARD) içerir. Ölüm alanı (domain) aile üyeleri olan DED ve CARD, protein-protein etkileşimleri yoluyla prokaspaz aktivasyonu ve aşağı akış kaspaz-kaskad düzenlemesinde yer alır. Benzer bir pirin alanı (domain), zebra balığı prokaspazının ön alanında bulunmuştur. Üç alanın tümü, bir Yunan anahtar konformasyonunda düzenlenmiş altı antiparalel α -heliksinden oluşan, ölüm alanı kıvrımı olarak bilinen ortak bir 3 boyutlu yapı içerir. Ancak apoptozis yürütücü kaspazların prokaspazlarındaki daha kısa olan prodomainler protein-protein etkileşimlerinde yer almazlar [100].

Apoptozisde hayati öneme sahip olan kaspazlar, sistein-aspartik-proteazlardır. Bu kaspazlar bir sinyale tepki olarak ilk etkinleştirilen başlatıcı kaspazları (kaspaz 2, 8, 9 ve 10) ve apoptozisin yıkım aşamasını gerçekleştiren cellat kaspazları (kaspaz 3, 6 ve 7) içerir [101].

Cellat kaspazlar (3, 6 ve 7) aktif hale geldiğinde; endonükleaz aktivasyonu, DNA fragmentasyonu, nükleer proteinlerin imhası, fagositik hücreler için ligand ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu olayları gerçekleşir [102]. Başlatıcı kaspazlar kendilerini aktif hale getirebilir. Bu aktivasyon için pro-alanları içerir. Efektör kaspazlar ise aktifleşmiş başlatıcı kaspazlar-8,-9,-10 tarafından aktif hale getirilir. Kaspaz-2, başlatıcı ve efektör kaspazdır. Kaspaz-2 spesifik olarak efektör kaspaz-13 ile substrat spesifikasyonlarını paylaştığından efektör kaspaz olarak gruplandırılabilir. Kaspaz-2'nin rolü tam olarak belli olmasa da, yakın zamanda yapılan çalışmalar genotoksik strese cevap olarak mitokondriyal yolun yukarıya doğru hareket ettiğini belirtmiştir [101].

Cellat kaspazlarının aktif hale gelmesi performin/granzim yolu ile direkt olarak da başlatılabilir [103]. Kaspaz-3 ve kaspaz-7 cellat kaspazlar arasında bulunur. Bu grupta kaspaz-6 da

yer alır fakat apoptozisteki rolü daha az belirgindir. Nörodejeneratif hastalıklarda oldukça önemli rol oynar [104,105].

Başlatıcı kaspazlar, kaspaz-2, -8, -9 ve -10' dur. Her başlatıcı kaspazın protein ve protein etkileşim motifini kodlayan uzun bir prodomaini vardır. Bu şekilde katalitik alanların dimerizasyonunu kolaylaştırır. Kaspaz-2 ve kaspaz-9'da bulunan kaspaz alım bölgesi (CARD; caspase recruitment domain) ve kaspaz-8 ve kaspaz-10 prodoinlerinde bulunan ölüm efektör bölgesi (DED; death effector domain) bu motifler arasında yer alır [106]. Her kaspaz için bu etkileşim alanları aktivasyon platformları olarak işlev yapar. Büyük çoklu protein komplekslerine başlatıcı kaspazların alınmasına izin verir. Her kaspaz için aktivasyon platformları spesifiktir. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 için ölüme neden olan sinyal kompleksini (DISC), kaspaz-9 için apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apaf1) apoptozomu ve p53'ü, kaspaz-2 için indüklenen ölüm alanı proteinini (PIDDosome) içerir [107]. Genellikle her kompleks bir reseptör proteininden meydana gelir [101].

1.3.1. Bcl-2 ailesi

Çok sayıda çalışma, PI3K/AKT sinyal yolunun anormal aktivasyonunun, birçok kanser tedavisinde apoptoz aracılı çoklu ilaç direncine yol açan Bcl-2 ekspresyonunun düzenlenmesine katkıda bulunduğunu ileri sürmüştür [108]. Bcl-2 protein ailesi apoptozda anahtar faktördür ve kanser gelişimi ve ilaç yanıtı için önemli olan bir hücre intihar programıdır [109]. Bad, Bax, Bcl-2, Bid ve Bcl-xL' yi içeren Bcl-2 proteinleri mitokondriyal membran üzerinde bulunurlar, mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirebilir ve postmitokondriyal kaspaz kaskadlarının aktivasyonu yoluyla apoptotik hücre ölümüne yol açan sitokrom c veya kaspaz salınımını tetikleyebilir. Bcl-xL ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinler, mitokondriden sitokrom c salınımını önleyerek hücre sağkalımını uyarır ve Bax ve Bad gibi proapoptotik proteinler, sitokrom c' yi serbest bırakmak için mitokondriyi indükler [110]. Bcl-2 ailesinin proteinleri arasındaki denge, PI3K/AKT' nin çeşitli yabancı uyaranları tarafından indüklenen apoptotik yollarda hayati bir rol oynar [111]. Basit bir "varistör" gibi bu karşıt apoptoz proteinleri arasındaki denge, hücrelerin apoptotik strese duyarlılığını düzenler [112]. Apoptotik düzenleyici Bcl-2, anti-apoptotik mekanizmanın önemli bir bileşenidir. Bcl-2, mitokondriyal dış membran geçirgenliğini bloke eden ve apoptozu inhibe eden bir onkogendir ve kanserlerin çoklu ilaç direncinde her zaman aşırı eksprese edilir. Bcl2' nin aşırı ekspresyonu tipik olarak, PI3K/AKT yollarındaki anormal değişikliklerle ilişkili olan kanser hücrelerinin kanser faktörlerine direnci ile sonuçlanır [113,114].

Aktive edilmiş AKT, Bad Ser136'yı (AKT'nin hedefi) doğrudan fosforile eder [115]. AKT, Ser-112' de Bad' i fosforile eden ve apoptozu inhibe etmek için Bcl-xL kompleksinden salınmasına neden olan PAK1' i aktive eder. Aktive edilmiş AKT, Bcl-2 aktivasyonu ve Bax' ın inhibisyonu yoluyla hücrenin hayatta kalmasını destekler [116]. Bad' in mitokondriyal translokasyonu ve Bad

ve Bcl-xL arasındaki fizyolojik etkileşim de mitokondriyal disfonksiyonu indükler ve Bad ve Bcl-xL arasındaki PI3K/AKT aracılı etkileşim mitokondriyal bütünlüğü korur ve sitokrom c akışını önler [117]. Bu nedenle, PI3K aktivitesi, Bax' ın sitoplazmada tutulması için önemlidir ve AKT, apoptoz aracılı çoklu ilaç direnci ile ilişkili olan Bax' ın mitokondriye translokasyonunu inhibe eder [118]. Özetle, PI3K/AKT yolunun aktivasyonu, çeşitli hücrel apoptotik süreçlerin (Bax/Bcl-2) düzenlenmesi yoluyla çoklu ilaç direncini destekler [119].

1.3.2. PI3K-AKT-mTOR Sinyal Yolu

Keşfedilmesinden bu yana 20 yıldan fazla bir süre içinde, çalışmalar, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt/memeli rapamisin hedefinin (mTOR) kanser büyümesi, metabolizması, hayatta kalması ve hareketliliğinde merkezi rolünü ortaya koymuştur [120-123]. PI3K/Akt/mTOR yolu, muhtemelen insan kanserlerinde en sık aktive edilen yoldur ve tümörlerin yaklaşık %30-50'sini etkiler [124], bu da onu onkoloji ilaç gelişimi için çekici bir hedef haline getirir [125]. Bu sinyal yolunun inhibisyonu, hem hücrel proliferasyonun azalmasına hem de hücrel ölümün desteklenmesine neden olabilir [126]. Yapı ve fonksiyona göre PI3 kinaz üç sınıfa ayrılır. Bunlar; sınıf I, II ve III' tür. Bunlardan sınıf I PI3 kinazlar, insan kanserinde en açık şekilde rol oynayanlardır [128]. Üç sınıf IA PI3K izo formu vardır (PI3K α , PI3K β ve PI3K δ). PI3K γ , PI3K'lerin 1B sınıfındaki tek enzimi temsil eder [128]. Ayrıca Akt'ın üç izoformu vardır: Akt1, Akt2 ve Akt3. Sinyalleme kaskadını tamamlayan mTOR, bilinen iki kompleksten oluşur. Bunlar mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) dir [129].

PI3K/Akt/mTOR yolunun patolojik aktivasyonu, en yaygın olarak PI3K'nın nokta mutasyonları olmak üzere, tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) inaktivasyonu ve Akt'ın amplifikasyonu veya mutasyonu olmak üzere çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir [126]. PI3K'nın p110 α alt birimini kodlayan gen olan PIK3CA'daki nokta mutasyonları, kanserde en yaygın olarak tespit edilen mutasyonlar arasındadır [124]. Bu mutasyonlar hemen hemen her büyük tümör tipinde tanımlanmış olmasına rağmen, en yüksek prevalansa sahip olanlar meme, endometrium, kolon, baş ve boyun kanserlerini içerir [125].

PI3K α 'nın aksine, PI3K δ ve PI3K γ 'deki mutasyonlar nadirdir. PI3K δ tercihen lökositlerde ekspresyon edilir ve B hücresi aktivasyonu, proliferasyonu, hayatta kalması ve lenfoid doku hedeflenmesinde önemlidir [130]. PI3K δ , PI3K p85 düzenleyici alt biriminin SH2 alanları ile etkileşim yoluyla veya doğrudan RAS yoluyla hücrel reseptörler tarafından aktive edilir [131]. PI3K δ sinyalinin birçok B hücre malignitesinde özellikle hiperaktif olduğu bilinmektedir. Çok sayıda klinik öncesi çalışma, PI3K δ 'nin izoforma özgü inhibisyonunun, diğer hematopoietik hücre tiplerinde toksisiteyi korurken B hücrelerinin sitotoksitesine yol açtığını göstermiştir [132-134]. PI3K γ , G-proteinine bağlı reseptörlerle ilişkilidir ve fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfatın (PIP3) çok hızlı indüklenmesinden sorumludur ve ayrıca diğer reseptörlerin aşağı akış yönünde RAS

tarafından da aktive edilebilir. PI3K δ 'ye benzer şekilde, PI3K γ tercihen lökositlerde eksprese edilir ve B hücre malignitelerinin büyümesi ve hayatta kalması için merkezidir. PI3K γ 'nin ayrıca tümör mikro ortamının korunmasında ve T hücresi gelişimi ve hayatta kalmasında rol oynadığı bilinmektedir [125]. PTEN, PI3K sinyalizasyonunun bir antagonistidir ve bu tümör baskılayıcı genin fonksiyon kaybı, aşağı akış aktivasyonunun artmasına neden olur [122,135,136]. PTEN'deki mutasyonlar, özellikle endometriyal, merkezi sinir sistemi, deri ve prostat kanserleri olmak üzere çok sayıda kanserde gösterilmiştir. Somatik mutasyonlar daha yaygın olmakla birlikte, PTEN'in germ hattı kaybı Cowden sendromuna neden olur [137,138]. PTEN kaybı, delesyonlar, transkripsiyonel susturma veya translasyon sonrası modifikasyon ve protein kararsızlığı nedeniyle de gelişebilir [139].

Akt'nin üç izoformunun tümü, çeşitli malignitelerde amplifikasyon göstermiştir. Mide karsinomu, glioblastoma ve gliosarkomda Akt1 amplifikasyonu bildirilmiştir. Akt2 amplifikasyonu baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, pankreas, yumurtalık ve meme kanserlerinde tanımlanmıştır. Akt'ta da mutasyonlar tanımlanmıştır, ancak PIK3CA ile gözlemlenen sıklıktan daha az yaygındır [140]. Benzer şekilde, mTOR'daki mutasyonlarda nadirdir [129].

PI3K/Akt/ mTOR yolunun üyelerindeki doğal aberasyonlara ek olarak, bu yol boyunca patolojik sinyalleşme, reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler), G proteinine bağlı reseptörler ve diğer onkogenler dâhil olmak üzere başka yollarla da meydana gelebilir (örn. RAS) [120,123,141-143].

1.4. Kolonun Anatomisi

Sindirim sisteminin son organı olan ve sindirilmiş madde kalıntıları ile sindirilemeyen maddeleri ihtiva eden katı atıkların oluşumundan sorumlu olan kolon, anüsten ileoçekal dan valve kadar uzanan bir yapıya sahiptir [144]. 130-150 cm uzunluğunda ve 2,5-8,5 cm çapında olan kolon, çekum, çıkan, transvers, inen ve sigmoid kolon ile rektum kısımlarından oluşur [145]. Kolon duvarı mukoza, submukoza, muskularis propria, adventisya ve serosa olmak üzere beş tabakadan oluşmaktadır [146].

Çekum 7,5-8 cm uzunluğunda olan, kolonun en geniş çaplı ve musküler tabakası en ince olan kısmını oluşturmaktadır. Çekumdan karaciğerin sağ lobuna kadar uzanan, 15-20 cm uzunluğunda olan, sola ve öne doğru kıvrımlar oluşturarak hepatik fleksurayı oluşturan çıkan kolon içte duodenum, ince barsak ve dışta da karın yan duvarına komşudur[147]. Batını sağdan sola doğru kateden, ortalama 50 cm uzunluğunda olan transvers kolonun tamamı periton ile kaplıdır ve mezosu ile pankreas ve sol böbrek kapsülüne asılarak batını alt ve üst bölmelere ayırır [148]. Karın zarının arkasında bulunan bir yapı olan inen kolon, kolonun sigmoid kolonunun içine girer [149]. İnen kolonun devamı olan sigmoid kolon ise pelvik ağzın önünden başlayıp ve üçüncü sakral vertebra seviyesinde rektum haline gelen kalın bağırsağın “S” şeklinde bir kısmıdır buna ek olarak sigmoid kolon inen kolonu rektuma bağlar [149,150]. İnen kolondan farklı olarak periton sigmoid kolonu

evreler ve bu nedenle retroperitoneal bir yapı değildir. Aynı zamanda sigmoid mezokolon, sigmoid kolonu karın arka duvarına bağlar [150].

1.5. Kolon Kanseri

Prostat ve akciğer kanserinden sonra erkeklerde en sık görülen üçüncü, kadınlarda da akciğer ve meme kanserinden sonra üçüncü sıklıkta görülen bir kanser türü olan kolon kanserinin oluşum sıklığı giderek artmaktadır [151]. Amerika Birleşik Devletlerinde 2002 yılı ve 2011 yılları arasındaki kolon kanseri çeşitlerine bağlı ölümlerde üç kat artış olduğu bildirilmiştir [152]. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan önceki yıllara ait verilerine göre kolon kanserinin kadınlarda görülme oranı % 7,8 olarak belirlenmişken bu oran erkeklerde % 7,5 olarak bulunmuştur. Gastrointestinal kanserler arasında kolon kanseri dünya genelinde lme neden olan dördüncü kanser türü olarak görülmektedir ve kanser ölümlerinin yaklaşık % 8'lik kısmının bu kanser türünden kaynaklandığı belirtilmektedir [153]. Yaş ve yaşam biçimi kolon kanserinin önemli sebepleri arasında olmasına rağmen genetik sebepler de bu kanserin oluşumunun nedenlerindendir [154]. 40 yaşından önce kolon kanserinin görülme oranı çok az olurken oluşma sıklığı 40-50'li yaşlardan sonra artış göstermektedir [155]. Kolon kanserinin görülme sıklığı coğrafik bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Asya ve Güney Amerika'da düşük seviyelerde görülmesine rağmen Avustralya, Yeni Zellanda, Hindistan ve Avrupa'da görülme sıklığı daha yüksektir aynı zamanda batılılaşma ve gelişmişlikle bağlantılı olduğu düşünülmektedir [156].

En dıştan içe doğru, seroza, muskularis peopiya, submukoza ve mukozadan oluşan kolon duvarının i duvarında yer alan epitelyumun, adenokarsinomlara ve tümöre dönüşümüyle kolon kanseri başlar. Tedavi edilmezse başta kolon duvarlarına sonrasında da lenf sistemi ve diğer organlara yayılım gösterir [157,158]. Birçok eşidi olmasına rağmen en yaygın olan kolon kanseri çeşidi adenokarsinomlardır [159]. Kolon kanseri çeşitlerinin erkeklerde en çok görülen üçüncü ve kadınlarda ise en çok görülen ikinci kanser türü olduğu ve 2018 yılında 1,8 milyondan fazla kişiye kolon kanseri teşhisi konulduğu görülmüştür [160]. Kolon kanseri pek çok genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır ve genellikle yaş, diyet, fiziksel aktivite eksikliği, obezite, adenom ve karsinom, radyasyon, sigara, alkol kullanımı ve inflamatuvar kolon hastalığı gibi etkenler kolon kanserini olumsuz yönde etkiler [161]. Hayvansal yağların ve kırmızı etin çok fazla alındığı ve yeterince lifli gıdalarla beslenilmediği, karbohidrat ağırlıklı beslenildiği durumlarda kolon kanseri eşitleri çok daha fazla görülmektedir [160,161]. Kolon kanserlerinin tamamına yakını kolon duvarlarındaki iyi huylu poliplerin malign poliplere dönüşümü sonucunda ortaya çıkarlar. Kolon kanserinin ilk oluşumunda kolonda doku büyümesi meydana gelerek polipler oluşur. Başlangıçta, normal olan epitel doku adenoma dönüştükten sonra adenomun displastik değişimlerle intramukozal karsinoma dönüşümü meydan gelir ve daha sonra invaziv adenokarsinomi oluşur [162]. İlk aşamalarda belirti göstermemesine karşılık daha ileri aşamalarda

kilo kaybı, iştahsızlık, karında ağrı ve kanamalar görülmesi şeklinde karakterize edilir [18]. Kolon kanserlerinin birçoğunda kalıtsal bir eğilim ya da aile öyküsü az bir oranı kapsamaktadır. Bu türden kanser vakalarında adenomatoz polipozis kolinin (APC) somatik mutasyonu, kalıtsal olmayan sporadik adenomatöz polipozisli (SAP) hastaların yaklaşık %80-85'inin ayırt edici bir belirticidir [7]. APC geninin mutasyonunun kolon kanseri çeşitlerinin gelişiminde erken bir adım olduğu düşünülmektedir[165]. APC geninin kusurlu son ürünlerinin toplanması c-myc ve siklin D gibi belirli hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açan Wnt/-katenin sinyal yolunun sonraki aktivasyonuna katkıda bulunur [166]. İlk genetik değişikliğin ardından, karsinogenez süreci, bir dizi genetik mutasyon, fenotipik ve p53 tümör baskılayıcı genin invaziv kolorektal karsinoma doğru kaybı gibi patolojik değişiklikleri içerir [167]. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, erkeklerde ve artan yaşın hastalığın oluş sıklığıyla korelasyon taşıdığını göstermiştir. Kolon kanserlerinin çoğunun orijinini oluşturan hücrelerin, kanser kök hücresi ya da kök hücresi olduğu bildirilmektedir. Bu hücreler, tümör baskılayıcı genleri inaktif hale getirirken onkogenleri aktive edebilen, epigenetik ve genetik değişimlerin birikimi sonucunda oluşmaktadırlar [168].

Kolon kanserinin oluşumunda ve gelişiminde diyet başta olmak üzere kilolu olmak, tütün, alkol önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, diyet açısından yağca zengin, lifli besinlerce fakir besinlerle beslenmek kolon kanseri oluşumunda etkin rol oynamaktadır [160].

1.5.1. Kolon Kanseri Risk Faktörleri

1.5.1.1 Diyet ve Yaşam Tarzı

Kolon kanserinde, diyetssel faktörler DNA hasarına neden olan genotoksit bileşenleri içeren başlatıcı faktörler ve genotoksit olmayan ancak hücre çoğalmasını uyaran ilerletici faktörler olmak üzere iki grupta incelenmektedir [160]. Lifli ve tahıllı gıdaların az alınması, yağca yüksek gıda tüketimi, kırmızı ve işlenmiş et ile sigara ve aşırı alkol tüketimi kolon kanseri açısından risk oluşturmaktadır [169]. Ayrıca, sebze ve meyve tüketiminin azlığı ve sedanter yaşam ile birlikte artan şeker tüketiminin de kolon kanserine neden olduğu bilinmektedir [170]. Bu tür diyetleri içeren ve literatürde batı tarzı yaşam biçimi olarak bilinen bu yaşam biçiminin kolon kanserine sebep olduğu bildirilmektedir [171].

1.5.1.2 Obezite

Obezite, kolon kanserlerinde önemli bir risk faktörlerinden biridir ve obezite ile kolon kanseri arasındaki ilişkinin başka gastrointestinal sistem kanserlerine göre daha yüksek bir korelasyon olduğu belirtilmiştir [172]. Yeni tanı konan kanserlerin kadınlarda ortalama % 8,8 nin, erkeklerde ise % 3.2'sinin artan vücut kitle indeksi ile ilişkili olduğu bulunmuştur [173]. Kolon kanserinde obezitenin olumsuz etki mekanizmalarından biri insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IG-1) ile olmaktadır. İnsülin normal mukozada apoptozu azaltmaktadır ve kolonda

adenomdan kanser oluşum zincirini uyarabilmektedir [174]. Yapılmış olan çalışmalar kolon kanseri ve fiziksel aktivite arasında ters bir oran olduğunu ayrıca kilo alımı ve obezite ile kolon kanseri arasında yüksek bir oran olduğunu göstermiştir [175].

1.5.1.3 Yaş ve Cinsiyet

Yaş, kolon kanserlerinde en güçlü risk faktörlerinden biridir ve vakaların % 90'ını ile ölümlerin % 94'ünün 50 yaş üstü bireylerde gerçekleştiği bildirilmiştir [163]. 65 yaşın üzerindeki kadınların aynı yaş grubundaki erkeklere göre 5 yıl daha az yaşadıklarını ve daha yüksek ölüm riskine sahip oldukları belirtilmiştir [164]. Ayrıca, kolon kanserlerinde 5 yıllık sağ kalım oranının özellikle de 70 yaş üstü kadınlarda erkeklere oranla daha düşük olduğu ve bu durumun yaşlı kadınlar açısından ciddi bir sağlık tehdidi oluşturduğunu göstermektedir [176,177]. Bununla beraber, daha genç kadınlarda ise muhtemelen de eşey hormonlarından dolayı genç erkeklere oranla daha iyi yaşam kalitesi sergiledikleri belirtilmiştir [178]. Farklı ırklardaki farklı cinsiyetlerle yapılan çalışmalar östrojen ve progesteronun kolon kanserinde koruyucu bir rol oynadıklarını göstermiştir [163]. Ayrıca, obezite ve sedanter yaşam tarzı erkeklerde kolon kanseri riskini artırmaktadır [179].

1.5.1.4 Irk ve Etnik Köken

Kolon kanserinin olma sıklığı ve ölüm oranı ırk ve etnik kökene göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin, Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsünün 2000-2003 yılları arasında yapmış olduğu çalışmada kolon kanseri oranı Afrika-Amerikalılar için her 100 binde 27.3 iken Kafkasyalılar için bu oran 100 binde 19.3'tür. Ayrıca, 5 yıllık yaşam oranı Afrika-Amerikalılar için % 54.7 iken Kafkasyalılar için bu oran % 65.1'dir [80]. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir başka araştırmada da Afrika-Amerikalıların kolon kanserine yakalanma ve bu hastalıktan ölüm oranlarının diğer etnik gruplara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur[181]. Ayrıca, Amerika'ya göç etmiş olan Japon bireylerde kolon kanseri görülme sıklığı Japonya'da yaşayanlara oranla artış içinde olmuş ve sonraki yıllarda Amerika'da doğup yaşayan Japon bireylerde kanserin görülme oranı Amerikalılarla benzer seviyeye gelmiştir [160].

1.5.1.5 Coğrafya

Esas olarak batı kültürüne sahip gelişmiş ülkelerin bir hastalığı olarak tanımlanan kolon kanseri, dünya genelinde aynı şekilde yaygın değildir ve kolon kanseri küresel ölçekte büyük bir coğrafik farklılık göstermektedir [182]. Dünya genelindeki bütün vakaların yaklaşık % 63'ünü gelişmiş ülkeler oluşturmaktadır ve kolon kanserinin olma sıklığı genetik yatkınlıkla birlikte fiziksel aktivite, diyet ve çevresel faktörlerinde etkisiyle gelişmiş ülkelerle diğer ülkeler arasında 10 kata kadar farklılık göstermektedir[183-186]. Örneğin, Avustralya ve Yeni Zelanda, kolon

kanserinin oluşum sıklığının dünyada en yüksek olduğu yerlerdendir aynı zamanda yaşamları boyunca her 13 Avustralyalıdan birinde kolon kanseri gelişebilmektedir [187]. Genel olarak ise kolon kanseri olma sıklığı Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya, Yeni Zelanda ve Batı Avrupa'da 100.000 kişide 40'tan fazla, Norveç'te her 100 binde 20'den fazla iken bu oran Afrika ve Asya'nın bazı bölgelerinde 100.000 kişide 5'in altına kadar değişmektedir [185,186].

1.5.1.6 Alkol Tüketimi ve Sigara Kullanımı

Alkol tüketiminin ve sigaranın kolon kanseri de dâhil olmak üzere gastrointestinal kanser türlerinde başlıca risk faktörü oldukları belirtilmektedir [188]. Yapılan çalışmalar, günde iki ya da üç kez alkol (günde 45 g) alan kişilerde kolon kanseri riskinin % 30 ile % 40 oranında arttığı ifade edilmiştir [189]. Sigara kullanımının hem kolon kanserine yakalanma riskini hem de bu hastalığa bağlı ölüm riskini artırdığı belirtilmiş buna ek olarak ilk kullanım yaşının, sigara içme süresinin ve içilen paket sayısının bu riski daha artırdığı ifade edilmiştir [190]. Sigara tüketiminin mikrosatellit instabilitesi, cpG adacıkları metilatör fenotipi risklerini artırdığı da bulunmuştur [191].

1.5.2. Kolon Kanseri Polipler

Gastrointestinal polipler, mukoza ve submukozadan kökenlenen proliferatif ve neoplastik lezyonlardır. Kolon kanseri çoğu zaman kolonun mukoza tabakasından (iç astar) gelişerek kanserli olmayan bir polip olarak büyümeye başlar. Çoğunlukla görülen polipler kolonoskopi yapılarak incelenen 50 yaş ve üzeri ortalama riskli bireylerin yaklaşık yüzde %50 sinde (tırtıklı polipler dâhil) saptanır. Erkeklerde kadınlara kıyasla ve daha yaşlı yaş gruplarında daha yüksek oranda gözlenir [192]. Bununla beraber, poliplerin % 10'undan daha azının 10 ila 20 yıl içinde invaziv kansere doğru ilerleme gösterdiği belirtilmiştir [193]. Bu tür poliplerden kökenlenen invaziv kanserler adenokarsinomi olarak bilinirler ve kolon kanserlerinin % 96'sını oluştururlar [194]. Kolonik adenomaların oluşum sıklığı yaş ile birlikte artış gösterir ve coğrafya ile etnik kökene göre de değişim gösterir [192]. Kolon polipleri, pediküllü veya pedikülsüz, neoplastik veya neoplastik olmayan tek veya çoklu lokalizasyonlarda olabilirler, genellikle sol kolon ve rektumda görülürler [195]. Genel olarak polipler histolojik özelliklerine göre ya neoplastik (benign, adenomas (APS); malign: carcinomas) olarak ya da neoplastik olmayan (hiperplastik ve inflamatuvar) olarak gruplara ayrılırlar [196].

Normal şartlarda kolon mukozasında hücre çoğalması ve değişimi 3-6 gün arasında devam ederek mukoza yüzeyinin yenilenmesi özellikle de proliferatif çoğalma gösteren kriptin bazal kısmının üçte birinde yoğun biçimde devam eder [197]. Bazal kısımda büyüyüp farklılaşan hücreler goblet hücrelerine dönüşürler. Hiperplastik poliplerde farklılaşma olurken apoptoziste azalma meydana gelmez. Adenomatöz poliplerde ise tam tersi bir mekanizmadan dolayı proliferasyonun artışı ile hücreler kriptlere doğru yayılım gösterirler [198].

1.5.3. Kolon Kanserinin Genetiği

Kolon kanserinde kromozomal instabilite, mikrosatellit instabilitesi ve anormal DNA metilasyonu ile histon modifikasyonu şeklinde farklı genetik instabiliteler tanımlanmıştır [199,200]. Genetik instabilitenin kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığı ve kolon kanserlerinde genel olarak tüm kromozomun ya da kromozomun büyük bir bölümünün kaybı sonucunda oluşan kromozomal instabliteden kaynaklandığı bilinmektedir [201]. Kromozomal instabilitede spesifik onkogenlerde ve tümör supressör genlerinde mutasyonların birikmesiyle karakterize edilirler [202,203]. Mikrosatellit instabilitesinde ise kolon kanserli hastalarda tamirden sorumlu DNA tamir genlerinin inaktif oldukları gözlenmiştir ve bu genlerde meydana gelen mutasyonlar Lynch sendromunun (kalıtsal polipsiz kolon kanseri) gelişmesine neden olur [204].

Son olarak kolon kanserinde birbiriyle yakından ilgili DNA metilasyonu ve kovalent histon modifikasyonları şeklinde iki tip epigenetik değişimlerin olduğundan bahsedilmektedir [200]. Promotor bölgesinin anormal DNA metilasyonu yoluyla oluşan gen sessizliği tümör supressör genlerini inaktive eden en önemli epigenetik mekanizmalardan biridir [28]. Genomdaki cpG bölgeleri normal hücrelerde metillenmiş olarak bilinirler ve metillenmemiş cpG bölgeleri tipik olarak cpG adacıkları olarak bilinen genomik bölgelerde bulunurlar. Bu cpG adacıklarının genlerin % 60-70'inin promotor bölgeleriyle örtüştüğü ve metilasyondan koruma eğiliminde oldukları bununla beraber karsinogenez esnasında da anormal biçimde metillenebilir özellikte olduğu bilinmektedir [206]. Kalıtım yoluyla ortaya çıkan kanserler daha çok erken yaşlarda ortaya çıkmakta ve ailede birkaç nesil boyunca devam etmektedir. Aynı zamanda Ailesel Adenomatöz Polipozis ve Lynch Sendromu en sık karşılaşılan kolon kanseri sendromları arasındadır [207]. Bunlar dışında Muir-Torre sendromu (MTS), Peutz-Jeghers Sendromu (PJS), MUTHY ilişkili polipozis sendromu (MAP), Juvenil Polipozis gibi farklı kolon kanseri sendromu çeşitleri de vardır [208-210].

1.5.3.1 Ailesel Adenomatöz Polipoz

Ailesel adenomatöz polipoz yüzlerce veya binlerce adenomatözlü kolon polipleri ile karakterize edilirler. Erkekler ve kadınlarda görülme sıklığı eşit olan Ailesel Adenomatöz Polipoz, kolon kanserlerinin yaklaşık % 1'ini oluşturur [203]. APC geninin inaktivasyonu kolon kanseri oluşumunda ilk adımdır [211]. APC'nin başlıca görevi hücre adezyonu ve göçünde rol alan proteinin katlanmasını sağlamaktır. Bu genin ürünleri Wnt sinyal yolağı tarafından modüle edilen bir protein kompleksinin bir parçasıdır ki bu kompleks β -catenin'in fosforilasyonunu ve degradasyonunu düzenler. APC geni mutasyona uğradığı zaman, β -catenin sitoplazmada toplanır ve Tcf transkripsiyon faktörleri ailesine bağlanarak proliferasyonu, farklılaşmayı ve hücrelerin apoptozisini etkileyen genlerin ekspresyonunu değiştirir [212,213]. APC aynı zamanda hücrelerin G0/G1'den S safhasına ilerleyişini ve hücre döngüsünü kontrol eder. APC geninin inaktivasyonu

iğ ipliklerinde bozukluklara, kromozomların yanlış ayrılmasına sebep olarak aneöploidinin ve sonuçta kanserin oluşmasına neden olur [211].

1.5.3.2 Herediter Kolorektal Sendromu (Lynch Sendromu)

Günümüzde Lynch sendromu olarak ifade edilen herediter kolorektal sendromunun tanımlanması yüzyıl öncesine dayanmaktadır [214]. Bu sendrom, bütün kolon kanseri türlerinin % 2'si ile % 4'ünü kapsar. Kolon kanserleri ve polipler, Lynch sendromunda sporadik neoplazmalara kıyasla daha genç yaşta ve daha proksimal bir yerde ortaya çıkar ayrıca DNA replikasyonunda yanlış eşleşmeleri düzenlemede görevli DNA yanlış eşleşme tamir genlerinde (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) görülen mutasyon sonucunda ya da EPCAM geninde meydana gelen mutasyona bağlı olarak oluşan MSH2 geninin sessizleşmesiyle oluşur [214-216,]. Genel popülasyondaki her 279 kişiden birinde patojenik DNA tamir geninde mutasyon olduğu tahmin edilmektedir [217].

1.5.3.3 Muir-Torre Sendromu (MTS)

Bu sendrom, Lynch sendromunun bir varyantı olarak düşünülmekte ve iç organlardaki malignansi ile ya da cilt neoplazmaları ile karakterize edilmektedirler. Bu sendroma DNA tamir mekanizmalarındaki mutasyon sebep olmaktadır [210]. Bu sendromda yanlış eşleşmeleri düzenleyen genler olan MSH2 ile MLH1 genlerinde mutasyonlar söz konusudur ve bu genlerin mikrosatellit instabilitesinin değerlendirilmesi için yapılan immünohistokimyasal çalışmalar hastalığın teşhisinde kullanılmaktadır [205].

1.5.3.4 Peutz-Jeghers Sendromu (PJS)

Peutz adlı araştırmacı 1921 yılında bir ailenin 3 neslinde PJS'u ilk olarak tarif etmiştir daha sonra ise 1949 yılında Jegher bu sendromun özelliklerini tanımlamıştır [218]. Otozomal dominant olarak kalıtılan bir sendrom olan bu hastalıkta geneli ince bağırsakta olan neoplastik özellik göstermeyen 0,1-5 cm çapında çok sayıda polipler mevcuttur [219]. Gastrointestinal polipler, jejunum, ileum, mide, duodenum ve kolonda görülmektedir [209].

1.5.3.5 Muthy İlişkili Polipozis Sendromu (MAP)

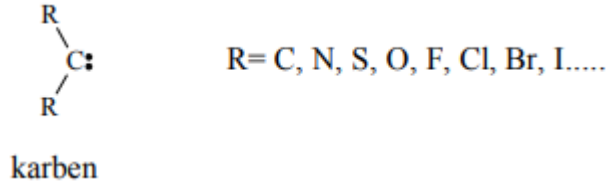
Otozomal resesif kalıtmı bir rahatsızlık olan MAP sendromu baz eksizyon tamir geninde patolojik bir durum sonucunda meydana gelir. Baz eksizyon onarım sistemi, oksidatif DNA hasarı sonucunda ortaya çıkan mutasyonları onarır ve APC geninin bu tür hasara oldukça hassas olduğu görülmektedir. Bu nedenle, baz eksizyon onarım sistemindeki başarısızlık sıklıkla APC'de somatik mutasyonlara, özellikle polipozis fenotipine yol açabilen G:C ile T:A transversiyonlarına yol açar [220]. Bu hastaların % 35'inde hiç polipe rastlanmazken % 22'sinde ise 10'dan daha az polip görülmektedir [221].

1.5.3.6 Juvenil Polipozis

Daha çok çocukluk ve genç yetişkinlerde görülen polip çeşidi olan bu hastalıkta izole juvenil polip görülmektedir [222]. Kolonda 4-5 polip bulunması ile karakterize edilen Juvenil Polipozis'in oluşum sıklığı Ailesel Adenomatöz Polipoz'a göre 10 kat daha düşüktür [208]. Malign huylu olma özelliği taşıyan Juvenil Polipozislerde tümör supressör geninde mutasyon ve allel kaybı meydana gelmektedir [223].

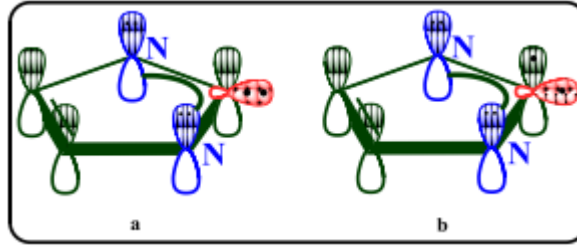
1.6. Karbenler

Karbonun sadece iki bağ oluşturduğu nötr iki değerlikli karbon bileşikler karbenler olarak adlandırılırlar [224]. Yıllardır reaktif ara ürünler olarak organik sentezlerde kullanılan nötr divalent karbon merkezli bileşikler olan karbenler, altı elektron içeren ve bir çift eşlenmemiş elektron bulunan doğrusal ya da açısall geometride olabilen iki değerlikli nötral bileşiklerdir [225,226]. Karbenler, genel olarak kısa süre bulunabilen, kararsız ve hemen bir başka molekülle tepkimeye giren yapıdadırlar. Karbenlerin bazıları bağlı grupların kuvvetli elektron verme özelliklerinden dolayı nükleofilik özellikler taşıyabilirler [227]. sp^2 -hibritleşmesi yapan karben karbonunda bulunan bağ yapmayan iki elektron boş iki orbitale (p π ve σ) yerleştiğinde triplet karben yapısı oluşmakta iken boş σ orbitaline antiparalel olacak biçimde yerleşim gösterdiğinde ise daha az kararlı singlet karben yapısı oluşmaktadır [228]. Karben molakülünün yapısı Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Karbenin yapısı [229].

Karbenlerin geçiş metallerine bir çift bağ ile bağlanması ile metal-karben kompleksleri oluşmaktadır. Karben karbonuna bağlanmış olan grupların türlerine göre Fischer tipi veya Schrock tipi karben kompleksleri oluşmaktadır [230]. Karben yapılarının farklı temel şekillerde bulunmaları reaktivite durumlarını ve özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Dolu σ ve boş $p\pi$ orbitaline sahip olan singlet karbenler ambifilik davranış gösterirken triplet karbenler iki eşleşmemiş elektron taşıdıklarından diradikal oldukları düşünülmektedir [231]. N-heterosiklik karbenlerin elektronik konfigürasyonu Şekil 1.8'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. N-heterosiklik karbenlerin elektronik konfigürasyonu (a) Singlet karben (b) Triplet karben [230]

1.6.1. N-Heterosiklik Karbenler (NHC)

N-heterosiklik karbenler (NHC) halka yapısında en az bir azot atomu ve bir karben karbonu barındıran nötr yapılardır. NHC'ler halka yapısındaki azota ek olarak oksijen, kükürt gibi başka bir heteroatom da içerebilirler [232]. Yapılarında N'' heteroatom bulunduran halkalı karben yapılar olan N-heterosiklik karbenler, karben merkezine komşu azot atomunu bulunduran geniş bir siklik karben sınıfı olarak ifade edilen N-heterosiklik karbenlerin yapısında en az bir tane α -amino substituenti bulunur ve karbenin iki komşu azot atomunun π -verici ve σ -alıcı özelliğinden dolayı kararlı yapıdadırlar [226,233,234].

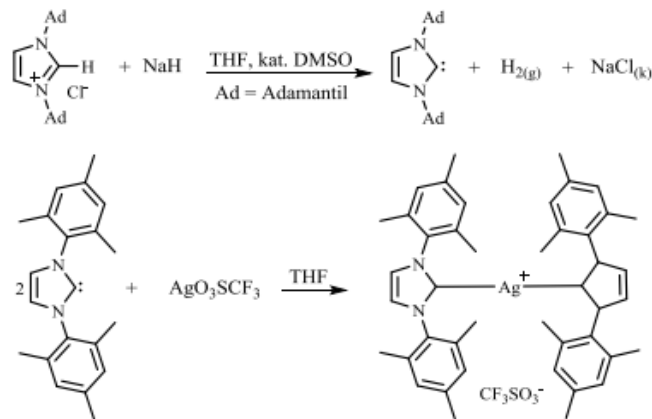
N-heterosiklik karben ile ilgili çalışmalar 1960'lerde Wanzlick tarafından başlatılmış [352] ve 1968 yılında Öfele'nin [353] ve 1991 yılında Arduengo [298] ve arkadaşlarının ilk olarak serbest karbeni izole etmeye yönelik çalışmalarıyla N-heterosiklik karbenden sentezlenen metal kompleksleri ile ilgili çalışmalar geniş bir uygulama alanı bulmuştur [235]. Arduengo ve arkadaşlarının (1991) serbest karbenlerle ilgili çalışmalarını azotlu diğer halka türevlerine uygulamış ve elde edilen karbenlere N-heterosiklik karben adını vermişlerdir [236]. Singlet halde bulunan ve azot atomu taşıyan heterosiklik yapılar olan N-heterosiklik karbenler, güçlü σ -donör ve zayıf π -akseptör özelliklerinden dolayı genel olarak bütün geçiş metalleriyle bağ yapabilmektedirler.

N-heterosiklik karbenler genellikle imidazol-benzimidazol- ve imidazolin-2-tiyonların desülfürizasyonu, azolyum kationlarının deprotonasyonu ve imidazolidinlerin α -eliminasyonu yöntemlerinden biriyle sentezlenmektedirler [238]. Metal-NHC kompleksleri başlangıçta katalik kimyada kullanılmışsa da NHC ligandları biyolojik uygulamalarda metaller için taşıyıcı moleküller olarak kullanılmaktadırlar [239]. Geleneksel fosfin ligandlarıyla olan benzerlikleriyle beraber bu yapılardan daha iyi performans göstermeleri bu ligandlara olan ilginin artmasına neden olmuştur. Daha olumlu geleneksel kenetlenme reaksiyon şartlarını sağlama, az miktarda kullanılma, çevre dostu olmaları ve toksit özelliklerinin olmaması gibi özelliklerinden dolayı NHC'ler, fosfinli ligandların yerine kullanılmaktadır [240]. NHC metal kompleksleri katalizör olarak yüksek bir etkiye sahiptir ve yaygın olarak kullanılan NHC transfer ajanları olarak NHC gümüş (I) kompleksleri, diğer NHC metal komplekslerini (Ni, Pd, Pt gibi) hazırlamak için de uygulanabilir [241,242]. NHC-gümüş komplekslerinin antikanser ve antimikrobiyal özelliklerinin olduğu

gösterilmiştir [241]. Organometallic farmasötik çalışmalarının büyük çoğunluğu platin ve altınla yapılan çalışmalara odaklanıyorsa da gümüşün medikal uygulamalarına yönelik ilgili çalışmalara da önem verilmiştir. Gümüş uzun süreli maruziyetlerde nadiren de olsa deri ve gözde sorunlara yol açma ihtimalini barındırsa da insanlar için nispeten toksit olmayan bir maddedir [239]. M-NHC komplekslerinin antifungal, antitümör, antioksidan ve antikanserojen aktiviteleri ve enzim inhibisyonu ile ilgili etkilerine yönelik çalışmalar mevcuttur [237,243].

1.6.2. Gümüş Karben

Tarihi süreç boyunca insan sağlığını korumak amacıyla kullanılan gümüş metali, içme suyunun arıtılmasında kullanılmasının yanı sıra 18. yüzyıldan günümüze varıncaya kadar antimikrobiyal, antikanserojen ajan olarak ve günümüzde de enfeksiyonların önlenmesi amacıyla yara örtülerinde ajan olarak kullanılmaktadır [244]. Gümüş bileşiklerinin antimikrobiyal ajan olarak ya bakteri hücrelerinin duvarının veya zarlarının yapısını ve geçirgenliğini bozarak ya da bakteri hücresi içerisinde yer alan enzimlerin yapılarını veya aktivitelerini bozarak etki ettiği bulunmuştur [245]. Sonraki yapılan çalışmalar gümüş NHC komplekslerinin, antibakteriyel özelliklerinin güçlü gümüş-karben bağından kaynaklandığını ifade etmiştir [246]. Genel olarak gümüş bileşikleri gümüş katyonunu çok hızlı saldırılarından dolayı kısa süreli aktiviteye sahiplerse de gümüş-NHC'lerin diğerlerinden farklı olarak gümüş katyonunu daha yavaş bırakmaktadırlar bu nedenle etkileri daha uzun devam etmektedir [247]. Benzer şekilde, gümüş nitrat bileşikleri sıklıkla kronik deri ve deri ülserlerinin tedavisinde kullanılmakta iken 1968 yılından itibaren yanık tedavilerinde de gümüş sulfadiazine kullanılmaktadır [248]. Etki mekanizmaları tam olarak bilinmese de gümüş komplekslerindeki biyolojik aktivitenin Ag^+ 'larından kaynaklandığı düşünülmektedir [249]. İlk serbest NHC ve ilk gümüş-NHC kompleksinin sentezlenmesi Şekil 1.9'da gösterilmiştir.



Şekil 1.9. İlk serbest NHC ve ilk gümüş-NHC kompleksinin sentezlenmesi [246]

Gümüş NHC kompleksleri ilk olarak serbest karben ve gümüş tuzları kullanılarak karakterize edilmiştir [250]. Çeşitli araştırma grupları tarafından gümüş bazlarla yapılan çalışmalarda gümüş NHC yapıları in situ olarak imidazolium tuzlarından sentezlenmiştir [244]. 1997 yılında Guerret ve arkadaşları [350] gümüş NHC'yi gümüş asetat kullanarak triazolium tuzlarından sentezlemeyi başarmış, 1998 yılında ise Lin ve Wang [351] ise Ag_2O (Gümüş oksit) kullanarak gümüş NHC leri sentezlemeyi başarmışlardır. Sentezlenen Ag-NHC komplekslerinin $AgNO_3$ 'ten daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterdikleri anlaşıldıktan sonraki yapılan medikal çalışmalarda Ag (Gümüş), Au (Altın), Pt (Platin), Pd (Paladyum) ve Cu (Bakır) metallerini içeren NHC komplekslerinin kullanımı artış göstermiştir [249]. Çeşitli geçiş metal karben kompleksleri arasında gümüş N-HC karben kompleksleri, yapısal çeşitliliğinden ve transmetallasyon reaksiyonlarında diğer NHC metal komplekslerini (Nikel, Bakır, Platin, Altın, Palladium vb.) yapmak için etkili karben transfer reaktifi olarak başarılı, yaygın kullanımından dolayı N-heterosiklik karbenin kimyasının gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar [251].

1.7. Dimetil Hidrazin

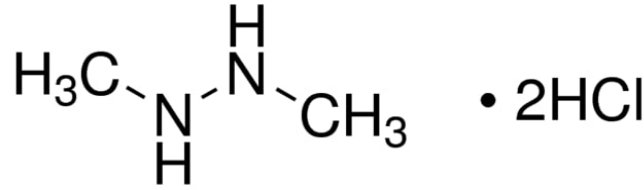
Dimetilhidrazin izomerleri 1,2-dimetilhidrazin ve 1,1- olarak oluşmaktadır [252]. Dimetilhidrazin izomerleri, jet ve uçaklarda yakıt olarak kullanılmakla beraber çeşitli kimyasalların ham maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bitkilerde büyüme kontrol ajanı olarak da işlev gördüğü bilinmektedir [253]. Dimetil hidrazin (DMH) ve metaboliti, azoksimetan (AOM), DNA-reaktif bağını oluşturmak için metabolik aktivasyon gerektiren prokarsinojenler olarak tanımlanmaktadırlar. Alkilleyici ajanlar DMH ve AOM, DNA'daki N-7 konumdaki guaninin metilasyonu yoluyla mutajenik aktivite göstermektedir. Alkillenmiş guanin, bir protonunu vererek sitozin yerine timidin ile bağ yapmaktadır. Replikasyonun ilerlemesiyle birlikte yanlış baz eşleşmesi sonucu nokta mutasyonu meydana gelir. Bu mutasyonda guanin timin ile sitozinde adenin ile bağ yapmaktadır. Bu prokarsinojenik bileşiklerin metabolizması, ksenobiyotik metabolize edici enzimler dâhil olmak üzere çeşitli metabolik enzimleri içermektedir. Bu enzimler, nihai kanserojen metilazoksimetanolün (MAM) oluşumu dâhil olmak üzere birkaç N oksidasyon hidroksilasyon aşamasını izlemektedir. MAM, karaciğer ve kolonda makromolekülleri alkile edebilen metildiazonyum iyonunu kolayca veren DMH ve AOM'nin reaktif bir metaboliti olduğu çeşitli çalışmalar ile tespit edilmiştir [254-256].

1,2-Dimetil hidrazin (DMH), deney hayvanlarında kolorektal tümörleri indüklemek için kolona özgü olarak yaygın olarak kullanılan bir kanserojendir [257]. 1,2-dimetilhidrazin, güçlü DNA alkilleyici ajan olan hidrazinler sınıfının bir üyesidir. Kolorektal tümörlerin indüklenmesi çalışmalarında kullanılan kemirgen deney modellerinde biyokimyasal, moleküler ve histopatolojik bir belirteç olduğu saptanmıştır [252]. Prokarsinojen olarak işlev gören DMH, bir dizi metabolik reaksiyonlara katıldıktan sonra kolorektal dokulardaki reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu

tetiklemektedir. İnsan ve hayvan dokularında yapılan çalışmalar ile birlikte kolonlardaki ROS artışının proneoplastik lezyonlara ve histopatolojik bozulmalara sebep olduğu gösterilmiştir [252].

DNA ve kolon karsinogenezinin gelişiminin DMH ile indüklenmesi için başlangıçta DMH karaciğerde metabolize edilmesi gerekmektedir. DMH ile indüklenen kolorektal hücreler, anormal kript odakları (ACF) ve müsin tükenmiş odakların (MDF) oluşumu ile birlikte kanserojen yapılara dönüşmektedir [258,259]. ACF ve MDF, kolon kanserinde erken biyobelirteç olarak kabul edilmektedir [260,261]. DMH ın karaciğerde metabolize edilerek safra veya kan yoluyla kolona taşınımı gerçekleşir. Daha sonra DMH, azometana indirgenerek metil serbest radikallerinin salınımını tetikleyen reaksiyonlar dizisini uyarmaktadır. DMH'ın varlığında ROS artışı ile hidroksil radikali veya hidrojen peroksit oluşarak oksidatif stres meydana gelmektedir. Artan oksidatif stres ile birlikte kolon kanserinde inflamatuvar etkiler gözlenmektedir [262-265].

Dimetil hidrazin, IUPAC adı 1,2-dimethylhydrazine olup moleküler formülü C₂H₈N₂ olarak bilinmektedir(Şekil1.10). Kanserijen, toksik, çevreye zararlı ve zehirli olarak sınıflandırılmaktadır. Dimetil hidrazin beyaz renkte, kristal yapıda ve moleküler kütlesi 133,02 g/mol'dür. Sıgma- Aldrich firması tarafından temin edilmekte olup CAS-No.: 306-37-6 EC-No.: 206-183-5 olarak bilinmektedir. Dimel Hidrazin'in moleküler yapısı Şekil 1.10'da gösterilmiştir.



Şekil 1.10. Dimetil Hidrazin'in Moleküler Yapısı [266]

Bu tez çalışmasında, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratlarda yeni bir gümüş (Ag) karben kompleksi uygulamasının;

- Kolon dokusunun makroskopik yapısı üzerine etkileri,
- Kolon dokusunun mikroskopik yapısı üzerine etkileri,
- PI3K-AKT-mTOR yolağında ve apoptoziste rol oynayan bazı genlerin (Bax, Bcl2, Kaspase 3, Kaspase 9, Akt, p-Akt, PI3K, p-PI3K, mTOR, p-mTOR) protein düzeyindeki ekspresyonları üzerine etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL VE METOT

2.1. Hayvan Materyali

Bu doktora tezi kapsamında deney hayvanları üzerinde yapılan tüm çalışmalar Hayvan Refahı Yasasına, Halk Sağlığı Hizmetleri Politikasına ve üniversitenin Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından belirlenen kurallara bağlı olarak, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındıktan sonra (Tarih: 29.04.2020, Toplantı: 2020/06, Karar No: 05/05/2020-391194) etik kurallara uygun olarak yürütülmüştür.

Çalışma, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (FÜDAM) yürütülmüştür. Çalışmada Sprague dawley (8 haftalık) ratlar kullanılmıştır. Deney hayvanlarına 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde bir aydınlatma periyodu uygulanarak, 22 ± 2 °C sıcaklıkta, 55 ± 5 nispi nem bulunan havalandırma sistemine sahip bir ortamda ve her gün altları temizlenen kafeslerde muhafaza edilmiştir. Çalışma süresince ratlar standart rat yemi ile su *ad libitum* olarak verilmiştir. Pelet rat yeminin içeriğinde bulunan katkı maddeleri Tablo 2.1'de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Pelet rat yemi bileşenleri

Pelet yem içeriğindeki maddeler	Yüzdesi
Arpa	14
Balık Unu	8
Buğday	10
E-Kemik unu	4
Kepek	8
Melas	4
Mısır	21
Soya Küspesi	25
Tuz	4
* Mineral Karması	1
** Vitamin Karması	1

* Mineral karması: Bakır, çinko, demir, iyot, kalsiyumda, kobalt, Mangan ve selenyumdan oluşmaktadır.

** Vitamin karması: A, B1, B2, B6, B12, D3, E, K vitaminleri ile D-biotin, folik asit, kolin klorit ve nikotinamid içermektedir.

2.2. Araştırma Grupları

Çalışmada seçilen hayvan sayısı istatistiksel olarak G power paket programı ile power analizi yapılarak belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmada 0.05 güven aralığında (tip 1 hata) %85 güçte gösterebilmek için her grupta 15 adet rat kullanılacağı hesaplanmıştır.

Bu çalışmada, 90 adet erkek Sprague dawley rat (yaş: 8 hafta, ağırlık: 180 ± 20 g) kullanılmıştır. Laboratuvar koşullarına uyum sağladıktan sonra, ratlar her grupta 15 adet olacak

şekilde rastgele 6 gruba ayrılarak çalışma yürütülmüştür. Tüm çalışma 24 hafta boyunca devam etmiştir. Araştırma grupları Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Araştırma grupları (n=15)

Kontrol: Ratlara (haftada 1 kez 3 hafta %0.9 steril serum fizyolojik s.c.), çözdürücü toplamda 1 mL/rat olacak şekilde gün aşırı oral gavaj ile uygulanmıştır.
DMH Kontrol: Kolon kanserini indüklemek için hayvanlara (haftada 1 kez 15 mg / kg vücut ağırlığı) Edta Salin çözeltisi içinde seyreltilmiş spesifik bir kanserojen olan DMH s.c. olarak 24 hafta uygulanmıştır.
Kontrol+Gümüş Karben I: DMSO da çözülüp içme suyu ile seyreltilen gümüş karben kompleksi (1 mg / kg, 1 mL / rat) gün aşırı oral gavaj ile 24 hafta verilmiştir.
Kontrol+Gümüş Karben II: DMSO da çözülüp içme suyu ile seyreltilen gümüş karben kompleksi (2 mg / kg, 1 mL / rat) gün aşırı oral gavaj ile 24 hafta verilmiştir.
DMH+Gümüş Karben I: DMH (haftada 1 kez 15 mg / kg vücut ağırlığı) + DMSO da çözülüp içme suyu ile seyreltilen gümüş karben kompleksi (1 mg/kg, 1 mL / rat) gün aşırı oral gavaj ile 24 hafta verilmiştir.
DMH+Gümüş Karben II: DMH (haftada 1 kez 15 mg / kg vücut ağırlığı) + DMSO da çözülüp içme suyu ile seyreltilen gümüş karben kompleksi (2 mg/kg, 1 mL / rat) gün aşırı oral gavaj ile 24 hafta verilmiştir.

Uygulamalara başlamadan önce deney hayvanlarının standart şartlara adaptasyonlarını sağlamak için 10 gün bekletilmiştir. Uygulamalar yapıldıktan sonra ratlar dekapite edilerek kolon dokuları alınmıştır. Kolon dokusuna ait örnekler Western Blot analizi için küçük plastik tüplere konularak soğuk zincir buz üzerinde bekletilerek dondurulmuştur. Kolon dokusuna ait örnekler derin dondurucuda (-80°C) analizleri yapılincaya kadar muhafaza edilmiştir.

2.3. Laboratuvar Analizleri

Kolon dokusuna ait örneklerde laboratuvar analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler Tablo 2.3’te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Kolon dokusu ile yapılan analizler

Çalışılan Doku	Yapılan Analizler	Antikorlar
Kolon	Western Blot	Bax
	Western Blot	Bcl2
	Western Blot	Kaspaz 3
	Western Blot	Kaspaz 9
	Western Blot	p-PI3K
	Western Blot	PI3K
	Western Blot	mTOR
	Western Blot	p-mTOR
	Western Blot	Akt
	Western Blot	p-Akt
	Western Blot	β-actin
	Histopatoloji	

2.3.1. Gümüş Karben Kompleksinin Apoptotik Yoldaki Bazı Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerine Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi

Uygulama yapılan ratlar dekapite edilerek kolon dokuları alınmıştır. Kontrol olarak sadece çözücü verilen ratlardan alınan kolon dokuları kullanılmıştır. Kolon dokularına ait örneklerin homojenizasyonu yapılarak homojenatların protein miktarları hesaplanmıştır. Western blot analizi ile Bax, Bcl2, Kaspaz-3, Kaspaz- 9, PI3K, mTOR, p-mTOR, Akt, p-Akt, β -actin proteinlerinin düzeyleri belirlenmiştir.

2.3.2. Kolon Dokusuna Ait Örneklerinin Homojenizasyonu

Kolon dokularına ait örneklerinin homojenizasyonu Sahin vd. [354] tarafından kullanılan homojenizasyon yöntemine göre yapılmıştır. Bu yönteme göre, kolon dokularına ait dondurulmuş örneklerin homojenizasyonu 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solusyonunda (10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1mM fenil metil sülfonil florid 19 (PMSF), 5 μ M soybean (bir tripsin inhibitörü olarak)) cam-cam homojenizatör kullanılarak yapılmıştır. Proteinlerin bozulmalarına neden olan proteaz aktivitesini engellemek için tüm homojenizasyon işlemleri buz üzerinde yapılmıştır.

Homojenize edilen örnekler soğutmalı santrifüj kullanılarak (+4 °C) 15.000 rpm’de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen ilk süpernatantlar mikrosantrifüj tüplerine alınarak –80 °C’de çalışma yapılncaya kadar muhafaza edilmiştir.

Pelletler üzerine eşit hacimde homojenizasyon solüsyonu (25 mM Tris-HCl (pH= 7.4), 0.1mM PMSF, % 2’lik TritonX –100 ve % 1’lik SDS) eklenmiş ve tekrar süspanse edilerek +4 °C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda homojenatlar soğutmalı santrifüjde (+4°C) 15.000 rpm’de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra elde edilen ikinci süpernatantlar mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve Western blot analizleri yapılncaya kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.3.3. Kolon Dokularına Ait Örneklerin Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Kolon dokularına ait örneklerden elde edilen homojenatların içerdiği toplam protein miktarı Lowry [349] metodu ile belirlenmiştir. Tablo 2.4’te verilmiştir.

Tablo 2.4. Lowry metodu ile protein miktarının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Na ₂ CO ₃ (Sodyum Bikarbonat) (%2)	2 g Na ₂ CO ₃ üzerine 0.1 N NaOH eklenerek hacim 100 mL'ye tamamlanır.
Na-K Tartarat (Sodyum Potasyum Tartarat) (%1)	1 g Na-K Tartarat üzerine distile H ₂ O eklenerek hacim 100 mL'ye ile tamamlanır.
CuSO ₄ (Bakır Sülfat) (% 0.5)	0.5 g CuSO ₄ üzerine distile H ₂ O eklenerek hacim 100 mL'ye tamamlanır.
Alkali Bakır	48 mL % 2'lik Na ₂ CO ₃ çözeltisine 1 mL % 1'lik Na-K Tartarat çözeltisi ve 1 mL % 0.5'lik CuSO ₄ çözeltisi eklenir.
Folin	1:1 oranında distile H ₂ O ile seyreltilir.
Bovin Serum Albumin (BSA)	1 mg/mL olacak şekilde distile H ₂ O ile çözülür.

Bakır iyonu (Cu⁺²) proteinlerdeki peptid bağları ile alkali ortamda bir kompleks oluşturarak Cu⁺¹'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve protein yan zincirlerinde bulunan Cys, Tyr ve Trp aminoasitleri Folin reaktifini indirgeyerek protein konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak renk oluşumuna neden olur. Reaksiyon sonunda oluşan rengin yoğunluğu 600 nm'de spektrofotometrede ölçülür.

Standart olarak kullanılan bir kalibrasyon eğrisi elde etmek için; her bir tüpe; 0, 20, 40, 60, 80, 100 µL BSA, 2 mL alkali bakır eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir tüpe 0.2 mL Folin eklenerek vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir numunenin 600 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Kolon homojenatlarındaki toplam protein miktarını belirlemek için; her bir kolon homojenatından 75 µL alınarak 975 µL distile H₂O ile seyreltilmiş ve üzerlerine alkali bakır çözeltisi eklenmiştir. Oluşan karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir örneğe Folin belirteci ilave edilerek 30 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda oluşan rengin yoğunluğu 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (OPTIMA, SP 3000, Tokyo, JAPAN) ölçülmüştür. Spektrofotometrik analiz sonuçları regresyon yöntemi ile değerlendirilerek her bir kolon homojenatındaki toplam protein miktarı belirlenmiştir. Standartların ve örneklerin spektrofotometrik analizleri hata payını minimuma indirmek için iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.3.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)

SDS-Page (sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektrophorezi) metodu proteinlerin saflığının kontrolü ve proteinlerin moleküler büyüklüğünü belirlemek için kullanılmaktadır. Yüklü moleküllerin bir elektrik alan içinde yürütülerek moleküler kütlelerine göre ayrıştırılmasını sağlayan analitik bir tekniktir. Jel elektrophorezi en yaygın olarak kullanılan protein elektrophorez

metodudur. Poliakrilamid jellerle yapılan bu teknikte moleküllerin hareketi; moleküllerin boyutuna, yüküne, biçimine, kimyasal içeriğe ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır. Poliakrilamid jeller kullanılarak yapılan elektroforezde ayrışım hem moleküler elekleme hem de elektroforetik harekete dayandığı için örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmalarını sağlamaktadır.

Poliakrilamid jellerin hazırlanmasında akrilamid monomerleri kullanılır. Akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N'-metilen-bis akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu ile poliakrilamid jeller hazırlanır. Kimyasal polimerizasyonun kontrolü bir başlatıcı-katalizör sistem (amonyum persülfat (APS) - tetrametilendiamin (TEMED)) tarafından yapılır. APS gibi bir serbest radikal ile TEMED gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bis akrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Böylece jel meydana gelir.

Poliakrilamid jellerin yapısında bulunan SDS, proteinleri alt birimlerine ayıran bir deterjandır. Bu deterjan proteinlerin hidrofobik bölgelerini bağlayarak denatüre eder ve denatüre olmuş proteinleri negatif yükle yükler. Böylece proteinler üzerinde bulunan yükler maskelenir ve proteinler yüklerine göre değil molekül ağırlıklarına göre jel içerisinde hareket ederler. Jelde hareket eden proteinlerin molekül ağırlıkları, aynı jelde yürütülen standart proteinlerle karşılaştırılarak belirlenir.

Güç kaynağından gelen elektrik akımına bağlı olarak protein moleküllerinin hareketi negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutba doğru olur. Araştırılan protein büyüklüğüne göre poliakrilamid jel içeriği düzenlenebilir. Protein moleküllerinin ağırlığı 15–45 kDa aralığına karşılık geliyorsa akrilamid konsantrasyonu %15, protein moleküllerinin ağırlığı 45 kDa'dan daha fazla ise akrilamid konsantrasyonu %10 veya daha düşük olacak şekilde jeller hazırlanır. Yani protein molekülünün ağırlığı arttıkça akrilamid konsantrasyonu azaltılır. Düşük akrilamid konsantrasyonu jelde büyük porların oluşumuna, yüksek akrilamid konsantrasyonu ise jel içerisindeki porların daha sık olmasına sebep olur. Dolayısıyla akrilamid konsantrasyonu arttıkça protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır [267,268,269]. Başka bir ifade ile kullanılan akrilamidin miktarıyla jelde oluşan porların büyüklüğü ters orantılıdır. Bu nedenle yüksek oranda akrilamid içeren jeller küçük proteinleri ayırmak için, düşük oranda akrilamid içeren jeller ise büyük proteinleri ayırmak için kullanılmaktadır [270].

2.3.4.1 Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması (SDS-PAGE)

Kolon dokularına ait protein örnekleri Laemmli [268] tarafından geliştirilen prosedüre göre hazırlanan SDS-PAGE ile incelenmiştir. Öncelikle, bu metodda kullanılan poliakrilamid jeller hazırlanır. Jellerin döküleceği kaset, iki cam plaka arasına çubuk (spacer) yerleştirildikten sonra belirli kısımlarından sıkıştırılarak hazırlanır ve düzeneğe yerleştirilir.

Ayırma (seperating, resolving) jel içeriğinde bulunan maddeler (Tablo2.5) karıştırılarak uygun bir pipet yardımıyla hızlı ve dikkatli bir şekilde iki cam levha arasına dökülmüştür. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar ($\approx 1\text{cm}$) bir boşluk bırakılmıştır. Jel solüsyonuna katalizör eklendikten sonra kısa bir süre içinde donacağı için bu işlem hızlı bir şekilde yapılmıştır. Jel yaklaşık olarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlanmıştır. Jel iyice polimerize olduktan sonra iki cam plakanın üst kısmına jelde kuyucukların oluşmasını sağlayan, örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirilmiştir.

Tablo 2.5. Ayırma (seperating, resolving) jelinin (%12) içeriği

Maddeler	Miktar
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 mL
dH ₂ O	3.35 mL
%10 SDS	100 μL
Akrilamid/Bis (%30)	4.0 mL
Amonyum persülfat (%10)	75 μL
TEMED	15 μL

Daha sonra yükleme (stacking) jel içeriğinde bulunan maddeler (Tablo 2.6) karıştırılarak uygun bir pipet ile cam plakalar arasına yerleştirilmiş tarak dişleri arasındaki boşluklara aktarılmıştır. Yükleme jel solüsyonu iki cam palakanın en üst yüzeyine kadar eklenmiştir. Yükleme jeli de hızlı bir şekilde polimerize olduğu için tüm işlemler hızlı bir şekilde yapılmıştır. Oda sıcaklığında jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra cam plakalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirilmiş ve tarak cam plakalar arasından çıkarılmıştır.

Tablo 2.6. Yükleme (stacking) jelinin (%4) içeriği

Maddeler	Miktar
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 mL
dH ₂ O	6.1 mL
%10 SDS	100 μL
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 mL
Amonyum persülfat (%10)	60 μL
TEMED	12 μL

Hazırlanan poliakrilamid jeldeki her bir kuyuya marker ve toplam protein miktarları spektrofotometrik olarak belirlenen kolon dokularına ait örneklerin protein miktarları eşit olacak şekilde yüklenmiştir. Kolon dokusundan izole edilen örneklerden 300 μL alınarak her bir örneğe

eşit miktarda protein çözücü solüsyon (Laemmli Buffer/tamponu) eklenerek karıştırılmıştır. Oluşan karışımdan 20 µL alınarak jelde oluşan kuyulara yüklenmiştir. Protein çözücü solüsyon belirli oranlarda SDS, β-merkaptoetanol (2- merkaptto-etanol), gliserol, bromophenol blue (Bromofenol mavisi), Tris ve dH₂O içermektedir.

Laemmli tamponu içerisinde bulunan SDS bir deterjandır ve proteinleri negatif yüklü hale getirir. Gliserol kuyulara yüklenen örneklerle yoğunluk kazandırır ve kuyuların dibine çökmesini sağlarken, 2- merkaptto-etanol disülfid bağlarını kırar. Bromofenol mavisi ise reaktif olmayan bir boyadır ve örneklerin jeldeki hareketinin görülmesini sağlar [268].

Örnekler jele yüklendikten sonra elektroforez tankı yeterli miktarda yürütme tamponu (Running Buffer) ile doldurulmuştur. Güç kaynağı aracılığıyla önce düşük bir voltajla (150 V) 20 mA'lık akım 30 dakika süreyle uygulanmıştır. Daha sonra voltaj değeri 40 mA'e yükseltilmiştir (180–200 V). Çıplak gözle görülebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince güç kaynağı kapatılmıştır. Daha sonra kaseti oluşturan iki cam plaka arasındaki jel çıkarılmıştır. Jelin stacking kısmı kesilerek atılmıştır. Jeldeki bantlaşmanın meydana geldiği separating jel kısmı ise % 1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alınarak en az yarım saat en fazla bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra jel boyayı giderici solüsyona (destain solüsyon) ortamına alınmış ve çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddelerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu yıkama işlemi birkaç kez tekrarlanarak protein bantlarının dışındaki boyalar giderilmiştir. Oluşan bantların fotoğrafları alınmıştır.

2.4. Western Blot

Western blot tekniği; protein örneklerinin hazırlanması ve protein kantifikasyonu, örneklerin poliakrilamid jele yüklenmesi ve elektroforetik seperasyonu, membrana transfer-blotlama, spesifik olmayan (nonspesifik) antikor bağlama bölgelerinin bloke edilmesi (bloklama), antikorla inkübasyon ve deteksiyon aşamalarından oluşmaktadır [271].

Blotlama yapılmadan önce, çalışılan örneklerdeki proteinler jel elektroforezi ile poliakrilamid jel üzerinde fiziksel özelliklerine göre ayrılmaktadır. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirilmektedir. Elektroforez işleminin sona ermesiyle Western blot tekniği dört aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada blotlama (jeldeki proteinlerin nitrocelüloz membrana transferi), ikinci aşamada bloklama (nonspesifik reaksiyonları önlemek amacıyla nitrocelüloz membranda proteinlerin bağlanmadığı bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması), üçüncü aşamada özgül antikorlarla tepkime ve son aşamada da proteinlerin görüntülenmesi gerçekleşmektedir.

Kolon dokusuna ait örneklerin Western blot analizleri Sahin ve arkadaşları [269] tarafından kullanılan metoda göre yapılmıştır.

Poliakrilamid jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana transferi esnasında jel ile nitroselüloz membran karşılıklı olacak şekilde filtre kâğıtları arasına yerleştirilmektedir. Proteinlerin transferi, jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanarak sağlanmaktadır. Transfer aşamasından sonra nitroselüloz membrandaki özgül olmayan proteinlerin bloklanmasında albümin proteini kullanılmaktadır. Spesifik antikorlar olarak monoklonal veya poliklonal antikorlar kullanılabilir.

Monoklonal antikorlar sadece bir epitopa özgüdürler ve çok kuvvetli immünokimyasal köprüler oluştururlar. Bu nedenle monoklonal antikorlar antijenlerle spesifik olarak bağlanırlar. Dolayısıyla monoklonal antikorların kullanımı avantaj sağlamaktadır. Fakat çalışılan proteinlerde benzer epitop bölgeleri varsa çapraz reaksiyonlara bağlı olarak yalancı pozitiflikler oluşabilmektedir. Bu durum poliklonal antikorların kullanılması durumunda da görülmektedir. Poliklonal antikorların kullanımında yalancı pozitiflik oluşma ihtimalinin fazla olduğu bilinmektedir. Western blotta monoklonal antikor kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama sırasında polipeptid yapılarıdaki epitopların ortadan kalkmasıdır. Tespit edilmek istenen epitopun ortadan kaldırılması durumunda monoklonal antikor-epitop bağlanması gerçekleşmez. Bu durumdan dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikor kullanımına göre yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır.

Spesifik antikorlarda genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler raportör madde olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, enzim olarak alkalen fosfataz ve peroksidaz tercih edilmektedir. Bu enzimlerin etki ettiği substratlar ve kromojen maddeler birbirinden farklılık göstermektedir. Son zamanlarda yapılan enzimle işaretleme işlemlerinde, testin hassasiyetini artırmak için peroksidaz ile işaretli avidin biyotin sisteminin kullanımı yaygın hale gelmiştir. Kromojenlerin en önemli özellikleri çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır.

Poliakrilamid jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana (Schleicher and Schuell, Inc., USA) transferi (blotlama) için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran arasında boşluk olmayacak şekilde karşı karşıya getirilerek filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilmiş ve tampon çözelti ile doyurulmuştur. Hazırlanan düzenek tampon çözelti ile doldurulmuş tanka yerleştirilmiş ve işlem esnasında ortamın soğuk kalması için de düzenek içerisine buz aküleri ve manyetik karıştırıcılar eklenmiştir. Düzeneğe 90 dakika boyunca 250 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin transferi gerçekleştirilmiştir.

Nonspesifik reaksiyonları önlemek amacıyla nitroselüloz membrandaki protein bağlanmamış bölgelerin spesifik olmayan proteinlerle kaplanması (bloklama) için nitroselüloz membranlar petri kutularına alınarak tampon çözeltiyle $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)] 5 kez 5 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Nonspesifik bağlanmalar 100 mM NaCl , 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH:

7.2) tamponunda hazırlanan %1'lik BSA (taze sığır serum albumini) ile 37°C'de 90 dakika bloklanmıştır (Bowling serum albümini hazırlanması: 5 gr Albumin fraction, PBS ile 100 ml ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda çözülmesi gerçekleştirildikten sonra + 4°C'de bekletilmiştir). Bu işlemden sonra yıkama yapılmadan primer antikorlar ile muamele edilmiştir. Primer antikorlar olarak poliklonal rabbit anti-rat Bax, Bcl2, Kaspaz-3, Kaspaz-9, PI3K, mTOR, p-mTOR, Akt, p-Akt ve β -actin antikorları kullanılmıştır (Primer antikorlar (1:1000 oranında) tampon çözelti (%0.05 oranında Tween-20 içeren) içinde hazırlanarak kullanılmıştır). Nitroselüloz membranlar primer antikorlar ile +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Bu aşamadan sonra, nitroselüloz membranlar tampon çözeltiyle 5 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra nitroselüloz membranlar, %0.05 oranında Tween-20 içeren tampon çözeltide 1:1000 oranında hazırlanan peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immüoglobulin (sekonder antikor) ile 37 °C' de 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika boyunca tampon çözelti ile yıkanmıştır. Bantların görüntülenmesi için diaminobenzidin (DAB) çözeltisi [1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda %0.03–0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin] kullanılmıştır. DAB çözeltisine 80 μ L H₂O₂ eklenmiş ve reaksiyon sonucunda nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir sürede görünür hale gelmiştir. DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra (5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda) nitroselüloz membranlar dH₂O ile iyice yıkanmıştır. Nitroselüloz membranlar kuruduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edilmiştir.

2.5. Kolon Histopatolojisi

Histopatoloji çalışmasında, her bir hayvandan alınan kolon dokuları toplanarak %20 nötr tamponlu formalin çözeltisinde sabitlenmiştir. Sabitlenen örnekler aşamalı olarak dehidre edilerek parafine yerleştirilmiştir. Daha sonra küçük bölümler halinde kesitler alınarak histolojik inceleme için hematoksilin ve eozin ile boyanarak ışık mikroskobu kullanılarak farklı büyüklükteki objektiflerle incelenmiştir.

2.6. İstatistiksel Analizler

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS paket programı (IBM SPSS Versiyon 22.0) yardımıyla yapıldı. Çalışmada, veriler için parametrik testlerin ön şartlarından normallik varsayımına uygunluk “Shapiro-Wilk” testi ile belirlendi. Gruplar arası farklılıkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve grupların ikili karşılaştırmalarında *post-hoc* analizi olarak “Tukey” testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ve standart hata olarak sunuldu.. İstatistiksel olarak anlamlılık 0,95 önem düzeyinde, P değeri < 0.05 olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Makroskopik Bulgular

Bu tez çalışmasında 90 adet *Sprague dawley* türü rat kullanılmıştır. Her grupta 15 adet rat olmak üzere 6 grup oluşturulmuştur. Çalışma süresi sonunda ratlar dekapite edilerek kolon dokularının fotoğrafları çekilmiştir.

Kontrol grubundaki ratların kolon dokularının makroskopik görüntüleri Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’ de gösterilmiştir ve herhangi bir makroskopik kript gözlenmemiştir.



Şekil 3.1. Kontrol grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü



Şekil 3.2. Kontrol grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü

Gümüş Karben I grubundaki ratların kolon dokusunun makroskopik görüntüleri Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’ te gösterilmiştir ve herhangi bir makroskopik kript gözlenmemiştir.



Şekil 3.3. Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü



Şekil 3.4. Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü

Gümüş Karben II grubundaki ratların kolon dokusunun makroskopik görüntüleri Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’ da gösterilmiştir ve herhangi bir makroskopik kript gözlenmemiştir.



Şekil 3.5. Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü



Şekil 3.6. Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü

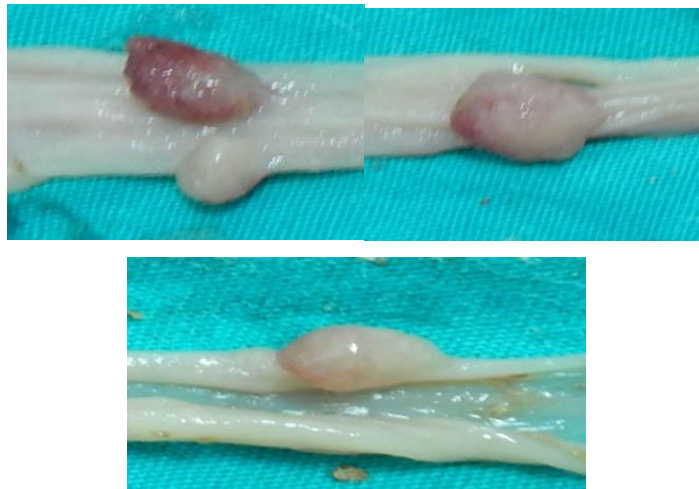
DMH grubundaki ratların kolon dokusunun makroskopik görüntüleri Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15 ve Şekil 3.16' da gösterilmiştir ve kripler makroskopik olarak gözlenmiştir.



Şekil 3.7. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kripler



Şekil 3.8. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kripler



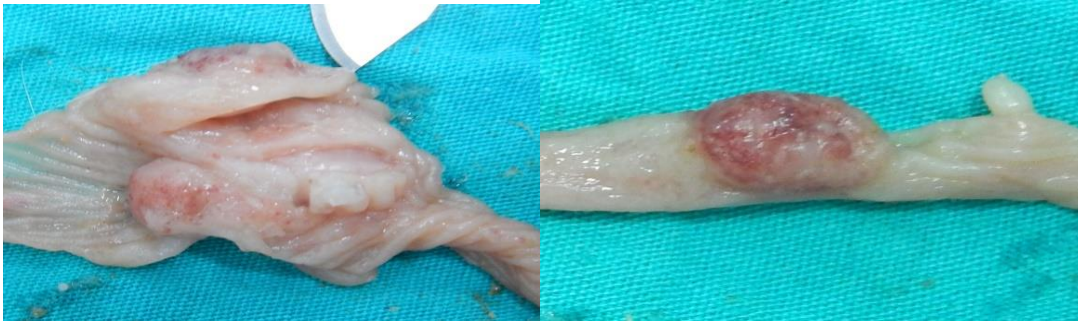
Şekil 3.9. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunda yer alan kriplerin açık, yakından makroskopik görüntüsü



Şekil 3.10. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler



Şekil 3.11. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler



Şekil 3.12. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık yakından makroskopik görüntüsü



Şekil 3.13. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler



Şekil 3.14. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler



Şekil 3.15. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık yakından makroskopik görüntüsü



Şekil 3.16. DMH grubuna ait ratlardan bazılarının kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık ve kapalı genel masroskopik görüntüleri

DMH + Gümüş Karben I grubundaki ratların kolon dokusunun makroskopik görüntüleri Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19 ve Şekil 3.20’ de gösterilmiştir ve kriptler makroskopik olarak gözlenmiştir.



Şekil 3.17. DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler



Şekil 3.18. DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler



Şekil 3.19. DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratların kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık yakından makroskopik görüntüsü



Şekil 3.20. DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan bazılarının kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık ve kapalı genel makroskopik görüntüleri

DMH + Gümüş Karben II grubundaki ratların kolon dokusunun makroskopik görüntüleri Şekil 3.21, Şekil 3.22, Şekil 3.23 ve Şekil 3.24' te gösterilmiştir ve kriptler makroskopik olarak gözlenmiştir.



Şekil 3.21. DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun kapalı makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler



Şekil 3.22. DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler



Şekil 3.23. DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun açık makroskopik görüntüsü ve gözlemlenen kriptler

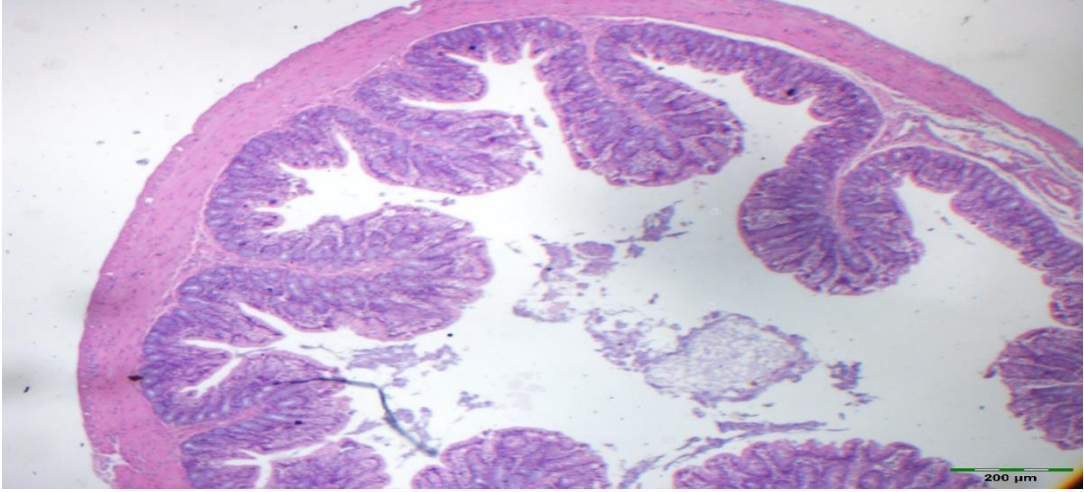


Şekil 3.24. DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan bazılarının kolon dokusunda yer alan kriptlerin açık genel makroskopik görüntüleri

3.2. Histopatolojik Görüntüler

Çalışma sonunda örnek kolon dokularından 2'şer cm aralıklarla kesitler alınarak hematoksilen-eosin boya solüsyonu ile muamele edilmiştir. Daha sonra bu örneklerin preparatları hazırlanarak mikroskopta incelenmiştir.

Kontrol grubundaki ratlardan birinin kolon dokusunun histopatolojik görüntüsü Şekil 3.25 de gösterilmiştir ve herhangi bir kanser oluşumuna rastlanmamıştır.



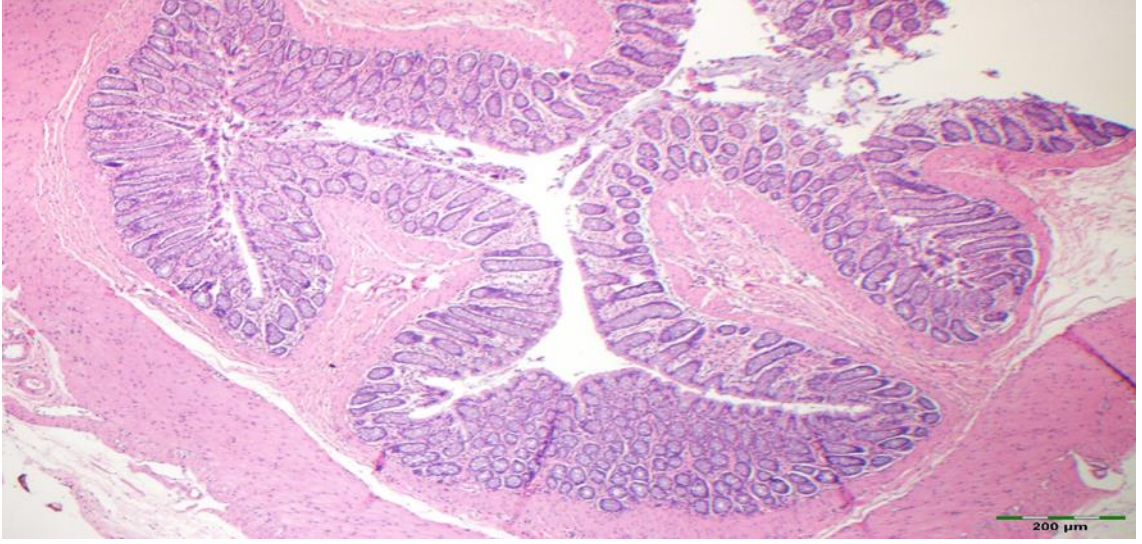
Şekil 3.25. Kontrol grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun histopatolojik görüntüsü (HE x100)

Gümüş Karben I grubundaki ratlardan birinin kolon dokusunun histopatolojik görüntüsü Şekil 3.26’ da gösterilmiştir ve herhangi bir kanser oluşumuna rastlanmamıştır.



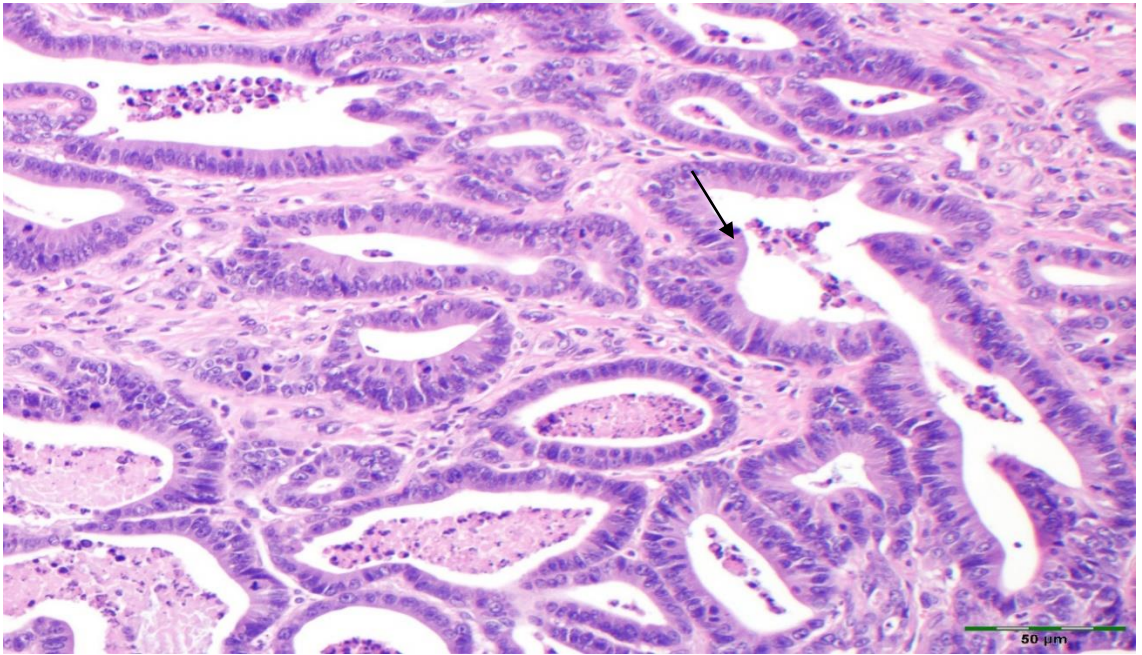
Şekil 3.26. Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun histopatolojik görüntüsü (HE x100)

Gümüş Karben II grubundaki ratlardan birinin kolon dokusunun histopatolojik görüntüsü Şekil 3.27’ de gösterilmiştir ve herhangi bir kanser oluşumuna rastlanmamıştır.

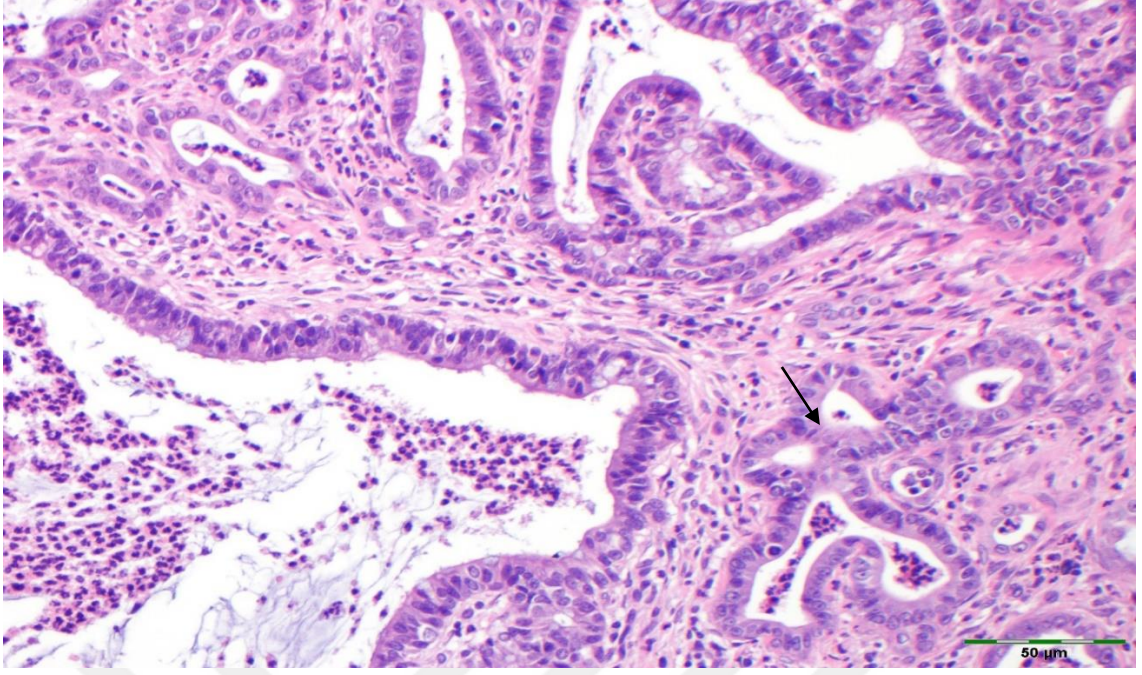


Şekil 3.27. Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusunun histopatolojik görüntüsü (HE x100)

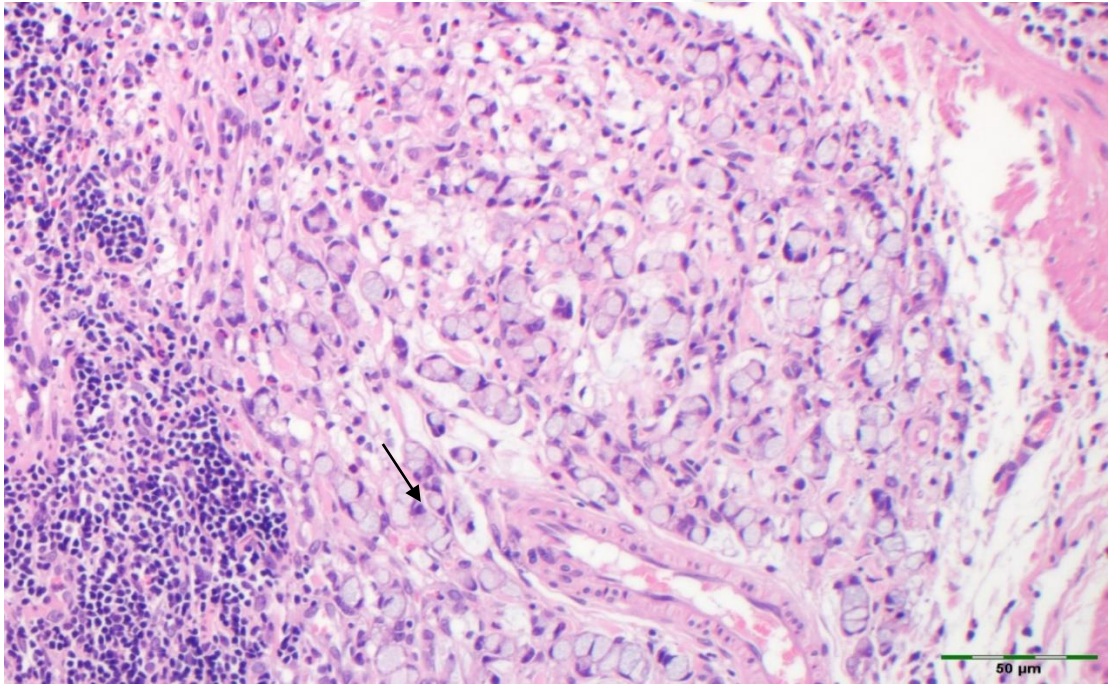
DMH grubundaki ratların kolon dokusunun histopatolojik görüntüleri Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30 ve Şekil 3.31’ de gösterilmiştir. Şekiller üzerinde yer alan siyah ok işaretleri kanserli hücreleri göstermektedir.



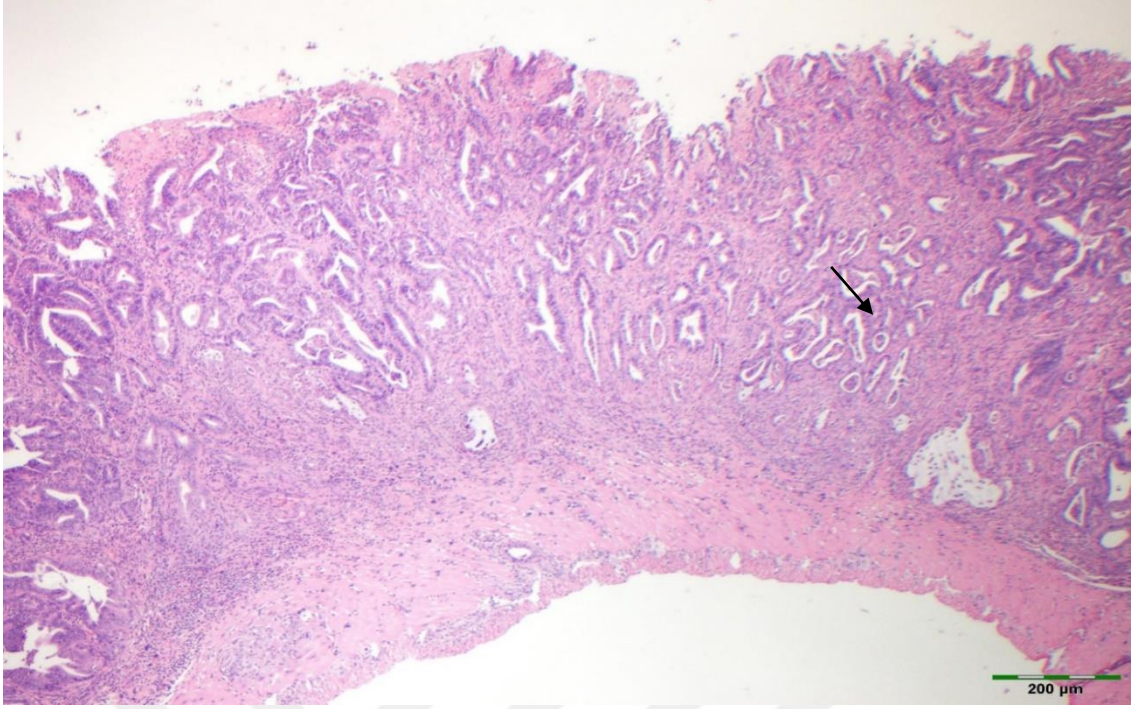
Şekil 3.28. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi atipik kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200)



Şekil 3.29. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi atipik kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200)

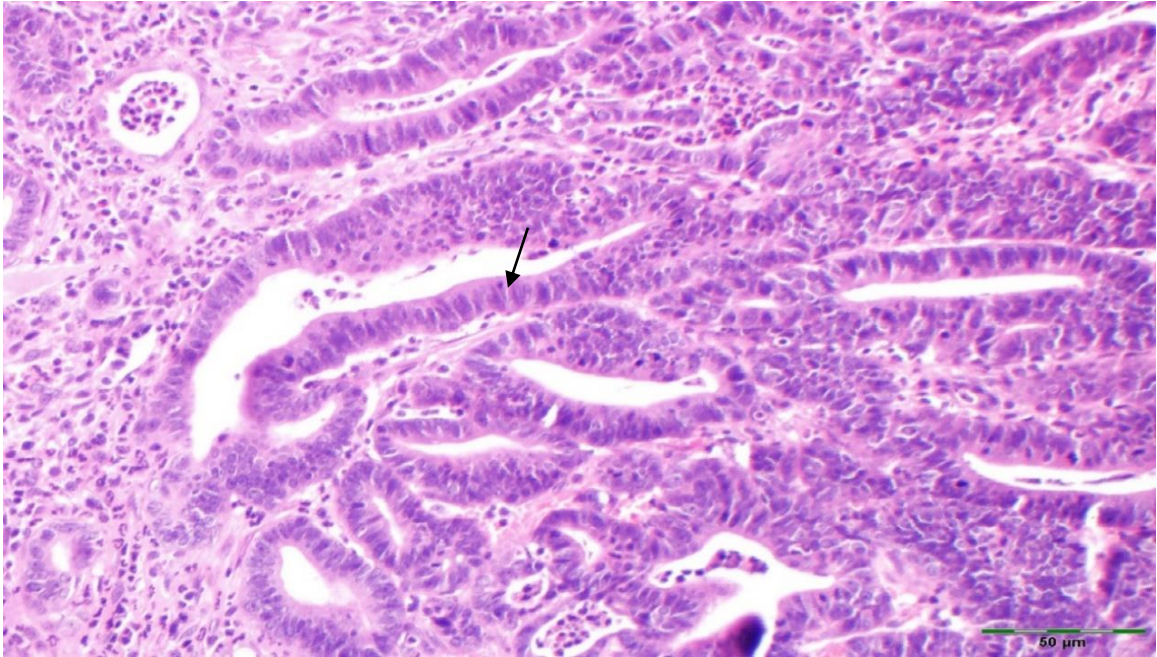


Şekil 3.30. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi (taşlı yüzük hücreleri) kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200)

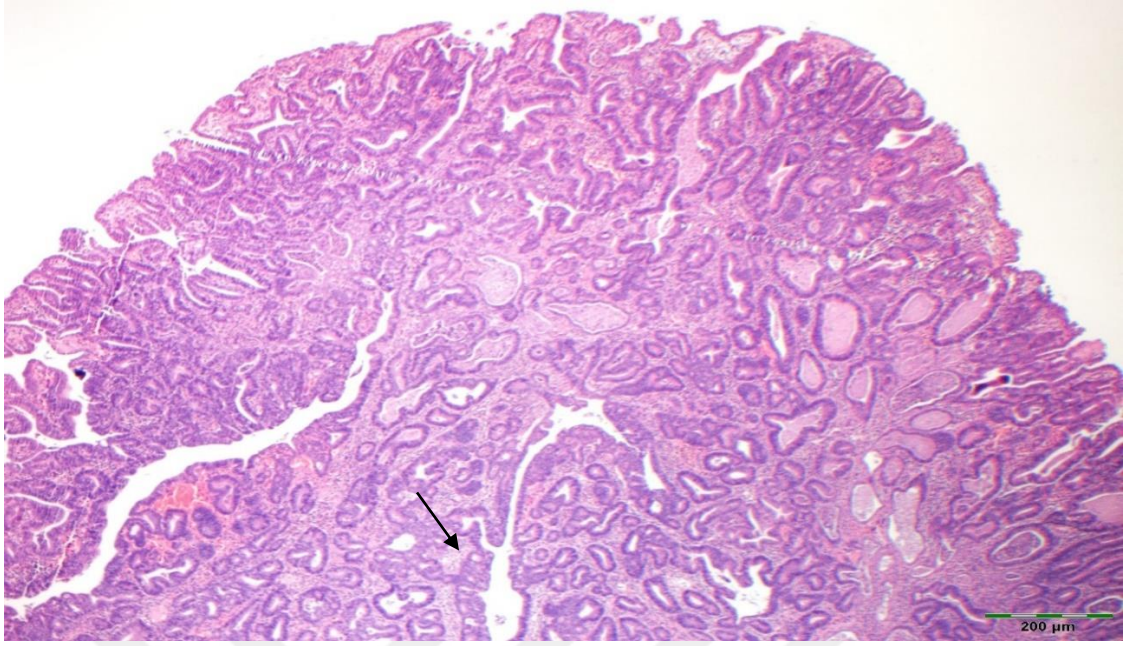


Şekil 3.31. DMH grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x100)

DMH + Gümüş Karben I grubundaki ratların kolon dokusunun histopatolojik görüntüleri Şekil 3.32 ve Şekil 3.33’de gösterilmiştir. Şekiller üzerinde yer alan siyah ok işaretleri kanserli hücreleri göstermektedir.

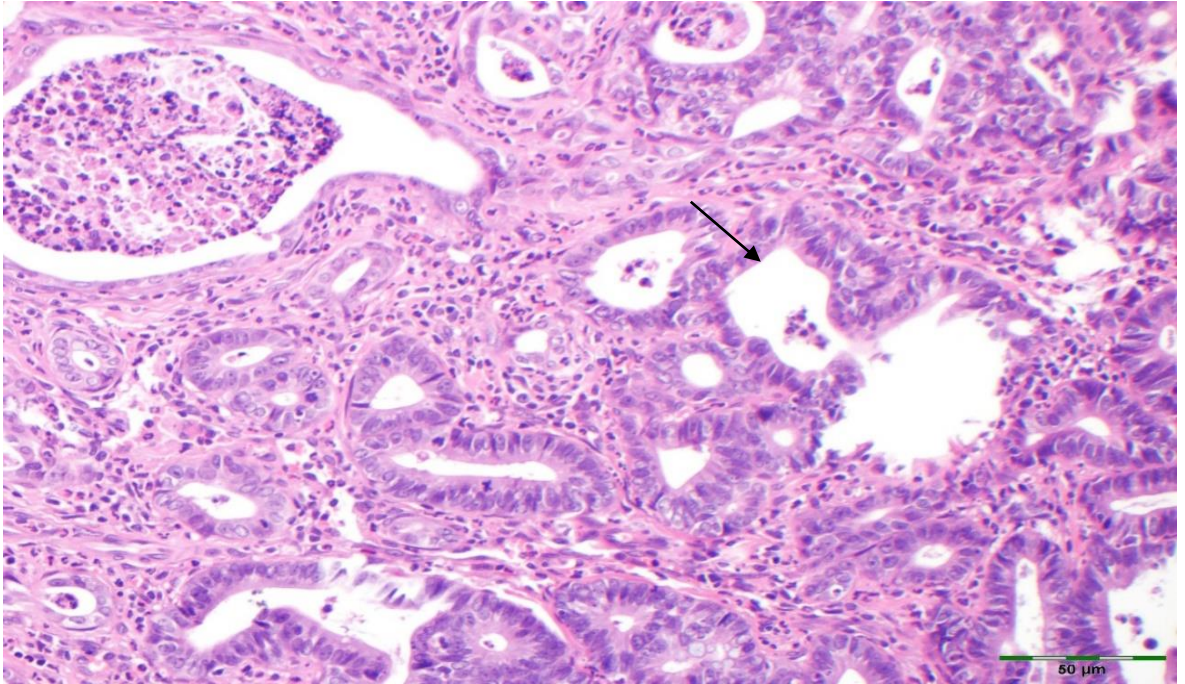


Şekil 3.32. DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200)

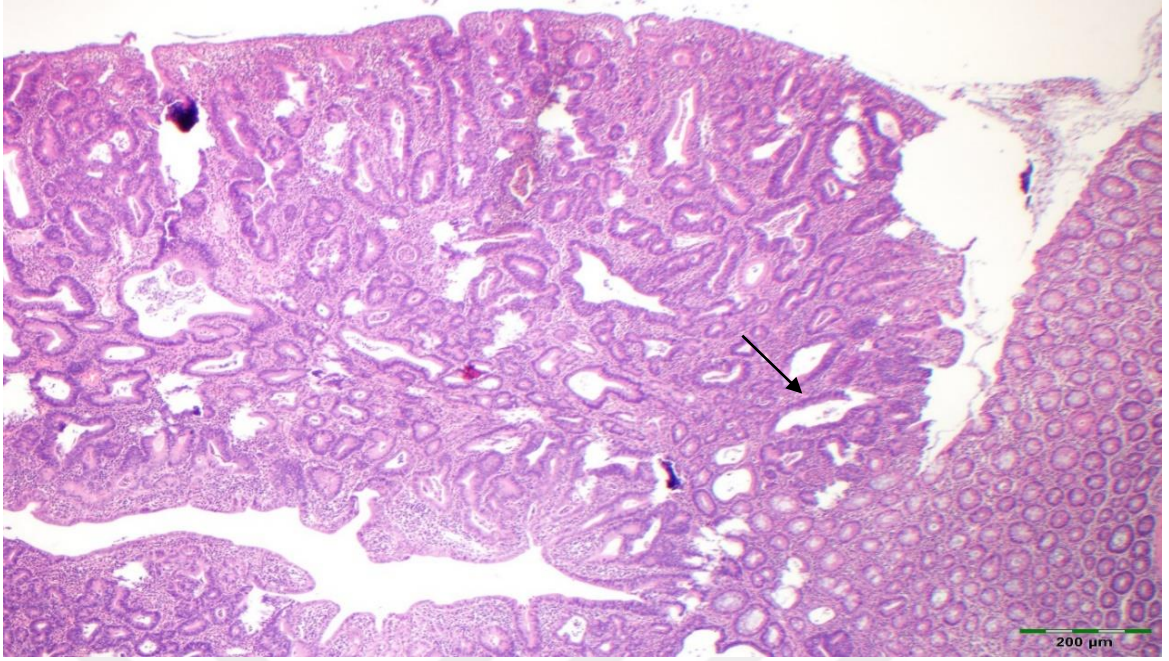


Şekil 3.33. DMH + Gümüş Karben I grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x100)

DMH+ Gümüş Karben II grubundaki ratların kolon dokusunun histopatolojik görüntüleri Şekil 3.34 ve Şekil 3.35’ de gösterilmiştir. Şekiller üzerinde yer alan siyah ok işaretleri kanserli hücreleri göstermektedir.



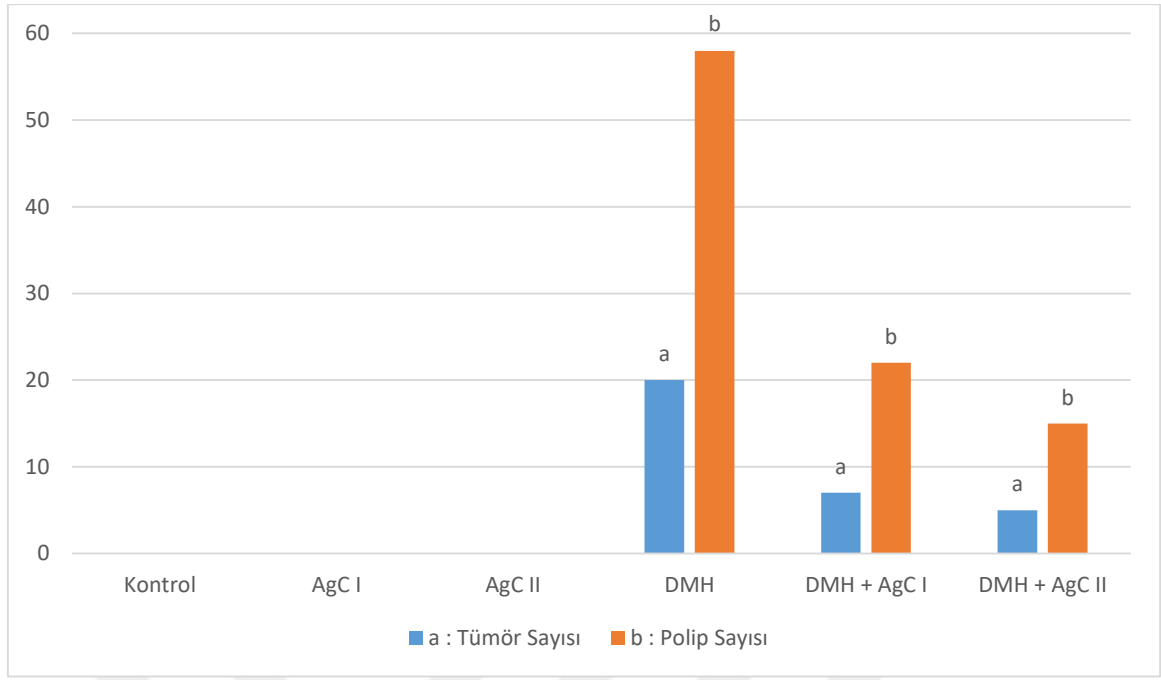
Şekil 3.34. DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x200)



Şekil 3.35. DMH + Gümüş Karben II grubuna ait ratlardan birinin kolon dokusundaki adenokarsinom tipi kanser hücrelerinin histopatolojik görüntüsü (HE x100)

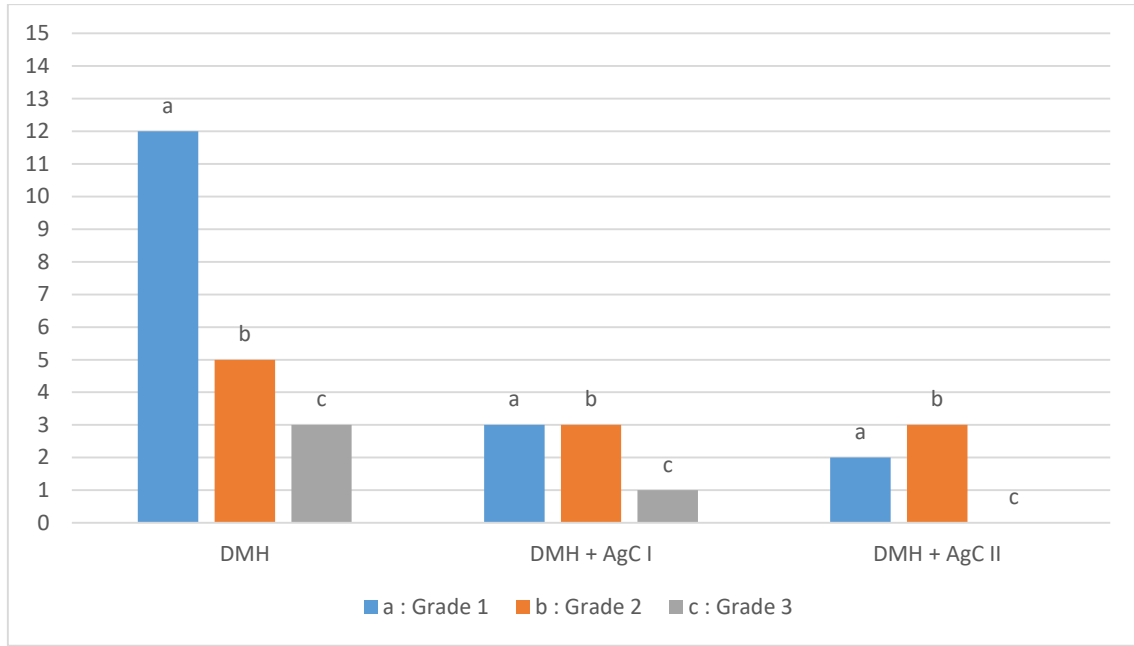
3.3. Ratlarda Oluşan Kript Sayıları ve Anormal Hücre Gelişimi (ACF)

Çalışma sonunda *Sprague dawley* türü ratlar dekapite edildikten sonra bütün ratların kolon dokusu özenle çıkarılarak içeriği serum fizyolojik ile temizlenmiştir. Daha sonra bir cetvel yardımı ile ortalama olarak anüsten itibaren 20 cm lik kısımda yer alan tümör ve polip sayıları ayrı ayrı sayılarak fotoğrafları çekilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.36’de gösterilmiştir.



Şekil 3.36. Çalışılan gruplarda yer alan tümör ve polip sayıları

Kontrol grubunda, antikanser etkisi olduğu düşünülen etken maddenin (Gümüş Karben) uygulandığı AgC I ve AgC II gruplarında hiçbir polip ve tümör yapısına rastlanılmamıştır. Buna karşılık kanserojen madde olan DMH uygulanan gruplardan elde edilen sonuçlara göre; sadece DMH uygulanan grupta toplam 58 polip ve büyüklükleri 0,5 cm ile 1,4 cm arasında değişen 20 tümör yapısı belirlenmiştir. Bu tümörlerin ise 12 tanesinin Grade 1 aşamasında, 5 tanesinin Grade 2 aşamasında 3 tanesinin ise grade 3 aşamasında olduğu tespit edilmiştir. AgC I + DMH uygulanan grupta toplam 22 polip ve büyüklükleri 0,6 cm ile 0,8 cm arasında olan 7 tümör yapısı belirlenmiştir. Bu tümörlerin 3 tanesinin Grade 1 aşamasında, 3 tanesinin grade 2 aşamasında 1 tanesinin ise grade 3 aşamasında olduğu tespit edilmiştir. AgC II + DMH uygulanan grupta ise 15 polip ve büyüklükleri 0,4 cm ile 0,8 cm arasında değişen 5 tümör yapısı belirlenmiştir. Bu tümörlerin 2 tanesi grade 1 aşamasında 3 tanesi grade 2 aşamasında iken Grade 3 aşamasında olan hiçbir tümöre rastlanmamıştır. Sonuçlar Şekil 3.37’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.37. Tümör oluşumu gözlenen gruplardaki grade dereceleri

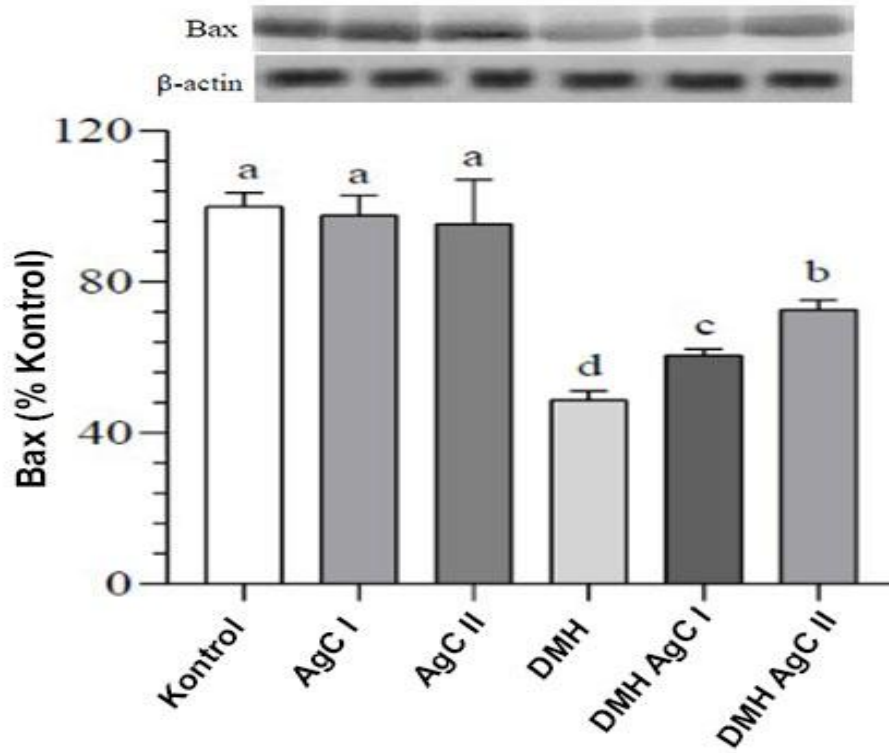
Bu sonuçlara göre antikanser etkisini düşündüğümüz AgC (Gümüş Karben)' in uygulanmadığı DMH grubuna karşılık AgC nin farklı dozlarda uygulandığı gruplarda tümör, polip sayılarında ve büyüklüğünde belirgin miktarda azalma olduğu görülmektedir. Aynı zamanda iki farklı dozda uygulanan Gümüş Karben gruplarında ise doz miktarı arttıkça daha etkili sonuçlar tespit edilmiştir.

Tümörlerin Grade dereceleri ve patolojik görüntüleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN tarafından tespit edilmiştir.

3.4. Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz -9, Akt 1, P Akt 1, PI3K, P PI3K, mTOR, P mTOR Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri

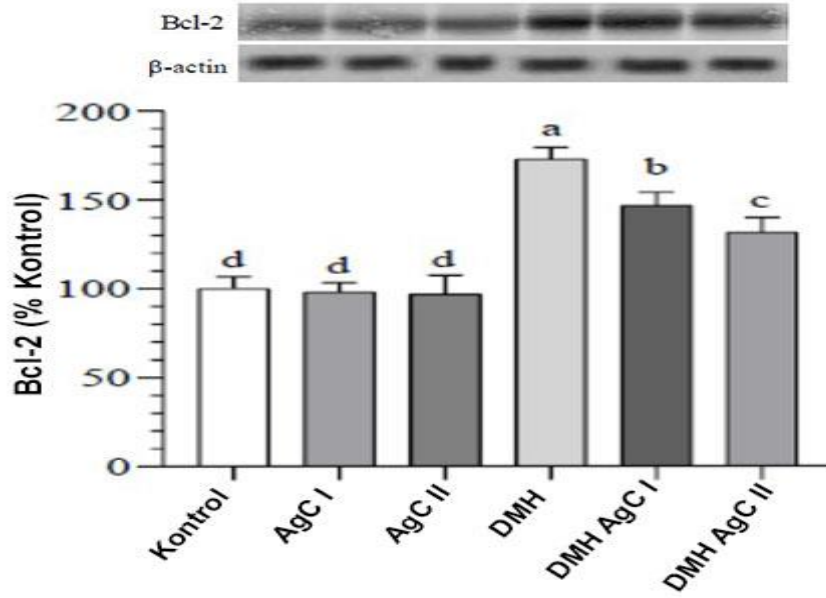
Bu çalışmada Bax, Bcl-2, Kaspaz -3, Kaspaz -9, Akt1, P-Akt1, PI3K, P-PI3K, mTOR, P-mTOR genlerinin wester blot yöntemi ile protein ekspresyon düzeylerine bakılmış ve elde edilen bulgular Şekil 3.38 – Şekil 3.47' de gösterilmiştir.

Western blot sonuçlarına göre, kontrol grubu ile sadece gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan grupların kolon dokusundaki Bax protein düzeyinde herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki Bax düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde azaldığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise Bax protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($P < 0.0001$). DMH + AgC II uygulanan grubunun Bax protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla artırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.38).



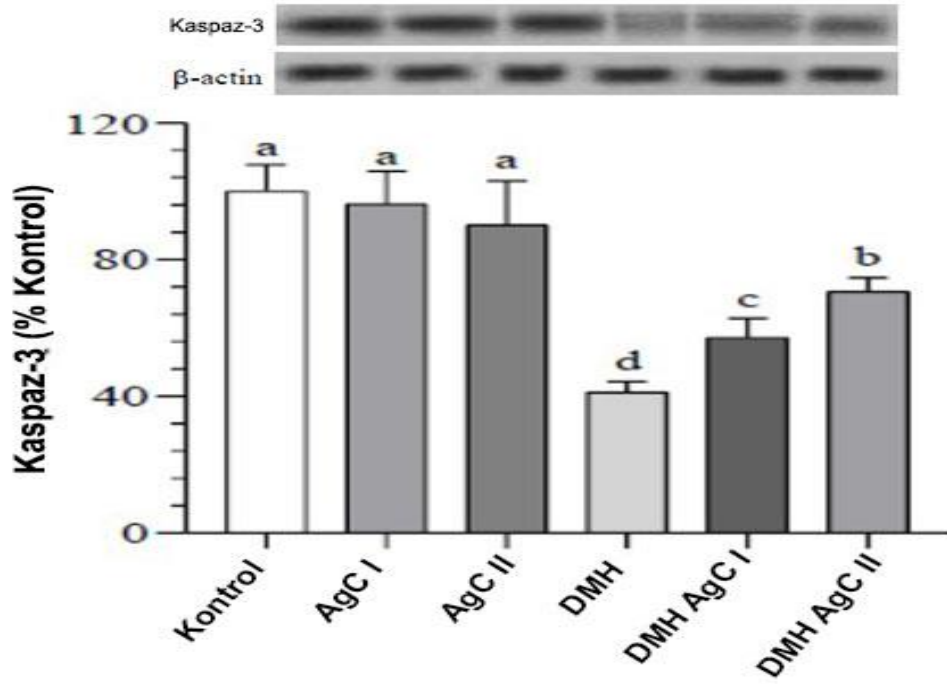
Şekil 3.38. Kolon dokusu Bax protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.0001$)] ANOVA *Post hoc* Tukey Testi

Bcl-2 protein düzeyi incelendiğinde, kontrol grubu ile sadece gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan grupların kolon dokusundaki Bcl-2 protein düzeyinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki Bcl-2 düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise Bcl-2 protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.0001$). DMH + AgC II uygulanan grubunun Bcl-2 protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla düşürdüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.39).



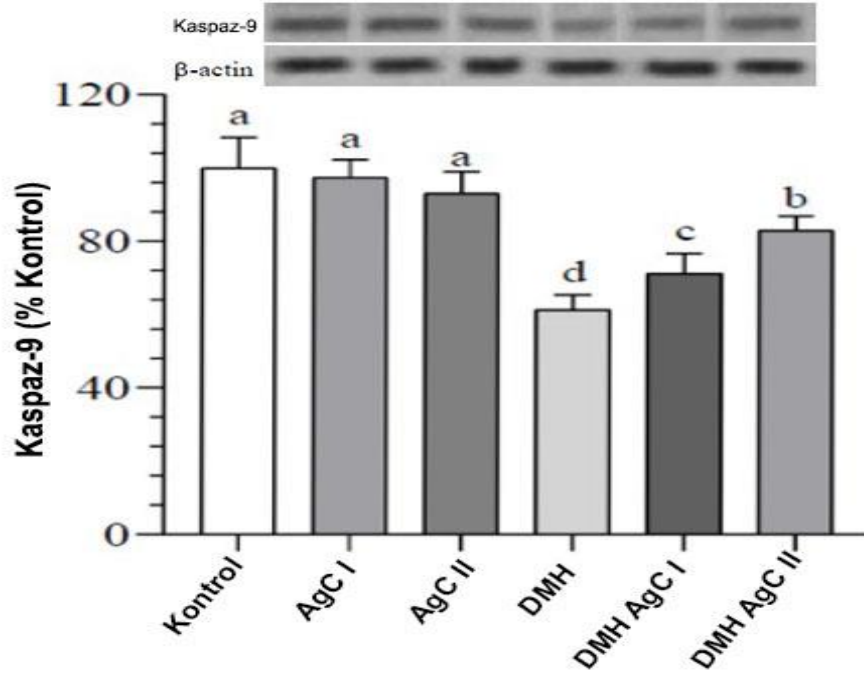
Şekil 3.39. Kolon dokusu Bcl-2 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.0001$)] ANOVA *Post hoc* Tukey Testi

Kaspaz -3 protein düzeyi değerlendirildiğinde, gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan grupların kolon dokusundaki Kaspaz -3 protein düzeyi kontrol grubuna göre azaldığı ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamsız bulunduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki Kaspaz -3 düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde azaldığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise Caspase-3 protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($P < 0.0001$). DMH + AgC II uygulanan grubunun Kaspaz-3 protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla artırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.40).



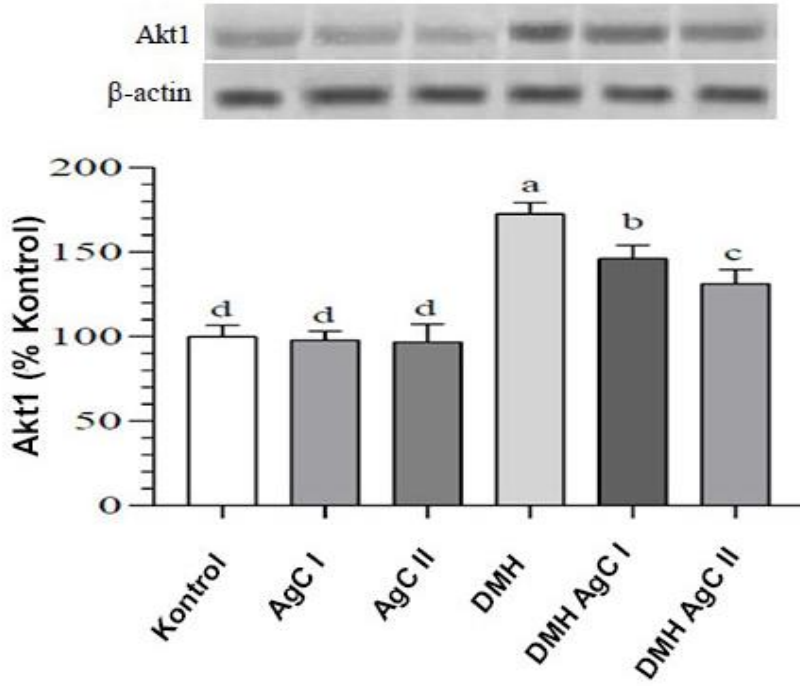
Şekil 3.40. Kolon dokusu Kaspaz -3 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA *Post hoc* Tukey Testi

Kaspaz-9 geninin protein düzeyindeki ekspresyon sonuçları incelendiğinde, gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan grupların kolon dokusundaki Kaspaz-9 protein düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki Kaspaz-9 düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde azaldığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise Kaspaz-9 protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (P <0.0001). DMH + AgC II uygulanan grubunun Kaspaz-9 protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla artırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.41).



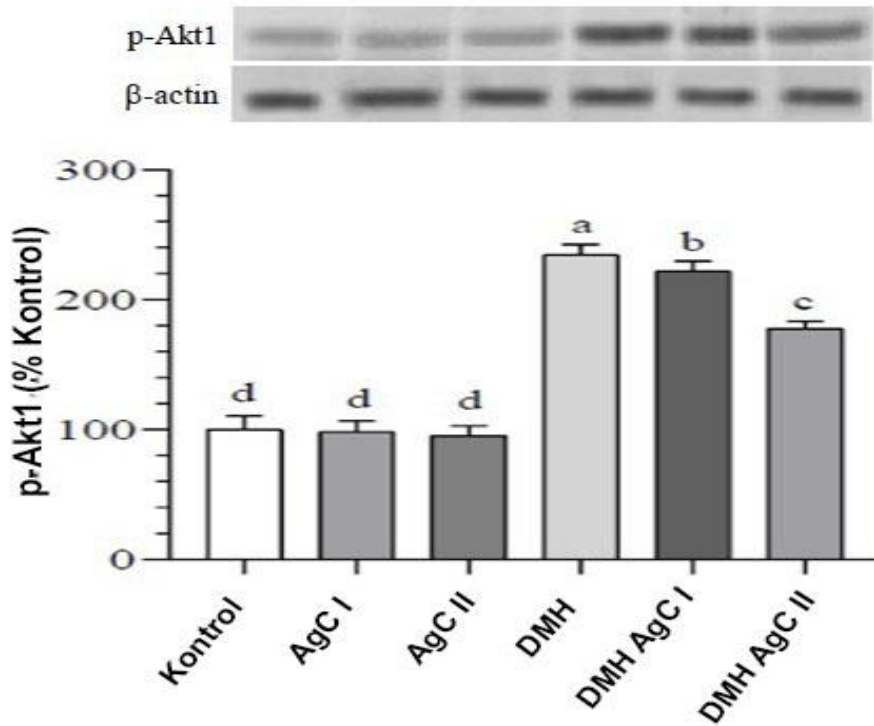
Şekil 3.41. Kolon dokusu Kaspaz-9 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.0001$)] ANOVA *Post hoc* Tukey Testi

Akt1 protein düzeyi değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile sadece gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan grupların kolon dokusundaki Akt1 protein düzeyinde belirgin bir farklılık gözlenmiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki Akt1 düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise Akt1 protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.0001$). DMH + AgC II uygulanan grubunun Akt1 protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla düşürdüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Şekil 3.42).



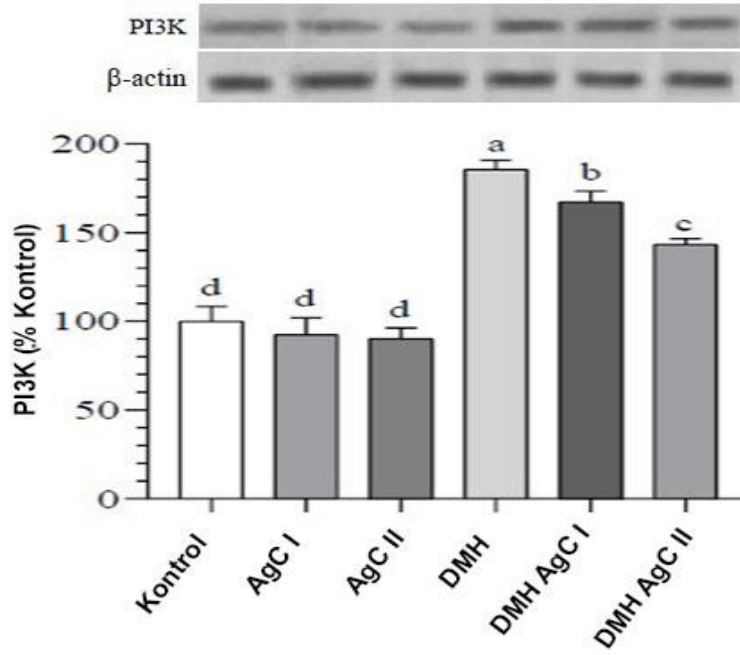
Şekil 3.42. Kolon dokusu Akt1 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA *Post hoc* Tukey Testi

p-Akt1 protein düzeyleri incelendiğinde, gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan gruplar ile kontrol grubunun kolon dokusundaki p-Akt1 protein düzeyleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki p-Akt1 düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise p-Akt1 protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (P <0.0001). DMH + AgC II uygulanan grubunun p-Akt1 protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla düşürdüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.43).



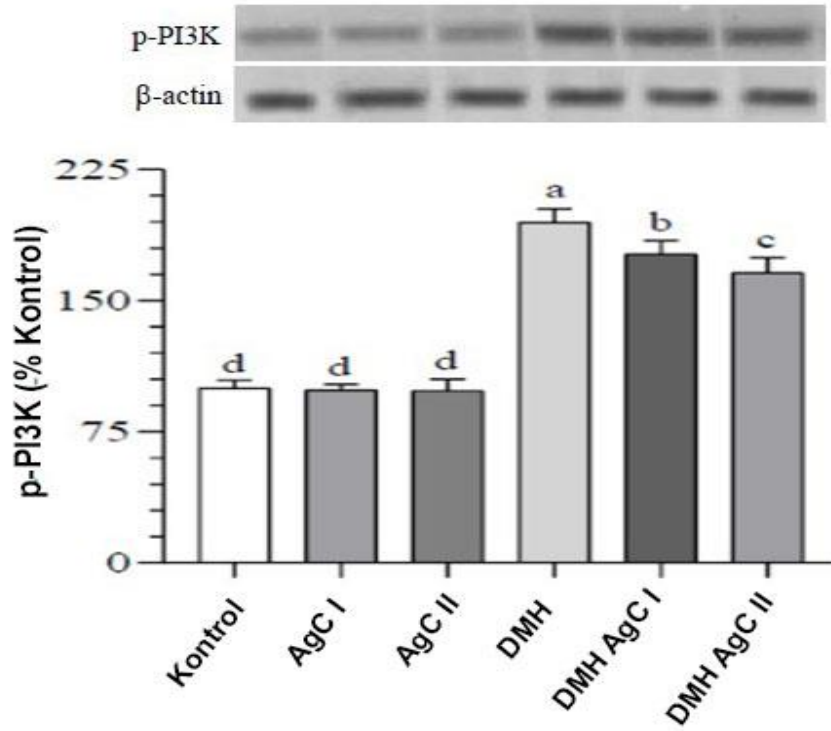
Şekil 3.43. Kolon dokusu p-Akt1 protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.0001$)] ANOVA Post hoc Tukey Testi

PI3K protein düzeyleri değerlendirildiğinde, gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan grupların kolon dokusundaki PI3K protein düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamsız bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki PI3K düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise PI3K protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.0001$). DMH + AgC II uygulanan grubunun PI3K protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla düşürdüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.44).



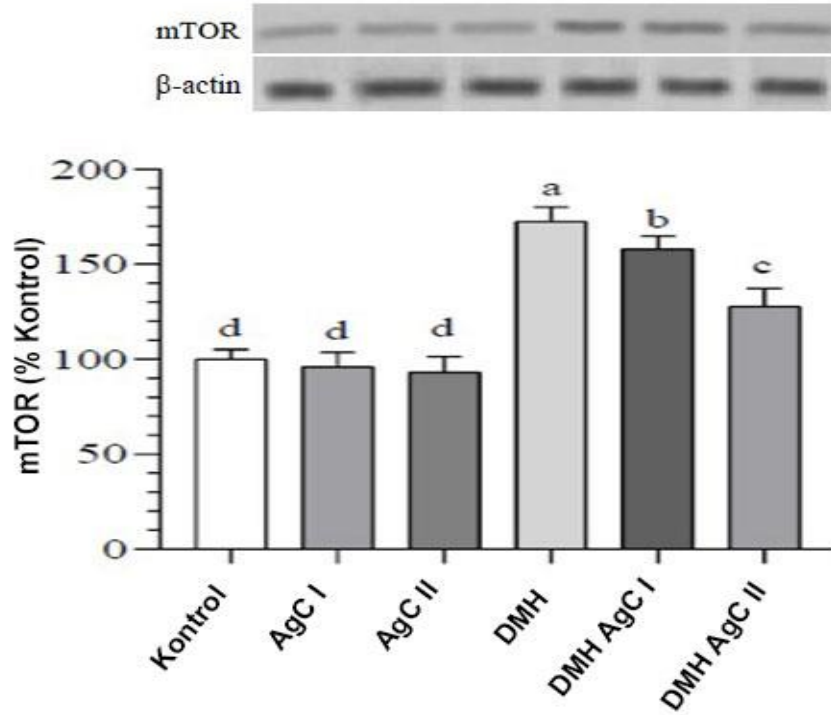
Şekil 3.44. Kolon dokusu PI3K protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (P <0.0001)] ANOVA Post hoc Tukey Testi

p-PI3K protein düzeyleri incelendiğinde, gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan gruplar ile kontrol grubunun kolon dokusundaki p-PI3K protein düzeyleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki p-PI3K düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise p-PI3K protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (P <0.0001). DMH + AgC II uygulanan grubunun p-PI3K protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla düşürdüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Şekil 3.45).



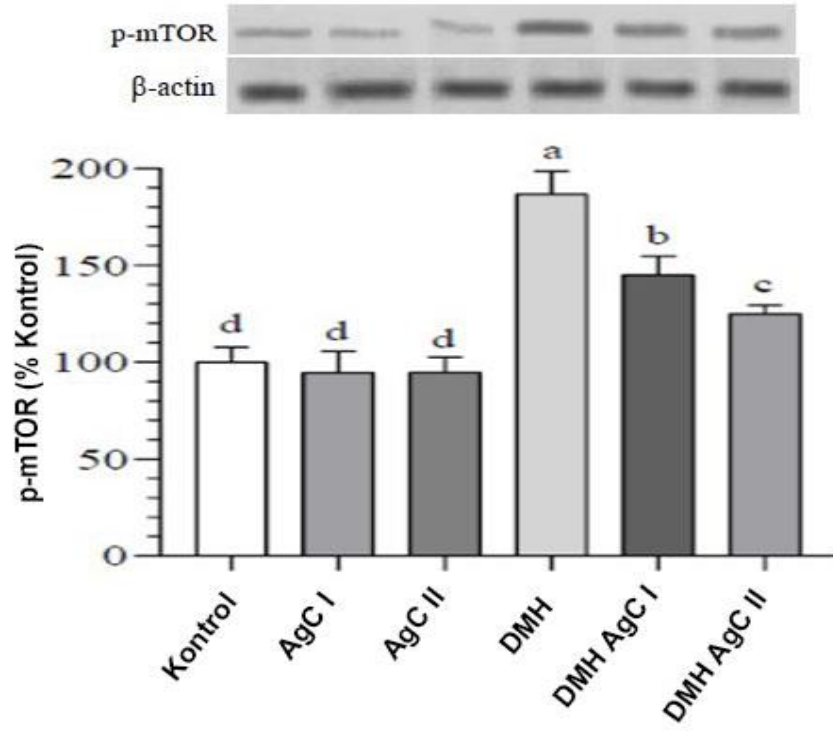
Şekil 3.45. Kolon dokusu p-PI3K protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.0001$)] ANOVA Post hoc Tukey Testi

mTOR protein düzeyleri değerlendirildiğinde, gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan gruplar ile kontrol grubunun kolon dokusundaki mTOR protein düzeyleri arasında belirgin bir farklılık tespit edilmemiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki mTOR düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise mTOR protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.0001$). DMH + AgC II uygulanan grubunun mTOR protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla düşürdüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Şekil 3.46).



Şekil 3.46. Kolon dokusu mTOR protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.0001$)] ANOVA Post hoc Tukey Testi

p-mTOR protein düzeyleri incelendiğinde, gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan grupların kolon dokusundaki p-mTOR protein düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki p-mTOR düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise p-mTOR protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.0001$). DMH + AgC II uygulanan grubunun p-mTOR protein düzeyini DMH + AgC I grubuna göre daha fazla düşürdüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Şekil 3.47).



Şekil 3.47. Kolon dokusu p-mTOR protein seviyeleri [a-d: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.0001$)] ANOVA Post hoc Tukey Testi

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kolorektal kanser (CRC), 2020’de kaydedilen tüm kanser ölümlerinin yaklaşık % 9,39’ unu oluşturan küresel olarak en sık teşhis edilen üçüncü ve en ölümcül ikinci kanserdir [272-275]. Yaşlılarda teşhis edilen vakaların hızla artmasıyla CRC insidansının dünya çapında 2035 yılına kadar iki katına çıkması beklenmektedir. Ayrıca, daha az gelişmiş ülkelerde teşhis edilen CRC vakalarının da artması beklenmektedir [274,276].

CRC terimi, glandüler epitel hücrelerinin anormal büyümesiyle oluşan kalın bağırsak ve rektuma özgüdür. Bu gelişme, epitel hücreleri, kendilerine seçici bir hiper-çoğalma avantajı sağlayan bir dizi genetik veya epigenetik değişiklik kazandığında meydana gelir [277]. Bu kontrol dışı büyüyen hücreler, daha sonra üç ana yolla karsinom ve metastaza ilerleyen iyi huylu bir adenom üretir. Bunlar, mikro uydu kararsızlığı (MSI), kromozomal kararsızlık (CIN) ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) olarak belirtilmiştir [278-280].

Bir polipin kanserli olması 10-15 yıl sürdüğünden, polipleri erken bir aşamada tespit etmek ve çıkarmak çok önemlidir. Bununla birlikte, CRC’nin sadece % 40’ ı erken aşamalarda tespit edilir ve bazen CRC tedaviden sonra tekrarlar [193,281]. CRC tedavisi için, FDA (Food and Drug Administration) onaylı en az 30 farklı ilaç tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Bu kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerini etkiler ve aynı anda sağlıklı hücrelere de zarar verir. Sonuç olarak, bu ilaçlar yorgunluk, baş ağrısı, kas ağrısı, mide ağrısı, ishal ve kusma, boğaz ağrısı, kan anormallikleri, kabızlık, nöronal hasar, cilt değişiklikleri, hafıza sorunları, iştahsızlık ve saç dökülmesi gibi çeşitli yan etkiler gösterir [193,281].

Yeni kemoterapi rejimleri nedeniyle son yıllarda ileri CRC’ li bireylerin genel sağkalımı artmış olsa da, CRC’ li hemen hemen tüm hastalarda mevcut sistemik kemoterapiler direnç geliştirerek [282], kanser önleyici ilaçların terapötik etkinliğini sınırlamış ve sonuçta kemoterapi başarısızlığına yol açmıştır. Kemoterapötik ilaç direnci mevcut klinik uygulamada CRC tedavisinde önemli bir sorundur. Bu sınırlamadan bağımsız olarak, gelişmekte olan ülkelerde, özellikle de dünya nüfusunun yaklaşık % 44’ünün şu anda yaşadığı kırsal kesimde, CRC’ nin hayatta kalmak için teşhis ve tedavisine erişim daha sınırlıdır [283]. Bu nedenle, dünya nüfusunun neredeyse yarısı teşhis ve tedavi etme araçlarından yoksundur.

“Metallodrug”lar (metal içerikli ilaçlar), geçen yüzyıldan bu yana kansere karşı savaşmak için umut verici biyoaktif ajanlar olarak araştırmacıların dikkatini çekmektedir [284]. Bunlardan en popülerleri cisplatin (platin bazlı) dir [285-287]. Cisplatin çok etkili bir antikanser ajanı olmasına rağmen, sadece birkaç kanser türüne karşı etkilidir ve yaygın kullanımı, kemik iliği baskılanması, mide bulantısı ve böbrek toksisitesi gibi ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Yüksek yan etkileri nedeniyle hastalarda dayanılmaz ağrılara neden olur ve sonunda tedaviyi bırakmak zorunda kalırlar [288]. Bu yan etkiler, araştırmacıları yukarıda belirtilen sınırlamalardan uzak, yan etkileri olmayan

veya nispeten daha az olan yeni antikanser metal içerikli ilaçları araştırmaya yönlendirmiştir ve son zamanlarda, organometalik gümüş kompleksleri umut verici antikanser ajanlar olarak önem kazanmıştır. Bu komplekslerin platin bazlı antikanser ilaçların kusurlarını aşması beklenmektedir [289]. Çeşitli gümüş formları (gümüş koordinasyon kompleksleri, gümüş nanopartiküller ve gümüş organometalik bileşikler), gümüşün dikkat çekici biyolojik potansiyeli özellikle de antikanser potansiyeli nedeniyle son birkaç yıldan beri araştırılmıştır [13,290-297]. Eşleştirilmemiş iki elektronu içeren karbenler, mükemmel nükleofillerdir. Periyodik tablo boyunca metalleri yüksek stabiliteli kompleksler oluşturmak için bağlayabilen güçlü Lewis bazları olarak bilinirler ve fosfin komplekslerinden daha kararlı oldukları belirtilmektedir [298-304]. Bu özellikler karbenleri geleneksel yapıya dayalı ilaç tasarımı ve optimizasyonu için yararlı başlangıç noktaları olan biyolojik olarak aktif moleküller haline getirmiştir [305].

Biyolojik olarak, gümüş N-heterosiklik karben (NHC) komplekslerinin ilaca dirençli bakteriler dâhil olmak üzere antibakteriyel aktiviteler sergilediği bildirilmiştir [306-309]. Yapılan çalışmalarda, bu bileşiklerin kronik akciğer enfeksiyonları ve kistik fibroz tedavisi için kullanımı önerilen gümüş N-heterosiklik karben komplekslerinin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* gibi patojenlere karşı antibakteriyel aktiviteleri belirtilmiştir [306,307,310]. Ek olarak, gümüş N-heterosiklik karben kompleksleri kanserde incelenmiş ve daha fazla gelişme potansiyeli gösteren etkili aktivite sergiledikleri bulunmuştur [308,311-313,315]. Ayrıca, gümüşün kendi başına düşük toksisiteye sahip olduğu ve organik gümüş kompleksleri halinde bu toksisitenin daha da azaltılabileceği, bunun da daha az toksik etkiye neden olabileceği belirtilmiştir [316].

Kanserde etkili bir ajanının tespit edilmesi için ajanın hangi mekanizma üzerinden etki gösterdiğinin belirlenmesi gerekmektedir. Çeşitli gümüş karben komplekslerinin antikanser etkileri literatürlerde belirtilmiş ve yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu *in vitro* düzeyde olup moleküler mekanizması da henüz tam olarak açıklanamamıştır. Literatür taramalarında, antitümör aktivite çalışmalarının büyük kısmının imidazol ligantı içeren NHC kompleksleriyle yapıldığı ve imidazolin ligantıyla ilgili çalışmaların çok sınırlı sayıda olduğu görülmüştür. Bu tez çalışması mevcut literatüre göre daha kapsamlı olup sadece etkili bir ajanın tespitine yönelik değil, aynı zamanda etki mekanizmasının anlaşılmasına yönelik çalışmaları da içermektedir. Literatürdeki bu eksiklikleri gidermek amacıyla, tez çalışmasında yeni bir gümüş karben kompleksi hazırlanarak bu metal-karben komplekslerinin antikanser etki mekanizmaları araştırılmıştır. Bu amaçla, DMH ile indüklenen kolorektal kanser oluşturulmuş rat modelinde yeni bir gümüş karben kompleksinin kolon dokusunda etkileri hem histopatolojik olarak incelenmiş hem de Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-9, Akt1, p-Akt1, PI3K, p-PI3K, mTOR, p-mTOR genlerinin protein düzeyindeki ekspresyonları üzerine etkileri araştırılmıştır. DMH ile oluşturulan kolorektal kanser gruplarının kolon dokusu incelendiğinde gümüş karbenin uygulandığı gruplarda toplam kript sayılarında belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Ayrıca, gümüş karbenlerin uygulandığı gruplarda Bax,

Kaspaz-3, Kaspaz-9 genlerinin protein düzeyindeki ekspresyonlarında anlamlı bir artış ($p<0.0001$), Akt-1, p-Akt1, PI3K, p-PI3K, mTOR, p-mTOR genlerinin protein düzeyindeki ekspresyonlarında ise anlamlı bir azalış belirlenmiştir ($p<0.0001$). Gözlenen artış ve azalışlar konsantrasyon artışıyla benzerlik göstermiştir.

Kolon kanseri, pekçok bağımsız fakat sinerjestik proapoptotik ve antiapoptotik proteinleri kodlayan aktif genlerin ekspresyonu ile yönlendirilen bir süreç olan apoptozun düzenlenmesindeki bozukluklarla ilişkilendirilmektedir [294,317]. Kolorektal kanserler dâhil olmak üzere çok çeşitli insan kanser tiplerinde çeşitli fizyolojik uyaranlara cevap olarak apoptozise girme kapasitelerinin azaldığı ve bu yüzden apoptozisteki bir kusur, kolorektal kanser dâhil kanser hücrelerinin anormal biçimde hayatta kalmalarında veya gelişimlerinde önemli roller oynamaktadırlar [318]. Bu araştırmada Bcl-2 protein düzeyleri incelendiğinde kontrol grupları arasında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bununla beraber, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş grupta Bcl-2 düzeyinin kontrol gruplarına oranla artış gösterdiği ve tedavi gruplarında (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) ise Bcl-2 protein düzeyinin anlamlı biçimde azaldığı belirlenmiştir. DMH + AgC II grubunda Bcl-2 protein düzeyinin DMH + AgC I grubuna oranla daha fazla düştüğü ve bu düşüşün istatistiki olarak anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0.0001$). Artan apoptosis frekansı ile Bcl-2 ekspresyonundaki azalma arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir [317]. Pek çok bağımsız fakat sinerjestik olarak proapoptotik ve antiapoptotik proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonu ile yönlendirilen apoptozis kısmen Bcl-2 genleriyle düzenlenir ki bu genler hücrenin yaşamasını sağlayan genlerdir [317]. Mitokondriyal bütünlüğün devamında önemli görevler üstlenen Bcl-2 proteinlerinin seviyesinin kanserli hücrelerde azaldığı N-heterosiklik karbenlerle desteklenen kanserli gruplarda ise proapoptotik protein olan Bax'ın ekspresyonunun artışına neden olduğu bulunmuştur [319]. Bcl-2 ekspresyon seviyeleri, hücre tipleri ve tümör hücre hatları arasında değişiklik göstermektedir ve Bcl-2 ailesinin her bir üyesine apoptozda özel bir görev verilmektedir. Apoptoz inhibisyonu, kanserin devam ettiği kritik mekanizmadır. Anormal genetik bileşenlere sahip hücreler apoptozu atlar ve ölümsüz tümörler haline gelir. Bcl-2'nin, Bax işlevini baskılayarak apoptozu tetiklediği düşünülmektedir [320]. Mevcut modeller, anti ve proapoptotik proteinlerin oranlarının apoptoziste düzenleyici bir rol oynadığını göstermektedir [321,322]. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu Bax indüksiyonunu etkilemediğinden, hem Bax hem de Bcl-2 bağımsız olarak düzenleniyor gibi görünmektedir [323]. Bax'ın aşırı ekspresyonunun, büyüme faktörünün geri çekilmesi de dâhil olmak üzere çeşitli uyaranlara yanıt olarak apoptozu hızlandırdığı gösterilmiştir [318]. Dina vd. [355] tarafından yapılan araştırmada kanser hücrelerinin N-heterosiklik kompleksler ile tedavisinde çeşitli apoptotik proteinlerin ekspresyonunun artış gösterdiği bulunmuştur. Araştırmacılar kanserli hücrelerde tedavi amaçlı çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan N-heterosiklik komplekslerin Bax proteinin ekspresyonunun artmasına, Bcl-2'nin ekspresyonunun azalmasına ve sitosolik sitokrom C'nin seviyesinin artışı sağladıklarını belirtmişlerdir [324]. Bcl-

2'nin kolorektal karsinom gelişiminde de önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür ve apoptozis inhibisyonunun Bcl-2 ve Bax genlerinin ekspresyonları arasındaki dengeye bağlı olduğu belirtilmiştir [317,325]. Bu araştırmanın sonuçları Bax protein düzeylerinin kontrol gruplarının (kontrol; kontrol+AgCI ve kontrol+AgCII) kolon dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını gösterirken DMH'ın uygulandığı grupta kolon dokularındaki Bax protein düzeyinin kontrol gruplarına oranla anlamlı biçimde azaldığı buna karşın DMH+AgCI ve DMH+AGII gruplarında ise DMH grubuna oranla Bax proteinin artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca DMH+AgCII grubundaki Bax protein miktarının DMH+AgCI grubuna oranla daha fazla artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Hücre içinde olaylar tersine döndüğünde Bax protein konformasyonel bir değişiklik, membran insersiyonu ve oligomerizasyon geçirerek apoptozisi teşvik ederek sitokrom C'nin mitokondri dışına çıkması için bir kanal sağlar. Bu da kaspaz aracılı hücre ölümünü aktive eder [326].

Bu çalışmada Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 protein düzeylerinin gümüş karben uygulanan kontrol gruplarında kontrol grubuna oranla düşüş gösterdiği ancak bu düşüşün istatistiki olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca DMH grubundaki Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 düzeylerinin kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalış gösterdiği ancak DMH + AgC I ve DMH + AgC II tedavi gruplarında ise Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 düzeylerinin DMH ile kolon kanseri oluşturulmuş gruba oranla anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuştur. Aynı zamanda DMH + AgC II grubunun Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 protein düzeylerinin DMH + AgC I grubuna göre daha fazla artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Li vd. [327] gümüş karben türevlerinin G2/M fazının durmasını ve apoptozisi indükleyerek akciğer kanserli hücrelerin büyümesini inhibe ettiklerini bulmuşlardır. Araştırmacılar, gümüş karbenlerin mitokondriyal membran potansiyelini bozduğunu, kaspaz-3 aktivasyonunu indüklediğini ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G'ın nükleusa translokasyonuna sebep olduğunu ifade etmişlerdir [327]. Gandin vd. [12] yaptıkları çalışmada AgCI'in Kaspaz-3 ve Kaspaz-9'da önemli bir aktivasyon sağladıklarını ve gümüş karben kompleksine sahip olan hücrelerin Kaspaz-3 aktivitelerinde % 130'luk bir artışın meydana geldiğini bulmuşlardır. Iqbal vd. [328] de 2015 yılında Ag (I)-NHC kompleksinin insan kolorektal kanseri, prostat adenokarsinoma ve normal kolon fibroblast hücrelerine karşı sitotoksit etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, Ag (I)-NHC kompleksinin sitotoksit aktivite sergilediğini ve ilginç biçimde normal hücrelerde toksisite göstermediğini belirtmişlerdir. Bunun dışında bu kompleksin, hücrelerin klonojenik ve göç özelliklerini engellediğini ayrıca Ag (I)-NHC kompleksinin hücre nükleusunda pro-apoptotik değişiklikleri indüklediğini bulmuşlardır ve muhtemelen apoptotik indüksiyonun Kaspaz yolağı aracılığıyla olduğunu ifade etmişlerdir [328]. Marmol ve diğerleri de 2020 yılında yapmış oldukları çalışmada gümüşün Kaspaz-3 ve Kaspaz-8'in aracılık ettiği serbest oksijen radikallerinden bağımsız apoptozisi tetiklediğini ve mitokondriyal membran potansiyeli

kaybını başlattığını bulmuşlardır [356]. Iqbal vd. tarafından 2015 yılında yapılan araştırmada Ag (I)-NHC kompleksinin hücre nükleusunda pro-apoptotik değişiklikleri indüklediğini bulunmuştur ve muhtemelen apoptotik indüksiyonun kaspas yolağı aracılığıyla olduğu ifade edilmiştir. Bununla beraber Eloy vd. [329] gümüş(I)-NHC komplekslerinin mitokondriyal apoptoz indükleyici faktör yoluyla kaspazdan bağımsız apoptotik hücre ölümü indüklediği fikrini ortaya atmışlardır.

Bu araştırmanın mTOR proteinleri ile ilgili sonuçları incelendiğinde kontrol grubu ile gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan grupların kolon dokularındaki mTOR protein düzeyleri arasında belirgin bir farklılık tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki mTOR düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına oranla anlamlı bir şekilde arttığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise mTOR protein düzeyinin DMH grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur. Ayrıca DMH + AgC II uygulanan grubunun mTOR protein düzeyindeki düşüşün DMH + AgC I grubuna göre daha fazla olduğu ve bu düşüşün istatistiki olarak anlamlı bir fark oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kolon kanserinde, mTOR'un hiperaktivasyonu, erken ve yaygın bir olaydır ve in vivo ortamda mTOR inhibitörlerinin kanserli hücrelerde apoptosis indüklediği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda, mTOR inhibisyonunun hücre döngüsü ilerlemesinin baskılanmasına, epitelyalden mezenkimal geçişe (EMT), hücre hareketliliğine ve metastaza yol açabileceği ifade edilmektedir [330]. Bu araştırmanın p-Akt1 protein düzeylerine ilişkin sonuçları değerlendirildiğinde ise gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan gruplar ile kontrol grubunun kolon dokusundaki p-Akt1 protein düzeyleri arasında bir fark olmadığı DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki p-Akt1 düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı biçimde artış gösterdiği, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise p-Akt1 protein düzeyinin DMH grubuna oranla belirgin ve anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda DMH + AgC II uygulanan grubun p-Akt1 protein düzeyinin DMH + AgC I grubuna göre daha düşük olduğu ve bu düşüşün istatistiki açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur. Akt, apoptozu inhibe eden, glikojen metabolizmasını düzenleyen ve kanserin ilerlemesine katkıda bulunan Protein Kinaz B (PKB) olarak da bilinen bir serin/treonin kinazdır. Akt'nin içinde bulunduğu siyal yolunun apoptozis üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve kolorektal kanser de olmak üzere birçok kanserin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [331]. Aynı zamanda bu çalışmada PI3K protein düzeyleri incelendiğinde, gümüş karben (AgC I ve AgC II) uygulanan grupların kolon dokusundaki PI3K protein düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı ancak bu azalmanın istatistiki olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte DMH ile kolorektal kanser oluşturulmuş ratların kolon dokusundaki PI3K düzeyinin kontrol ve gümüş karben gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı, tedavi (DMH + AgC I ve DMH + AgC II) gruplarında ise PI3K protein düzeyinin DMH grubuna göre belirgin ve anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. DMH + AgC II uygulanan grubunun PI3K protein düzeyinin DMH + AgC I grubuna göre daha fazla azaldığı ve

bu azalmanın istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3-K)/PTEN/Akt sinyali, kolon kanseri de dâhil olmak üzere çeşitli tümörlerde aşırı aktiftir. Bu yolun aktivasyonu, bir kanser hücresinin biyolojisinin altında yatan apoptoz, metabolizma, hücre çoğalması ve hücre büyümesi gibi çoklu biyolojik süreçleri düzenlediği belirtilmektedir [332].

PI3 Kinaz yolu, kanserde sıklıkla düzensizdir ve PI3 Kinaz sinyal yolağı AKT, PDK ve mTOR gibi çoklu hücrel mekanizmaları içeren proteinleri kapsar [333]. Fosfatidilinositol 3-kinaz/AKT / rapamisininin memeli hedefi (PI3K/Akt/mTOR) sinyal yolağı, kolorektal kanser dâhil olmak üzere insan malignitelerinin büyük kısmında önemli bir rol oynamaktadır [334,335]. Protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen serin / treonin protein kinazı (AKT), PI3K'nın aşağı akış etkilerinin çoğuna aracılık eder ve sonuç olarak PI3K yolu tarafından hem normal hem de patolojik sinyalizasyonda merkezi rol oynar. AKT ailesi üç üyeden oluşur. Bunlar; AKT1, AKT2 ve üç farklı gen tarafından kodlanan AKT3'tür. Her üç izoform da yapısal olarak homologdur ve benzer aktivasyon mekanizmalarında rol oynarlar [336,337]. AKT1 ve AKT2 birçok organın hücrelerinde her yerde ifade edilir ve AKT3 sinir dokusunda bol miktarda bulunur [341]. mTOR, PI3K / AKT'nin bilinen önemli bir efektörüdür. mTOR bir serin/treonin protein kinaz olarak işlev görür ve mTORC1 ve mTORC2 olarak iki farklı fonksiyonel kompleks halinde bulunur. mTORC1, protein sentezini kontrol eden p70S6K ribozomal kinaz (S6K) ve ökaryotik translasyonu başlatma faktörü 4E (eIF4E) bağlayıcı proteinini (4E-BP1) fosforile ve aktive eder [338,340]. Memelilerde S6K ailesi, sırasıyla iki farklı gen tarafından kodlanan p70S6K1, p85S6K1, p54S6K2 ve p56S6K2 proteinlerinden oluşan S6K1 (RPS6KB1) ve S6K2 (RPS6KB2) dir [339]. mTORC1-S6K1 ekseninin transkripsiyon, translasyon, protein ve lipid sentezi, hücre gelişmesi / büyüklüğü ve hücre metabolizması dâhil temel hücrel süreçleri kontrol ettiği düşünülmektedir [340].

PI3K /AKT aktivasyonu hücre proliferasyonuna ve hayatta kalmasına yol açtığından insan kanserlerinde en çok hedeflenen yoldur [127]. AKT kinaz, hücre içi hücre sinyalleşmesinde önemli bir moleküler bağlantıdır ve aktivasyonu, hücrelerin sağ kalımı için hem gerekli hem de yeterli olarak kabul edilmektedir. PI3K aktivasyonuna yanıt olarak bu enzim, kinazlar, transkripsiyon faktörleri ve diğer düzenleyici moleküller dâhil olmak üzere bir dizi hedefin aktivitesini fosforile eder ve düzenler [337]. Özellikle AKT'nin mitokondriyal fonksiyonlara bağlı apoptozun intrinsik yoluna katılan Kaspaz-9 da dâhil olmak üzere birçok proapoptotik proteinin fosforilasyonu ve inaktivasyonu yoluyla hücre sağ kalımını artırdığı gösterilmiştir. Apoptoz sırasında kaspaz 9, pivotal efektör kaspaz 3'ü aktive eder. Kaspaz 3'ün aktivasyonu ve yarılması, apoptozun son fazı olan uygulama fazının bir göstergesidir [342,343]. Ayrıca AKT, anti-apoptotik genlerin ve CDKN1B geninin transkripsiyonuyla sonuçlanan NF-κB ve FOXO (transkripsiyon faktörlerinin Forkhead ailesi) transkripsiyon faktörlerini aktive eder [336,337].

PI3K / Akt yolağının aktivasyonunun birçok kanserin oluşumundan ve metastazından sorumlu olduğu gösterildiği için bu yolağın engellenmesi, kolorektal kanserin tedavi edilmesinde

terapötik bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir [344,345]. İnsan kolorektal kanserlerinde Akt fosforilasyonunun hücre proliferasyonu ve apoptoz inhibisyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [346,347]. Kanser hücrelerin canlılığını sürdürmesi, hücrelerin çoğalması ile apoptozu arasındaki dengesizliği göstermektedir. Bu nedenle, kanser tedavisi ve önleme stratejisinin temel amacı tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemek ve ölümlerini teşvik etmektir [348]. Bu çalışmanın sonuçları da çalışılan gümüş karben kompleksinin PI3K/AKT/mTOR yolağını inhibe ettiğini ve apoptotik yolağı aktive ederek anti kolon kanser aktivitesi sergilediğini göstermektedir.

Bu tez çalışması *in vivo* düzeyde yapılmış olup sonuçları literatür çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde, gümüş karben uygulanan tedavi gruplarında Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9 protein ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu, Bcl-2, Akt1, p-Akt1, PI3K, p-PI3K, mTOR ve p-mTOR protein ekspresyon düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ve sadece gümüş karben uygulanan grupların protein ekspresyon düzeylerinde belirgin bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Bu tez çalışmasının diğer parametreleri incelendiğinde kolorektal kanser oluşturularak gümüş karben ile tedavi edilen ratlardaki kript sayısı sadece DMH uygulanan gruba göre belirgin bir azalma göstermiştir. Bu sonuç da, gümüş karben molekülün anti kolon kanser aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir ve western blot çalışmasından elde edilen sonucu desteklemektedir. Sonuç olarak, bu tez çalışması literatür çalışmalarına göre daha kapsamlı olup, elde edilen sonuçlar birbirini destekler nitelikte olduğu için yeni bir gümüş karben kompleksinin kolorektal kanser üzerine etki mekanizmasının açıklanmasına yardımcı olacaktır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar literatür eksikliğini giderecek potansiyele sahiptir ve bundan sonraki çalışmalara da yardımcı olabilecek niteliktedir.

ÖNERİLER

Kanser tedavisi, hücre sinyal yollarının karmaşıklığı, tümör hücresinin heterojenliği, mevcut tedaviye direnç gelişimi ve kaçınılmaz yan etkilerden dolayı büyük zorluklarla karakterizedir. Bu nedenle, kanseri tedavi etmek ve yan etkileri azaltmak için yeni ve daha etkili ajanların bulunması gerekmektedir. Son yıllarda yeni alternatif kemoterapötik bileşiklerinin sentezinin giderek arttığı görülmektedir. Toksik özelliği daha az olan metaller kullanılarak sağlıklı hücrelere zarar vermeyen, tümörlü hücreyi hedef alan, metal bazlı ilaçlar geliştirilmeye başlanılmıştır. Gümüş kendi başına düşük toksisiteye sahiptir ve organik gümüş kompleksleri olarak toksik etkileri daha da azaltılabilmektedir. Gümüş bileşikleri antikanser etkiye sahip oldukları için Ag(I)-NHC komplekslerinin de etkili yeni bir antikanser ajan geliştirilmesinde büyük bir potansiyele sahip olduğu düşünüldüğünden bu konuyla ilgili daha fazla çalışma yapılması önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Madencioğlu, S. (2020). *Resveratrolün Kolon Kanseri Hücrelerinde Hücre Siklusu Üzerine Etkisi*, Doktora Tezi, Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [2] Hoydahl, O., Edna, T. H., Xanthoulis, A., Lydersen, S., Endreseth, B. H. (2018). Long-term trends in colorectal cancer: incidence, localization, and presentation, *BMC Cancer*, C. 2020 (20), 1077.
- [3] Qian, X., Zhao, Y., Zhang, T., Fan, P. (2022). Downregulation of MACC1 facilitates the reversal effect of verapamil on the chemoresistance to active metabolite of irinotecan in human colon cancer cells, *HELIYON*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11294>.
- [4] Tuzcu, M., Aslan, A., Tuzcu, Z., Yabas, M., Bahcecioglu, I. H., Ozercan, I. H., Kucuk, O., Sahin, K. (2012). Tomato powder impedes the development of azoxymethane-induced colorectal cancer in rats through suppression of COX-2 expression via NF- κ B and regulating Nrf2/HO-1 pathway, *Molecular nutrition & food research*, C. 56(9), 1477-1481.
- [5] Islam, S., Wang, S., Bowden, N., Martin, J., Head, R. (2022). Repurposing existing therapeutics, its importance in oncology drug development: Kinases as a potential target, *British Journal of Clinical Pharmacology*, C. 88(1), 64-74.
- [6] Wongkaewkhiaw S., Wongrakpanich A., Krobthong S., Saengsawang W., Chairoungdua A., Boonmuen N. (2022). Induction of apoptosis in human colorectal cancer cells by nanovesicles from fingerroot (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.), *PLoS ONE*, C. 17(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266044>.
- [7] Mishra, J., Dromund, J., Quazi, S. H., Karanki, S. S., Shaw, J. J., Chen, B., Kumar, N. (2013). Prospective of Colon Cancer Treatments and Scope for Combinatorial Approach to Enhanced Cancer Cell Apoptosis, *Crit Rev Oncol Hematol*, C. 86(3), 232–250. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.09.014.
- [8] Madencioğlu, S., Becer, E., Kabadayı, H., Vatansever, H. S., Yücecan, S. (2021). Resveratrol Triggers Apoptosis In Colon Cancer Cells Rather Than Senescence, *Progress in Nutrition*, C. 23(1).
- [9] Yang, S.Y., Sales, Y.K., Buller, A., Seifalian, A.F., Winslet, M.C. (2009). Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy, *Trends in Molecular Medicine*, C. 15(5), 225-233.
- [10] Haque, R. A., Salman, A. W., Budagumpi, S., Abdullah, A. A.-A., Majid, A. M. S. A. (2013). Sterically Tuned Ag(I)- And Pd(II)-N-heterocyclic Carbene Complexes Of Imidazol-2-Ylidenes: Synthesis, Crystal Structures, And In Vitro Antibacterial And Anticancer Studies, *Metallomics*, C. 5(6), 760–769.
- [11] Sanchez, O., Gonzales, S., Fernandez, M., Higuera-Padilla, A. R., Leon, Y., Coll, D., Vidal, A., Taylor, P., Urdanibia, I., Goite, M. C., Castro, W. (2015). Novel Silver(I)- And Gold(I)-N-Heterocyclic Carbene Complexes. Synthesis, Characterization And Evaluation Of Biological Activity Against Tumor Cells, *Inorganica Chimica Acta*, C. 437, 143-151.
- [12] Gandin, V., Pellei, M., Marinelli, M., Marzano, C., Dolmella, A., Giorgetti, M., Santini, C. (2013). Synthesis And In Vitro Antitumor Activity Of Water Soluble Sulfonate- And Ester-Functionalized Silver(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes, *Journal of Inorganic Biochemistry*, C. 129, 135–144.
- [13] Haque, R. A., Choo, S. Y., Budagumpi, S., Iqbal, M. A., Abdullah, A. A. A. (2015). Silver (I) Complexes Of Mono-And Bidentate N-Heterocyclic Carbene Ligands: Synthesis, Crystal Structures, And In Vitro Antibacterial And Anticancer Studies, *European Journal Of Medicinal Chemistry*, C. 90, 82-92.
- [14] Akkoç, S., İlhan, I. O., Gök, Y., Upadhyay, P. J., Kayser, V. (2016). In Vitro Cytotoxic Activities Of New Silver And Palladium N-Heterocyclic Carbene Complexes Derived From Benzimidazolium Salts, *Inorganica Chim. Acta*, C. 449.
- [15] Sarıova, A. N. (2019). *Meme Kanseri (Mcf-7) Hücre Hattında Arbutinin Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [16] Atıcı, E. (2007). Tıp tarihinde kanser ve lösemi, *Türk onkoloji dergisi*, C. 22(4), 197-204.
- [17] Dilsiz, N. (2004). *Moleküler Biyoloji*. Palme Yayıncılık, Ankara.

- [18] Darendelioğlu, E. (2017). *İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde (Ht-29) Lactobacillus Reuteri Türünden Elde Edilen Bazı Kısa Zincirli Yağ Asitlerinin Apoptotik Etkilerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Bingöl-Bitlis Eren Üniversiteleri, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [19] Lüleyp H. Ü. (2008). *Moleküler Genetiğin Esasları*. Nobel Kitabevi, Ankara, 293-316.
- [20] İçli, F., Akbulut, H. (2005). *Onkolojiye Giriş*. İn. İliçin, G., Bibberoğlu, K., Süleymanlar, G. ve ark, 2007-2014.
- [21] Aliustaoğlu, M. (2009). *Temel Kanser Fizyopatolojisi*. Klinik Gelişim. 46-49.
- [22] Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Balıkesir Sağlık Bil Dergisi*, C. 5(3), 154-165.
- [23] Hall, A. B., Gakidis, M. A. M., Glogauer, M., Wilsbacher, J. L., Gao, S., Swat, W., Brugge, J. S. (2006). Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcγR-mediated phagocytosis, *Immunity*, C. 24(3), 305-16.
- [24] Yüksel, M. (2019). *Curcuma Longa Linn Ve Zingiber Officinale Roscoe Bitkilerinden Uçucu Yağ Eldesi ve Bazı Kanser Hücre Hatları Üzerinde Sitotoksik Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [25] Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of Cancer, *Cell*, C. 100, 57-70.
- [26] Floor, S., Dumont, J. E., Maenhaut, C., Raspe, E. (2012). Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time?, *Trends in Molecular Medicine*, C. 18(9), 510-515.
- [27] Gürses, H. E. (2015). *Myrtus Communis (Mersin Otu) 'In Meme Kanseri Ve Baş-Boyun Kanseri Hücre Hatlarında Terapötik Etkisinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Turgut Özal Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı.
- [28] Özgün, G., Türker, P. F., Kaya, B. (2020). Assessment of Quality of Life, Anxiety and Anthropometric Measurements of Oncology Patients According to Cancer Types, *H.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, C. 7(3), 345-368.
- [29] Akturan, S., Gümüş, B., Özer, Ö., Balandız, H., Erenler, A. K. (2019). TÜİK verilerine göre Türkiye'de 2009 ve 2016 yılları arasındaki ölüm oranları ve nedenleri, *Konuralp Tıp Dergisi*, C. 11(1), 9-16.
- [30] Yılmaz, M., Yıldırım, H., Mayda, A. S., Bolu, F., Durak, A. A., Şener, Ö. (2017). Düzce'de Yaşayanların Kanser ve Kanser Risk Faktörleri Hakkında Bilgi Düzeyi, *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, C. 7(1), 01-10.
- [31] Kaş, F. (2018). *Kemoterapi Alan Hastaların Apoptozis Markerleri, Tümör Belirteçleri, Mikro Rna Düzeyleri İle Klinik, Laboratuvar ve Radyolojik Görüntüleme Verileri Açısından Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı.
- [32] Sağlık Bakanlığı. (2021). *Türkiye Kanseri İstatistikleri 2017*, Ankara, 2021.
- [33] Yokuş, B., Çakır, D. Ü. (2012). Kanseri biyokimyası, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, C. 1, 7-18.
- [34] https://hsqm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf. Erişim: 24.12.2022
- [35] Hanahan, D., Weinberg Robert, A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, C. 144(5), 646-674.
- [36] Aktaş, S. H. (2010). *Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri Ve Mide Kanseri Üzerine Etkisinin İn Vivo ve İn Vitro İncelemesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü.
- [37] Fışkın, K. (2002). *Genetik Kavramlar*. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. Sayfalar 635-651.
- [38] Kırıçoğlu, C. E., Öztürk, C., Köktürk, N. (2003). Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Üzerinde Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü ve İnhibitörlerinin Yeri, *Solunum*, C. 5(3), 146-152.

- [39] Sevimli, M. (2018). *Borik Asitin İn Vitro Ortamda Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
- [40] Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, C. 5(28), 1-17.
- [41] Göksu, E., Kazan, S. (2017). Metastazların Moleküler Mekanizmaları, *Türk Nöroşir Dergisi*, C. 27(2), 137-142.
- [42] Keleş, D. (2015). *Kolon Kanseri Hücrelerinde Rhoc Yolakları ile Ekstrasellüler Proteoliz Arasındaki Olası İlişkinin İnvazyon ve Metastaz Açısından Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [43] Güllü, İ. H., Akalın, İ. (2005). Metastaz Biyolojisi, *Üroonkoloji Bülteni*, C. 4, 16-19
- [44] Bamberger, E. S., Perrett, C. W. (2002). Angiogenesis in epithelial ovarian cancer, *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, C. 55, 348-359. <https://dx.doi.org/10.1136%2Fmp.55.6.348>.
- [45] Aktaş, C., Kurtman, C., Kocacan, S. A., Sarı, E., İmamoğlu, G. İ., Şahmaran, T., Yılmaz, C., Adaş, Y., Ere, T. (2016). Anjiyogenez, *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics*, C. 2(1), 35-9.
- [46] Özkal, Baydın, P., Akbulut, H. (2013). Kanserde damar endoteline yönelik gen tedavisi ajanları geliştirilmesi, *Türk Onkoloji Dergisi*, C. 28(4), 179-186.
- [47] Üyetürk, Ü., Öksüzöğlü, B., Yalçıntaş Arslan, Ü., Alkış, N. (2011) Metastatik kolon kanseri tedavisinde bevacizumab kullanımına bağlı ince barsak perforasyonu gelişen bir olgu ve literatürün gözden geçirilmesi, *Türk Onkoloji Dergisi*, C. 26(4), 178-181.
- [48] Seyran Çelik, L., Mete, U. Ö., (2017). Overlerde Anjiyogenez Etkileyen Faktörler, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, C. 26(3), 330-341.
- [49] Aydoğan Türkoğlu, S., Poyrazlı, F., Okuyan, D., Köçka, F. (2021). Hipoksi ve Kanser, *Çanakkale Onsekiz Mart University Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, C.7(3), 450-463.
- [50] Develi, E. S. (2019). *Yeni Protoflavon Bazlı Hibrid Bileşiklerin Meme Kanseri Hücre Soylarında Sitotoksik/Apoptotik Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İstinye Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi.
- [51] Memmedov, C. (2006). *Kersetin ve Epigallokatesin Gallat'ın C6 Glioblastoma Multiforme Kanseri Hücreleri Üzerine Toksik Etkilerinin ve Bu Etkilerde Kalsiyumun Rolünün Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı.
- [52] Pehlivanoglu, B., Aysal, A., Ekmekçi, S., Şahin, Y., Toper, M. H., Gündoğdu, B., Gündoğdu, İ. H., Kelten Talu, C., (2019) . Molecular Pathologic Mechanisms of Neoplastic Diseases, *J Curr Pathol*, C. 2, 62-80.
- [53] Kelland L. (2007). Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway, *Clinical Cancer Research*, C. 13(17), 4960-4963.
- [54] Yavuz Dokgöz, E. (2020). *Pterostilben Ve Laktat Dehidrogenaz İnhibitörünün Kanser Hücre Hatlarında Tümör Metabolizmasına Etkisinin Araştırılması*, Doktora Tezi, İstanbul Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [55] Çekmen, M. B., Altundağ Kara, S., Ada, S., Yücel, B. (2019). *Lösemi Hücre Hatlarında Glukoz Kısıtlamasında Stat3 Gen Ekspresyonlarının Araştırılması*, Sonuç Raporu, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi.
- [56] Mızrak, D., Akbulut, H. (2015). Kanser hastası ve açlık, *Türk Onkoloji Dergisi*, C. 30(3),152-157.
- [57] Gürpınar, Y. (2021). *Kanser Kök Hücrelerinde PFKFB İzoenzimlerinin Rolü*, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı.
- [58] Kısaçam, M. A., Temizer, Ozan P. S. (2017). Kanser Hücrelerinin Metabolik İhtiyaçları ve Bağımlılıkları, *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*, C. 31(1), 67 - 72 .
- [59] Çokmert, S., Altun, Z., Öztop, İ., Aktaş, S., Olgun, N. (2016). Kolorektal Kanser ve İmmünoterapi Colorectal Cancer And Immunotherapy, *Deü Tıp Fakültesi Dergisi*, C. 30(3), 131-137.

- [60] Ateşli, Ö. (2013). *Monoklonal Antikorlarla Kanseri Tedavisi*, Bitirme Tezi, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı.
- [61] Eryılmaz, E. (2021). *Farklı Direnç Fenotiplerine Sahip Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Apigenin ve Fenetil İzotiyosiyanat (Peitc) Kombinasyonu İle Oluşturulan Prooksidan Kanseri Terapi Modeli Etkinliğinin Ve Moleküler Hedeflerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı.
- [62] Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., Capaccioli, S., Orlandini, S. Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis, *J Cell Physiol.*, C. 182(1), 41-49.
- [63] Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer.*, C. 26(4), 239-257.
- [64] Nathan, C., Ding, A. (2011). Nonresolving inflammation, *Cell*, C. 140, 871-882.
- [65] Chaabane, W., User S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny J., Los M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, C. 61, 43-58.
- [66] Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, C.15, 81-94.
- [67] Yılmaz, İ. (2005). *Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikosektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği.
- [68] Adrain, C., Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas, *Trends Biochem Sci.*, C. 26, 390-397.
- [69] Adams, J. M., Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family, *Trends in Biochemical Sciences*, C. 26, 61-66.
- [70] Abedin, M. J., Wang, D., McDonnell, M. A., Lehmann, U., Kelekar, A. (2007). Autophagy Delays Apoptotic Death in Breast Cancer Cells Following DNA Damage, *Cell Death and Differentiation*, C. 14, 500-510.
- [71] Nehls, O., Okech, T., Hsieh, C. J., Enzinger, T., Sarbia, M., Borchard, F., Gruenagel, H. H., Gaco, V., Hass, H. G., Arkenau, H. T., Hartmann, J. T., Porschen, R., Gregor, M., Klump, B. (2007). Studies on P53, Bax and Bcl-2 Protein Expression and Microsatellite Instability in Stage III (UICC) Colon Cancer Treated by Adjuvant Chemotherapy: Major Prognostic Impact of Proapoptotic Bax, *British Journal of Cancer*, C. 96, 1409-1418.
- [72] Mousavia, S. H., Afshari, J. T., Brook, A., Anarkooli, I. J. (2009). Role of Caspases and Bax Protein in Saffron-Induced Apoptosis in MCF-7 Cells, *Food and Chemical Toxicology*, C. 47, 1909-1913.
- [73] Millau, J. F., Mai, S., Bastien, N., Drouin, R. (2010). p53 functions and cell lines: have we learned the lessons from the past?. *BioEssays*, C. 32(5), 392-400.
- [74] Arbiser, J. L., Bonner, M. Y., Gilbert, L. C. (2017) Targeting the duality of cancer, *NPJ Precis. Oncol.*, C. 1.
- [75] Xu, W., Jing, L., Wang, Q., Lin, C.-C., Chen, X., Diao, J., Liu, Y., Sun, X. (2015). Bas-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution, *Oncotarget*, C. 6, 30017–30034.
- [76] Lopez, J., Tait, S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within, *Br. J. Cancer*, C. 112, 957–962.
- [77] Hassan, M., Watari, H., Abu Almaaty, A., Ohba, Y., Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Res. Int.* C. 2014.
- [78] Liu, Y., Zhu, X. (2017) Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases, *Transl. Neurodegener.*, C. 6, 21.
- [79] Villa-Pulgarín, J. A., Gajate, C., Botet, J., Jimenez, A., Justies, N., Varela-M, R. E., Cuesta-Marbán, A., Müller, I., Modolell, M., Revuelta, J. L., et al. (2017). Mitochondria and lipid raft-located FoF1 -

ATP synthase as major therapeutic targets in the antileishmanial and anticancer activities of ether lipid edelfosin, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, C. 11.

- [80] Bao, H., Zhang, Q., Zhu, Z., Xu, H., Ding, F., Wang, M., Du, S., Du, Y., Yan, Z. (2017). BHX, a novel pyrazoline derivative, inhibits breast cancer cell invasion by reversing the epithelial-mesenchymal transition and down-regulating Wnt/ β -catenin signaling, *Sci. Rep.*, C. 7, 9153.
- [81] Zaman, S., Wang, R., Gandhi, V. (2014). Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies, *Leuk. Lymphoma*, C.55, 1980–1992.
- [82] Pfeffer, C. M., Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy, *International journal of molecular sciences*, C. 19(2), 448.
- [83] Danial, N., Korsmeyer, N. S. J. (2004). Cell death: critical control points, *Cell*, C. 116, 205-219.
- [84] Igney, F. H., Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nature Reviews Cancer*, C. 2, 277-288.
- [85] Ulukaya, E., Acilan, C., Ari, F., Ikitimur, E. I., Yilmaz, Y. K. (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively, *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry)*, C. 36, 261-269.
- [86] Adams, J. W., Sakata, Y., Davis, M. G., Sah, V. P., Wang, Y., Liggett, S. B., ... & Dorn, G. W. (1998). Enhanced G α_q signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, C. 95(17).
- [87] Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu, S., Liang, X. (2017). Virus infection and death receptor-mediated apoptosis, *Viruses*, C. 9(11), 316.
- [88] Ulukaya, E., Pirianov, G., Kurt, M. A., Wood, E. J., Mehmet, H. (2003). Fenretinide induces cytochrome c release, caspase 9 activation and apoptosis in the absence of mitochondrial membrane depolarisation, *Cell Death & Differentiation*, C. 10(7), 856-859.
- [89] Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death, *Cell*, C. 85(6), 803-815.
- [90] Ulukaya E. (2003). Apoptozis ders notları, Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf, Erişim Tarihi: 04.05.2007.
- [91] Ashkenazi, A. (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, C. 19, 325-331.
- [92] Tait, S. W. G., Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death outer membrane permeabilization and beyond, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, C. 11, 621-632.
- [93] Kashyap, D., Garg, V. K., Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, C. 125, 73-120.
- [94] Riedl, S. J., Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: Signalling platform of cell death, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, C. 8, 405-413.
- [95] Susin, S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, C. 397, 441-446.
- [96] Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., Liang, J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, C. 37, 719–727.
- [97] Favaloro, B., Allocati, N., Graziano V., Di, Ilio C., De, Laurenzi V. (2012). Role of apoptosis in disease, *Aging (Albany NY)*, C. 4(5), 330-349.
- [98] Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C. (2005). Vital functions for lethal caspases, *Oncogene*, C. 24, 5137–5148
- [99] Krajewska, M., Kim, H., Shin, E., Kennedy, S., Duffy, M. J., Wong, Y. F., Marr, D., et al. (2005). Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies, *Clin Cancer Res.*, C. 11, 5462–5471

- [100] Yuan, C. Q., Ding, Z. H. (2002). Structure and function of caspases, *Guowai Yixue Fenzi Shengwuxue Fence*, C. 24, 146–151
- [101] Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Ankara: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu*.
- [102] D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy, *Cell biology international*, C. 43, 582-592.
- [103] Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology, *Nat Rev Immunol.*, C.15, 388- 400.
- [104] Peña-Blanco, A., García-Sáez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis, *FEBS J.*, C. 285, 416-431.
- [105] Graham, R. K., Ehrnhoefer, D. E., Hayden, M. R. (2011).Caspase-6 and neurodegeneration, *Trends Neurosci*, C. 34, 646-656.
- [106] Boice, A., Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting apoptotic caspases in cancer, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.*, C.1867(6), 118688.
- [107] Tinel, A., Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress, *Science*, C. 304, 843-846.
- [108] Liu, B., Wang, C., Chen, P., Cheng, B. Cheng, Racki Y. (2018). induces chemotherapy resistance in esophageal carcinoma by upregulating the PI3K/AKT pathway and Bcl-2 expression, *OncoTargets Ther*, C. 11, 211–220.
- [109] Sochalska, M., Tuzlak, S., Egle, A., Villunger, A. (2015). Lessons from gain- and loss-of-function models of pro-survival Bcl2 family proteins: implications for targeted therapy, *FEBS J.*, C. 282, 834–849
- [110] Zhang, Y. H., Wu, Y. L., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T. (2011). Reactive oxygen species contribute to oridonin-induced apoptosis and autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells, *Acta Pharmacol.*, C. 32, 1266–1275.
- [111] Goan, Y. G., Wu, W. T., Liu, C. I., Neoh, C. A., Wu, Y. J. (2019). Involvement of mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and the PI3K/AKT/mTOR pathway in nobiletin-induced apoptosis of human bladder cancer cells, *Molecules*, C. 24(16), 2881. <https://doi.org/10.3390/molecules24162881>.
- [112] Volkmann, N., Marassi, F. M., Newmeyer, D. D., Hanein, D. (2014). The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis, *Cell Death Differ*, C. 21, 206–215.
- [113] Choi, E. et al. (2019). AKT1-targeted proapoptotic activity of compound K in human breast cancer cells, *J. Ginseng Res.*, C. 43, 692–698.
- [114] Adams, J. M., Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing roles as cancer targets, *Cell Death Differ*, C. 25, 27–36.
- [115] Li, P. et al. (2019). Nicotinic agonist inhibits cardiomyocyte apoptosis in CVB3-induced myocarditis via alpha3beta4-nAChR/PI3K/Akt-dependent survivin upregulation, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, C. 2019.
- [116] Heavey, S., O'Byrne, K. J., Gately, K. (2014). Strategies for co-targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in NSCLC, *Cancer Treat. Rev.*, C. 40, 445–456 .
- [117] Garcia-Regalado, A., Vargas, M., Garcia-Carranca, A., Arechaga-Ocampo, E., Gonzalez-De la Rosa, C. H. (2013). Activation of Akt pathway by transcriptionindependent mechanisms of retinoic acid promotes survival and invasion in lung cancer cells, *Mol. Cancer.*, C. 12, 44.
- [118] Geng, H. X. et al. (2017). 14,15-EET suppresses neuronal apoptosis in ischemiareperfusion through the mitochondrial pathway, *Neurochem. Res.*, C. 42(10), 2841–2849 .
- [119] Liu, R., Chen, Y., Liu, G., Li, C., Song, Y., Cao, Z., ... & Liu, Y. (2020). PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers, *Cell death & disease*, C. 11(9), 1-12.

- [120] Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., Waterfield, M. D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, C. 17, 615–675.
- [121] Vivanco, I., Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer, *Nat Rev Cancer.*, C. 2, 489–501.
- [122] Engelman, J. A., Luo, J., Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3- kinases as regulators of growth and metabolism, *Nat Rev Genet.*, C. 7, 606–619.
- [123] Zhao, L., Vogt, P. K. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation, *Oncogene*, C. 27, 5486–5496.
- [124] Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers, *Science*, C. 304(5670), 554–554.
- [125] Bauer, T. M., Patel, M. R., Infante, J. R. (2015). Targeting PI3 kinase in cancer, *Pharmacology & therapeutics*, C. 146, 53–60.
- [126] Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., Mills, G. B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery, *Nat Rev Drug Discov.*, C. 4, 988–1004.
- [127] Yuan, T. L., Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme, *Oncogene*, C. 27(41), 5497–5510.
- [128] Pacold, M. E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C. T., Walker, E. H., Hawkins, P. T., Stephens, L., Eccleston, J. F., Williams, R. L. (2000). Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma, *Cell*, C. 103, 931–943.
- [129] Hardt, M., Chantaravisoot, N., Tamanoi, F. (2011). Activating mutations of TOR (target of rapamycin), *Genes Cells*, C. 16, 141–151.
- [130] Fung-Leung, W. P. (2011). Phosphoinositide 3-kinase delta (PI3Kdelta) in leukocyte signaling and function, *Cell Signal*, C. 23, 603–608.
- [131] Hsu, J. H., Shi, Y., Frost, P., Yan, H., Hoang, B., Sharma, S., Gera, J., Lichtenstein, A. (2004). Interleukin-6 activates phosphoinositide-3' kinase in multiple myeloma tumor cells by signaling through RAS-dependent and, separately, through p85-dependent pathways, *Oncogene*, C. 23, 3368–3375.
- [132] Deane, J. A., Fruman, D. A. (2004). Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation, *Annu Rev Immunol.*, C. 22, 563–598.
- [133] Fruman, D. A. (2004). Towards an understanding of isoform specificity in phosphoinositide 3-kinase signalling in lymphocytes, *Biochem Soc Trans.*, C. 32, 315–319.
- [134] Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B., Foukas, L. C. (2005). Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice, *Trends Biochem Sci.*, C. 30, 194–204.
- [135] Maehama, T., Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, *J Biol Chem.*, C. 273, 13375–13378.
- [136] Chow, L. M., Baker, S. J. (2006). PTEN function in normal and neoplastic growth, *Cancer Lett*, C. 241, 184–196.
- [137] Zbuk, K. M., Eng, C. (2007). Cancer phenomics: RET and PTEN as illustrative models, *Nat Rev Cancer*, C. 7, 35–45.
- [138] Suzuki, A., Nakano, T., Mak, T. W., Sasaki, T. (2008). Portrait of PTEN: messages from mutant mice, *Cancer Sci.*, C. 99, 209–213.
- [139] Ali, I. U., Schriml, L. M., Dean, M. (1999). Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity, *J Natl Cancer Inst.*, C. 91, 1922–1932.
- [140] Cheung, M., Testa, J. R. (2013). Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy, *Curr Cancer Drug Targets*, C. 13, 234–244.

- [141] Skolnik, E. Y., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fischer, R., Drepps, A., Ullrich, A., & Schlessinger, J. (1991). Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases, *Cell*, C. 65, 83–90.
- [142] Kang, S., Denley, A., Vanhaesebroeck, B., Vogt, P. K. (2006). Oncogenic transformation induced by the p110beta, -gamma, and -delta isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase, *Proc Natl Acad Sci*, C. 103, 1289–1294.
- [143] Shaw, R. J., Cantley, L. C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth, *Nature*, C. 441, 424–430.
- [144] Hacıfazlıoğlu, Ç. (2009). *Tüm Abdomen Bt İncelemelerinde Kolon Pozisyon Varyasyonlarının İncelenmesi*, Uzmanlık Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, İzzet Baysal Tıp Fakültesi.
- [145] Eray, İ. C. (2009). *Deneyisel Kolit Modeli Üzerine Glutamin, N-Asetil Sistein Ve İntrarektal Metotreksat'ın Etkilerinin İncelenmesi*, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [146] Lamb, M. N., Kaiser, A. M. (2015). Anatomy, Physiology, And measurement of physiologic funtion For Colorectal Surgery, *Scientifi C American Surgery*, C. 03(15), 1-20.
- [147] Pınar, İ. (2014). *Konvansiyonel Kolonoskopi İle Geçilemeyen Obstrüktif Kolon Kitleli Ya Da Dolikokolon Olan Olguların 64 Kesitli Bilgisayarlı Tomografi Sanal Kolonoskopi İle Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [148] Ay, E. (2013). *Mekanik İnce ve Kalın Barsak Tıkanıklıklarında Mortaliteyi Etkileyen Faktörler*, Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [149] Aksoy, E. (2021). *Led Tabanlı Fotodinamik Tedavide Işık Dozu Etkisinin Kolorektal Kanser Hücreleri İçin İn Vitro Olarak Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [150] Harkins, J. M., Sajjad, H. (2022). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Sigmoid Colon. *StatPearls Publishing*. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549824/>)
- [151] Manoğlu, B., Altun, Z., Yavuzşen, T., Aktaş, S. (2019). Kolorektal Kanser ve Dolaşımdaki Tümör DNA'sı: Geleceğin Biyobelirteci, *Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi*, C. 29(1), 11-20.
- [152] Siegel, R. L., Sahar, L., Portier, K. M., Ward, E. M., Jemal, A. (2015). Cancer Death Rates in US Congressional Districts, *CA Cancer J Clin.*, C. 65(5), 339-344.
- [153] Tezerji, S., Fallah, A., Talaei, B. (2022). The effect of resveratrol and quercetin intervention on azoxymethane-induced colon cancer in Rats model, *Clinical Nutrition Open Science*.
- [154] Cho, Y. A., Lee, J., Oh, J. H., Chang, H. J., Sohn, D. K., Shin, A., Kim, J. (2019). Genetic risk score, combined lifestyle factors and risk of colorectal cancer, *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, C. 51(3), 1033-1040.
- [155] Diyarbakırlıoğlu, C., Gürsu, R.U., Müderrisoğlu, C., Polat, H., Ulaş, N., Gür, C. (2014). Kolon Kanseri Hastalarının Demografik Özellikleri ve Tedavi Yanıtı, *İstanbul Med J.*, C. 15, 199-202.
- [156] Karabay, U.(2019). *Kolorektal Kanserlerde Çıkarılan Kolon Uzunluğunun Lenf Nodu Sayısı İle İlişkisi*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [157] Genç, S. (2020). *Vitis Vinifera Ekstraktı (Üzüm Çekirdeği) İle Sentezlenen Altın Nanopartiküllerinin İn Vitro Antikanser Etkilerinin Ve Kolon Kanseri Hücrelerine Karşı Gemsitabin İle Birlikte Kullanımlarının Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [158] Özsoy, S., Becer, E., Kabadayı, H., Vatansever, H. S., Yücecan, S. (2020). Quercetin-mediated apoptosis and cellular senescence in human colon cancer, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, C. 20(11), 1387-1396.
- [159] Usta, D. D. (2014). *Kolon kanser hücreleri için altın kaplı manyetik yüklü transfeksiyon ajanlarının kullanılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [160] Tuncer, D. (2018). Kolon Kanseri ve Diyet, *Güncel Gastroenteroloji*, C. 22(4), 211-222.
- [161] Canbay Durmaz, S. (2021). *Kolorektal kanserli hastalarda anatomik lokalizasyona bağlı olarak klinik ve patolojik bulguların incelenmesi*, Doktora Tezi, İnönü üniveritesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- [162] Şipşak, F. (2020). *Kolorektal kanserde epigenetik bir çalışma: line-1 retrotranspozonunda 5UTR metilasyon değişimlerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [163] Barzi, A., Lenz, A. M., Labonte, M. J., Lenz, H.-J. (2013). Molecular Pathways: Estrogen Pathway in Colorectal Cancer, *Clin Cancer Res.*, C. 19(21), 1-13.
- [164] Kim, S. E., Paik, H. Y., Yoon, H., Lee, J. E., Kim, N., Sung, M. K. (2015). Sex and gender-specific disparities in colorectal cancer risk, *World J Gastroenterol*, C. 21(17), 5167-5175.
- [165] Saif, M. W., Chu, E. (2010) Biology of colorectal cancer, *Cancer Journal*, C. 16, 196–201.
- [166] Khalek, F. J. A., Gallicano, G. I., Mishra, L. (2010). Colon cancer stem cells, *Gastrointestinal cancer research: GCR*, C. 1, 16.
- [167] Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell*, C. 61, 759–767.
- [168] Onar, O. (2022). *İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde Clitocybe Nebularis'in Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [169] Conti, L., Del Corno, M., Gessani, S. (2020). Revisiting the impact of lifestyle on colorectal cancer risk in a gender perspective, *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, C. 145, 102834.
- [170] Potter, J. D. (1993). Colon cancer: review of the epidemiology, *Epidemiol*, C. 15, 499–545.
- [171] Bruce, W. R., Giacca, A., Medline, A. (2000). Possible Mechanisms Relating Diet and Risk of Colon Cancer, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, C. 9, 1271–1279.
- [172] Kalkım, A., Dağhan, Ş., Taşkın, C. (2014). Yaşlı bireylerin kolorektal kanserin riskleri ve erken tanısına yönelik bilgi düzeylerinin ve bu kanserle ilişkili risklerinin incelenmesi, *SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, C. 5(3), 88-93.
- [173] Erarslan, E., Yüksel, İ. (2011). Obezite ve gastrointestinal kanser ilişkisi, *Yeni Tıp Dergisi*, C. 28(4), 203-206.
- [174] Çelik, B. (2019) . *Rezektabl Kolon Kanserinde Anastomoz Hattı Nüksüne Etki Eden Prediktif Faktörler*, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı.
- [175] Ballı, E. (2013). *Obezite, Obezitenin Tetiklediği Hastalıklar ve Tedavileri*, Bitirme Tezi, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi.
- [176] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers., C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Internet. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.
- [177] Park, H. C., Shin, A., Kim, B. W., Jung, K. W., Won, Y. J., Oh, J. H., Jeong, S. Y., Yu, C. S., Lee, B. H. (2013) . Data on the characteristics and the survival of korean patients with colorectal cancer from the Korea central cancer registry, *Ann Coloproctol.*, C. 29, 144-149. DOI: 10.3393/ac.2013.29.4.144.
- [178] Majek, O., Gondos, A., Jansen, L., Emrich, K., vd. (2013). Sex Differences in Colorectal Cancer Survival: Population-Based Analysis of 164,996 Colorectal Cancer Patients in Germany, *PLoS One*, C. 8, 7.
- [179] Hendifar, A., Yang, D., Lenz, F., vd. (2009). Gender Disparities in Metastatic Colorectal Cancer Survival, *Clin Cancer Res.*, C. 15(20), 6391–6397.
- [180] Du, X. L., Meyer, T. E., Franzini, L. (2007). Meta-analysis of Racial Disparities in Survival in Association With Socioeconomic Status Among Men and Women With Colon Cancer, *CANCER*, C. 109(11), 2161-2170.
- [181] Augustus, G. J., Ellis, N. A. (2018). Colorectal Cancer Disparity in African Americans Risk Factors and Carcinogenic Mechanisms, *The American Journal of Pathology*, C. 188(2), 291-303.
- [182] Boyle, P., Langman, J. S. (2000). ABC of colorectal cancer, *Epidemiology*, C. 321(7264), 805–808.
- [183] Stone, W. L., Papas, A. M. (1997). Tocopherols and the Etiology of Colon Cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, C. 89, 14.

- [184] Janout, V. (2001). Kolla'rova' H. Epidemiology of colorectal cancer, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacku Olomouc Czech Repub.*, C. 145, 5–10.
- [185] Haggard, F. A., Boushey, R. P. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics In Colon And Rectal Surgery*, C. 22(4), 191-197.
- [186] Oyeyemi, S. O., Braaten, T., Botteri, E., Bberstad, P., Borch, K. B. (2019). Exploring Geographical Differences In The Incidence Of Colorectal Cancer In The Norwegian Women and Cancer Study: a population-based prospective study, *Clinical Epidemiology*, C. 11, 669–682.
- [187] Ireland, M. J., March, S., Crawford-Williams, F., vd. (2017). A systematic review of geographical differences in management and outcomes for colorectal cancer in Australia, *Ireland et al. BMC Cancer*, C. 17,95.
- [188] Cho, S., Shin, A., Park, S. K., Shin, H. R., Chang, S. H., Yoo, K. Y. (2015). Alcohol Drinking, Cigarette Smoking and Risk of Colorectal Cancer in the Korean Multi-center Cancer Cohort, *Journal of Cancer Prevention*, C. 20(2), 147-152.
- [189] Tsong, W. H., Koh, W-P., Yuan, J-M., Wang, R., Sun, C.-L., Yu, M. C. (2007). Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study, *British Journal of Cancer*, C. 96, 821 – 827.
- [190] Çürük, G., Yüceler, N., Kaçmaz, H. (2017). Kolorektal Kanserden Korunma ve Hemşirenin Sorumlulukları, *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, C. 6(4), 224-233.
- [191] Amitay, E. L., Carr, P. R., Jansen, L., Roth, W., Alwers, E., vd. (2020). Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways, *British Journal of Cancer*, C. 122, 1604–1610.
- [192] Corley, D. A., Jensen, C. D., Marks, A. R. vd. (2013). Variation of Adenoma Prevalence by Age, Sex, Race, and Colon Location in a Large Population: Implications for Screening and Quality Programs, *Clin Gastroenterol Hepatol*, C. 11(2), 172-180.
- [193] ACS (2020). Cancer Facts & Figures 2020. Atlanta, The United States: American Cancer Society. Online. Available: <https://www.cancer.org/cancer/colonrectal-cancer/> (Accessed July 15, 2021).
- [194] Rawla, P., Sunkara, T., Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors, *Gastroenterology Rev.*, C. 14 (2), 89–103
- [195] Akkuzu, M. Z., Sezgin, O., Üçbilek, E., Yaraş, S., Özdoğan, O., Ateş, F., Aydın, F., Rızaoğlu, Balcı, H., Altıntaş, E. (2021) Colon Polyps with All Features: Third Step Center Experience in the Eastern Mediterranean, *İstanbul Med.*, C. 22(2), 100-104.
- [196] Bulur, A., Çakır, A. S. (2021). An Evaluation of Colorectal Polyps by Size and Advanced Histological Features: In a Secondary Referral Centre, *Turk J. Colorectal Dis.*, C. 31, 224-229.
- [197] Honda, T., Kai, I., Ohi, G. (1999). Fat and dietary fiber intake and colon cancer mortality: a chronological comparison between Japan and the United States, *Nutr Cancer*, C. 33, 95-99.
- [198] Şahintürk, Y., Çekin, A. H. (2018). Kolon polipleri: Lokalizasyon, histoloji, boyut - beş yıllık kolonoskopik değerlendirme, *Endoskopi*, C. 26(2), 57-60.
- [199] Munteanu, I., Mastalier, B. (2014). Genetics Of Colorectal Cancer, *Journal of Medicine and Life*, C. 7(4), 507-510.
- [200] Sakai, E., Nakajima, A., Kaneda, A. (2014). Accumulation of aberrant DNA methylation during colorectal cancer development, *World J Gastroenterol*, C. 20(4), 978-987
- [201] Barber, T. D., Mc Manus, K., Yen, K. W. vd. (2008). Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, C. 105(9), 3443-3448.
- [202] Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (2002). Colorectal tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW. The genetic basis of human cancer, 2nd ed. New York, McGraw-Hill. 583-612.
- [203] Bogaert, J., Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer, *Ann Gastroenterol.* C. 27(1), 9–14.

- [204] Hampel, H., Frankel, W. L., Martin, E., Arnold, M. vd. (2005) Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, *N Engl J Med.*, C. 352(18) , 1851-1860.
- [205] Tsai Y-J., Yuan, E. (Lan-Ting), Hsu, W-H., ve diğ., (2017). Muir-Torre syndrome manifesting as sebaceous adenoma/adenocarcinoma and colonic adenocarcinoma – A case report, *Advances in Digestive Medicine*, C. 4, 140-143.
- [206] Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.*, C.16, 6-21. DOI: 10.1101/gad.947102
- [207] Rencüzoğulları, A., Okkabaz, N., Boznıyık, O., Işık, Ö., Sevim, Y., Kuzu, A. (2021). herediter kolorektal kanser. *TKRCD*. 1-7. (https://www.tkrcd.org.tr/uploads/kolorektal-kanser/herediter_kolorektal_kanser_toplum.pdf).
- [208] Yüksel, S. (2014) . *Kolorektal Karsinoma Ve Öncü Lezyonlarında Mikrosatellit İnstabilitesinin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [209] Han, Yılmaz T., Avcı, T., Gülay, E. H. (2016). Peutz-Jeghers sendromu, *Ege Tıp Dergisi*, C. 55(3), 152-154.
- [210] Burris, C. K. H., Burrisa Rodriguez, M. E., Raven, M. L., vd. (2019). Muir-Torre Syndrome: The Importance of a Detailed Family History, *Case Rep Ophthalmol*, C. 10, 180–185.
- [211] Galiatsatos, P., Foulkes, W. D. (2006). Familial Adenomatous Polyposis. *American Journal of Gastroenterology*, C. 101(2), 385-398.
- [212] Goss, K. H., Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor, *J Clin Oncol.*, C. 18, 1967–1979.
- [213] Nathke I. (2004). APC at a glance, *J Cell Sci.*, C. 117, 4873–4875.
- [214] Akın, E., Dülger, U., Altıntoprak, F. (2021). Lynch Sendromunda Profilaktik Cerrahi: Ne Zaman Ve Nasıl? Güncel Yaklaşımlar Ve Literatür Derlemesi, *Çukurova Anestezi ve Cerrahi Bilimler Dergisi*, C. 4(1), 37-44.
- [215] Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., Burt, R. W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer, *Gastroenterology*, C. 138(6), 2044–2058
- [216] Ahadova, A., Seppala, T. T., Engel, C. (2021). Christoph Engel The “unnatural” history of colorectal cancer in Lynchsyndrome: Lessons from colonoscopy surveillance. *Int. J. Cancer.*, C. 148, 800–811.
- [217] Bucksch, K., Zacharia, S., Aretz, S. vd. (2020). Cancer risks in Lynch syndrome, Lynch-like syndrome, and familial colorectal cancer type X: a prospective cohort study, *BMC Cancer*, C. 20, 460, 1-11.
- [218] İnan, G., Gürel, F. S., Aydoğdu, A., Yenigün, A., Karaman, C. (2001). Peutz-Jeghers Sendromu - Bir Olgu Sunumu, *Adü Tıp Fakültesi Dergisi*, C. 2(2), 23-26.
- [219] Darbuka, E. (2018). *Kolorektal Kanseri Hastalarda Tcea17 Geninin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [220] Macrae, F. A. (2022). Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors (<https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>)
- [221] Akın, E., Küçük, F., Altıntoprak, F. (2020). Herediter Adenomatöz Polipozis Sendromlarında Profilaktik Cerrahi: Ne Zaman ve Nasıl? Güncel Yaklaşımlar ve Literatür Derlemesi, *Sakarya Tıp Dergisi*, C. 10(3), 528-535.
- [222] Badak, B., Kandemir, M., Yasar, N. F. (2018). Giant Juvenile Polyp in an Adult Patient: Case Report, *Osmangazi Journal of Medicine*, C. 40(2), 82-85.
- [223] İnce, A. T., Övünç, O. (2003). Kolon Polipleri ve Kromoendoskopi, *Güncel Gastroenteroloji*, C. 7(4), 255-264.
- [224] Subasi, N. T. (2021). Basic Information about Carbenes. In *Carbene*. IntechOpen.
- [225] Temelli, N. (2010). *Gümüş ve altın N- heterosiklik karben komplekslerinin sentezi ve özellikleri*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniveristesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [226] Ertuğrul, E. (2020). *Uzun alifatik yan zincirli Ru(II)-Nheterosiklik karben komplekslerinin sentezi ve katalitik aktivitesi*, Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [227] Gümüş, S., Gümüş, A., Turhan İrak, Z., (2017). Siklik Alken Türevlerinin Karbenler ile Siklopropanasyon Tepkimelerinin Teorik Olarak İncelenmesi, *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, C. 10(1), 48-60.
- [228] Kılınç, D. (2016). *Ni, Pd N-Heterosiklik karben kompleksleri ve özellikleri*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [229] Maviş, M. E. (2009). *Organik Reaksiyonlarda N-Heterosiklik Karbenlerin Katalizör Olarak Kullanımı*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [230] Fırıncı, R. (2014). *N-Sübtitüentli heterosiklik karben kompleksleri ve katalitik özellikleri*, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [231] Doğan, Ö. (2008). *N-Heterosiklik karben katalizli C-H Aktivasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [232] Kazancı, A. (2019). *1-(N-Metilfitalimit)-3-Alkilbenzimidazol-2-İliden Gümüş ve Palladyum Komplekslerinin Sentezi Özellikleri*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [233] Kunduracıoğlu, A. (2016). Fitalimid Fonksiyonel Grup İçeren Yeni Bir Benzimidazol Tuzunun Sentezlenmesi, Yapısal Özelliklerinin Spektroskopik ve Hesapsal Yöntemlerle İncelenmesi, *El-Cezeri Fen ve Mühendislik Dergisi*, C. 3(3), 391-400.
- [234] Şahin-Yıldırım, E., Şahin, N. (2020). Kloro1-allil-3-(2-diizopropilaminoetil)benzimidazol-2-ilidengümüş(I)'in sentezi ve yapısal karakterizasyonu, *Ordu Üniv. Bil. Tek. Dergisi*, C. 10(2), 66-75.
- [235] Sadıç, N. 2019. *N-Heterosiklik Karben Ag(I) komplekslerinin sentezi ve üç bileşenli eşleşme (A3) tepkimesindeki katalitik aktivitelerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [236] Yiğit, B. (2005). *Bazik Fonksiyonlu N-Heterosiklik Karben Kompleksleri*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [237] Aktaş, A. (2019). Platin ve Bakır Temelli N-Heterosiklik Karben (NHC) Komplekslerinin Antikanser Özellikleri ve Etki Mekanizmaları, *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, C. 8(2), 713-724.
- [238] Dağdeviren, Z. (2016). *Perhidrobenzimidazol-2-İliden Liganlı Karben Komplekslerinin Sentezi ve Özellikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [239] Johnson, N. A., Southerland, M. R., Young, W. J. (2017). Recent Developments in the Medicinal Applications of Silver-NHC Complexes and Imidazolium Salts, *Molecules*, C. 22, 1263, 1-20.
- [240] Çetin, M. (2010). *Yeni İmidazolyum Türü N-Heterosiklik Karbenlerin Sentezleri ve Heck Reaksiyonu ile Bazı Heterohalkalı Bileşenlerin Türevlendirilmelerindeki Uygulamaları*, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [241] Kılınçarslan, R., Sadıç, N., Çetinkaya, B. (2016). Ag(I) complexes of benzimidazol-2-ylidene ligands: a study of catalytic efficiency towards three-component coupling reactions, *Turk J Chem.*, C. 40, 681 – 687
- [242] Liu, Q., Hu, X., -L, Z., Yu, S-C. vd., (2018). NHC Pd(II) and Ag(I) Complexes: Synthesis, Structure, and Catalytic Activity in Three Types of C–C Coupling Reactions, *ACS Omega*, C. 3, 4035-4047.
- [243] Aktaş, A., Keleştemur, Ü., Gök, Y., Balcıoğlu, S., Ateş, B., Aygün, M. (2017). Synthesis, characterization, crystal structure, and antimicrobial studies of 2-morpholinoethyl-substituted benzimidazolium salts and their silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes, *Research on Chemical Intermediates*, C. 43(11), 6379–6393.
- [244] Garrison, J. C., Youngs, W. J. (2005). Ag (I) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, structure, and application, *Chemical reviews*, C. 105(11), 3978-4008.
- [245] Ergün, A., Karataş, M.O. (2020). Yeni N-benzilbenzimidazol-gümüş(I) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu, karbonik anhidraz ve polifenol oksidaz enzimleri üzerindeki inhibitör özellikleri, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, C. 10(1), 320-327.

- [246] Karlık, Ö. (2018). *Yeni Fonsiyonel Sübstitüye Diazol Bileşiklerinin Sentezi ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [247] Hindi, K. M., Panzner, M. J., Tessier, C. A., Cannon, C. L., Youngs, W. J. (2009). The medicinal applications of imidazolium carben-metal complexes, *Chem. Rev.*, C. 109, 3859-3884.
- [248] Lansdown, A. B. G. (2004) A review of the use of silver in wound care: facts and fallacies, *British J. Nursing*, C. 13, 6.
- [249] Kaloğlu, N., Özdemir, İ. (2022). Synthesis of Silver- and Gold-N-Heterocyclic Carbene Complexes Including Strong Metal-Carbon Binding, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 50(1), 31-36.
- [250] Arduengo, A. J., Dias, H. V. R., Calabrese, J. C., Davidson, F. (1993). Homoleptic carbene-silver(I) and carbene-copper(I) complexes, *Organometallics*, C. 12, 3405–3409.
- [251] Boukbari, L., Dridi, K., Al-Ayed, A.S., Ozdemir, I., Yasar, S., Hamdi, N. (2019). Synthesis of novel Ag(I)-N-heterocyclic carbene complexes soluble in both water and dichloromethane and their antimicrobial studies, *Journal Of Coordination Chemistry*, C. 72(12), 2080-2090.
- [252] Venkatachalam, K., Vinayagam, R., Arokia Vijaya Anand, M., Isa, N. M., Ponnaiyan, R. (2020). Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review, *Toxicol Res (Camb)*, C. 9(1), 2-18.
- [253] Trochimowicz, H. , Kennedy, G., Krivanek, N. (1994). Heterocyclic and miscellaneous nitrogen compounds, *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, C. 4, 3374–3379.
- [254] Fiala, E. S, Caswell, N., Sohn, O. S. *et al* (1984). Non-alcohol dehydrogenase-mediated metabolism of methylazoxymethanol in the deer Mouse, *Peromyscus maniculatus*, *Cancer Res.*, C. 44(7), 2885–2891.
- [255] Notman, J., Tan, Q. H., (1982). Zedeck MS. Inhibition of Methylazoxymethanol-Induced Intestinal Tumors In The Rat By Pyrazole With Paradoxical Effects On Skin And Kidney, *Cancer Res.*, C.42, 1774–1780.
- [256] Fiala, E. S., Sohn, O. S., Puz, C. Czerniak, R. (1987). Differential effects of 4-iodopyrazole and 3-methylpyrazole on the metabolic activation of methylazoxymethanol to a DNA methylating species by rat liver and rat colonmucosa in vivo, *J Cancer Res Clin Oncol.*, C. 113, 145–150.
- [257] Jisha, N., . Vysakh, A., Vijeesh, V., Anand, P. S., Latha, M. S. (2021). Methanolic Extract of Muntingia Calabura L. Mitigates 1,2-Dimethyl Hydrazine Induced Colon Carcinogenesis in Wistar Rats, *Nutrition and Cancer*, C. 73(11-12), 2363-2375.
- [258] Newell, L. E., Heddle, J. A. (2004) The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon, *Mutat Res*, C. 564(1), 1–7. doi:10.1016/j.mrgentox.06.005
- [259] Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis, *Nature*, C. 363(6429), 558–561. doi:10.1038/363558a0
- [260] Janne, P. A., Mayer, R. J. (2000). Chemoprevention of Colorectal Cancer, *N Engl J Med.*, C. 342(26), 1960–1968. doi: 10.1056/NEJM200006293422606
- [261] Mori, H., Hata, K., Yamada, Y., Kuno, T, Hara, A. (2005) Significance And Role Of Early-Lesions In Experimental Colorectal Carcinogenesis, *Chem Biol Interact*, C. 155(1–2), 1–9. doi:10.1016/j.cbi..04.005
- [262] Fiala, E. S. (1977). Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane, *Cancer*, C. 40(5), 2436–2445. doi: 10.1002/1097-0142(197711)40:5<2436:AID-CNCR282 0400908>3.0.CO;2-U.
- [263] Arutunian, A. V., Prokopenko, V. M., Burmistrov, S. O., Oparina, T. I., Frolova, E. V., Zabezhinskik, M. A., Popovich, I. G., Anisimov, V. N. (1997). Free-radical processes in blood serum, liver and large bowel during 1,2-dimethylhydrazine- induced carcinogenesis in rats, *Vopr Onkol.*, C. 43(6), 618–622.
- [264] Sengottuvelan, M., Viswanathan, P., Nalini, N. (2006). Chemopreventive effect of trans- resveratrol- a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1, 2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis, *Carcinogenesis*, C. 27(5), 1038-1046.

- [265] Prasad, V. G., Kawade, S., Jayashree, B., Reddy, S., Francis, A., Nayak, P. G., Kishore, A., Nandakumar, K., Rao, C. M., Shenoy, R. R. (2014). Iminoflavones combat 1,2-dimethyl hydrazine-induced aberrant crypt foci development in colon cancer, *Biomed Res Int*, C. 2014.
- [266] https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/1%2C2dimethylhydrazine?focus=products&page=1&page=30&sort=relevance&term=1%2C2-dimethylhydrazine&type=product_name (16.12.2022)
- [267] Bao, Y., Gao, Y., Du, M., Hou, W., Yang, L., Kong, X., Zheng, H., Li, W., Hua, B. (2015). Topical treatment with xiaozheng zhitong paste (xzp) alleviates bone destruction and bone cancer pain in a rat model of prostate cancer-induced bone pain by modulating the rankl/rank/opg signaling, *Evid. Based Complement, Alternat. Med.*, C. 2015, 1-14.
- [268] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, C. 227(5259), 680- 685.
- [269] Sahin, K., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, N., Erten, F., Juturu, V. (2018). Capsaicinoids improve consequences of physical activity, *Toxicol. Rep.*, C. 15, 598-607.
- [270] Dunn, M. J. (1993). Electrophoresis in the presence of additives. Gel electrophoresis proteins, *BIOS Scientific Publishers*, 41-49.
- [271] Ceviz, A. B., Aydoğan, H. Y. (2020). “Western Blot” Analizi ve Kullanım Alanları, *ÜCD Güncelleme Serileri*, C. 9(2).
- [272] Who (2021). Cancer. 1211 Geneva, Switzerland: World Health Organization. Online. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Accessed July 14, 2021).
- [273] Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., et al. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Online. Available: <https://gco.iarc.fr/today> (Accessed July 14, 2021).
- [274] Vekic, B., Dragojevic-Simic, V., Jakovljevic, M., Kalezic, M., Zagorac, Z., Dragovic, S., Rancic, N. (2020). A correlation study of the colorectal cancer statistics and economic indicators in selected Balkan countries, *Frontiers in Public Health*, C. 8, 29.
- [275] Hossain, M. S., Kader, M. A., Goh, K. W., Islam, M., Khan, M. S., Harun-Ar, M. R., Ming, L. C. (2022). Herb and Spices in Colorectal Cancer Prevention and Treatment: A Narrative Review, *Frontiers in pharmacology*, C. 13, 865801-865801.
- [276] Papamichael, D., Audisio, R. A., Glimelius, B., de Gramont, A., Glynne-Jones, R., Haller, D., (2015). Treatment of Colorectal Cancer in Older Patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) Consensus Recommendations 2013, *Ann. Oncol.*, C. 26(3), 463–476. doi:10.1093/annonc/ mdu253
- [277] Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G. (2018). Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells, *Med. Sci. (Basel)*, C. 6(2), 31. doi:10.3390/ medsci6020031
- [278] Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., et al. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development, *N. Engl. J. Med.*, C. 319(9), 525–532. doi:10.1056/NEJM198809013190901
- [279] Nguyen, H. T., and Duong, H. Q. (2018). The Molecular Characteristics of Colorectal Cancer: Implications for Diagnosis and Therapy, *Oncol. Lett.*, C. 16(1), 9–18. doi:10.3892/ol.2018.8679
- [280] Malki, A., ElRuz, R. A., Gupta, I., Allouch, A., Vranic, S., Al Moustafa, A. E. (2020). Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements, *Ijm.*, C. 22(1), 130. doi:10.3390/ijms22010130
- [281] Hossain, M. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, D. J., John, A., Hadi, M. A. (2022). Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies, *Cancers*, C. 14(7), 1732.
- [282] Cho, C.H., Hu, T. (2020). *Drug Resistance in Colorectal Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies*. London EC2Y 5AS, United Kingdom: Academic Press
- [283] World Bank (2021). Rural Population (% of Total Population). NW Washington, DC 20433 USA: The World Bank. Online. Available: <https://data.worldbank.org/indicator/SP.RUR.TOTL.ZS> (Accessed July 15, 2021)

- [284] Mjos, K. D., Orvig, C. (2014). Metallodrugs In Medicinal Inorganic Chemistry, *Chemical reviews* C. 114(8), 4540-4563.
- [285] Komeda, S., Casini, A. (2012). Next-generation anticancer metallodrugs, *Current topics in medicinal chemistry*, C. 12(3), 219-235.
- [286] Muhammad, N., Guo, Z. (2014). Metal-Based Anticancer Chemotherapeutic Agents, *Current opinion in chemical biology*, C. 19, 144-153.
- [287] Zhang, X., Wang, F., Zhang, C., Wu, S., Zheng, X., Gong, T., Bai, D. (2018). Novel fluorinated platinum (II) complexes with pyridine-2-carboxylate ligand as potent radiosensitizer and antiviral agent, *Inorganic Chemistry Communications*, C. 94, 92-97.
- [288] Yi, Q. Y., Zhang, W. Y., He, M., Du, F., Wang, X. Z., Wang, Y. J., Liu, Y. J. (2019). Anticancer and antibacterial activity in vitro evaluation of iridium (III) polypyridyl complexes, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, C. 24(2), 151-169.
- [289] Kamal, A., Iqbal, M. A., Bhatti, H. N. (2018). Therapeutic applications of selenium-derived compounds, *Reviews in Inorganic Chemistry*, C. 38(2), 49-76.
- [290] Mohamed, H. A., Lake, B. R., Laing, T., Phillips, R. M., Willans, C. E. (2015). Synthesis And Anticancer Activity Of Silver (I)-N-Heterocyclic Carbene Complexes Derived From The Natural Xanthine Products Caffeine, Theophylline And Theobromine, *Dalton Transactions*, C. 44(16), 7563-7569.
- [291] Mollick, M. M. R., Rana, D., Dash, S. K., Chattopadhyay, S., Bhowmick, B., Maity, D., Mondal, D., Pattanayak, S., Roy, S., Chattopadhyay, M. (2015). Studies On Green Synthesized Silver Nanoparticles Using *Abelmoschus esculentus* (L.) Pulp Extract Having Anticancer (*In Vitro*) And Antimicrobial Applications. *Arab. J. Chem.*
- [292] Kalaiaarasi, K., Prasannaraj, G., Sahi, S. V., Venkatachalam, P. (2015). Phytofabrication of biomolecule-coated metallic silver nanoparticles using leaf extracts of in vitro-raised bamboo species and its anticancer activity against human PC3 cell lines, *Turkish Journal of Biology*, C. 39(2), 223-232.
- [293] Nayak, D., Pradhan, S., Ashe, S., Rauta, P. R., Nayak, B. (2015). Biologically Synthesised Silver Nanoparticles From Three Diverse Family Of Plant Extracts And Their Anticancer Activity Against Epidermoid A431 Carcinoma, *Journal of colloid and interface science*, C. 457, 329-338.
- [294] Evertsson, S., Bartik, Z., Zhang, H., Jansson, A., Sun, X. F. (1999). Apoptosis in relation to proliferating cell nuclear antigen and Duke's stage in colorectal adenocarcinoma, *Int. J. Oncol.*, C. 15(1), 53 – 58.
- [295] Arockia John Paul, J., Karunai Selvi, B., Karmegam, N. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Premna serratifolia* L. leaf and its anticancer activity in CCl₄-induced hepato-cancerous Swiss albino mice, *Applied Nanoscience*, C. 5(8), 937-944.
- [296] Mittal, A. K., Tripathy, D., Choudhary, A., Aili, P. K., Chatterjee, A., Singh, I. P., Banerjee, U. C. (2015). Bio-synthesis of silver nanoparticles using *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook. and its therapeutic evaluation as anticancer and antimicrobial agent, *Materials Science and Engineering*, C. 53, 120-127.
- [297] Fichtner, I., Cinatl, J., Michaelis, M., C Sanders, L., Hilger, R., N Kennedy, B., Tacke, M. (2012). In vitro and in vivo investigations into the carbene silver acetate anticancer drug candidate SBC1, *Letters in Drug Design & Discovery*, C. 9(9), 815-822.
- [298] Arduengo, A. J., Harlow, R. L., Kline, M. (1991). A stable crystalline carbene, *J. Am. Chem. Soc.*, C. 113, 361-363.
- [299] Arduengo, A. J., Tamm, M., Calabrese, J. C. (1994). A bis(carbene) adduct of iodine(1+), *Journal of the American Chemical Society*, C. 116(8), 3625–3626.
- [300] Arduengo, A. J., Gamper, S. F., Tamm, M., Calabrese, J. C., Davidson, F., Craig, H. A. (1995). A bis(carbene)-proton complex: Structure of a C-H-C hydrogen bond, *Journal of the American Chemical Society*, C. 117(1), 572–573.

- [301] Herrmann, W. A., Köcher, C. (1997). N-heterocyclic carbenes, *Angewandte Chemie International Edition in English*, C. 36(20), 2162–2187.
- [302] Herrmann, W. A., Öfele, K., Elison, M., Kühn, F. E., Roesky, P. W. (1994). Nucleophilic cyclocarbenes as ligands in metal halides and metal oxides, *Journal of Organometallic Chemistry*, C. 480(1), 7–9.
- [303] Kuhn, N., Kratz, T., Henkel, G. (1993). A stable carbene iodine adduct: Secondary bonding in 1,3-diethyl-2-iodo-4,5-dimethylimidazolium iodide. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, C. (23), 1778–1779.
- [304] Öfele, K., Herrmann, W. A., Mihalios, D., Elison, M., Herdtweck, E., Scherer, W., Mink, J. (1993). Mehrfachbindungen zwischen hauptgruppenelementen und übergangsmetallen, *Journal of Organometallic Chemistry*, C. 459(1), 177–184.
- [305] Gasser, G., Ott, I., Metzler-Nolte, N. (2011). Organometallic anticancer compounds, *Journal of Medicinal Chemistry*, C. 54(1), 3–25.
- [306] Hindi, K. M., Siciliano, T. J., Durmus, S., Panzner, M. J., Medvetz, D. A., Reddy, D. V., Youngs, W. J. (2008). Synthesis, stability, and antimicrobial studies of electronically tuned silver acetate N-heterocyclic carbenes, *Journal of Medicinal Chemistry*, C. 51(6), 1577–1583.
- [307] Kascatan-Nebioglu, A., Melaiye, A., Hindi, K., Durmus, S., Panzner, M. J., Hogue, L.A., Youngs, W. J. (2006). Synthesis from caffeine of a mixed N-heterocyclic carbene–silver acetate complex active against resistant respiratory pathogens, *Journal of Medicinal Chemistry*, C. 49(23), 6811–6818.
- [308] Medvetz, D. A., Hindi, K. M., Panzner, M. J., Ditto, A. J., Yun, Y. H., Youngs, W. J. (2008). Anticancer activity of Ag(I) N-heterocyclic carbene complexes derived from 4,5-Dichloro-1H-imidazole, *Metal-Based Drugs*, C. 2008, 1–7.
- [309] Panzner, M. J., Hindi, K. M., Wright, B. D., Taylor, J. B., Han, D. S., Youngs, W. J., Cannon, C. L. (2009). A theobromine derived silver N-heterocyclic carbene: Synthesis, characterization, and antimicrobial efficacy studies on cystic fibrosis relevant pathogens, *Dalton Transactions*, C. 35, 7308–7313.
- [310] Kascatan-Nebioglu, A., Panzner, M. J., Tessier, C. A., Cannon, C. L., Youngs, W. J. (2007). N-heterocyclic carbene–silver complexes: A new class of antibiotics, *Coordination Chemistry Reviews*, C. 251(5), 884–895.
- [311] Citta, A., Schuh, E., Mohr, F., Folda, A., Massimino, M. L., Bindoli, A., Rigobello, M. P. (2013). Fluorescent silver(I) and gold(I)-N-heterocyclic carbene complexes with cytotoxic properties, Mechanistic insights, *Metallomics*, C. 5(8), 1006–1015.
- [312] Zheng, W., Zheng, Q., Chen, C., Wang, H. (2021). Multinuclear silver N-heterocyclic carbene complexes provoke potent anticancer activity via mitochondrial dysfunction and cell necrosis induction, *Applied Organometallic Chemistry*, e6544.
- [313] Haque, R. A., Ghdhayeb, M. Z., Budagumpi, S., Salman, A. W., Ahamed, M. B. K., Majid, A. M. S. A. (2013). Non-symmetrically substituted N-heterocyclic carbene–Ag(I) complexes of benzimidazol-2-ylidenes: synthesis, crystal structures, anticancer activity and transmetallation studies, *Inorganica Chim. Acta*, C. 394, 519–525.
- [314] Ray, S., Mohan, R., Singh, J. K., Samantaray, M. K., Shaikh, M. M., Panda, D., Ghosh, P. (2007). Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes, *Journal of the American Chemical Society*, C. 129(48), 15042–15053.
- [315] Siciliano, T. J., Deblock, M. C., Hindi, K. M., Durmus, S., Panzner, M. J., Tessier, C.A., Youngs, W. J. (2011). Synthesis and anticancer properties of gold(I) and silver(I) N-heterocyclic carbene complexes, *Journal of Organometallic Chemistry*, C. 696(5), 1066–1071.
- [316] Kankala, S., Thota, N., Björkling, F., Taylor, M. K., Vadde, R., Balusu, R. (2019). Silver carbene complexes: an emerging class of anticancer agents, *Drug development research*, C. 80(2), 188–199.
- [317] Paul-Samojednya, M., Kokocinskab, D., Samojednya, A., Mazureka, U., Partykab, R., Lorenz, Z., Wilczok, T. (2005). Expression Of Cell Survival/Death Genes: Bcl-2 And Bax At The Rate Of Colon Cancer Prognosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, C. 1741, 25–29.

- [318] Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J., Kumar, R. (1998). Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells, *Oncogene*, C. 17(8), 999-1007.
- [319] Saturnino, C., Barone, I., Iacopetta, D., Mariconda, A., Sinicropi, M. S., Rosano, C., Andò, S. (2016). N-heterocyclic carbene complexes of silver and gold as novel tools against breast cancer progression, *Future Medicinal Chemistry*, C. 8(18), 2213-2229.
- [320] Kunac, N., Filipović, N., Kostić, S., Vukojević, K. (2022). The Expression Pattern of Bcl-2 and Bax in the Tumor and Stromal Cells in Colorectal Carcinoma, *Medicina*, C. 58, 1135. <https://doi.org/10.3390/medicina58081135>
- [321] Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Millman, C. L., Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis, *Cell*, C. 75(2), 241-251.
- [322] Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J. (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, C. 92(17), 7834-7838.
- [323] Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo, *Oncogene*, C. 9(6), 1799-1805.
- [324] Iacopetta, D., Mariconda, A., Saturnino, C., Caruso, A., Palma, G., Ceramella, J., Longo, P. (2017). Novel gold and silver carbene complexes exert antitumor effects triggering the reactive oxygen species dependent intrinsic apoptotic pathway, *ChemMedChem*, C. 12(24), 2054-2065.
- [325] Huang, W., Yao, X. (2003). Prognostic Relevance Of Fas Ligand In Human Colorectal Cancer, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*, C. 15(4), 375-380.
- [326] Lalier, L., Vallette, F., Manon, S. (2022). Bcl-2 Family Members, and the Mitochondrial Import Machineries: The Roads to Death, *Biomolecules*, C. 12, 162.
- [327] Li, Y., Liu, G. F., Tan, C. P., Ji, L. N., Mao, Z. W. (2014). Antitumor properties and mechanisms of mitochondria-targeted Ag(I) and Au(I) complexes containing N-heterocyclic carbenes derived from cyclophanes, *Metallomics*, C. 6(8), 1460-1468.
- [328] Iqbal, M. A., Umar, M. U., Haque, R. A., Ahamed, M. B. K., Bin Asmawi, M. Z., Abdul Majid, A. M. S. (2015). Macrophage And Colon Tumor Cells As Targets For A Binuclear Silver(I) N-Heterocyclic Carbene Complex, An Anti-Inflammatory And Apoptosis Mediator, *Journal of Inorganic Biochemistry*, C. 146, 1-13.
- [329] Eloy, L., Jarrousse, A.-S., Teyssot, M.-L., Gautier, A., Morel, L., Jolival, C., Roland, S. (2012). Anticancer activity of silver-N-heterocyclic carbene complexes: Caspase-independent induction of apoptosis via mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF), *ChemMedChem*, C. 7(5), 805-814.
- [330] Braga, E. A., Fridman, M. V., Loginov, V. I., Dmitriev, A. A., Morozov, S. G. (2019). Molecular mechanisms in clear cell renal cell carcinoma: role of miRNAs and hypermethylated miRNA genes in crucial oncogenic pathways and processes, *Frontiers in genetics*, C. 10, 320.
- [331] Huang, H., Park, S., Zhang, H., Park, S., Kwon, W., Kim, E., Zhang, X., Jang, S., Yoon, D., Choi, S.-K., Yi, J.-K., Kim, S.-H., Dong, Z., Lee, M.-H., Ryoo, Z., Kim, M. O. (2021). Targeting AKT With Costunolide Suppresses The Growth Of Colorectal Cancer Cells And Induces Apoptosis In Vitro And In Vivo, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, C. 40(114) 1-18.
- [332] Rana, C., Piplani, H., Vaish, V., Nehru, B., Sanyal, S. N. (2015). Downregulation of PI3-K/Akt/PTEN Pathway And Activation Of Mitochondrial Intrinsic Apoptosis By Diclofenac And Curcumin In Colon Cancer, *Mol. Cell Biochem.*, C. 402, 225-241
- [333] Saturno, G., Valenti, M., Brandon, A. De H., Thomas, G. V., Eccles, S., Clarke, P. A., Workman, P. (2013). Combining TRAIL With PI3 Kinase Or HSP90 Inhibitors Enhances Apoptosis In Colorectal Cancer Cells Via Suppression Of Survival Signaling, *Oncotarget*, C. 4, 1185-1198.
- [334] Guertin, D. A., Sabatini, D. M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer, *Cancer cell*, C. 12(1), 9-22.

- [335] Johnson, S. M., Gulhati, P., Rampy, B. A., Han, Y., Rychahou, P. G., Doan, H. Q., Evers, B. M. (2010). Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer, *Journal of the American College of Surgeons*, C. 210(5), 767-776.
- [336] Manning, B. D., Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream, *Cell*, C. 129(7), 1261-1274.
- [337] Song, G., Ouyang, G., Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival, *Journal of cellular and molecular medicine*, C. 9(1), 59-71.
- [338] Ma, X. M., Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control, *Nature reviews Molecular cell biology*, C. 10(5), 307-318.
- [339] Amaral, C. L., Freitas, L. B., Tamura, R. E., Tavares, M. R., Pavan, I. C., Bajgelman, M. C., Simabuco, F. M. (2016). S6Ks isoforms contribute to viability, migration, docetaxel resistance and tumor formation of prostate cancer cells, *BMC cancer*, C. 16(1), 602.
- [340] Ekim, B., Magnuson, B., Acosta-Jaquez, H. A., Keller, J. A., Feener, E. P., Fingar, D. C. (2011). mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression, *Molecular and cellular biology*, C. 31(14), 2787-2801.
- [341] Martelli, A. M., Evangelisti, C., Chiarini, F., Grimaldi, C., McCubrey, J. A. (2010). The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cell biology, *Cancers*, C. 2(3), 1576-1596.
- [342] Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science*, C. 282(5392), 1318-1321.
- [343] Slee, E. A., Adrain, C., Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis, *J Biol Chem.*, C. 276, 7320-7326.
- [344] Garcia-Echeverria, C., Sellers, W. R. (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer, *Oncogene*, C. 27(41), 5511-5526.
- [345] Huang, X. F., Chen, J. Z. (2009). Obesity, the PI3K/Akt signal pathway and colon cancer, *Obesity reviews*, C. 10(6), 610-616.
- [346] Itoh, N., Semba, S., Ito, M., Takeda, H., Kawata, S., Yamakawa, M. (2002). Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma, *Cancer*, C. 94(12), 3127-3134.
- [347] Khaleghpour, K., Li, Y., Banville, D., Yu, Z., Shen, S. (2004). Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma, *Carcinogenesis*, C. 25(2), 241-248.
- [348] Shafie, N. H., Esa, N. M., Ithnin, H., Saad, N., Pandurangan, A. K. (2013). Pro-apoptotic effect of rice bran inositol hexaphosphate (IP6) on HT-29 colorectal cancer cells, *International journal of molecular sciences*, C. 14(12), 23545-23558.
- [349] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents, *J. Biol. Chem.*, C. 193, 265-275.
- [350] Guerret, O., Sole', S., Gornitzka, H., Teichert, M., Trinquier, G., Bertrand, G. (1997) 1,2,4-Triazole-3,5-diylidene: A Building Block for Organometallic Polymer Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, C. 119, 6668.
- [351] Wang, H. M., Lin, I. J. (1998). Facile synthesis of silver (I)-carbene complexes. Useful carbene transfer agents, *Organometallics*, C. 17(5), 972-975.
- [352] Wanzlick, H. W. (1962). Aspects of nucleophilic carbene chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, C. 1, 75-80.
- [353] Öfele, K. (1968). 1,3-Dimethyl-4-imidazolinyliiden-(2)-pentacarbonylchrom ein neuerübergangsmetall-carben-complex, *J. Organomet. Chem.*, C. 12, 42-43.
- [354] Sahin, K., Yenice, E., Bilir, B., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, N., Kucuk, O. (2019). Genistein prevents development of spontaneous ovarian cancer and inhibits tumor growth in hen model, *Cancer Prevention Research*, C. 12(3), 135-146.

- [355] Dinda, J., Nandy, A., Rana, B. K., Bertolasi, V., Saha, K.D., Bielawski, C. W. (2014). Cytotoxicity of silver(I), gold(I) and gold(III) complexes of a pyridine wingtip substituted annelated N-heterocyclic carbene, *RSC Advances*, C. 4(105), 60776–60784.
- [356] Mármol, I., Montanel-Perez, S., Royo, J. C., Gimeno, M. C., Villacampa, M. D., Rodríguez-Yoldi, M. J., Cerrada, E. (2020). Gold (I) and Silver (I) Complexes with 2-Anilinopyridine-Based Heterocycles as Multitarget Drugs against Colon Cancer, *Inorganic Chemistry*, C. 59(23), 17732-17745.

