

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**DİOSMETİNİN KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNDEKİ
(HCT 116) ANTİKARSİNOJENİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Miyase YÖRÜK

Danışman
Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 191318006 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2021

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Miyase YÖRÜK**'ün “**Diosmetinin Kolorektal Kanser Hücrelerindeki (HCT 116) Antikarsinojenik Etkinliğinin Araştırılması**” başlıklı tezi tarafımızca incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
KONYA- 24/ 06/ 2021

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN
N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Hasibe VURAL
N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes SÖZEN
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../2021 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Enstitü Müdürü

TEZ BEYAN SAYFASI

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

24/ 06/ 2021

Miyase YÖRÜK



BENZERLİK RAPORU

Tezin Tam Adı: Diosmetinin Kolorektal Kanser Hücrelerinde (HCT 116) Antikarsinojenik Etkinliğinin Araştırılması

Öğrencinin Adı Soyadı: Miyase YÖRÜK

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 66 sayfa

Diosmetinin Kolorektal Kanser Hücrelerinde (HCT116)
Antikarsinojenik Etkinliğinin Araştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 9	% 4	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
2	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	% 1
3	www.scribd.com İnternet Kaynağı	% 1
4	tel.archives-ouvertes.fr İnternet Kaynağı	<% 1
5	aac.asm.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	tez.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1

Danışman öğretim Üyesi Adı Soyadı: Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bilim insanı olma yolundaki ilk adımında bana yol gösteren, bilgi ve tecrübeleriyle akademik hayatımın anlamlı olmasını sağlayan çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN’a,

Bilimi çok sevmemi ve içimdeki araştırmacı ruhu ortaya çıkarmamı sağlayan her konuda bilgi ve tecrübeleriyle en büyük destekçilerim saygıdeğer Anabilim dalı hocalarım Prof. Dr. Ercan KURAR, Prof. Dr. Hasibe VURAL’a ve Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN’a,

Tez çalışmam sırasında laboratuvar araştırmalarımnda bilgi ve tecrübeleriyle hiçbir desteğini esirgemeyen Asistan hocam Arş. Gör. İlknur ÇINAR AYAN’a,

Bilgi birikim ve desteklerini esirgemeyen Asistan hocalarım Arş. Gör. Ebru GÜÇLÜ’ye Arş. Gör. Dr. Canan EROĞLU GÜNEŞ’e,

Kararlarım ve isteklerim karşısında beni canı gönülden destekleyen ve “Canın ne istiyorsa yap kızım, ben arkandayım” diyen sevgili annecim Songül YÖRÜK’e,

Hep yanımda olup beni destekleyen canım kardeşlerim; Fatma YÖRÜK, Semra YÖRÜK, Murat YÖRÜK, Selma YÖRÜK ve Zehra ESER’e ve yeğenim Taha ESER’e kızı olduğum için gurur duyduğum rahmetli babam Mehmet Ali YÖRÜK’e

TEŞEKKÜR EDERİM...

Bu tezi Babam Mehmet Ali YÖRÜK’e atfediyorum.

Miyase YÖRÜK

İÇİNDEKİLER

Tez Kapağı ve İç Kapak.....	i
Tez Onay Sayfası	ii
Tez Beyan Sayfası.....	iii
Benzerlik Raporu	iv
Önsöz ve Teşekkür.....	v
İçindekiler	vi
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi	viii
Şekiller Listesi.....	ix
Tablolar Listesi.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kanser Nedenleri ve Tedavisi	5
2.2. Kolorektal Kanser	9
2.2.1. İnsidans ve Mortalite.....	10
2.2.2. Risk Faktörleri.....	11
2.2.3. Tedavi.....	12
2.3. Kanser ve Apoptoz.....	13
2.3.1. Apoptoz Sırasında Hücrede Meydana Gelen Değişiklikler	14
2.3.2. Apoptoz Yolakları.....	15
2.3.2.1. İç Yolak (İntrinsik ya da Mitokondriyal Yolak)	15
2.3.2.2. Dış Yolak (Ekstrinsik ya da Ölüm Reseptör Yolağı).....	16
2.3.3. Kanser Tedavisinde Apoptozun Rolü	17
2.3.4. Kanser Tedavisinde ve Önlenmesinde Fitokimyasallar	18
2.3.5. Diosmetin	21
2.4. Çalışmanın Hipotezi.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler	23
3.2. Hücre Kültürü.....	25
3.2.1. HCT 116 Hücre Hattının Dondurulması	26

3.2.2. HCT 116 Hücre Hattının Çözdürülmesi	26
3.2.3. HCT 116 Hücre Hattının Pasajlanması	27
3.2.4. Etken Madde Dozlarının Hazırlanması	27
3.2.5. Hücre Sayımı.....	28
3.3. XTT Testi	28
3.4. Koloni Oluşum Testi	29
3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi	29
3.5.1. Total RNA İzolasyonu	30
3.5.2. RNA örneklerinin Yatay Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	30
3.5.3. DNase Uygulaması.....	31
3.5.4. cDNA sentezi	31
3.5.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	32
3.6. DNA Fragmentasyon Testi	32
3.7. İstatistiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Diosmetinin HCT 116 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	34
4.2. Diosmetinin Koloni Oluşumu Üzerindeki Etkisi	35
4.3. Diosmetinin, Apoptoz ve Hücre Döngüsü ile İlişkili Genlerin Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi.....	35
4.4. DNA Fragmentasyon Analizi.....	36
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
7. KAYNAKLAR.....	45
8. ÖZGEÇMİŞ.....	53
9. EKLER.....	54
Ek-1: Etik Kurul Kararı.....	54

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AIF	: Apoptosis Inducing Faktör
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör
CO₂	: Karbondioksit
DD	: Ölüm Resöptörlerinde Bulunan Ölüm Alanı
Diosmetin	: 3'5,7-trihidroksi-4'metoksiflavon
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Besi yeri
DMSO	: Dimetil Sulfoksit
EMT	: Epitel Mezenkimal Geçiş
ERK	: Hücre Dışı Sinyallerle Düzenlenen Kinaz
FADD	: Fas Associated Death Domain
HCT 116	: İnsan Kolon Karsinoma Hücre Hattı
IAP	: Apoptoz Proteinleri İnhibitörleri
KRK	: Kolorektal Kanser
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NF-KB	: Nükleer Faktör Kappa B DNA'yı (transkripsiyon faktörü)
P53	: Tümör Protein 53
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
qPRZ	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
XTT	: Sodyum 3'-[1-[(fenilamino)-karbonil]-3,4-tetrazolyum]-bis(4-metoksi-6-nitro)benzen-sülfonik asit hidra
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Kanserin ayırt edici özellikleri ve bu özelliklerle ilişkili proteinlerin fonksiyon/ekspresyon değişiklikleri	4
Şekil 2.2. Karsinogenezin evreleri.	6
Şekil 2.3. Kanseri gelişimini etkileyen faktörler.....	8
Şekil 2.4. Kolorektal karsinogenez sürecinde rol oynayan moleküler yollar..	11
Şekil 2.5. İç (İntrinsik) ve dış (ekstrinsik) apoptoz yolları	17
Şekil 2.6. Fitokimyasalların sınıflandırılması.....	21
Şekil 2.7. Diosmetinin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 3.1. HCT116 hücre hattının (ters)inverted mikroskop görüntüsü.....	26
Şekil 3.2. RNA'nın yatay jel elektroforez görüntüsü.	31
Şekil 4.1. XTT proliferasyon testinin 48. saatteki renk değişimi görüntüsü	34
Şekil 4.2. Diosmetinin doz ve zaman bağımlı olarak HCT 116 hücre hattındaki hücre canlılığı üzerine etkisi.	34
Şekil 4.3. Diosmetinin farklı dozlarının koloni oluşumları üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.4. Diosmetin uygulamasının HCT 116 hücrelerinde DNA fragmentasyon oranlarına etkisi.....	37

TABLÖLER LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan makine ve teçhizat listesi.....	23
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	24
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan kitler	25
Tablo 3.4. HCT 116 hücre hattının özellikleri	25
Tablo 4.1. Diosmetinin IC ₅₀ dozu ile muamele edilen HCT 116 hücre hattında, apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkili genler üzerindeki etkisi.....	36

ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Diosmetinin Kolorektal Kanser Hücrelerinde (HCT 116) Antikarsinojenik Etkinliğinin Araştırılması

Miyase YÖRÜK

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi / Konya - 2021

Kolon ve rektumda ortaya çıkan tümörlerle karakterize olan kolorektal kanser (KRK), erkeklerde tüm kanserler arasında insidans ve mortalite açısından 3., kadınlarda ise insidans açısından 2. ve mortalite açısından 3. sırada yer almaktadır. KRK prognozu hastalığın evresine bağlıdır. KRK tanısı hastaların yaklaşık üçte birinde metastatik süreç başladıktan sonra konulabilmektedir. İlerlemiş KRK'da 5 yıllık sağkalım oranları da düşüktür. Erken evrede tanı alabilen ve tedavisine başlanan hastalarda da nüks oranının yüksek olması, bir süre sonra kemo-rezistans gelişmesi ve tedavide kullanılan terapötiklerin sitotoksitelerinin yüksek olması tedavi başarısını olumsuz etkilemektedir. Daha başarılı ve daha az yan etkili terapötik ajan adayları olarak yıllardır fitokimyasallar üzerinde çalışılmaktadır. Bu fitokimyasallardan biri de Diosmetindir.

Baklagiller ve turunçgiller gibi birçok bitkide bulunan diosmetinin anti-bakteriyel, anti-inflamatuvar, anti-mutajenik ve anti-karsinojenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada diosmetinin KRK hücre hattı HCT 116 hücrelerindeki anti-karsinojenik etki mekanizmasının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak; diosmetinin sitotoksitesinin ve proliferasyon üzerindeki etkisinin belirlenmesi için XTT testi ve koloni oluşum testi yapılmış, antikarsinojenik etkisini apoptoz üzerinden gösterip göstermediğinin anlaşılması için de apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ekspresyonları Real time-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca apoptozu doğrulamak üzere ELISA yöntemi ile DNA fragmentasyon analizi gerçekleştirilmiştir.

XTT testi sonucunda diosmetinin IC₅₀ değeri 7,5 µM olarak bulunmuş ve çalışmanın sonraki kısımlarına IC₅₀ değerinin bir alt ve bir üst dozu da dahil edilerek toplam üç doz (5 µM, 7,5 µM ve 10 µM) ile devam edilmiştir. Koloni oluşum testinde diosmetinin doz-bağımlı şekilde koloni oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür (Kontrol, 5 µM, 7,5 µM ve 10 µM dozlar için koloni sayısı sırasıyla 476±15,1; 248,33±3,51; 201±30,44 ve 106,33±8,14). Gen ekspresyon analizlerinde apoptoz-ilişkili genlerden TP53, BAX, KASPAZ 3, KASPAZ 7, KASPAZ 8, KASPAZ 9, KASPAZ 10, FAS, FADD, CYCS, TNF, TNFR2'nin ekspresyon seviyelerinde anlamlı düzeyde artış (p<0,05) ve BCL-2 gen ekspresyon seviyesinde ise anlamlı düzeyde azalış (p<0,05) gözlenmiştir. Hücre döngüsü-ilişkili genlerinden RB1 gen ekspresyon seviyesinde anlamlı düzeyde bir artış (p<0,05) ve E2F4, CCND3, CDK4, CDK6 gen ekspresyon seviyelerinde ise anlamlı düzeyde azalış (p<0,05) belirlenmiştir. DNA fragmentasyon analizinde de apoptozun belirteçlerinden olan DNA fragmentasyonunun doz gruplarında kontrole göre doza-bağılı şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, diosmetin KRK hücre hattı HCT 116 hücrelerinde proliferasyonu baskılayarak ve apoptozu uyatarak anti-karsinojenik etki göstermiştir. Hücre döngüsü-ilişkili genlerdeki ekspresyon değişiklikleri diosmetinin anti-proliferatif etkisini hücre döngüsünü durdurarak gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Hem iç (intrinsik) yolak-ilişkili genlerdeki hem de dış (ekstrinsik) yolak-ilişkili genlerdeki ekspresyon değişiklikleri, diosmetinin her iki apoptoz yolağı üzerinden de etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Anti-kanserojen, Apoptoz, Diosmetin, HCT 116.

ABSTRACT

REPUBLIC OF TURKEY
NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Anticarcinogenic Activity of Diosmetin on Colorectal Cancer Cells (HCT 116)

Miyase YÖRÜK

Department of Medical Biology

Master Thesis / Konya - 2021

Colorectal cancer (CRC), which is characterized by tumors arising in the colon and rectum, ranks 3rd in terms of incidence and mortality among all cancers in men, 2nd in incidence and 3rd in terms of mortality in women. The prognosis of CRC depends on the stage of the disease. The diagnosis of CRC can be made after the metastatic process has started in approximately one third of the patients. 5-year survival rates are also low in advanced CRC. The high recurrence rate, development of chemoresistance after a while, and high cytotoxicity of the therapeutics used in the treatment negatively affect the success of the treatment in patients who can be diagnosed at an early stage and whose treatment is started. Phytochemicals have been studied for years as candidates for more successful and less side-effect therapeutic agents. One of these phytochemicals is Diosmetin.

It is known that diosmetin, which is found in many plants such as legumes and citrus fruits, has anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-mutagenic and anti-carcinogenic effects. In this study, it was aimed to reveal the anti-carcinogenic mechanism of action of diosmetin in CRC cell line HCT 116 cells. For this purpose; XTT test and colony formation test were performed to determine the cytotoxicity of diosmetin and its effect on proliferation, and the expressions of genes related to apoptosis and cell cycle were evaluated by Real time-PCR method to understand whether it shows its anticarcinogenic effect through apoptosis. In addition, DNA fragmentation analysis was performed by ELISA method to confirm apoptosis.

As a result of the XTT test, the IC_{50} value of diosmetin was found to be 7,5 μ M, and three doses (5 μ M, 7,5 μ M and 10 μ M) were included in the next parts of the study, including one lower and one higher IC_{50} value. In the colony formation test, diosmetin was found to inhibit colony formation in a dose-dependent manner (Colony count for Control, 5 μ M, 7,5 μ M, and 10 μ M doses, respectively 476 ± 15.1 ; 248.33 ± 3.51 ; 201 ± 30.44 and 106.33 ± 8.14). In gene expression analyzes, the expression levels of apoptosis-related genes TP53, BAX, CASPASE 3, CASPASE 7, CASPASE 8, CASPASE 9, CASPASE 10, FAS, FADD, CYCS, TNF, TNFR2 were significantly increased ($p < 0.05$) and BCL- A significant decrease ($p < 0.05$) was observed in 2 gene expression levels. A significant increase ($p < 0.05$) in RB1 gene expression levels and a significant decrease ($p < 0.05$) in E2F4, CCND3, CDK4, CDK6 gene expression levels were determined. In DNA fragmentation analysis, it was determined that DNA fragmentation, which is one of the markers of apoptosis, increased in a dose-dependent manner in the dose groups compared to the control.

In conclusion, diosmetin showed anti-carcinogenic effect by suppressing proliferation and stimulating apoptosis in CRC cell line HCT 116 cells. Expression changes in cell cycle-related genes suggest that diosmetin exerts its anti-proliferative effect by arresting the cell cycle. Expression changes in both intrinsic pathway-related genes and extrinsic pathway-related genes suggest that diosmetin acts on both apoptosis pathways.

Key Words: Anti-carcinogene, Apoptosis, Diosmetin, HCT 116.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının (IARC) 2020 yılındaki GLOBOCAN verilerine göre, kolorektal kanser (KRK) insidans ve mortalite açısından kanserler içerisinde ilk üçte yer alır (Sung ve ark. 2021). KRK hastalarının yaklaşık % 20-30'unda, ancak ileri evrede tanı konulabilmektedir. Erken evrede tanı alıp tedavi edilenlerin % 40-50'sinde ise nüks görülmektedir. İleri evrede tanı konulup tedaviye alınanlarda 5 yıllık sağkalım oranları son derece düşüktür (Rodriguez-Salas ve ark. 2017). KRK tedavisinin ana omurgasını cerrahi, neoadjuvan radyoterapi, adjuvan kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler oluşturmaktadır (Van der Jeught ve ark. 2018). Daha yüksek tedavi başarısı ve daha az yan etki beklentisi ile birçok bitki-türevli ajan kanser kemoterapisi için büyüteç altına alınmıştır. Bu bitkisel türevli ajanlar bitkilerin ürettiği “sekonder metabolitler” diye adlandırılan biyoaktif bileşiklerdir. Bunların arasında alkaloidler, flavonoidler, fenoller, glikozitler, saponinler, tanenler, uçucu yağlar, zamlar ve reçineler bulunur (Matsuda ve ark. 2018). Bu bileşikler kanser oluşumunu aktive eden proteinleri, enzimleri ve sinyal iletim yollarını inhibe ederek ya da DNA tamir mekanizmasını ve apoptozu uyaran proteinleri aktive ederek ve/veya antioksidan işlevleri indükleyerek anti-karsinojenik fonksiyonlarını yerine getirirler (Iqbal ve ark. 2017). Bu bileşenlerden biri olan Diosmetin polifenollerin flavonoid alt sınıfına ait bir flavonoldür. Maydanoz, turuncgiller, kasımpatı, kekik, zeytin ve baklagil yapraklarında bolca bulunur (Yoshikawa ve ark. 2000; Lin ve Harnly 2010; Abad-García ve ark. 2014).

Apoptozu hedeflemek kanser tedavisinin ana stratejilerinden birisidir. Nitekim klinik kullanımda olan kanser terapötik ilaçlarının çoğu apoptozu indüklemektedir (Liu ve ark. 2015). Birçok karmaşık sinyal iletimini içeren apoptoz, çok sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Majno ve Joris 1995). Başlıca iki yolak üzerinden meydana gelir: 1. “İç Yolak” (İntrinsik ya da Mitokondriyal Yolak). Bu yolak onarılamayan genetik hasar, hipoksi, büyüme faktörü eksikliği, sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonunda artış ve şiddetli oksidatif stres gibi faktörlerin varlığında devreye girer; mitokondri ve mitokondriyal proteinler kullanılır (Oren ve Rotter 1999). Bu yolağın düzenlenmesinde BCL-2 (B-cell Lymphoma 2) ailesine ait bir grup protein rol oynar: “Pro-apoptik BCL-2 proteinleri” ve “Anti-apoptik BCL-2 proteinleri” (Carneiro ve Deiry 2020). 2. Dış Yolak (Ekstrinsik ya da Ölüm Reseptör Yolağı). Ölüm reseptörleri adı verilen hücre yüzey reseptörlerine hücre dışı ligandların bağlanmasıyla aktive olan

apoptoz yolağıdır. Bu yolaktaki ölüm reseptörleri ve bu reseptörlere bağlanan ligandları: TNFR1-TNF α , FAS (CD95, APO-1)-FASL, TRAILR1 (DR4)-TRAIL ve TRAILR2 (DR5)-TRAIL'i kapsar.

Bu çalışmada diosmetinin KRK hücre hattı HCT 116 hücrelerindeki anti-karsinojenik etki mekanizmasının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak; diosmetinin sitotoksitesinin ve proliferasyon üzerindeki etkisinin belirlenmesi için XTT testi ve koloni oluşum testi yapılmış, antikarsinojenik etkisini apoptoz üzerinden gösterip göstermediğinin anlaşılması için de apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ekspresyonları Real time-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca apoptozu doğrulamak üzere ELISA yöntemi ile DNA fragmentasyon analizi gerçekleştirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

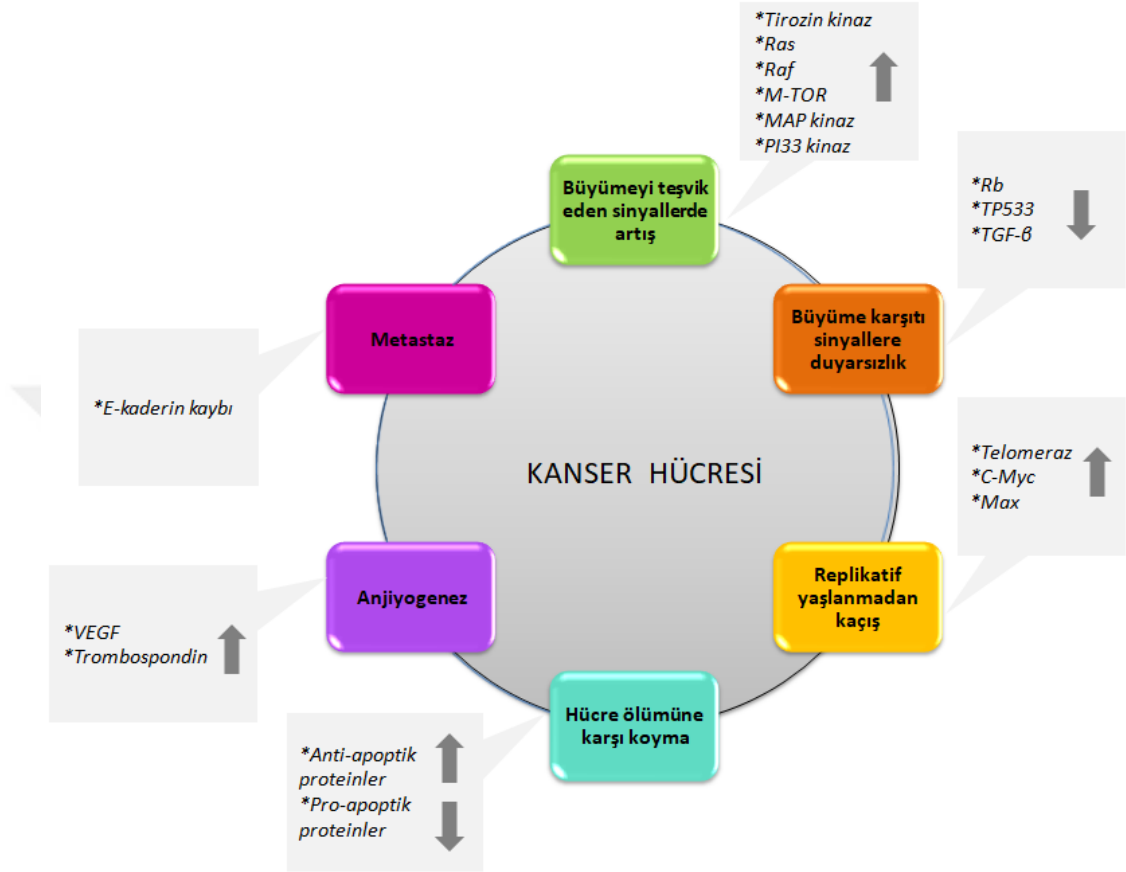
2.1. Kanser

Kanser DNA'daki ve gen ekspresyonundaki çoklu değişikliklerden kaynaklanan, kontrolsüz anormal çoğalan ve uzak bölgelere de yayılma potansiyeline sahip hücre popülasyonunun ortaya çıkmasıyla karakterize olan genetik bir hastalıktır (Forcados ve ark. 2017). Tüm dünyada insan hayatını en çok tehdit eden hastalıklardan birisi olan kanser, ölümlerin en yaygın nedenlerindendir (Zarei ve ark. 2016; Heron 2018). Dünya Sağlık Örgütünün bir alt kuruluşu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından oluşturulan GLOBOCAN veritabanının verilerine göre 2020 yılı için kansere bağlı ölüm sayısının dünya genelinde 10 milyona ve yeni vaka sayısının da 19.3 milyona ulaştığı tahmin edilmektedir. Yine aynı verilere göre kadın ve erkeklerdeki en sık tanı alan ilk beş kanser sırasıyla meme, akciğer, kolorektal, prostat ve mide kanserleri iken; kanser-nedenli ölümlerin sıralamasında ilk beşte akciğer, kolorektal, karaciğer, mide ve meme kanserleri yer almaktadır (Sung ve ark. 2021). Kanserden ölüm oranları 1991'den günümüze kadar toplamda % 29'luk bir düşüş göstermiştir. Kanser nedenli ölüm oranlarındaki bu önemli düşüşün özellikle sigara tüketiminin azalmasından ve buna bağlı olarak akciğer kanser mortalitesinin düşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca kanser taramaları sayesinde erken teşhis olanaklarının artması ve hedefe yönelik uygulanan tedaviler de bu düşüşte rol oynamaktadır (Siegel ve ark. 2020a). 2016 yılındaki Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre; ülkemizde ölümlerin % 20'sini kanserler oluşturur. Kanserler içerisinde en çok ölüm erkeklerde; soluk borusu, bronş ve akciğerdeki kötü huylu tümörlere bağlı olurken; kadınlarda ise meme kanseri en sık ölüm nedenidir (Gültekin ve Boztaş 2016).

Kanser hücreleri kendilerini normal hücrelerden ayıran bazı ortak karakteristik özellikler gösterirler. Bu özelliklerden 6'sı Hanahan ve Weinbers tarafından "kanserin ayırt edici özellikleri" olarak 2011 yılında tanımlanmıştır (Şekil 2.1) (Hanahan ve Weinberg 2011).

1. Sınırsız replikasyon yeteneği
2. Kendi büyüme sinyallerini üretme
3. Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık
4. Apoptozdan kaçış
5. Anjiogenez
6. Doku invazyonu ve metastaz

Karsinogenez sürecinin ve bu süreçte etkili olan moleküler olayların daha iyi anlaşılmasıyla daha sonraları bu listeye immün sistemden kaçış, inflamasyon artışı, genomik instabilite artışı, bozulmuş metabolik yollar ve farklılaşmamış durumda kalma gibi özellikler de eklenmiştir (Hanahan ve Weinberg 2011; Parker ve Metallo 2015).



Şekil 2.1. Kanserın ayırt edici özellikleri ve bu özelliklerle ilişkili proteinlerin fonksiyon/ekspresyon değişiklikleri (Hanahan ve Weinberg 2011).

Karsinogenez hücrelerin giderek artan anormal proliferatif ve invazif karakter kazandığı çok basamaklı bir süreçtir. Tümör hücrelerinde biriken mutasyonlar bu sürecin yönetilmesinde ve seyrinde önemli rol oynar. Ortaya çıkan ilk mutasyonun sınırlı bir yayılıma yol açtığı; sonra edinilen her bir mutasyonun ise daha güçlü bir çoğalma potansiyeli kazandırarak klonal bir seçim ve büyümeye neden olduğu öngörülmektedir. Karsinogenezin çok basamaklı sürecini kolorektal kanser gibi bazı kanserlerde gözlemek mümkündür: Pre-malign hücre büyümesi ile malign hücre oluşumu arasındaki süreç, “benign adenom → *in situ* karsinom → invazif karsinom → lokal/uzak metastaz” şeklindeki çoklu basamaklar halinde ayırt edilebilmektedir (Coleman ve Tsongalis 2006).

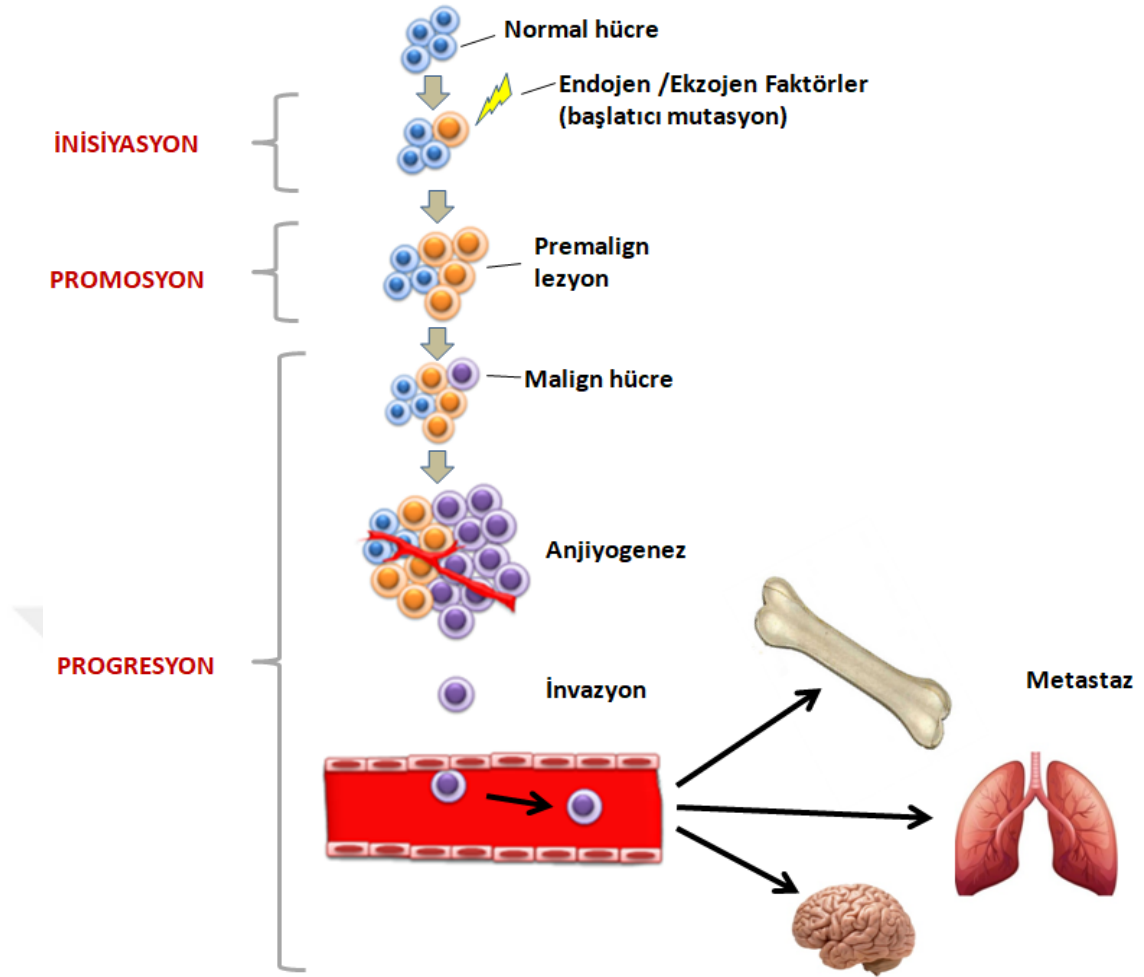
Deneyisel ve epidemiyolojik çalışmalar karsinogenezin üç evreye ayrılabilirliğini göstermiştir: 1. İnisiyasyon, 2. Promosyon ve 3. Progresyon. İnisiyasyon evresi, normal hücrelerde meydana gelen ilk genetik değişikliklerle başlar. Bu değişiklikler kanser gelişiminde kritik olan protoonkogenlerde, tümör baskılayıcı genlerde veya DNA tamir sistemi genlerinde meydana gelir ve hücrelerde çoğalma yeteneğinin artmasına yol açar. Değişikliklerle henüz neoplazik olmayan hücreler neoplazi yolundaki ilk adımı atmış olurlar (Ortega ve Campos 2019). Bu başlatıcı mutasyonlar depürinasyon ve deaminasyon gibi zaten hücrede meydana gelmekte olan olaylarla ya da replikasyon hatalarıyla da desteklenir (Oliveira ve ark. 2007).

Promosyon evresi, hücrelerin klonal yayılımının gerçekleştiği evredir. Klonal yayılma hücreleri onları malign karaktere dönüştürecek genetik değişikliklere yatkın hale getirir. Bu süreç hormonlar ve büyüme faktörleri de dahil olmak üzere hücre bölünmesini teşvik eden moleküller ya da dış kaynaklı bileşenler tarafından desteklenir (Ortega ve Campos 2019).

Progresyon evresi, pre-neoplastik lezyonların ve/veya benign neoplazilerin yeni genetik ve epigenetik değişikliklerle malign lezyonlara dönüştüğü son evredir. Artan mutasyonlar ve oluşan genomik instabilite hücrelerin son derece proliferatif, metastatik ve apoptik mekanizmalardan yoksun bir karakter kazanmasına yol açar. Bu evrede sürece epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve anjiyogenez de eşlik eder (Şekil 2.2; Ortega ve Campos 2019).

2.1.1. Kanser Nedenleri ve Tedavisi

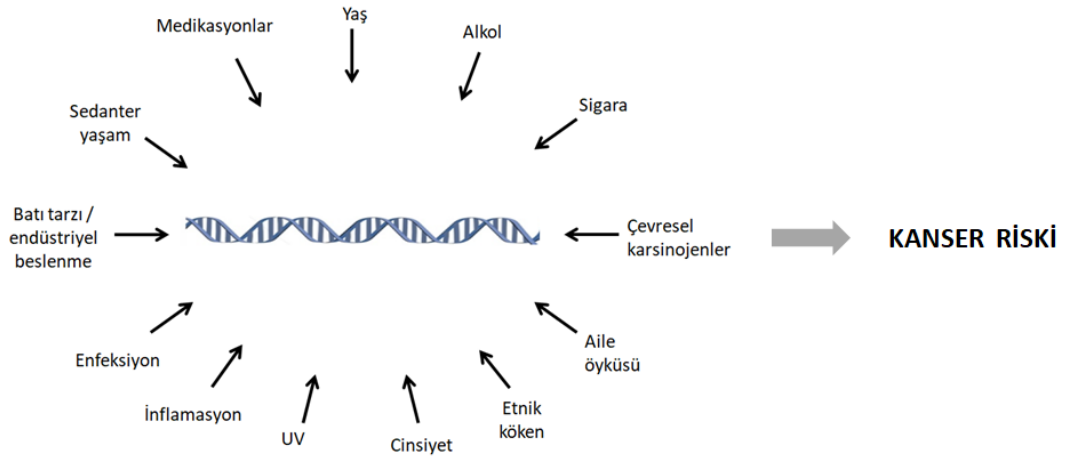
Kansere sebep olan faktörleri “İntrinsik Faktörler” ve “Ekstrinsik Faktörler” olarak iki başlık altında değerlendirmek mümkündür. İntrinsik faktörlerin başında mutasyonlar, inflamasyon ve oksidatif stres gelir. Ekstrinsik faktörler ise hayat tarzı, beslenme, enfeksiyonlar, çevresel kimyasal ve fiziksel ajanlardan oluşur. Kanser gelişiminde rol oynayan mutasyonlar “sürücü mutasyonlar” olarak adlandırılır. Proliferasiyona doğrudan etkisi olmayan ancak sürücü mutasyonların kazanılmasıyla ortaya çıkan mutasyonlar da “yolcu mutasyonlar”dır. Kansere yol açan mutasyonlar protoonkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri ve bu genlerin protein ürünlerini etkiler. Mutasyonlar protoonkogenlerin onkogenlere dönüşmesinde ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunda etkili olurlar. Protoonkogen-onkogen dönüşümü sinyal iletim yollarının hiperaktivasyonuna yol açarak hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olur.



Şekil 2.2. Karsinogenezin evreleri.

Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu neticesinde de sinyal iletiminin negatif regülatörleri veya hücre proliferasyonunun frenleyici elemanları etkisiz hale gelir (Reagan 2019). Onkogenler büyüme faktörlerini, büyüme faktörü reseptörlerini (EGFR, PDGFR gibi), sinyal aktarım proteinlerini (Ras, abl, β -catenin gibi), hücre döngüsü düzenleyicilerini (siklin D, Cdk4 gibi) ve transkripsiyon faktörlerini (myc gibi) kodlayan genlerden oluşur. Tümör baskılayıcı genler ise hücre yüzey proteinlerini (TGF- β R gibi), hücre iskeleti proteinlerini (NF2 gibi), transkripsiyon faktörlerini (RB1, p53 gibi), hücre döngüsünün düzenleyicilerini, apoptozda görev alan proteinleri (BCL-2, BCL-X_L, BAX gibi) ve DNA tamir sistemi proteinlerini (XP, HNPCC, MLH1, ATM, BRCA1 ve BRCA2 gibi) kodlayan genleri içerir (Liu ve ark. 2016a). Kronik inflamasyon kanser için en büyük risk faktörlerinden birisidir, nitekim kanserlerin % 20 kadarının kronik inflamasyonla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Reagan 2019).

Kanser oluşumunu etkileyen faktörler sürekli olarak araştırma konusu olmuştur. 1950’de Dünya Sağlık Örgütünün sponsorluğunda düzenlenen bir sempozyumda, dünyanın farklı bölgelerinde görülen kanser türlerindeki dramatik farklılıklar katılımcıların ilgisini çekmiştir. Başka ülkelere göç edenlerin anavatanlarında en çok görülen kanserlerden ziyade göç ettikleri ülkelerde/bölgelerde en çok görülen kanser türlerinden etkilendiklerinin ortaya konulmuş olması çoğu kanser türünün kalıtsal ve genetik faktörlerden çok, çevresel maruziyetler ile ilintili olduğunu ortaya koymuştur. Sempozyum 1965 yılında insan kanserlerinin nedenleri üzerine multidisipliner araştırmalar yürütmesi için IARC’ın kurulmasına önayak olmuştur. Böylece kanser nedenlerini araştırmak için pek çok çevresel ajan üzerinde epidemiyolojik ve deneysel kanıtlara dayalı incelemelerde bulunulmuştur. Bu çalışmalarda çeşitli mesleklerin kanser oranlarının artışı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Boya işçilerinin mesane kanserine, petrol işçilerinin skrotal kansere, maden işçilerinin akciğer kanserine, radyologların özellikle X ışınlarının keşfedildiği yıllarda sürekli kendileri üzerinde denemeleri sonucunda cilt kanserine yakalanma oranlarının yüksek olduğu görülmüştür (Blackadar 2016). Bugün artık bazı plastik kimyasalların, polinükleer hidrokarbonların, asbest liflerinin, bazı metal bileşiklerin, katran ve ziftin, radyasyonun (X-ışını radyasyonu, toprak radonu ve ultraviyole radyasyonu), bazı ilaçların (immün yetmezliğe neden olan ilaçlar, bazı antineoplastik ajanlar ve hormonlar), bazı bakterilerin (*Helicobacter pylori* gibi) ve virüslerin (EBV [Epstein-Barr virüsü], HPV [İnsan papilloma virüsü], HBV [hepatit B virüsleri], HCV [Hepatit C virüsü], KSHV [Kaposi sarkomu ilişkili herpes virüsü], HIV [İnsan immün yetmezlik virüsü]) kansere neden olduğu bilinmektedir (Ameri 2019; Reagan 2019). Ayrıca tütün dumanı ve silika, alkol, batı tarzı beslenme ve obezite de önemli risk faktörlerinin arasındadır (Reagan 2019). Kanser gelişiminin tek bir nedeni yoktur. Yukarıda bahsi geçen faktörlerin her biri tek başına kanseri başlatmak için yeterli değildir. Kanser gelişimi genetik, çevresel veya bireysel yapısal özellikleri kapsayan birçok faktörün birbiriyle etkileşmesi sonucunda gerçekleşen çok basamaklı bir süreçtir (Şekil 2.3; Ameri 2019; Reagan 2019).



Şekil 2.3. Kanser gelişimini etkileyen faktörler.

Kanserler tümörün tipi ve evresine göre belirlenen tedavi seçenekleri ile multimodal bir yaklaşımla tedavi edilir. Bu seçeneklerin içerisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel yöntemlerin yanında hedefe yönelik kemoterapi, ablatif tedavi ve immünoterapi gibi yöntemler de bulunur (Hines 2018; Yıldızhan ve ark. 2018). Nitekim son yıllarda daha etkili kanser tedavilerinin geliştirilmesi ile kanserden sağkalım önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, bu güçlü tedavilerin kullanımı, neredeyse her organ sistemini etkileme potansiyeline sahip olan toksisiteler ve yan etkilerle ilişkilidir. Bu etkilerden bazıları geçici olmakla birlikte; bazıları da kalıcı şekillere yol açar (Hines 2018). Geleneksel kemoterapi, hızla bölünen hücreleri hedef alan ve replikasyona müdahale eden sitotoksik ilaçların kullanımını içerir. Etki mekanizmasına göre sınıflara ayrılırlar: alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antibiyotikler, mikrotübül inhibitörleri, topoizomerez inhibitörleri, hormonal ajanlar ve çeşitli karışık veya karma mekanizmalı ilaçlar. Hedeflenen kemoterapi, tümör hücresi çoğalması ve göçünde yer alan spesifik süreçlere yönelik bir dizi kemoterapötik ilaç kullanımını kapsar. Bu kemoterapötik ilaçlarla büyüme faktörlerinin, reseptörlerinin veya bunlarla ilişkili tirozin kinazların bloke edilmesi amaçlanır. Hedeflenen tedaviler arasında EGF ve VEGF gibi hücre dışı reseptörler üzerinde etki yapan monoklonal antikorlar ve hücre zarlarına nüfuz eden ve hücre içi sinyal yollarını bloke eden küçük moleküller yer alır. Kanser hücrelerinin mutasyona uğrama ve hedefe yönelik tedavilere direnç geliştirme yeteneklerinin üstesinden

gelmek için, hedefe yönelik tedaviler genellikle geleneksel kemoterapi ile birlikte uygulanır. Radyoterapide kanser hücrelerinin DNA'larına zarar verilerek yok edilmesi için yüksek enerjili ışınlar, X ışınları, gama ışınları, elektron ışımaları ya da protonlar gibi radyasyon kullanılır. Tedavi tek başına verilebileceği gibi cerrahi ya da kemoterapi ile kombine edilebilir (Unal ve ark. 2018; Hines 2018). Kanser tedavisindeki bir başka seçenek olan ablatif tedaviler ise kanser hücrelerinin bölgesel olarak yok edilmesini içerir. Tümör hücrelerini koagüle etmek, parçalamak ya da kemoterapinin etkinliğini artırmak için fosfolipid tabakalarını bozmak gibi amaçlarla tümör dokusuna doğrudan radyofrekans, lazer, ısı, soğuk veya elektrik alanı uygulanır. Radyofrekans ablasyonu (RFA), mikrodalga ablasyonu, lazer intertisyel termal terapi (LITT), kriyoterapi ve elektroporasyon bu amaçlarla kullanılan ablasyon teknikleridir (Hines 2018). İmmünoterapide ise immün sistemin uyarılıp güçlendirilmesi ve kanser ile olan spesifik mücadelesine yardım edilmesi amaçlanır. Farklı kanser türlerinde farklı immünoterapi yöntemleri tek başına ya da diğer tedavi seçenekleriyle kombine edilerek uygulanabilir. Kullanılan immünoterapi yöntemleri monoklonal antikoları, immün sistem kontrol nokta inhibitörlerini, kanser aşılarını, sitokinleri, immünomodülatör ilaçları, kimerik antijen reseptör yüklü T hücre tedavisini (CAR T-Cell), tümör infiltre eden lenfositleri (TIL) kapsar (Unal ve ark. 2018; Yıldızhan ve ark. 2018).

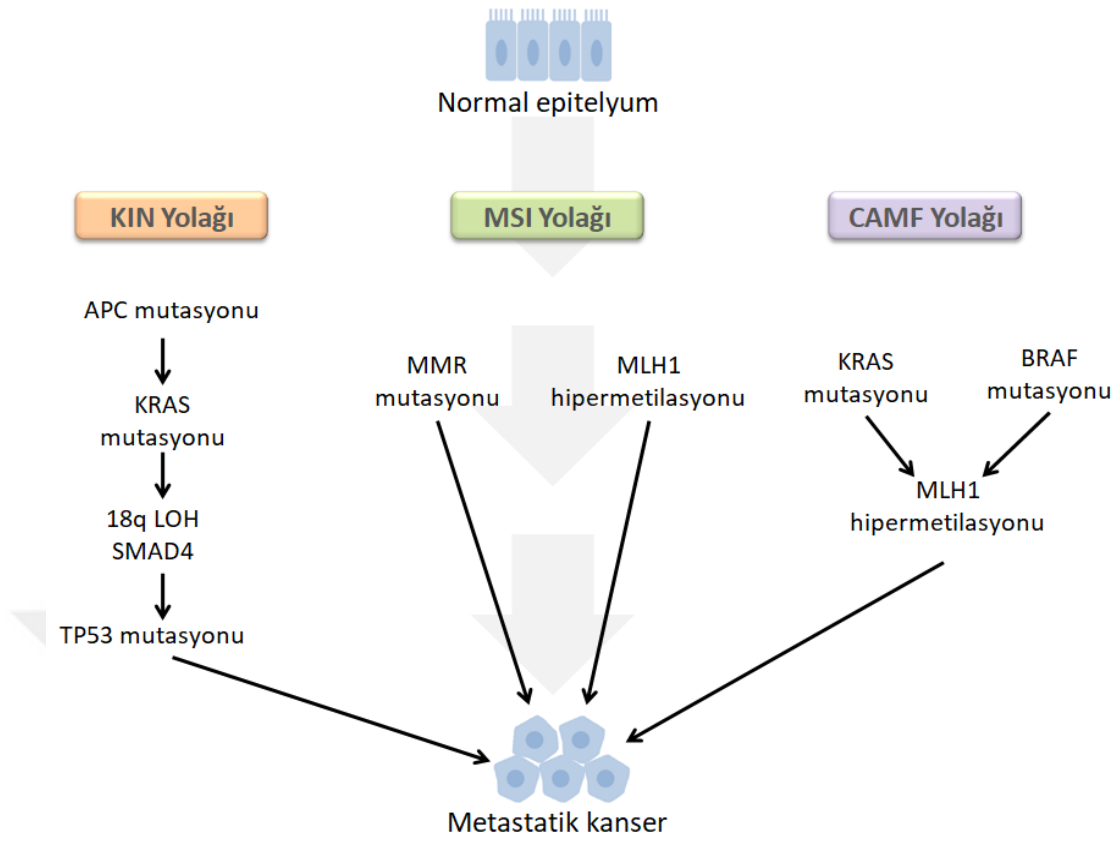
2.2. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser (KRK), gastrointestinal sistemin kısımları olan kolon ve rektumda ortaya çıkan heterojen bir hastalıktır. KRK'nin çoğunluğu adenomatöz poliplerden veya adenomlardan yavaş ilerleyen bir süreç içerisinde gelişir (Levine ve Ahnen 2006). Bu süreç neoplastik öncü lezyonlara dönüşen ve yaklaşık 10-15 yıllık bir süre içinde KRK'ye ilerleyen anormal bir kript ile başlar (Dekker ve ark. 2019). KRK'nin büyük çoğunluğunda orijin hücrenin bir kök hücre ya da kök hücre benzeri bir hücre olduğu varsayılmaktadır. Bu kanser kök hücreleri tümör supressör genleri inaktive ve onkogenleri aktive eden genetik ve epigenetik değişikliklerin birikiminin eseridir. Kolonik kriptlerin tabanında bulunan bu hücrelerin tümörün başlatılması ve sürdürülmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir (Medema 2013; Nassar ve Blanpain 2016). KRK'nin % 90'ı sporadik iken, % 10 kadarı da kalıtsal özellik ya da genetik yatkınlık göstermektedir (Bogaert ve Prenen 2014). Sporadik KRK için yaklaşık 30 yıl önce tanımlanan çok aşamalı kolorektal karsinogenez modeli hala geçerliliğini

korumaktadır. Bu modele göre süreç APC gen mutasyonlarının kazanılmasıyla başlamakta ve ardından bunu KRAS onkogeninin aktivasyonu, TP53 tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu, anöploidi ve heterozigosite kaybı (LOH) gibi çoklu mutasyonların birikimi izlemektedir (Fearon ve Vogelstein 1990). Son zamanlarda serrated adenomlar sayesinde alternatif KRK karsinogenez yolları da tanımlanmıştır. Bugün için KRK karsinogenezinde rol oynayan, klinik özellikleri ve prognozu da etkileyebilen en az üç moleküler yolak olduğu kabul edilmektedir (Bogaert ve Prenen 2014; Gonzalez-Pons ve Cruz-Correa 2015) (Şekil 2.4). Birincisi sporadik KRK'lerin % 70'inden sorumlu olan kromozomal instabilite (KIN) yolağıdır. Bu yolak tümör baskılayıcı gen lokuslarında heterozigosite kaybı ve kromozomal yeniden düzenlemeler ile karakterizedir. Ayrıca APC, KRAS, PIK3CA, BRAF, SMAD4, TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerde ve onkogenlerde biriken mutasyonlar da sürece dahil olur. İkinci yolak hatalı eşleşme tamir sistemi (mismatch repair, MMR) genlerinin disfonksiyonunun yol açtığı mikrosatellit instabilite (MSI) yolağıdır. KRK'nın kalıtsal formlarından biri olan HNPCC (herediter non-polipozis kolorektal kanser)'nin de ayırt edici özelliği olan bu yolak sporadik KRK'ların da % 15'inden sorumludur. Üçüncü yolak CpG adacığı metilatör fenotip (CAMF) yolağıdır. Sporadik MSI kolon tümörlerinin çoğu CAMF pozitifdir ve genellikle kolonun proksimal bölgesinde bulunur. Bu yolda hMLH1 gibi MMR genlerinde ve tümör baskılayıcı genlerde çoklu promotör CpG adacık hipermetilasyonu söz konusudur. Bu yolağa BRAF mutasyonları da eşlik etmektedir. KRK karsinogenezinde üç ayrı moleküler yolağın varlığına rağmen, tümörler birden çok yolağın özelliklerini sergileyebilmektedir (Bogaert ve Prenen 2014).

2.2.1. İnsidans ve Mortalite

IARC tarafından yayınlanan GLOBOCON verilerine göre 2020'de dünya genelinde 1.9 milyondan fazla yeni KRK vaka sayısı ve 935.000 KRK sebepli ölüm tanımlanmıştır. Yine aynı verilere göre KRK, erkeklerde tüm kanserler arasında insidans ve mortalite açısından 3., kadınlarda ise insidans açısından 2. ve mortalite açısından 3. sırada yer almaktadır (Sung ve ark. 2021). Türkiye'de de durum farklı olmayıp KRK, hem erkeklerde hem kadınlarda 3. en sık görülen kanserdir. Sağlık Bakanlığı'nın açıkladığı Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre KRK sıklığı erkeklerde 100.000 kişide % 25.3, kadınlarda % 14.2'dir (Gültekin ve Boztaş 2016).



Şekil 2.4. Kolorektal karsinogenez sürecinde rol oynayan moleküler yollar. KIN: kromozomal instabilite, MSI: mikrosatellit instabilite, CAMF: CpG adacığı metilatör fenotip.

2.2.2. Risk Faktörleri

KRK gelişiminde rol oynayan çeşitli değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri olduğu bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar değiştirilemez faktörlerden olan cinsiyet ve artan yaşın hastalık insidansı ile güçlü ilişkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Erkeklerdeki KRK riski kadınlardaki KRK riskinin yaklaşık iki katı kadardır (Brenner ve ark. 2007; Freedman ve ark. 2009; Kolligs ve ark. 2011). KRK'ların % 50'sinden fazlası 70 yaşından sonra teşhis edilirken, sadece % 10'u 50 yaşından önce tanı almaktadır (Kolligs 2016). Değiştirilemez risk faktörlerinden bir diğeri kalıtsal mutasyonlardır. KRK'ların yaklaşık % 10'u kalıtsaldır. Kalıtsal formları "kalıtsal non-polipozis kolorektal kanseri" (HNPCC, hereditary non-polyposis colorectal cancer), "adenomatöz polipozis" (FAP, familial adenomatous polyposis; MAP, MUTYH-associated polyposis) ve "hamartomatöz polipozis" (PJS, Peuts-Jeghers syndrome; JPS, juvenile polyposis syndrome; PHTS, PTEN hamartoma tumors syndrome) sendromlarını kapsamaktadır (Rawla ve Barsouk 2019). KRK

hastalarının yaklaşık % 30'u ailesel neoplazi öyküsüne sahiptir. Bu durum muhtemel saptanamamış germ-line mutasyonların varlığına işaret etmektedir. KRK tanısı almış birinci derece yakını bulunanlarda riskin 2-4 kat arttığı öngörülmektedir (Kosinski ve ark. 2007). Chron hastalığı ve ülseratif kolit hastalığı gibi inflamatuvar barsak hastalıklarının varlığı da KRK riskini yaklaşık iki katı artırmaktadır (Lutgens ve ark. 2013). Diğer risk faktörlerinin arasında polip öyküsü, diabetes mellitus ve insülin direnci de gösterilmektedir.

Değiştirilebilir risk faktörleri ise daha çok yaşam tarzı ile ilişkili olan faktörlerdir. Yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar obezite ve hareketsiz yaşamın, sigaranın, alkol tüketiminin ve Batı tarzı beslenmenin (liftten, yeşil yapraklı sebzelerden ve meyvelerden fakir; kırmızı et ve işlenmiş gıdadan zengin beslenme şekli) KRK riskini artırdığını göstermektedir (Lutgens ve ark. 2013; Aran ve ark. 2016; Sawicki ve ark. 2021).

2.2.3. Tedavi

KRK, heterojen bir hastalıktır. Klinik özellikleri, moleküler özellikleri ve prognozu hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Buna bağlı olarak tedaviye alınan yanıt da hastalar arasında değişmektedir. Beş yıllık sağkalım büyük oranda hastalığın evresine bağlıdır. Evre I KRK hastaları % 90'ın üzerinde bir sağkalım gösterirken, evre IV KRK hastaları için bu oran ancak % 10'a ulaşmaktadır. Bu nedenle erken teşhis KRK için öncelikli bir hedeftir (Dawood 2018). Etkin tarama protokollerinin ve erken tanı yöntemlerinin geliştirilmesine, pre-operatif ve post-operatif bakımın standardizasyonuna, cerrahi tekniklerde sağlanan ilerlemelere ve hastalığın her evresi için uygulanabilecek sistemik tedavilerin bulunmasına bağlı olarak son yıllarda KRK'ya bağlı ölüm oranlarında dereceli bir azalış söz konusudur (Siegel ve ark. 2014; Welch ve ark. 2016). Buna rağmen, hala hastaların % 20-30'unun ileri evrede saptanıyor olması ve erken evrede tanı alan hastaların da % 40-50'sinde nüks meydana geliyor olması KRK'yı ilaç direnci, tedavi ve prognoz açısından zorlu bir hastalık yapmaktadır. KRK'da tedavi seçimi hastanın genel durumu, tümörün boyutu, yeri ve metastaz varlığı da dahil olmak üzere birçok faktör göz önünde bulundurularak yapılmaktadır. Cerrahi en yaygın tedavi seçeneğidir. Tümör tek bir polip ile sınırlıysa sadece kolonoskopi tercih edilebilmektedir (Marley ve Nan 2016). Daha ilerlemiş hastalıkta bağırsak rezeksiyonu veya bağırsağın yanında diğer komşu organların kısmen ya da tamamen çıkarılması gerekli olabilmektedir (Marley ve Nan 2016).

Cerrahinin bir seçenek olmadığı durumlarda ya da cerrahiyi desteklemek amacıyla radyofrekans ablasyonu, kriyocerrahi, kemoterapi, adjuvan kemoterapi, radyoterapi ya da hedefe yönelik tedaviler uygulanabilmektedir (Marley ve Nan 2016). KRK kemoterapisinde ana omurgayı floropirimidinler (pirimidin analogları), irinotecan (topoizomeraaz I inhibitörü) ve oxaliplatin (alkilleyici ajan) oluşturmaktadır (Aran ve ark. 2016; Dienstmann ve ark. 2017). Kemoterapi primer tümörün uzak organlardaki nüksünü önlemek amacıyla evre II ve evre III'deki hastalara cerrahi tedavi ya da radyoterapiyi müteakip uygulanabilmektedir (adjuvan kemoterapi) (Biondi ve ark. 2013a; Biondi ve ark. 2016b). Son yıllarda özellikle metastatik KRK tedavisinde immünoterapi ve hedefe yönelik tedavilerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kontrol noktası inhibitörlerinin MMR ve MSI'nin söz konusu olduğu hastalarda sağkalımı uzatmada etkili olduğu kanıtlanmıştır. Hedefe yönelik tedavi seçeneklerinden anti-vasküler endotelial büyüme faktörü (anti-VEGF) ve anti-epidermal büyüme faktörü reseptörü (anti-EGFR) kemoterapi ile kombine edildiklerinde sağkalımı uzatıcı etki göstermektedir. Bu iki antikorun tercihinde biyobelirteç olarak K/N-Ras mutasyonları etkili olmaktadır. Anti-EGFR tedavisi K/N-Ras mutasyonu olmayan hastalarda anti-VEGF tedavisinden daha etkili sonuçlar ortaya koymaktadır (Van Cutsem ve ark. 2016; Rawla ve ark. 2019).

2.3. Kanser ve Apoptoz

Apoptoz, görevini tamamlamış ya da istenmeyen hasarlı hücreleri uzaklaştırarak doku homeostazisinin sürdürülmesini sağlayan programlı fizyolojik bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Nagata 1997; Mejer ve ark. 2000). Birçok karmaşık sinyal iletimini içeren bu mekanizma çok sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Majno ve Joris 1995). Apoptoz, malign potansiyeli olan hücrelerin eliminasyonunda rol oynadığı için karsinogenezin anahtar oyuncularından biri olarak kabul edilmektedir. Bu mekanizmadaki bozukluk ve yetersizlikler neoplastik hücrelerin çoğalmasına yol açabilmektedir. Apoptozdan kaçış (hücre ölümüne direnmek) kanserin ayırt edici özellikleri arasında tanımlanmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011). Bu özellik kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmasına imkan tanımakta ve onlara invazif ve metastatik olabilmelerini sağlayacak mutasyonların birikmesi için zaman kazandırmaktadır (Hassan ve ark. 2014). Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçışları aşağıdaki mekanizmalar yoluyla olmaktadır (Wong 2011):

- (1) Pro-apoptik ve anti-apoptik protein dengesinin bozulması

(2) Kaspaz işlevinin azaltılması/engellenmesi

(3) Ölüm reseptörleri aracılığıyla olan sinyal iletiminin bozulması

Birçok kanserde tedaviye yönelik temel yaklaşımın merkezinde de apoptoz yolakları yer almaktadır ve halen klinik kullanımda olan geleneksel kanser ilaçlarının çoğu kanser hücrelerinin apoptozunu indüklemeyi hedeflemektedir (Wong 2011; Liu ve ark. 2015; Pfeffer ve Singh 2018).

2.3.1. Apoptoz Sırasında Hücrede Meydana Gelen Değişiklikler

Apoptoz sırasında hücrede birçok karakteristik olay meydana gelir. Bu değişiklikleri “kaspaz” (sistein aspartil-spesifik proteazlar) adı verilen sistein protein ailesi üyesi proteazlar başlatır ve sürdürür (Pfeffer ve Singh 2018). Kaspazların hedefinde hücre iskeleti proteinleri ve nükleer proteinler gibi pek çok hücre protein bulunur (Pistritto ve ark. 2016). Kaspaz-2, -8, -9 ve -10 “başlatıcı kaspazlar” olarak; kaspaz-3, -6 ve -7 “efektör ya da cellat/infazcı kaspazlar” olarak; kaspaz-1, -4 ve -5 de “inflamatuvar kaspazlar” olarak tanımlanır. Diğer kaspazlar ise bu üç kaspaz sınıfından daha farklı ve spesifik şekilde fonksiyon gösterirler (Obeng 2021).

Kaspazlar sentezlendikleri andan itibaren hücrede zimojenler halinde bulunurlar ve bu haldeyken “prokaspaz” olarak adlandırılırlar. Daha sonra otoaktivasyon ile ya da bir başka molekül veya kaspazın aktivasyonu ile prokaspazlar aktif kaspazlara dönüşür. İlk kaspaz aktivasyonu bir kez meydana gelince proteolitik kaskad da başlar (Pistritto ve ark. 2016). Kaspaz aktivasyonu ve proteolitik kaskad ile birlikte hücrede de apoptozun karakteristik olayları gerçekleşmeye başlar: Sitoplazmik hücre büzüşmesi meydana gelir ve hücre hacminin yaklaşık yarısı kadarını kaybeder (piknoz). Hücrenin komşu hücrelerle ve ekstrasellüler matriksle olan bağlantıları zayıflar. Plazma membranı süreç boyunca bütünlüğünü korur (Majno ve Joris 1995). Sürecin başlarında hücre membranının iç tabakasında bulunan fosfatidil serin dış tabakaya transloke olur. Bu yer değişikliği sürecin sonunda apoptoza uğramış hücrelerin makrofajlar tarafından tanınıp, pro-inflamatuvar hücresel bileşenler ortama salınmadan fagosite edilmelerini sağlar (Hengartner 2001). Çekirdekte ise kromatin kondensasyonu başlar ve kromatin parçalanıncaya kadar ileri yoğunlaşmalar gerçekleştirerek kümeler oluşturur (karyoreksis) (Majno ve Joris 1995). Sürecin sonuna doğru sitoplazmik membranda kabarcıktanmalar, sitoplazmik organellerde de ultrastrüktürel değişiklikler meydana gelir ve membran bütünlüğü kaybolur (Kroemer ve ark. 2005). Son aşamada apoptik hücre “apoptik cisimcik” adı verilen veziküllere

ayrılır. Ancak genellikle daha apoptik cisimcikler oluşmadan fagositik hücreler apoptik hücreyi ortadan kaldırırlar (Bucur ve ark. 2001).

2.3.2. Apoptoz Yolakları

Kaspaz aktivasyonu ile gerçekleşen iki apoptoz yolağı vardır: İç Yolak (intrinsik ya da mitokondriyal yolak) ve Dış Yolak (ekstrinsik ya da ölüm reseptörü aracılı yolak).

2.3.2.1. İç Yolak (İntrinsik ya da Mitokondriyal Yolak)

Onarılamayan genetik hasar, hipoksi, büyüme faktörü eksikliği, sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonunda artış ve şidditli oksidatif stres gibi faktörlerin varlığında devreye giren; mitokondri ve mitokondriyal proteinlerin kullanıldığı apoptoz yolağıdır (Oren ve Rotter 1999). Yolak BCL-2 (B-cell Lymphoma 2) ailesine ait bir grup protein tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. BCL-2 ailesi proteinleri iki genel gruba ayrılır: “Pro-apoptik BCL-2 proteinleri” ve “Anti-apoptik BCL-2 proteinleri”. Pro-apoptik proteinler de “Çoklu domeyn üyeleri” (BOX, BAK ve BOK) ile “Sadece BH3 bölgesi içeren üyeler” (BİD, BİM, BAD, PUMA, NOXA ve diğerleri)’ den oluşur. Anti-apoptik proteinler ise BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1, A1 ve BCL-B’yi içerir. Sadece BH3 bölgesi içeren proteinler, anti-apoptik proteinlerin inhibisyonunda iş görürken; anti-apoptik proteinler de çoklu domeyn pro-apoptik proteinlerin baskılayıcısı olarak etki ederler (Carneiro ve Deiry 2020).

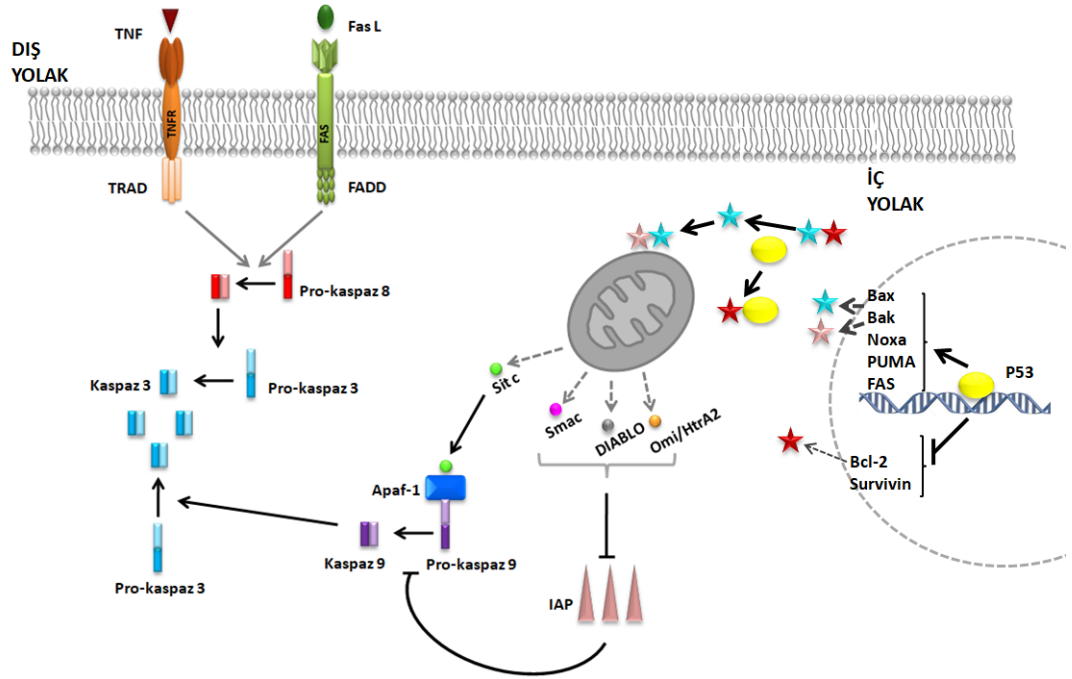
Hücrede apoptoz sinyali alındığında sadece BH3 bölgesi içeren proteinler aktive olur. Bu aktivasyon anti-apoptik proteinlerin inhibisyonuna ve dolaylı olarak çoklu domeyn pro-apoptik proteinleri BAX ve BAK’ın aktivasyonuna yol açar (Adams ve ark. 2019). Oligomerize olan BAX ve BAK mitokondriyal membrana yönelirler ve dış zara bağlanırlar. Bu bağlanma mitokondri dış zarının geçirgenliğini artırır. Böylece apoptozda kritik eşik aşılmış olur ve artık apoptotik süreç geri dönüşümsüz şekilde işlemeye başlar (Jopez ve Tait 2015). Zar geçirgenliğinin artışı ile sitokrom c, Smac, DIABLO, Omi/HtrA2 ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi apoptik proteinler mitokondriden sitoplazmaya geçer (Oren ve Rotter 1999; Pistritto ve ark. 2016). Sitokrom c sitoplazmada Apaf-1’e bağlanır. Sitokrom c, Apaf-1 ve dATP “Apoptozom” adı verilen bir kompleks oluştururlar. Bu yapıya Prokaspaz-9 da katılır ve kesime uğrayarak aktive olur ve Kaspaz-9’a dönüşür. Kaspaz-9 da Prokaspaz-3’ü keserek Kaspaz-3’ü aktive etmiş olur. Sitoplazmaya geçen apoptik

proteinlerden Smac, DIABLO ve Omi/HtrA2 apoptoz inhibitör proteinlerinin (IAP) engelleyicisi olarak iş görürler. NAIP, XIAP, Survivin, Apollon gibi proteinlerden oluşan AIP'ların görevleri ise Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 etkileşimini engellemektir. Böylece AIP'ların Smac, DIABLO ve Omi/HtrA2 tarafından engellenmesi Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 üzerindeki baskılayıcı etkinin ortadan kalkmasına neden olur (Oren ve Rotter 1999). Sitoplazmaya geçen AIF ise nukleusa ulaşarak kromatin fragmentasyonunu başlatır (Lorenzo ve ark.1999).

2.3.2.2. Dış Yolak (Ekstrinsik ya da Ölüm Reseptör Yolağı)

Ölüm reseptörleri adı verilen hücre yüzey reseptörlerine hücre dışı ligandların bağlanmasıyla aktive olan apoptoz yolağıdır. Bu yolaktaki ölüm reseptörleri ve bu reseptörlere bağlanan ligandları TNFR1-TNF α , FAS (CD95, APO-1)-FASL, TRAILR1 (DR4)-TRAIL ve TRAILR2 (DR5)-TRAIL'i kapsar. Ölüm reseptörleri ligandlar ile uyarıldıklarında oligomerizasyona uğrarlar. Ardından sitoplazmik ölüm domeynlerini (death domain, DD) ortaya çıkarmak için yapısal bir değişim geçirirler. Böylece DD içeren diğer proteinlerle homotipik etkileşimler mümkün hale gelmiş olur (Pistritto ve ark. 2016). Adaptör moleküller FADD (Fas-associated death domain) ve TRADD (TNF receptor-associated death domain) ölüm reseptörlerine gelirler. Başlatıcı prokaspazlar -8 ve -10 adaptör proteine bağlanarak hep birlikte DISC (death-inducing signalling complex) adı verilen bir kompleks oluştururlar. Prokaspaz-8 ve -10 DISC tarafından aktive edilir. Etkinleşen Kaspaz-8 ve -10, Efektör Prokaspaz-3, -6 ve -7'yi keserek aktive ederler. Efektör Kaspazlar da hedeflerindeki hücrel proteinleri proteolitik kesime uğratırlar (Pfeffer ve Singh 2018).

Diğer taraftan Kaspaz-8, pro-apoptik sadece BH3 bölgesi içeren proteinlerden Bid'i aktive eder. Bu aktivasyon özellikle bazı hücrelerde ekstrinsik yolağın etkinliğini amplifiye etmiş olur. Aktive olan Bid, mitokondriyal dış membranın geçirgenliğini artırmaları için BAX ve BAK'ı etkinleştirir. Böylece dış yolak, iç yolak ile kesişmiş olur ve apoptik süreç iç yolak ile de devam eder (Şekil 2.5) (Pistritto ve ark. 2016; Pfeffer ve Singh 2018).



Şekil 2.5. İç (İntrinsik) ve dış (ekstrinsik) apoptoz yolları (Pistritto ve ark. 2016; Pfeffer ve Singh 2018).

2.3.3. Kanser Tedavisinde Apoptozun Rolü

Kanserde başvurulanan tedavi stratejilerinin başında hücrenin kendi ölüm mekanizmasını harekete geçirmek gelmektedir. Apoptozdan kaçış tüm kanserlerin ortak özelliklerinden birisi olduğundan tedavide apoptozu hedeflemek son derece etkin bir yöntem gibi görünmektedir. En çok intrinsik yolak hedeflenmekle birlikte her iki yolakda da çeşitli aşamaları ve molekülleri hedefleyen klinik olarak kullanılan ya da ön çalışmaları sürdürülmekte olan birçok antikanser ajanı/ilacı vardır (Pfeffer ve Singh 2018). Apoptoz-kanser arasındaki bağlantının ortaya konulmasıyla ve apoptoz sürecine dahil olan molekül/proteinlerin işlevlerinin ve birbirleriyle ilişkilerinin gün geçtikçe daha iyi anlaşılmasıyla moleküler hedefli kanser terapötiklerinin geliştirilmesi için yeni ufukların açılmasına yol açmıştır (Nicholson 2000; Reed 2002; Kaufmann ve David 2003; Fesik 2005; Ashkenazi 2008).

Terapötik hedefleme için yaygın olarak kullanılan 2 yaklaşım bulunmaktadır: 1) Pro-apoptik moleküllerin uyarılması, 2) Anti-apoptik moleküllerin inhibisyonu. BCL-2 ailesi proteinleri kanser tedavisi için önemli hedeflerden birisidir (Ferreira ve ark. 2002). BCL-2 ailesi üyelerini antagonize etmek ya da seviyelerini düşürmek suretiyle kanser hücrelerinin apoptozunu uyaran çeşitli tedavi yaklaşımları

geliştirilmiştir. BCL-2'nin antisens deoksioligonükleotidlerle hedeflenmesi bu yaklaşımlardan biridir. Antisens deoksioligonükleotidler tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla hedef mRNA'lar ile hibridize olurlar ve onların degradasyonunu uyarırlar (Frankel 2003; Tamm 2006). Bu yöntem ile Survivin ve XIAP gibi anti-apoptik diğer proteinler de hedeflenebilmektedir (Call ve ark. 2008). Diğer bir yaklaşım BH3 mimetiklerinin kullanımıdır. BH3 mimetikleri, sadece BH3 bölgesi içeren proteinlerin anti-apoptik BCL-2 proteinlerine bağlanmasını taklit eden küçük moleküllerdir. Bu moleküller BCL-2'yi (Casara ve ark. 2018), BCL-X_L'yi (Tao ve ark. 2014), ve Mcl-1'i (Abulwerdi ve ark. 2014) inhibe etmektedir.

Pro-apoptik moleküllerin uyarılmasına yönelik olarak ise başlıca 2 yaklaşım vardır: TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'yi hedefleyen agonist monoklonal antikorlar ve rekombinant pro-apoptik ligandlar aracılığıyla (Call ve ark. 2008). Her iki apoptoz yolağındaki her bir aşama ve molekül potansiyel olarak terapötik hedef adaydır, ancak hangi hedefin daha etkin olduğuna/olabileceğine dair net bir gösterge bulunmamaktadır.

2.3.4. Kanser Tedavisinde ve Önlenmesinde Fitokimyasallar

Fitokimyasallar bitkilerde bulunan doğal biyoaktif bileşiklerdir. Bitki metabolizmasındaki fonksiyonlarına göre ikiye ayrılır: “Primer metabolitler” ve “sekonder metabolitler”. Primer metabolitler protein, amino asit, karbonhidrat, lipid ve klorofil gibi bitkinin temel metabolizması için gerekli olan bileşiklerdir. Sekonder metabolitler ise bitkinin temel metabolizması için esansiyel olmayan, bitkinin çevre şartlarına adaptasyon sağlamak veya predatörlerinden korunmak amacıyla ürettiği bileşiklerdir (Dias ve ark. 2012). Sekonder metabolitler aynı zamanda mikrobiyal çoğalmayı yavaşlatmak, metabolik yolları engelleyebilmek veya gen ekspresyonunu ve sinyal aktarımını değiştirebilmek gibi fonksiyonlara da sahiptir (Lee ve ark. 2013). Sekonder metabolitlerinin bu özel fonksiyonları sayesinde bitkiler çok eski zamanlardan beri çeşitli tıbbi amaçlarla ilaç kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımlarına dair en eski yazılı kayıtlara M.Ö. 2600'e ait Mezopotamya kil tabletlerinde ve M.Ö. 2900'e ait Mısır Ebers papirüsünde rastlanmaktadır (Dias ve ark. 2012). Son yıllarda kanser tedavisi ve önlenmesindeki rollerinden dolayı sekonder bitki metabolitlerine olan ilgi artmıştır. Mevcut geleneksel kanser terapötik ajanlarının çoğunun yüksek sitotoksisiteye sahip olması, kemorezistansa yol açması, tümör nüksü ve metastazını önleyememesi gibi nedenler

daha etkin ama daha az sitotoksik ajan ihtiyacıyla birlikte sekonder metabolitlere olan bu ilgiyi sürekli beslemiştir (Dias ve ark. 2012). Bugün çok sayıda bitki-türevli anti-kanser ajanının pre-klinik ve klinik çalışmaları devam etmektedir; muhtemelen bazıları yakın gelecekte anti-kanser ilacı olarak tedavi protokollerindeki yerini alacaktır.

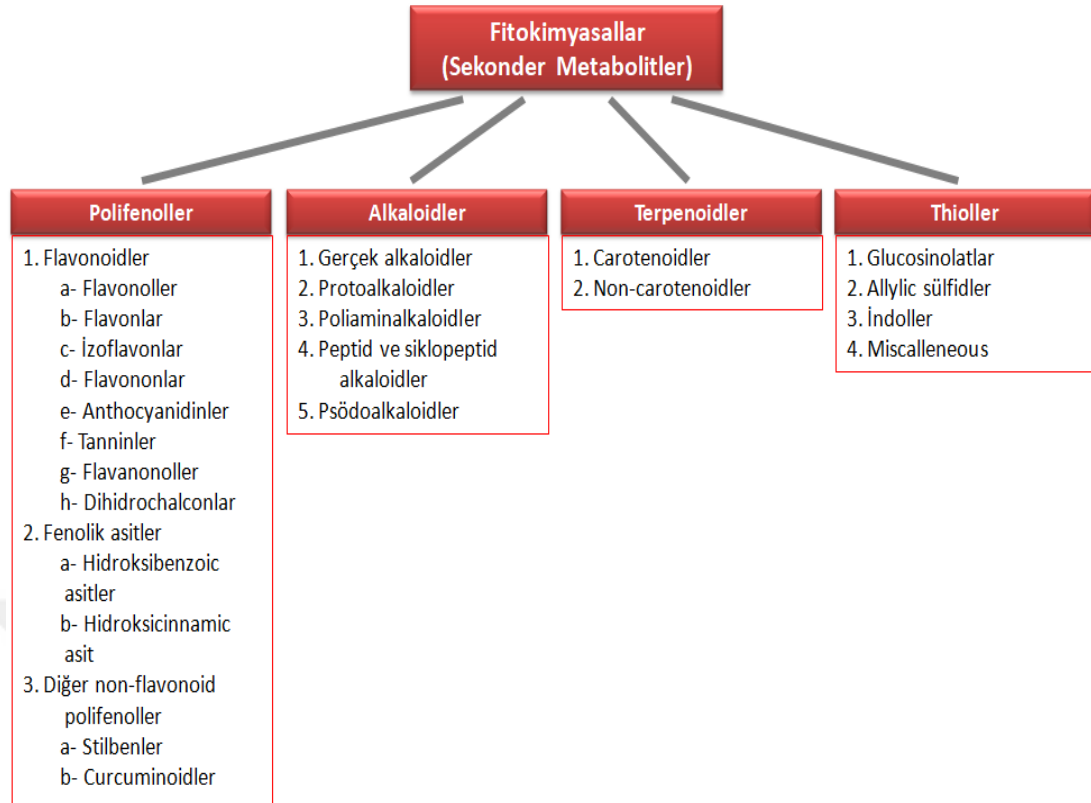
Sekonder metabolitlerin anti-kanserojen etki mekanizmaları hakkında bilgiler son yıllarda artmış olmakla birlikte, hala yeni bilgiler tanımlanmaya devam etmektedir. En çok bilinen kanser önleme mekanizması serbest radikal absorpsiyonu ya da anti-oksidan enzimlerin ekspresyonlarının uyarılmasıdır (Finley ve ark. 2011; Lee ve ark. 2013). Ayrıca anti-inflamatuar özellik sergileyerek; büyüme, invazyon ve metastaz ilişkili sinyal yollarını modüle ederek; hücre döngüsünü durdurarak; apoptozu teşvik ederek ya da hormonal mekanizmalarla da anti-kanserojenik özellik gösterebilirler (Thomas ve ark. 2015). Nitekim Epigallocateşin (yeşil çay sekonder metaboliti) hücre proliferasyonunu inhibe ve apoptozu aktive ederek (Thangapazham ve ark. 2007); Apigenin (maydanoz), Dicumarol (Sarı taş yoncası), Gingerol (Zencefil) ve Thymol (Kekik) apoptozu uyarak (Kaur ve ark. 2008; Martin ve ark. 2017; Chen ve ark. 2020; Elbe ve ark. 2020); Sulforaphane (Brokoli) ve Resveratrol (Japon madımağı, üzüm) hücre döngüsünü durdurarak ve apoptozu uyarak (Wu ve ark. 2019; Wang ve ark. 2021), anti-kanserojen etki gösterirler. Curcumin (Zerdeçal) de çeşitli sinyal yollarını düzenler ve p53 ekspresyonunu düzenler (Elena ve ark. 2012). Quercetin (mor renkli sebze ve meyveler) anti-inflamasyon, pro-oksidasyon, anti-proliferasyon ve hücre döngüsünün durmasını kapsayan çeşitli mekanizmalar üzerinden etkisini gösterir (Vafadar ve ark. 2020). Baicalein (Çin takkesi) anti-kanserojenik etkisini MAPK, ERK ve p38 sinyal iletim yollarını modüle ederek ortaya koyar (Han ve ark. 2019).

Çok sayıdaki fitokimyasal bileşik arasından FDA onayı alarak güncel kanser tedavisinde kullanılan 4 bileşik sınıfı vardır: Vinca alkaloidleri, taxanlar, camptothecin türevleri ve podophyllotoxinler. Vinca alkaloidleri *Catharanthus roseus* (rozet çiçeği)'dan elde edilen ilaçların bir alt sınıfıdır. Mikrotübül polimerizasyonunu ve organizasyonunu engelleyerek mitozu bloke ederler. Vinblastine ve vincristine doğal olarak izole edilmiş alkaloidlerdir. Vinorelbin ve vindensin ise bu gruptaki yarı-sentetik analoglardır. Bu ajanlar lösemi, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalar, Kaposi's sarkomu, ilerlemiş testiküler karsinom, meme ve akciğer kanserini kapsayan çeşitli kanserlerin tedavisinde kombin kemoterapi şeklinde uygulanmaktadır (Amit ve

ark. 2020). Taxanlar Yew ağacı kabuğundan elde edilir. Mikrotübül üzerine etki ederek hücre döngüsünün durmasına ve mitozun metafaz veya anafazda sonlandırılmasına neden olur. Meme, baş-boyun, prostat ve mide kanserlerinin tedavisinde kullanılır. Paclitaxel doğal formu, Docetaxel yarı sentetik türevidir (Safarzadeh ve ark. 2014; Amit ve ark. 2020). Camptothecinler, *Camptotheca acuminata* (Çin ağacı)'dan izole edilirler. DNA Topoizomeraz I inhibitörü olarak etkili olurlar. Yarı sentetik türevleri Irinotecan kalın bağırsak ve rektum kanserlerinin, Topotecan ise tekrarlayan over, küçük hücreli akciğer kanseri ve servikal kanser gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılır (Amit ve ark. 2020). Phodophyllotoxinler, *Podophyllum peltatum* (ayak otu/ördek otu)'dan izole edilir. Phodophyllotoxin tubuline bağlanarak etkili olurken, türevleri olan Etoposide ve Teniposide Topoizomeraz II'yi inhibe ederek iş görürler (Amit ve ark. 2020).

Bu dört ana sınıfın dışında başka sınıflardan bitki türevli ilaçlar da vardır: Ingenol mebutat (IM) *Euphorbia peplus*'tan izole edilen diterpene ingenolün hidrofobik esteridir. Yüksek konsantrasyonda hücre ölümünü uyarırken, düşük konsantrasyonda inflamatuvar yanıtı aktive eder. Homoharringtonine (HHT) *Cephalotaxus* cinsi ağaçlardan izole edilir. Ribozoma bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Combretastatinler *Combretum caffrum*'dan izole edilirler. Bu sınıf bileşikleri tubbulin polimerizasyonunu engelleyerek etkili olurlar (Amit ve ark. 2020).

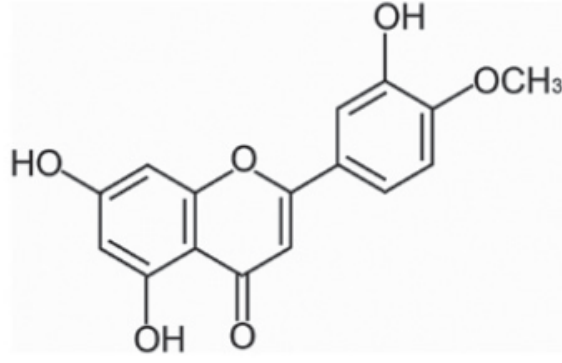
Sekonder metabolitler dört ana sınıfa ayrılır: Polifenoller, alkaloidler, terpenoidler ve tioller. Polifenoller flavanoidler, fenolik asitler ve diğer non-flavanoid polifenoller alt gruplarına; alkaloidler gerçek alkaloidler, protoalkaloidler, polyamin alkaloidler, peptid ve siklopeptid alkaloidler alt sınıflarına; terpenoidler karotenoidler ve non-karotenoidler alt sınıflarına; tioller de glucosinolatlar, allylic sülfidler, indoller ve miscellaneous alt sınıflarına ayrılırlar (Şekil 2.6; Nguyen ve ark. 2021).



Şekil 2.6. Fitokimyasalların sınıflandırılması (Nguyen ve ark. 2021).

2.3.5. Diosmetin

Diosmetin (3',5,7-trihidroksi-4'metoksi flavon), polifenollerin flavonoid alt sınıfına ait bir flavanoldür. Kimyasal formülü $C_{16}H_{12}O_6$ şeklinde olup (Şekil 2.7; Patel ve ark. 2013), maydanoz, turunçgiller, kasımpatı, kekik, zeytin ve baklagil yapraklarında bolca bulunur (Yoshikawa ve ark. 2000; Radušienė ve ark. 2008; Lin ve Harnly 2010; Patel ve ark. 2013; Abad-García ve ark. 2014), Diosmetin anti-oksidan (Liao ve ark. 2014), anti-inflamatuvar (Chandler ve ark. 2010), anti-bakteriyel (Wang ve ark. 2014), gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. Hücresel reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve malondialdehitin (MDA) oluşumunu engelleyerek anti-oksidan sistem enzimlerinin etkilerini artırır (Liao ve ark. 2014). Proliferasyonu baskılayarak (Zhao ve ark. 2011; Ge ve ark. 2015), hücre döngüsünü durdurarak (Androusoopoulos ve ark. 2009), apoptozu indükleyerek (Roma ve ark. 2018), metastazı inhibe ederek (Liu ve ark. 2016a), anti-karsinojenik aktivite de gösterebilir.



Şekil 2.7. Diosmetinin kimyasal yapısı. (Patel ve ark. 2013).

2.4. Çalışmanın Hipotezi

Fitokimyasalların sahip oldukları antikarsinojenik potansiyel çok uzun süreden beri bilinmektedir. Bu potansiyeldeki beklentinin büyük kısmını apoptozu teşvik edebilme ve proliferasyonu engelleyebilme özellikleri oluşturmaktadır. Bu çalışmada da hipotezimiz “Bir bitki sekonder metaboliti olan Diosmetinin antikarsinojenik etkinliğini apoptoz uyarımı ve proliferasyon inhibisyonu üzerinden gösterebileceği, apoptozu uyarımını da her iki yolak üzerinden gerçekleştirebileceği” şeklindedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler

Deneyisel aşamada kullanılan cihaz ve teçhizatlara dair bilgiler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan makine ve teçhizat listesi.

Makine/Teçhizat	Model/Markası
Soğutmalı Santrifüj	Nüve (NF 200)
ELISA Plaka Okuyucu	Biotek Epoch
-20°C Derin Dondurucu	Arçelik
-80°C Dondurucu	VWR Symphony
RT-PCR	Bio-Rad CFX Connect
Hassas Terazı	KERN-Sohn GmbH
Mikro Santrifüj	Hettich 200R
Santrifüj	Hettich Rotofix 32A
Laminar Flow Kabini Sınıf 2	Scanlaf
Buz Makinesi	Skotsman
Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Işık Mikroskobu	Olympus
İnverted Mikroskop	Olympus
Nanodrop Spektrofotometre	Maestro
Co ₂ ’li İnkübatör	Thermo
Vorteks	VWR
Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Yatay Jel Elektforezi	Cleaver
Jel Görüntüleme Sistemi	Syngene
Otomatik Mikro Pipet Seti	Eppendorf
Derin Dondurucu	Arçelik
Otoklav	VWR
Thermal Cycler	Peqlab
Manyetik Karıştırıcı	Hidolpe
Cell Scraper	Biologix
PZR Cihazı/Isısal Döngü Cihazı	Bioneer MyGenie 96 Thermal Block

Deneyisel aşamada kullanılan saf malzeme ve kimyasallar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	Marka
Diosmetin	Sigma
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Bioshop
Penisilin/Streptomisin	Lonza
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine	Capricorn Scientific
DPBS-Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Tuzlu fosfat tamponu)	Biowest
L-glutamin	VWR
Agaroz	Peqlab
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biowest
Trypsin-EDTA	Capricorn Scientific
Kristal Viole	Sigma
Trizol	RiboEx
15 ml Santrifüj Tüpleri	Nest Scientific
50 ml Santrifüj Tüpleri	Nest Scientific
5 ml Steril Serolojik Pipet	Nest Scientific
10 ml Steril Serolojik Pipet	Nest Scientific
Steril filtre ucu (0,45 µm)	Sarstedt
Trypsin-EDTA (0.25%) in HBSS (1x) with Phenol Red	Capricorn Scientific
Pipetleyici	Labcon
Pastör Pipeti	Superior
24 -Kuyulu Hücre Kültür Kabı	Nest Scientific
6-Kuyulu Hücre Kültür Kabı	Nest Scientific
2 Ml Kriyovial Tüp	Isolab
T75 Kültür Flaskı	Nest Scientific
T25 Kültürü Flaskı	Nest Scientific
PCR-8 Şeritli Tüpleri	Nest Scientific
PCR-8 Şeritli Tüp Kapakları	Nest Scientific

Deneyisel aşamada kullanılan kitler Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan kitler

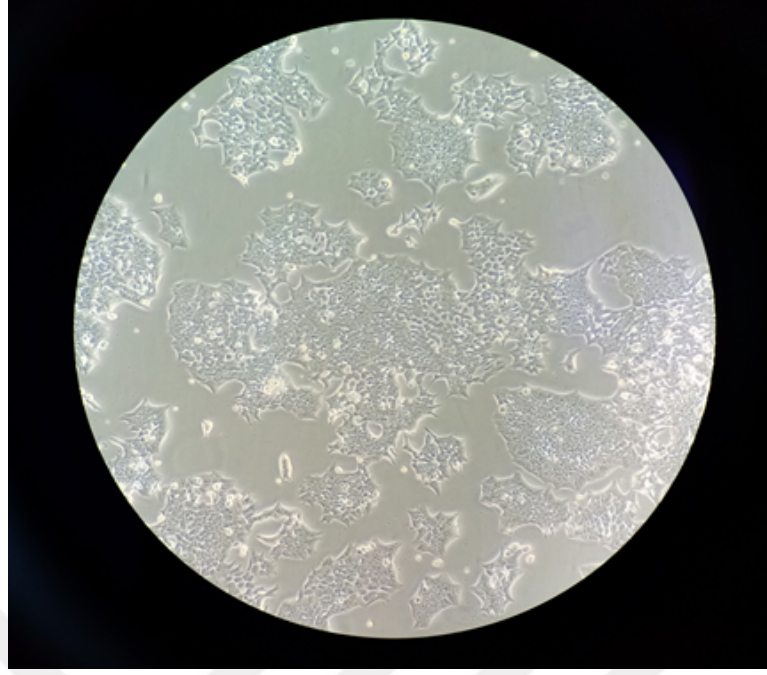
Kullanılan kitler	Marka
Cell Proliferation Kit (XTT based)	Capricorn Scientific
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
EvaGreen 2X qPCR MasterMix	ABM (Applied Biological Materials)
Cell Death Detection ELISA PLUS 96T	Sigma
DNase I, RNase-free (1 U/μL)	Thermo Scientific

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan insan kolon karsinoma hücre hatlarından HCT 116 hücreleri, Doç. Dr. Abdullah YALÇIN'ın laboratuvarlarından alınmıştır. HCT 116 hücre hattının özellikleri ve morfolojisi Tablo 3.4 ve Şekil 3.1'de gösterilmiştir. HCT 116 hücreleri, Laminar Flow Class II içerisinde, % 10 FBS (fetal sıgır serumu) ve %1 Penisilin-Streptomisin eklenmiş yüksek glukozlu DMEM besiyerinde (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (4.5 g/l) kültüre edilmiştir. Kültüre alınan HCT 116 hücreleri, T25'lik flasklarda 37°C, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren etüvde inkübe edilmiştir. Hücre büyümeleri, 2 günde bir inverted mikroskop altında kontrol edilmiştir.

Tablo 3.4. HCT 116 hücre hattının özellikleri

Organizma	Homo Sapiens, İnsan
Doku	Kolon
Morfolojisi	Epitel
Kültür özellikleri	Adherent (Yapışarak Çoğalan)
Hastalık	Kolorektal Karsinom
Cinsiyet	Erkek
Yaş	Yetişkin
Kimlik Doğrulama	ATCC Hücre Hattı



Şekil 3.1. HCT116 hücre hattının (ters) inverted mikroskop görüntüsü.

3.2.1. HCT 116 Hücre Hattının Dondurulması

Hücrelerin uzun süre saklanması için dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler flask yüzeyinde % 80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra yüzeyden kalkmaları için Tripsin-EDTA eklenerek 3-4 dk süreyle % 95 nem ve % 5 CO₂ şartlarında inkübe edilmiştir. Sonrasında flask yüzeyinden ayrılan hücreler 15 ml'lik falkon tüpte toplanarak, 1500 RPM'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pelletin üzerine her bir kriyovial için 9:1 oranında besiyeri-DMSO karışımı tüplere 1'er ml hacimde olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücreler önce -20°C 'de 1-2 saat kademeli olarak dondurulmuş ardından -80°C' ye kaldırılarak muhafaza edilmiştir.

3.2.2. HCT 116 Hücre Hattının Çözdürülmesi

HCT 116 hücrelerinin ilk defa hücre ekimi yapılacağında derin dondurucudan (-80°C) alınarak çözündürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kriyovial tüpler çözündürüldükten sonra içerisindeki hücreler besiyeri ile homojenize edilerek falkon tüpe alınmıştır. Hücreler 1500 RPM'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilirken, pellet de besiyeri ile homojenize edilerek % 10 FBS'li DMEM besiyeri bulunan flaslara ekilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen hücreler 37°C

sıcaklık, % 95 nem ve % 5 CO₂ şartlarında etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ekimden sonraki iki gün boyunca, inverted mikroskop altında, hücrelerin flask yüzeyine yapışma ve çoğalma durumları gözlenmiştir. Hücrelerin 2-3 günde bir besiyerleri değiştirilmiştir. Besleme işlemleri için flask yüzeyinde bulunan besiyeri aspire edilerek PBS ile tüm yüzeyin yıkanması sağlanmıştır. Ardından flask yüzeyine taze besiyeri eklenerek inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler flask yüzeyinde % 80-90 konfluent duruma geldiklerinde de pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. HCT 116 Hücre Hattının Pasajlanması

Kültüre alınan HCT 116 hücreleri, inverted mikroskop altında incelenerek gün aşırı besleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler % 80-90 oranında konfluent hale geldiklerinde pasajlama işlemi yapılmıştır. T25'lik flaskta yer alan besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler 3 ml PBS ile nazikçe yıkandıktan sonra flasktaki PBS aspire edilmiştir. Adherent hücrelerin yüzeyden kaldırılması için 1 ml Trypsin-EDTA eklenerek % 95 nem, % 5 CO₂ ve 37°C koşullarındaki etüvde 3-4 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamının kaldırılıp kaldırılmadığı inverted mikroskop altında kontrol edilmiştir. Ardından Trypsin inaktivasyonu için flaskta DMEM besiyeri eklenmiştir. Serolojik pipet yardımıyla homojenize edilen hücreler falkon tüpe aktarılmış ve 1500 RPM'de 4 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sonrasında oluşan süpernatant aspire edilerek uzaklaştırılmış ve pellet DMEM besiyeri ile homojen hale getirilerek istenilen hücre yoğunluğunda flaskta ekilmiştir.

3.2.4. Etken Madde Dozlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Diosmetin (C₁₆H₁₂O₆), molekül ağırlığı 300.26 g/mol olan, toz halinde, açık sarı renkli bir flavonoid bileşiğidir. Diosmetinin stok konsantrasyonu 1000 µM olacak şekilde, tartılan miktar % 0.1'lik DMSO içerisinde çözdürülerek homojen hale getirildikten sonra % 10 serumlu DMEM besiyeri ile istenilen hacime tamamlanmıştır. Sitotoksikite testi için uygulanan dozlar literatür taramalarına göre belirlenmiştir. Diosmetin için; 0.625 µM, 1.25 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 100 µM final konsantrasyonlarında olacak şekilde, DMEM besiyeri ile dilüe edilerek 9 farklı doz hazırlanmıştır. HCT 116 hücreleri 96 kuyulu hücre kültür plakalarına ekimleri gerçekleştirilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücrelerin yüzeye yapışma durumları inverted mikroskop

altında incelenmiştir. Daha sonra XTT testi için belirlenen farklı diosmetinin dozları 3 tekrarlı şekilde hücre plakalarına uygulanarak etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.5. Hücre Sayımı

Pasajlama sonucunda elde edilen pelletin üzerine belirlenen miktarda besiyeri eklenerek hücre süspansiyon haline getirilmiştir. Hücre süspansiyonundan (100 µl) ve Tripkan Mavisinden (100 µl) 1:1 oranında olacak şekilde PCR tüpü içerisinde pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Thoma lamı üzerine lamel kapatılarak oluk kısımlarına PCR tüpündeki karışımdan eklendikten sonra ışık mikroskobu altında hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Mikroskop altındaki her bir oluk için canlı hücreler sayıldıktan sonra aşağıdaki formülde yerine koyularak hesaplanmıştır.

$$\text{Canlı Hücre Sayısı / ml} = \text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$
$$10^4 = \text{Thoma lamı boyutlarından elde edilen faktör}$$

3.3. XTT Testi

Diosmetinin HCT 116 hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etki 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT) proliferasyon kiti ile belirlenmiştir. XTT, sarı renkli tetrazolyum tuzudur ve mitokondrideki dehidrojenaz enzimi sayesinde turuncu renkli formazan kristallerine indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Bu özelliği sayesinde kristallerin renk yoğunluğu ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında ölçülebilmektedir. Çalışmada ‘Hücre Proliferasyon XTT Kiti’ kullanılmış olup üretici firmanın (Biological Industries) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

XTT testi için 96’lık hücre kültür plakalarına, her bir kuyuda 100’er µl hacimde 2×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde HCT 116 hücreleri ekilerek 37 °C, % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin yapışma durumu inverted mikroskopta gözlendikten sonra besiyerleri uzaklaştırılarak diosmetin dozları: 0.625 µM, 1.25 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında ve 100 µl hacimde olacak şekilde kuyulara uygulanmıştır. Kontrol grubu kuyularına ise yalnızca % 10 serumlu besiyeri ilave edilmiştir. Zamana bağlı etkinin gözlenebilmesi için diosmetin dozları ile muameleler 24, 48 ve 72 saat boyunca gerçekleştirilmiştir.

XTT protokolüne göre her bir kuyu için 100 µl besiyeri, 50 µl XTT reaksiyon solüsyonu (50/1 oranında XTT reaktifi ve aktivasyon çözeltisi karışımı) ilave edilerek

hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım doz ve kontrol kuyularına 150 µl hacimde dağıtılmıştır. XTT reaksiyon solüsyonu uygulandıktan sonra hücreler 4 saat boyunca % 96 nem, % 5 CO₂ içeren etüvde ve 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından doz ve kontrol kuyularının absorbens değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Tüm doz grubu ve kontrol grubu kuyularına ait % canlılık ve sitotoksisite değerleri:

$$\% \text{ Canlılık} = [\text{Doz grubunun absorbensı (OD)} / \text{Kontrol grubunun absorbensı (OD)}] \times 100$$

$$\% \text{ Sitotoksisite} = [1 - (\text{Doz grubunun absorbensı} / \text{Kontrol grubunun absorbensı})] \times 10$$

formüllerine göre hesaplanmıştır.

3.4. Koloni Oluşum Testi

XTT testi sonuçlarına göre belirlenen sitotoksik 5 µM, 7,5 µM ve 10 µM’lik farklı diosmetin dozları ile muamele edilen HCT 116 hücrelerinin, koloni oluşturma yeteneklerinin nasıl etkilendiğini belirlemek amacıyla koloni oluşum testi gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak 6 kuyulu plakalara 2x10³ hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılmış ve 37°C sıcaklığa ayarlı % 5 CO₂ ve % 96 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeye yapışmaları ışık mikroskobu altında kontrol edildikten sonra belirlenen diosmetin dozları üç tekrarlı şekilde uygulanırken, kontrol grubu hücrelerinin ortamları da taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücrelerin iki günde bir olacak şekilde besleme işlemleri gerçekleştirilerek koloni oluşumlarının kontrolü sağlanmıştır. Altıncı günün sonunda hücreler PBS ile yıkandıktan sonra soğuk metanolle -20°C’de’de 10 dakika fikse edilmiştir. Süre sonunda metanol aspire edilerek fikse olan hücreler kristal viole boyası (500 µl) ile 10 dakika oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Ardından doz ve kontrol kuyuları steril distile su ile durulanarak boyadan arındırılmıştır. Boyanan doz ve kontrol grubu kuyularındaki koloniler fotoğraflanmış ve sonrasında sayılarak, değerlendirilmiştir.

3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

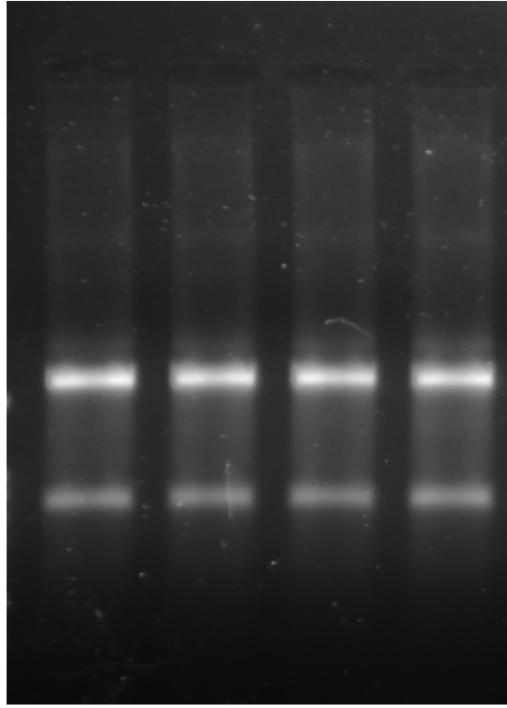
XTT testi sonrası belirlenen diosmetin konsantrasyonları ile muamele edilen doz grubu hücreleri ile kontrol grubu hücrelerinin gen ekspresyon analizleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu RiboEx (GenAll) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Altı kuyulu hücre plakalarına 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiş, ardından plakalar % 96 nem, % 5 CO₂ ve 37°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin plaka yüzeyine yapışmaları ve çoğalmaları mikroskop altında kontrol edildikten sonra 5µM, 7,5 µM ve 10µM şeklinde belirlenen diosmetin dozları mikrolaka kuyularına uygulanarak 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücreleri kaldırmak için, her kuyuya 500 µl trizol eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Hücre kazıyıcısı yardımıyla yüzeyden kaldırılan hücreler eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra tüplerin üzerine 100 µl kloroform eklenerek 15 saniye boyunca vortekslenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler +4°C’ de 12000 RPM’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası en üst faz mikropipet yardımıyla alınarak yeni eppendorf tüplerine aktarılmıştır. RNA’nın bulunduğu üst fazın üzerine; yavaş yavaş 500 µl izopropanal eklendikten sonra birkaç kez alt üst edilmiş ve sonrasında +4°C’ de 12000 RPM’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından oluşan süpernatant uzaklaştırılarak pelletin üzerine 500 µl % 70’lik etanol eklenmiştir. Daha sonra +4°C’ de 12000 RPM 10 dk santrifüj edilerek oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra tamamen kurutulması sağlanmıştır. Pellet 35 µl RNase-DNase free su (NFW) ile nazikçe homojenize edilerek RNA’nın tamamen çözdürülmesi sağlanmıştır. Elde edilen RNA’lar kullanılabilecek kadar -80’de saklanmıştır. İzole edilen RNA’ların miktarı ve kalitesi Nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Her bir RNA numunesinin UV ölçümlerinde A260/A280 için 2 ± 0.1 , A260/A230 için 2,0-2,4 arasındaki değerleri dikkate alınmıştır.

3.5.2. RNA örneklerinin Yatay Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi

RNA örneklerinin kalitesinin tespiti için 1 µg’lık RNA örnekleri, 5 µl 6X yükleme boyası karıştırılarak nükleaz içermeyen su ile 12 µl hacime tamamlanmıştır. Sonrasında örnekler % 1’lik agaroz jele yüklenerek, yatay jel elektrofrezinde 90 V’ta 40 dakika boyunca yürütülmüş ve UV jel görüntüleme sisteminde 28S ve 18S rRNA bantları jelde gözlenmiştir (Şekil 3.2).



— **Genomik DNA**

— **28S rRNA**

— **18S rRNA**

Şekil 3.2. RNA'nın yatay jel elektroforez görüntüsü.

3.5.3. DNase Uygulaması

DNase I enzimi (RNase-free) (Thermo Fisher Scientific) muamelesi üretici firmanın talimatlarına göre, örneklerin olası genomik DNA kontaminasyonundan arındırılması için gerçekleştirilmiştir. Protokole göre 2 µg RNA, 2 µl 10X Buffer (MgCl₂), 2 µl DNaz-I enzimi, nükleaz içermeyen su ile 20 µl toplam hacime tamamlanarak, 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında her bir tüpe 2 µl 50 mM EDTA ilave edilerek 65°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında RNA örneklerinin Nanadrop ile tekrar ölçümleri gerçekleştirilerek kaydedilmiştir.

3.5.4. cDNA sentezi

DNase I enzimi muamelesinin ardından cDNA sentezi, iScript™ cDNA Sentez Kiti (Bio-Rad) ile üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için 0,1 ml hacimli PZR tüp içerisine 1 µg RNA, 4 µl 5X iScript reaksiyon mix, 1 µl iScript reverse transkriptaz ilave edilmiş ve hacmi nükleaz içermeyen su ile toplamda 20 µl'ye tamamlanmıştır. Sonrasında thermal cycler cihazında +25°C'de 5 dakika, 46°C'de 20 dakika ve 95°C'de 1 dakika inkübasyona bırakılarak tek zincirli cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA örnekleri kullanılabildiği kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.5.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Diosmetinin IC₅₀ dozu ile muamele edilmiş HCT 116 hücrelerinde, apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkili seçilen genlerin mRNA ifadelerinin analizi için gerçek zamanlı kantitatif PZR sistemi (Bio-Rad CFX Connect) kullanılmıştır. Çalışılan genlere ait primer dizileri IDT PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/site>) programı kullanılarak tasarlanmıştır. Belirlenen genlerin ekspresyonlarının kantitatif olarak belirlenmesi için boya olarak, çift iplikli DNA'ya bağlanabilen EvaGreen 2X qPCR Mastermix (Applied Biological Materials) kullanılmıştır. Bu reaksiyon için; 5 µl EvaGreen 2X qPCR mastermix, 5 pMol ileri primer ve 5 pMol geri primer ve 2 µl cDNA, 10 µl total hacime nükleaz içermeyen su ile tamamlanarak karışım hazırlanmıştır.

Reaksiyonun, enzim aktivasyon basamağı +95°C'de 4 dakika, amplifikasyon basamağı 40 döngü (95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye) olacak şekilde Bio-Rad CFX Connect cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu basamağın ardından 95°C'de 10 saniye boyunca denatürasyon basamağı uygulanmıştır. Sonrasında erime eğrisi (melting curve) analizi için önce sıcaklık 60°C'ye düşürülmüş ve sonrasında da 95°C'ye kadar saniyede 0,2°C olacak şekilde kademeli olarak ısı artışı uygulanmış ve bu ısılardaki optik ölçümler yapılarak erime eğrisi grafiği oluşturulmuştur. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda optik analiz sonucu elde edilen veriler Ct olarak kaydedilmiştir. Apoptoz ile ilişkili belirlenen genlerin ifade düzeyleri GAPDH housekeeping referans geni ile normalize edilmiştir.

3.6. DNA Fragmentasyon Testi

Diosmetinin üç farklı dozunun apoptoz üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde, Cell Death Detection ELISA PLUS (Roche) testi kullanılmıştır. Test, kantitatif düzeyde sandviç-enzim immünolojik test prensibine dayanmakta olup DNA ve histonlara yönelik fare monoklonal antikorlarını kullanarak, hücre lizatlarının sitoplazmik fraksiyonunda mono- ve oligonükleozomların spesifik olarak belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu da apoptoz sırasında meydana gelen DNA fragmentasyonlarının tespit edilmesini sağlar. Cell Death Detection ELISA PLUS (Roche) testi; duyarlılığı yüksek, spesifik ve 3-4 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermektedir.

Bu testin analizi için ilk olarak 24 kuyulu hücre plakalarına 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde hücreler ekildikten 24 saat sonra diosmetinin 5 μM , 7,5 μM ve 10 μM dozları ve kontrol grubu olarak da diosmetin içermeyen taze besiyeri ile 48 saat muamele edilmiştir. Sonrasında hücreler tripsinize edilmiş ve her bir doz ve kontrol kuyusu hücreleri tekrar sayılarak 96 kuyulu hücre plakalarına 100 μl hacimde 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 3 tekrarlı ekildikten sonra 37°C 'de % 5 CO_2 içeren etüvde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından mikropłaka 200 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant nazıkçe uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 200 μl Lysis Buffer ile resüspanse edilmiş ve mikropłaka $+15^\circ\text{C}$ ile $+25^\circ\text{C}$ arasında 30 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen lizat 200 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra her bir örneğın süpernatantından 20 μl alınarak streaptavidin kaplı mikropłaka kuyularına aktarılmıştır. Her bir örnek için 72 μl incubation buffer, 4 μl Anti-histon-Biotin ve 4 μl Anti-DNA-POD karıştırılarak toplamda 80 μl hacimde immünoreagent hazırlanmıştır. Her bir örnek lizatının eklendiğı kuyuların üzerine 80 μl immünoreagent ilave edilerek, 300 RPM'de 2 saat boyunca karıştırıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda solüsyonlar nazıkçe uzaklaştırılmış ve her bir kuyu üç defa 300 μl incubation buffer ile durulanmıştır. Buffer uzaklaştırıldıktan sonra 100 μl ABTS solüsyonu eklenmiş ve renk değışimi gözlenene kadar 250 RPM'de 15 dakika karıştırıcıda inkübe edilmiştir. Sonrasında 100 μl stop solüsyonu ilave edilerek, ELISA okuyucu cihazında her bir örneğın absorbans değerleri (OD), 405 nm dalga boyunda ve 490 nm referans aralığında ölçülmüştür.

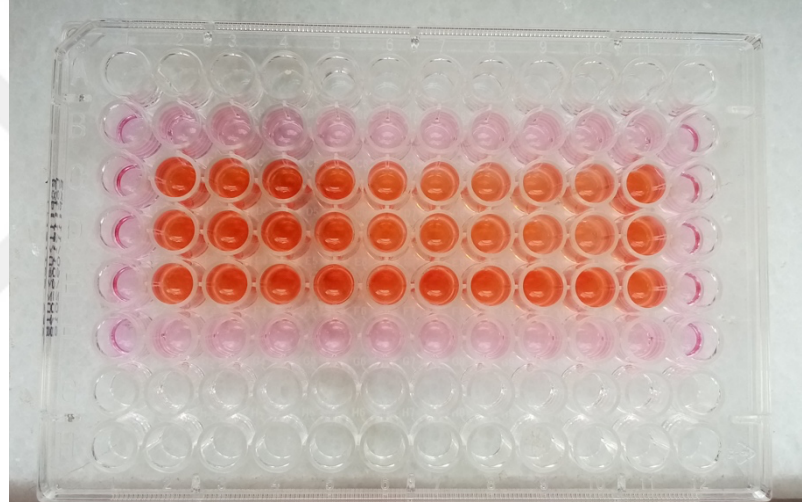
3.7. İstatistiksel Analiz

Deneyler üç tekrarlı çalışılmış ve elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Hücre Canlılığı analizi için GraphPad Prism 8 programı kullanılmıştır. Hedef genlerin mRNA ifadesindeki değışikliklerin istatistiksel olarak anlamlılığını belirlemek için online tabanlı "RT2 Profiler TM PCR Array Data Analysis" programı kullanılmıştır. Koloni ve ELISA testi sonuçları, SPSS 20.0 istatistiksel analiz programı kullanılarak tek yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiştir. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

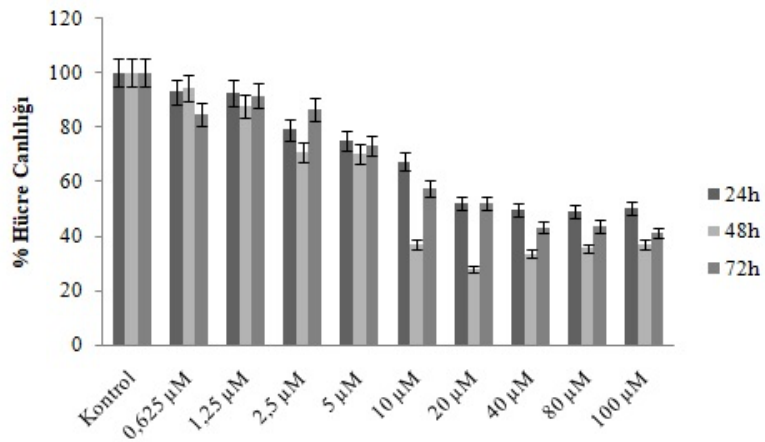
4. BULGULAR

4.1. Diosmetinin HCT 116 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Diosmetinin, HCT 116 hücreleri üzerindeki sitotoksitesi XTT proliferasyon testi ile belirlenmiştir. Diosmetinin 9 farklı dozu sırasıyla 0.625 μ M, 1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M final konsantrasyonlarında olacak şekilde HCT 116 hücrelerine uygulanarak 24, 48 ve 72 saat süresince inkübe edilmiştir. Diosmetinin 48. saatteki IC₅₀ değeri 7,5 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Diğer deneylerde IC₅₀ değerine IC₅₀'nin üstünde ve altındaki iki farklı diosmetin konsantrasyonu da eklenerek, doz grubu hücreler 3 farklı konsantrasyonla (5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M) muamele edilmiştir.



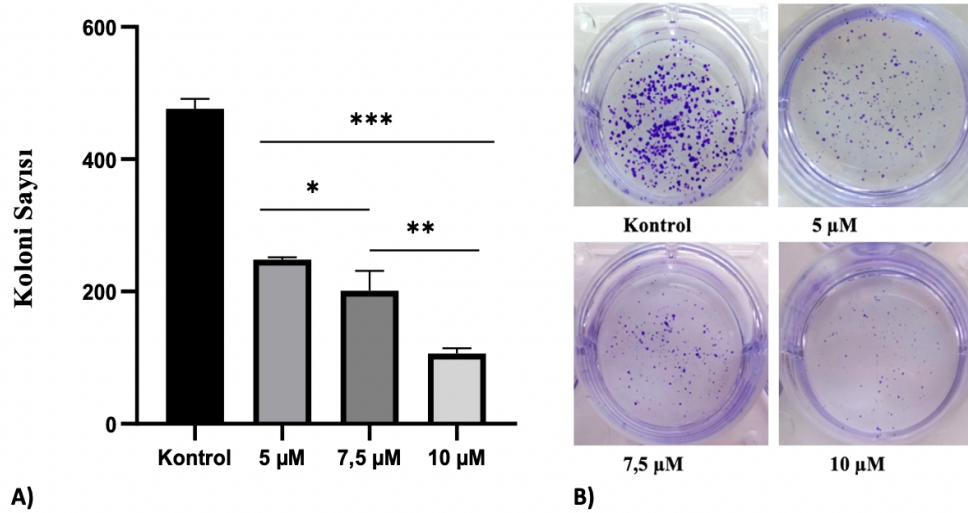
Şekil 4.1. XTT proliferasyon testinin 48. saatteki renk değişimi görüntüsü



Şekil 4.2. Diosmetinin doz ve zaman bağımlı olarak HCT 116 hücre hattındaki hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.2. Diosmetinin Koloni Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Koloni oluşum testi ile diosmetinin doz ve zaman bağımlı muamelesinin, kontrol grubu hücrelerine göre koloni oluşturma yetenekleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu test için, HCT 116 hücreleri, XTT proliferasyon testi sonuçlarına göre belirlenen 5 μ M, 7,5 μ M ve 10 μ M diosmetin dozları ile 48 saat muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, diosmetinin tüm doz grubu uygulamalarının, koloni oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe ettiği görülmüştür. HCT 116 hücre hattında koloni sayısı ortalamalarının kontrol grubunda $476 \pm 15,1$; 5 μ M, 7,5 μ M ve 10 μ M diosmetin doz gruplarında ise sırasıyla, $248,33 \pm 3,51$; $201 \pm 30,44$; $106,33 \pm 8,14$ olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu hücrelerine göre diosmetinin 5 μ M, 7,5 μ M ve 10 μ M dozlarının, koloni oluşumunu sırasıyla %47,9 $\pm$ 8,3; %57,8 $\pm$ 5,6; %77,73 $\pm$ 9,2 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Diosmetinin farklı dozlarının koloni oluşumları üzerine etkisi. A) Diosmetinin üç farklı dozunun uygulandığı HCT 116 hücre hattındaki koloni sayılarının karşılaştırılması. (Kontrol grubuna kıyasla, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$). B) Diosmetinin üç farklı dozu (5 μ M, 7,5 μ M ve 10 μ M) ile muamele edilen HCT 116 hücrelerinde koloni oluşumları.

4.3. Diosmetinin, Apoptoz ve Hücre Döngüsü ile İlişkili Genlerin Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

HCT 116 hücreleri, diosmetinin 48. saatteki IC₅₀ dozu olan 7,5 μ M ile muamelesinin ardından apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Apoptoz ile ilişkili TP53,

BAX, Kaspaz 3, Kaspaz 7, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Kaspaz 10, FAS, FADD, CYCS, TNF, TNFR2 genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı ($p<0,05$) artış; BCL-2 gen ekspresyonunda ise anlamlı azalış gözlenmiştir. Hücre döngüsünde önemli rol oynayan RB1 gen ekspresyonunda anlamlı düzeyde artış, E2F4, CCND3, CDK4, CDK6 gen ekspresyonlarında ise anlamlı düzeyde azalış belirlenmiştir.

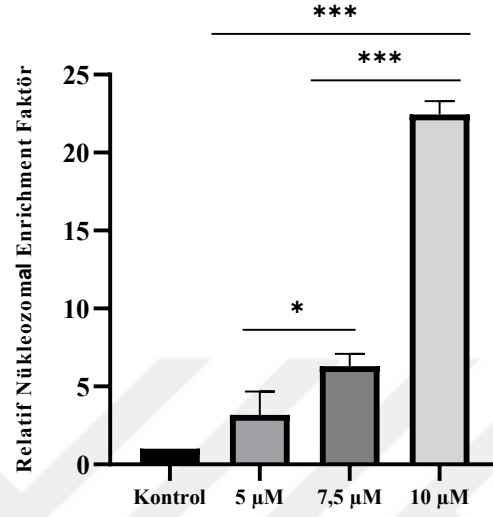
Tablo 4.1. Diosmetinin IC₅₀ dozu ile muamele edilen HCT 116 hücre hattında, apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkili genler üzerindeki etkisi.

Gen	Kat Değişimi	P değeri
TP53	10,23 ± 0,2	0.000000
BAX	11,16 ± 0,035	0.000001
BCL-2	-12,25 ± 0,14	0.000096
Kaspaz 3	5,45 ± 0,135	0.000111
Kaspaz 7	8,94 ± 0,405	0.005322
Kaspaz8	10,09 ± 0,075	0.000013
Kaspaz 9	2,66 ± 0,015	0.004128
Kaspaz 10	1,71 ± 1,06	0.278723
FAS	7,24 ± 0,04	0.000008
FADD	1,54 ± 0,225	0.018043
CYCS	3,24 ± 0,01	0.000001
PPARG	-1,24 ± 0,085	0.297565
TNF	1,54 ± 0,045	0.019829
TNFR1	32,45 ± 0,99	0.060122
TNFR2	3,29 ± 0,04	0.000002
RB1	3,61 ± 0,01	0.000010
E2F4	-1,03 ± 0,175	0.786134
CCND1	1,25 ± 0,31	0.238257
CCND2	1,54 ± 0,945	0.483945
CCND3	-1,61 ± 0,1	0.019097
CDK4	-1,99 ± 0,305	0.017360
CDK6	-1,89 ± 0,02	0.007885

4.4. DNA Fragmentasyon Analizi

Çalışmamızda diosmetinin indüklediği apoptotik hücre ölümünün belirteçlerinden biri olan DNA fragmentasyon seviyesinin belirlenmesinde kolorimetrik tabanlı bir test olan “Cell Death Detection Elisa Plus” kiti kullanılmıştır. Diosmetinin apoptotik etkilerini belirlemek için, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM olmak üzere üç farklı doz konsantrasyonu seçilmiştir. Doz grubu (5 µM, 7,5 µM, 10 µM) HCT 116

hücrelerinde 48. saatte gözlemlenen DNA fragmentasyon oranının (Enrichment Factor) kontrol grubuna göre sırasıyla, $3,17 \pm 1,5$ (ns); $6,29 \pm 0,79$ ($p < 0,001$); $22,44 \pm 0,85$ ($p < 0,0001$) kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Diosmetin uygulamasının HCT 116 hücrelerinde DNA fragmentasyon oranlarına etkisi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$).

5. TARTIŞMA

KRK klinik/moleküler özellikleri ve prognozu hastadan hastaya farklılık gösteren heterojen bir hastalıktır. Hastaların 1/3'üne yakını ancak hastalığın ileri evresinde tanı alabilmektedir. İlerlemiş KRK'da 5 yıllık sağkalım ise son derece düşüktür. Bu nedenle erken teşhis KRK'da öncelikli hedeftir (Rodriguez-Salas ve ark. 2017, Dawood 2018). Erken evrede tanı alabilen ve tedaviye başlanan hastalarda da hastalığın tekrarlama oranının yüksek olması, bir süre sonra kemoterapiye direnç geliştirmesi ve kullanılan terapötiklerin şiddetli yan etkilerinin bulunması hastalığın tedavi ve takibini zorlu hale getirmektedir. Bitkilerde bulunan fitokimyasallar uzun zamandan beri kanserlerin önlenmesinde/tedavisinde terapötik bir ajan adayı olarak araştırılmaktadır. Biz de bu çalışmada bir bitki fitokimyasalı olan Diosmetinin HCT 116 hücrelerindeki anti-karsinojenik etkisini ve bu etkinin mekanizmasını ortaya koymayı amaçladık. Diosmetin turunçgiller, baklagiller, zeytin, kekik, maydanoz ve kasımpatıda bolca bulunan, polifenollerin flavonoid alt sınıfına ait bir flavanoldür (Yoshikawa ve ark. 2000; Lin ve Harnly 2010; Abad-García ve ark. 2014).

Diosmetinin anti-karsinojenik etkinlikleri en çok karaciğer kansinomları olmak üzere çeşitli kanserlerde değerlendirilmiştir. Bu çalışmalardan birinde Diosmetinin anti-metastatik etkileri hepatosellüler karsinom hücre hatlarında (SK-HEP-1 ve MHcc97H) araştırılmış ve bu amaçla migrasyon, yara iyileşmesi ve motilite testleri; ardından da metastatik süreçle ilişkili genlerin ve proteinlerin ekspresyon düzeyleri için RT-qPCR ve Western Blot analiz yöntemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular Diosmetinin PKC/MAPK/MMP yolları aracılığıyla MMP-2/9 ekspresyonunu aşağı regüle ettiğini ve dolayısıyla metastazı engellediğini ortaya koymuştur (Liu ve ark. 2016a).

Hepatosellüler karsinom HepG2 hücrelerinde de Diosmetinin anti-karsinojenik etkileri Liu ve ark. (2016b) tarafından araştırılmıştır. Araştırmacılar çalışmalarında Diosmetinin proliferasyon, apoptoz ve otofaji üzerindeki etkilerini MTT analizi, Annexin V boyaması ve elektron mikroskobu/green fluorescent protein (GFP)-mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir (LC3) transfeksiyon/LysoTracker Red boyaması ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca Diosmetin ile otofaji, proliferasyon ve apoptoz arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için otofaji inhibitörü Bafilomycin A1 (BA1) uygulamışlardır. Western Blot analizi ile de otofaji- ve apoptoz-ilişkili proteinlerin ekspresyon durumlarını değerlendirmişlerdir. Liu ve ark.

(2016b), çalışmanın sonunda Diosmetinin HepG2 hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve mTOR yolağının regülasyonu yoluyla apoptozu uyardığını göstermişlerdir ve Diosmetinin hepatosellüler karsinom tedavisi için potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini ileri sürmüşlerdir. HepG2 hücrelerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada da Annexin iodide (PI) ikili boyaması, MTT ve CCK8 analizi, Western Blot ve Immünofloresan (IF) yöntemler gerçekleştirilerek Diosmetinin proliferasyonu inhibe ettiği ve p53 ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (Liu ve ark. 2016). Çalışmada Diosmetin ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerine rekombinant TGF- β verilmiş ve bu uygulamanın proliferasyonun inhibisyonunu ve apoptozu kısmen tersine çevirdiği görülmüştür. Bu sonuç TGF- β ve TGF- β reseptör sinyal iletiminin HepG2 hücrelerinde Diosmetin ile uyarılan apoptozun ana hedefi olabileceği görüşüne yol açmıştır. Yine HepG2 hücreleri ile yapılan diğer bir çalışmada (Qiao ve ark. 2016) MTT analizi, Annexin V/PI boyaması, Western blot analizi, immünofloresan (IF) ve koloni oluşum testlerinin sonucunda Diosmetinin p53-bağımlı apoptoz yolağının aktivasyonunu sağlayarak apoptozu uyardığını ve Notch3 reseptör ekspresyonunu aşağı regüle ederek NF- κ B sağkalım yolağını inhibe ettiğini göstermişlerdir. MTT analizi, Flow sitometrisi, Western blot (hücre döngüsü- ve apoptoz-ilişkili proteinler) ve transfeksiyon (Checkpoint kinase 1, Chk1-siRNA; Checkpoint kinase 2, Chk2-siRNA ve BCL-2-siRNA) yöntemlerinin HepG2 ve HCC-LM3 hücrelerinde uygulandığı başka bir çalışmada (Ma ve Zhang 2020), Diosmetinin proliferasyonu inhibe ederken, apoptozu ve hücre döngüsünün durmasını teşvik ettiği belirlenmiştir. Ayrıca Diosmetinin hücre döngüsünü Chk2'yi hedefleyerek G2/M'de durdurduğu saptanmıştır.

Diosmetinin anti-karsinojenik özellikleri Glioma hücrelerinde de çalışılmıştır (Yan ve ark. 2020). Çalışmada glioma hücrelerinde MTT, yara iyileşmesi ve transwell analizleri yapılırken, Western blot yöntemi ile apoptoz-ilişkili proteinler ile TGF- β , E-cadherin, fosforillenmiş ve fosforillenmemiş Smad2 ve Smad3 proteinlerinin düzeyleri değerlendirilmiştir. Ayrıca glioma U251 hücrelerinin gelişimi ve ilerlemesi fare modeli kullanılarak in vivo şekilde gözlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar Diosmetinin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu, TGF- β yolağını ve BCL-2 ekspresyonunu inhibe ettiğini, E-cadherin, BAX ve kesilmiş Kaspaz 3 ekspresyonunda önemli artışa yol açtığını göstermiştir. Yine sonuçlara göre Diosmetin glioma hücrelerinin tümörojenitesini in vivo azaltmış ve apoptozu uyarmıştır. Bu sonuçlardan

hareketle Diosmetinin glioma hücre büyümesini E-cadherin ekspresyonunu aktive ve TGF- β sinyal ileti yolağını inhibe ederek baskıladığı sürülmüştür.

Zhao ve ark. (2021), over kanser hücreleri (A2780 ve SKOV3) üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında Diosmetin muamelesi sonrası CCK8 hücre canlılık testi, koloni oluşum testi, yara iyileşme testi, transwell invazyon testi, apoptoz için Flow sitometrisi ile Nrf2 plazmid transfeksiyonu uygulamışlar ve Diosmetinin proliferasyon, migrasyon ve invazyonu inhibe ettiğini, apoptozu da uyardığını tespit etmişlerdir. Yine araştırmacılar çalışmada Diosmetinin BAX, kesilmiş Kaspaz 3 ve PARP düzeylerini yukarı regüle ederken, BCL-2 düzeyini de aşağı regüle ettiğini belirlemişlerdir. Ayrıca Nrf2'nin aşırı ekspresyonunun diosmetin tarafından uyarılan apoptozu ve proliferasyonun inhibisyonunu kısmen baskıladığını bulmuşlardır.

Prostat kanseri hücreleri (LNCap ve PC-3) ile gerçekleştirilen bir çalışmada (Oak ve ark. 2018), apoptoz- ve hücre döngüsü-ilişkili proteinlerin ekspresyonu için Western blot; hücre döngüsü analizi için Flow sitometrisi ile gerçekleştirilmiştir. Diosmetinin siklin D1, Cdk2 ve Cdk4, BAX, p27^{Kip1} ve FOXO3 protein ekspresyon düzeylerinde artışa, c-Myc ve BCL-2 protein ekspresyonunda da azalışa yol açtığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar Diosmetinin protein ekspresyonu üzerindeki modülatör etkisine dikkat çekmişler ve Diosmetinin apoptik mekanizmayı XIAP'ı (X-linked inhibitor of apoptosis) inhibe ederek ve kesilmiş Kaspaz 3 ekspresyon düzeylerini artırarak harekete geçiriyor olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Diosmetinin meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) tümörogenezi baskılayıcı etkisini ortaya koymayı amaçlayan bir çalışmada hücre canlılığının tespiti için CCK-8, laktat dehidrogenaz sızıntısının tespiti için LDH testi, mitokondriyal membran potansiyelini ve hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) ölçmek için de reverse floresan mikroskopisi yöntemleri kullanılmıştır (Wang ve ark. 2019). Apoptozun ve hücre döngüsünün değerlendirilmesi Flow sitometrisi ile yapılırken, apoptoz- ve hücre döngüsü-ilişkili genlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler RT-qPCR ve Western blot yöntemleri ile belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda Diosmetinin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etkiler sergilediği, Bcl-2 ve siklin D1 ekspresyonlarını aşağı regüle ederken; p53, BAX, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve kesilmiş Kaspaz 3 ekspresyonlarını yukarı regüle ettiği saptanmıştır. Böylece Diosmetinin meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü durdurarak ve mitokondri aracılı apoptoz iç yolağını uyararak anti-proliferatif ve pro-apoptik potansiyel

sergilediği, meme kanserinin önlenmesinde/tedavisinde aktif doğal ajanlar olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Diosmetinin anti-karsinojenik potansiyeli küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (Chen ve ark. 2018), ve deri kanserinde (Choi ve ark. 2019), de çalışılmıştır. Bu çalışmalardan ilki küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri (HLF-1 ve BEAS-2B) ve immün defisit fareler ile gerçekleştirilmiş, Diosmetin paclitaxel ile kombine edilmiştir. Hücre canlılığı, apoptoz ve ROS ile ilgili değişiklikler için MTT testi, Flow sitometrisi ve floresan prob DCFH-DA uygulanmış, protein ve mRNA ekspresyon analizleri için de Western blot ve RT-qPCR yöntemleri gerçekleştirilmiştir. Farelere inoküle edilen tümörler ölçülmüş ve vital organlar histolojik/immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Diosmetinin PI3K/Akt/GSK-3B yolağının bozulmasıyla Nrf2 stabilitesini azaltarak kanser hücrelerinde ROS üretimini uyardığını; ROS birikimi sayesinde de seçici olarak kanser hücrelerinin apoptozunu teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Ksenograft çalışmalarının sonuçlarına göre de Diosmetin ve Paclitaxel kombinasyonu sinerjistik olarak kanser hücrelerini baskılamıştır. Vital organların histolojik incelemesinde ise Diosmetine dair bir sitotoksositeye rastlanmamıştır. Bu sonuçlar üzerine araştırmacılar Diosmetinin küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde adjuvan tedavi için aday olabileceğini öngörmüşlerdir. Deri kanserinde gerçekleştirilen çalışmada (Choi ve ark. 2019), da Diosmetinin tümör büyümesi, anjiyogenez ve metastaz üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla B16F10 melanom hücreleri ile insan umbilikal ven endotel hücreleri ve B16F10 fare melanom modeli kullanılmıştır. Çalışmanın bulguları Diosmetinin hücre ölümünü uyararak, anjiyogenezi engelleyerek ve defektif tümör vasküler yapısını normalize ederek tümör ilerleyişini ve metastazı baskıladığını ortaya koymuştur.

Kolon kanserinde gerçekleştirilen iki çalışmanın ilkinde farelerde kolon kanseri HCT 116 hücre ksenograftları ile çalışılmıştır (Koosha ve ark. 2019a). Diosmetin uygulamasının farelerdeki tümör gelişimi üzerindeki etkileri takip edilmiş ve apoptoz-ilişkili proteinlerin ekspresyon değişiklikleri Western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda Diosmetinin HCT 116 hücrelerinin tümör büyümesini azalttığı tespit edilmiştir. İkinci çalışma yine aynı araştırmacılara aittir (Koosha ve ark. 2019b). Bu çalışmada da Diosmetinin HCT 116 hücrelerindeki anti-karsinojenik etkisinin moleküler mekanizmasının ortaya konması amaçlanmıştır.

Çalışmanın sonuçları Diosmetinin hücre döngüsünü G2/M'de durdurduğunu ve apoptozu uyardığını göstermiştir.

Mevcut çalışmada Diosmetin uygulanan HCT 116 hücrelerinde Diosmetinin sitotoksikite, proliferasyon ve apoptoz üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Diosmetin uygulanan HCT 116 hücrelerinde IC₅₀ değeri 7,5 µM olarak bulunmuştur. Uygulanan Koloni Oluşum Testi sonucunda Diosmetinin proliferasyonu 5 µM; 7,5 µM ve 10 µM'lık dozlar için sırasıyla % 47,9±8,3; % 57,8±5,6 ve % 77,73±9,2 oranında doz-bağımlı şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Diosmetinin kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi başka kanser tiplerinde de saptanmış ve bu etki sağkalım yollarının inhibisyonu ve/veya hücre döngüsünün durdurulması ile ilintilendirilmiştir (Liu ve ark. 2016a; Koosha ve ark. 2019b; Ma ve Zhang 2020; Yan ve ark. 2020). Çalışmamızda sağkalım yollarını ve hücre döngüsünü değerlendirmemiş olmakla birlikte; p53 ve RB1 ekspresyonlarının yukarı regüle ve siklin D3, Cdk4 ve Cdk6 ekspresyonlarının da aşağı regüle olmuş olması, hücre döngüsünün G1'de durdurulmuş olabileceğini ve bunun da p53 sinyal yolu ile gerçekleşmiş olabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Diosmetinin hücre döngüsü üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmaların bir kısmında döngünün G2/M'de (Koosha ve ark. 2019b; Ma ve Zhang 2020), bir kısmında ise G1'de (Androutsopoulos ve ark. 2009), durdurulduğuna dair veriler bulunmaktadır. Diosmetinin hücre döngüsü üzerindeki bu farklı etkilerinin kanser hücreleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği öngörülmektedir (Koosha ve ark. 2019).

Apoptozdan kaçış kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmalarına imkan tanıyan ve onlara invazif ve metastatik olabilmelerini sağlayacak mutasyonların birikmesi için zaman kazandıran bir özellikleridir (Hassan ve ark. 2014). Bu nedenle apoptoz mekanizmalarını hedef alan tedavi yaklaşımları farklı kanser türlerinin tedavisi için umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir (Choi ve ark. 2019). Çalışmamızda Diosmetinin HCT 116 hücrelerinde apoptoz üzerinde etkili olup olmadığını değerlendirmek için "Cell Death Detection Elisa Plus" kiti kullanarak DNA fragmentasyon analizi gerçekleştirdik. Analiz sonuçlarına göre Diosmetin uygulaması HCT 116 hücrelerinde apoptozun göstergelerinden olan DNA fragmentasyonunu doz-bağımlı şekilde artırmıştır (5 µM doz için 3,17±1,5 kat; 7,5 µM doz için 6,29±0,79 kat ve 10 µM doz için 22,44±0,85 kat artış). Apoptoz-ilişkili genlerin ekspresyon analizinde ise p53, BAX, Kaspaz 3, Kaspaz 7, Kaspaz 8, Kaspaz 9, FAS, FADD, Sitokrom c, TNF, TNF Reseptör 1 ve 2 genlerinin ekspresyon seviyelerindeki anlamlı

düzeyde artış; BCL-2 ekspresyon seviyesinde anlamlı düzeyde azalış saptanmıştır. İç apoptik yolağa özgü genlerden BAX, Kaspaz 9 ve Sitokrom c ekspresyonlarında artış ve BCL-2 ekspresyonunda azalış ile dış apoptik yolağa özgü genlerden Kaspaz 8, FAS, FADD, TNF, TNF Reseptör 1 ve 2 ekspresyonlarında artış Diosmetinin HCT 116 hücrelerinde her iki apoptoz yolağını modüle ettiğin ve apoptozu her iki yolak üzerinden de uyardığını ortaya koymaktadır. İç apoptik yolak BCL-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir (Chresta ve ark. 1996). Hücrenin apoptoz kaderi aslında BAX/BCL-2 oranı ile belirlenir. BCL-2, BAX ile bir heterodimer oluşturur ve bu etkileşim BAX'ın proapoptik fonksiyonlarını bloke eder. Ancak BAX/BCL-2 oranındaki artış (BAX ekspresyonunun artması ve BCL-2 ekspresyonunun azalması), iç apoptik yolağın mekanizmasını yani mitokondriyal membran geçirgenliğinin artmasını, bazı apoptik faktörlerin salınımını ve Kaspaz 9 aktivasyonunu tetikler. Aktive olan Kaspaz 9 da Prokaspaz 3'ü keser (Vaculova ve ark. 2008). Çalışmamızın ekspresyon analizlerinden HCT-116 hücrelerinde Diosmetin uygulamasının BAX/BCL-2 oranının artmasına yol açtığı anlaşılmaktadır. p53, hem iç apoptik yolağın hem de dış apoptik yolağın düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir proteindir (Zhang ve ark. 2014). Bu protein apoptik süreçte yer alan çok sayıda genin transkripsiyonunu uyarır. Bu genler arasında PUMA, NOXA, BAD, BAX, BAK, p53 ve AIP1 gibi iç yolak-ilişkili genlerle FAS, DR4 (TRAILR1) gibi dış yolak-ilişkili genler bulunur (Chen 2016). Bizim çalışmamızda da p53 ekspresyonunun artmış olması Diosmetinin her iki yolak üzerinden apoptozu teşvik edici etkisinin p53 aracılığıyla olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, Diosmetin HCT 116 kolorektal kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ederek ve apoptozu uyarak anti-karsinojenik bir etki göstermiştir. Apoptoz uyarıcı etkisini hem iç (mitokondriyal) hem de dış (ölüm reseptörleri aracılı) yolak üzerinden ortaya koymuştur. Diosmetinin proliferasyonu baskılayan ve apoptozu teşvik eden etkisi muhtemelen p53 proteini üzerinden olmaktadır. Bu bulgular, Diosmetinin kolorektal kanserlerin önlenmesi/ tedavisine yönelik doğal ajan arayışlarında odaklanılabilecek bir fitokimyasal olduğunu düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Diosmetinin HCT 116 hücrelerindeki IC50 değeri 48. saat için 7,5 μ M olarak belirlenmiştir.
2. Koloni oluşum testi sonuçları Diosmetinin HCT 116 hücrelerinde doz-bağımlı şekilde proliferasyonu inhibe ettiğini göstermiştir.
3. DNA fragmentasyon analizinde Diosmetinin HCT 116 hücrelerinde doz-bağımlı şekilde apoptozu uyardığı saptanmıştır
4. Gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre:
 - Diosmetin HCT 116 hücrelerinde hem iç (intrinsik/mitokondriyal) yolağı, hem de dış (ekstrinsik/ölüm reseptörü aracılı) yolağı tetikleyerek apoptozu yol açmıştır.
 - Proliferasyonu inhibe eden ve apoptozu uyaran etkisi muhtemelen p53 aracılığıyla olmaktadır.

Diosmetin KKK hücreleri üzerinde antikanserojenik etkiye sahiptir. Bu etkiyi proliferasyonu baskılayarak ve apoptozu teşvik ederek ortaya koymaktadır. Bu da Diosmetinin KKK'nın önlenmesinde ya da tedavisinde aktif bir doğal ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan Diosmetinin KKK'ya karşı terapötik güvenilirliğini ve toksisitesini değerlendirmek için daha fazla farmakokinetik / farmakodinamik çalışmalara ve hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Abad-García B, Garmón-Lobato S, Sánchez-Ilárduya MB, Berrueta LA, Gallo B, et al. Polyphenolic contents in citrus fruit juices: authenticity assessment. *European Food Research and Technology*. 2014; 238(5):803-18.
- Abulwerdi F, Liao C, Liu M, Azmi AS, Aboukameel A, et al. A novel small-molecule inhibitor of mcl-1 blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13(3):565-75.
- Adams CM, Clark-Garvey S, Porcu P, Eischen CM. Targeting the Bcl-2 family in B cell lymphoma. *Frontiers in Oncology*. 2019; 8:636.
- Ameri AM. Environmental causes of cancer. *American International Journal of Cancer Studies*. 2019; 1(1): 27-34. <https://doi.org/10.46545/aijcs.v1i1.50>
- Amit CS, Pallavi MC, Manasi D, Prabhakar R, Om P. Phytochemicals in cancer treatment: from preclinical studies to clinical practice. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 10:1614.
- Androutsopoulos VP, Mahale S, Arroo RR, Potter G. Anticancer effects of the flavonoid diosmetin on cell cycle progression and proliferation of MDA-MB 468 breast cancer cells due to CYP1 activation. *Oncology Reports*, 2009; 21(6):1525-8.
- Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG. Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality. *Clinical Colorectal Cancer*. 2016; 15(3): 195-203.
- Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature reviews Drug Discovery*. 2008;17(12):1001-12.
- Biondi A, Grosso G, Mistretta A, Marventano S, Toscano C, et al. Laparoscopic vs. open approach for colorectal cancer: evolution over time of minimal invasive surgery. *BMC Surgery*. 2013; 13(2): 1-6.
- Biondi A, Vacante M, Ambrosino I, Cristaldi E, Pietrapertosa G, et al. Role of surgery for colorectal cancer in the elderly. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2016; 8(9): 606-13.
- Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*. 2016; 7(1): 54.
- Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterology*. 2014; 27(1): 9–14.
- Brenner H, Hoffmeister M, Arndt V, Haug U. Gender differences in colorectal cancer: implications for age at initiation of screening. *British Journal of Cancer*. 2007; 96(5): 828-31.
- Bucur O, Nat R, Cretoiu D, Popescu LM. Phagocytosis of apoptotic cells by microglia in vitro. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2001;5(4): 438.
- Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *The Lancet Oncology*. 2008; 9: 1002–11.

- Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020;17(7): 395-417.
- Casara P, Davidson J, Claperon A, Le Toumelin-Braizat G, Vogler M, et al. S55746 is a novel orally active BCL-2 selective and potent inhibitor that impairs hematological tumor growth. *Oncotarget*. 2018; 9(28): 20075–88.
- Chandler D, Woldu A, Rahmadi A, Shanmugam K, Steiner N, et al. Effects of plant-derived polyphenols on TNF-alpha and nitric oxide production induced by advanced glycation endproducts. *Molecular nutrition & food research*. 2010; 54 Suppl 2: 141-50.
- Chen CH, Hsieh YC, Yang PM, Liu YR, Cho EC. Dicoumarol suppresses HMGA2-mediated oncogenic capacities and inhibits cell proliferation by inducing apoptosis in colon cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020; 524(4): 1003-9.
- Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016; 6(3):a026104.
- Chen X, Wu Q, Chen Y, Zhang J, Li H, et al. Diosmetin induces apoptosis and enhances the chemotherapeutic efficacy of paclitaxel in non-small cell lung cancer cells via Nrf2 inhibition. *British Journal of Pharmacology*. 2019; 176(12):2079-94.
- Choi J, Lee DH, Park SY, Seol JW. Diosmetin inhibits tumor development and block tumor angiogenesis in skin cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 117.
- Chresta CM, Masters JR, Hickman JA. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high BAX: BCL-2 ratio. *Cancer Research*. 1996; 56(8): 1834-41.
- Dawood S. The evolving role of immune oncology in colorectal cancer. *Chinese Clinical Oncology*. 2018; 7(2): 17.
- Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2019; 394:1467-80.
- Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012; 2(2): 303-36.
- Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2017; 17(2): 79-92.
- Elbe H, Yigitturk G, Cavusoglu T, Uyanikgil Y, Ozturk F. Apoptotic effects of thymol, a novel monoterpene phenol, on different types of cancer. *Bratislavske Lekarske Listy*. 2020;121(2): 122-28.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell Vol*. 1990; 61(5): 759-67.

- Ferreira CG, Epping M, Krut FAE, Giaccone G. apoptosis: target of cancer therapy. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2002; 8(7): 2024–34.
- Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*. 2005;11(5): 876-85.
- Finley JW, Kong AN, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei XG. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59 (13): 6837-46.
- Forcados GE, James DB, Sallau AB, Muhammad A, Mabeta P. Oxidative stress and carcinogenesis: potential of phytochemicals in breast cancer therapy. *Nutrition and cancer*. 2017; 69(3): 365-74.
- Frankel SR. Oblimersen sodium (G3139 BCL-2 antisense oligonucleotide) therapy in Waldenström's macroglobulinemia: a targeted approach to enhance apoptosis. *Seminars in oncology*. 2003; 30(2): 300-4.
- Freedman AN, Slattery ML, Ballard-Barbash R, Willis G, Cann BJ, et al. Colorectal cancer risk prediction tool for white men and women without known susceptibility. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; 27(5): 686-93.
- Ge A, Liu Y, Zeng X, Kong H, Ma Y, et al. Effect of diosmetin on airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015; 47(8): 604-11.
- Gonzalez-Pons M, Marcia Cruz C. Colorectal cancer biomarkers: where are we now?. *BioMed research international*. 2015.
- Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. T.C Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Savaş Daire Başkanlığı. 2016.
- Han SE, Park CH, Nam-Goong IS, Kim YI, Kim ES. Anticancer effects of baicalein in thyroid cancer cells through the up-regulation of erk/p38 mapk and akt pathway. *In Vivo (Athens, Greece)*. 2019; 33(2): 375-82.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The Next Generation. 2016;144(5): 646-74.
- Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Research International*. 2014.
- Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*. 2001;104(3): 325-8.
- Heron MP. Deaths: leading causes for 2016. *National vital statistics reports: from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics*. 2018; 67(6): 1-77
- Handlogten K S ve Johnson R L Stoelting's anesthesia and co-existing disease. *Anesthesia & Analgesia*. 2018;127(2): e6.
- Iqbal J, Abbasi BA, Mahmood T, Kanwal S, Ali B, et al. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017; 7(12):1129-50.

- Kaufmann SH, Vaux DL. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*. 2003; 22(47):7414-30.
- Kaur P, Shukla S, Gupta S. Plant flavonoid apigenin inactivates Akt to trigger apoptosis in human prostate cancer: an in vitro and in vivo study. *Carcinogenesis*. 2008; 29(11): 2210-17.
- Kolligs FT, Crispin A, Munte A, Wagner A, Mansmann U, et al. Risk of advanced colorectal neoplasia according to age and gender. *PloS One*. 2011; 6(5): e20076.
- Kolligs FT. Diagnostics and epidemiology of colorectal cancer. *Visceral medicine*. 2016; 32: 158-164.
- Koosha S, Mohamed Z, Sinniah A, Alshawsh MA. Evaluation of anti-tumorigenic effects of diosmetin against human colon cancer xenografts in athymic nude mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2019a; 24(14): 2522.
- Koosha S, Mohamed Z, Sinniah A, Alshawsh MA. Investigation into the molecular mechanisms underlying the anti-proliferative and anti-tumorigenesis activities of Diosmetin against HCT-116 human colorectal cancer. *Scientific Reports*. 2019b; 9(1):1-17.
- Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C ve ark. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007; 104(39):15418-23.
- Kroemer G, El-Deiry W S, Golstein P, Peter ME, Vaux D, et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death and Differentiation*. 2005;12(12): 1463-7.
- Lee WL, Huang JY, Shyur LF. Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013.
- Levine JS, Ahnen DJ. Adenomatous polyps of the colon. *New England Journal of Medicine*. 2006; 355(24): 2551-7.
- Liao W, Ning Z, Chen L, Wei Q, Yuan E, et al. Intracellular antioxidant detoxifying effects of diosmetin on 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress through inhibition of reactive oxygen species generation. *J Agric Food Chem*. 2014; 62(34) :8648-54.
- Lin LZ, Harnly JM. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*. 2010; 120:319–26.
- Liu B, Shi Y, Peng W, Zhang Q, Liu J, et al. Diosmetin induces apoptosis by upregulating p53 via the TGF- β signal pathway in HepG2 hepatoma cells. *Molecular medicine reports*. 2016 14(1):159-64.
- Liu J, Ren H, Liu B, Zhang Q, Li M, et al. Diosmetin inhibits cell proliferation and induces apoptosis by regulating autophagy via the mammalian target of rapamycin pathway in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Oncology Letters*. 2016b;12(6):4385-92
- Liu J, Wen X, Liu B, Zhang Q, Zhang J, et al. Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9. *Molecular Medicine Reports*. 2016a;13(3): 2401-08.

- Liu XC, Gao JM, Liu S, Liu L, Wang JR, et al. Targeting apoptosis is the major battle field for killing cancers. *World*. 2015; 4(3): 69-77.
- Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer*. 2015; 112: 957–62.
- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J ve Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death and Differentiation*. 1999;6(6):516–24
- Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, et al. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2013;1 9(4); 789-99.
- Ma A, Zhang R. Diosmetin Inhibits Cell Proliferation, Induces Cell Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Liver Cancer. *Cancer Management and Research*. 2020; 12: 3537-46.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*. 1995;146(1):3–15.
- Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*. 2016;7(3):105-114.
- Martin ACB, Fuzer AM, Becceneri AB, da Silva JA, Tomasin R, et al. [10]-gingerol induces apoptosis and inhibits metastatic dissemination of triple negative breast cancer in vivo. *Oncotarget*. 2017; 8(42): 72260-71.
- Matsuda T, Yamashita K, Hasegawa H, Oshikiri T, Hosono M, et al. Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterological Surgery*. 2018; 2(2): 129-36.
- Medema, JP. “Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nature Cell Biology*. 2013: 338-44.
- Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000; 407.6805: 796-801.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997; 88(3): 355-65.
- Nassar D, Blanpain C. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2016; (11): 47-76.
- Nguyen TH P, Kumar VB, Ponnusamy VK, Mai TTT, Nhat PT, et al. Phytochemicals intended for anticancer effects at preclinical levels to clinical practice: Assessment of formulations at nanoscale for non-small cell lung cancer (NSCLC) therapy. *Process Biochemistry*. 2021; 104: 55-75.
- Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*. 2000; 407: 810-16.
- Oak C, Khalifa AO, Isali I, Bhaskaran N, Walker E, et al. Diosmetin suppresses human prostate cancer cell proliferation through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. *International Journal of Oncology*. 2018; 53(2): 835-43.

- Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*. 2021; 81(4):1133-43.
- Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P, et al. Chemical carcinogenesis. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*. 2007;79(4): 593-616.
- Oren M, Rotter V. Introduction: p53—the first twenty years. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 1999; 55(1): 9-11.
- Ortega AM, Campos MRS. Medicinal plants and their bioactive metabolites in cancer prevention and treatment. *Bioactive Compounds*. Woodhead Publishing. 2019: 85-109.
- Patel K, Gadewar M, Tahiyani V, Patel DK. A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: a concise report. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2013; 19: 792-800.
- Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(2): 448.
- Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8(4): 603–19.
- Qiao J, Liu J, Jia K, Li N, Liu B, et al. Diosmetin triggers cell apoptosis by activation of the p53/Bcl-2 pathway and inactivation of the Notch3/NF- κ B pathway in HepG2 cells. *Oncology letters*. 2016; 12(6): 5122-28.
- Radušienė J, Ivanauskas L, Janulis, V, Jakštas V. Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithuania. *Biologija*. 2008; 54(1), 45-9.
- Rawla P, Barsouk A, Hadjinicolaou AV, Barsouk A. Immunotherapies and targeted therapies in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Medical Sciences*. 2019; 7(8): 83.
- Rawla, Tagore S, Adam B. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny*. 2019; 14(2): 89–103.
- Reagan M. Causes of cancer: genetic, epigenetic, viral, microenvironmental, and environmental contributions to cancer. *Cancer: Prevention, Early Detection, Treatment and Recovery*. 2019; 53-74.
- Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002; 1:111-21.
- Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;109: 9-19.
- Roma A, Rota SG, Spagnuolo PA. Diosmetin induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Molecular Pharmaceutics*. 2018; 15(3): 1353-60.
- Safarzadeh E, Sandoghchian Shotorbani S, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Adv Pharm Bull*. 2014; 4(Suppl1): 421-7.

- Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T et al. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*. 2021;13(9): 2025.
- Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2014; 64(2): 104-17.
- Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2020b;70(3): 145-64.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2020a; 70(1): 7-30.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021; 71(3): 209-49.
- Tamm I. Antisense therapy in malignant diseases: status quo and quo vadis?. *Clinical Science*. 2006; 110(4): 427-42.
- Tao ZF, Hasvold L, Wang L, Wang X, Petros AM, et al. Discovery of a potent and selective Bcl-x_L inhibitor with in vivo activity. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2014;5(10):1088-93.
- Thangapazham RL, Singh AK, Sharma A, Warren J, Gaddipati JP, et al. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*. 2007; 245(1-2): 232-41.
- Thomas R, Butler E, Macchi F, Williams M. Phytochemicals in cancer prevention and management?. *British Journal of Medical Practitioners*. 2015; 8(2): 1-8.
- Unal A, Baran Y, Kiraz Y. İmmünoterapi Kanser Moleküler Biyolojisi. Kısayol Yayıncılık, 2018: 391-400.
- Vaculova A, Zhivotovsky B. Caspases: Determination of their activities in apoptotic cells. *Methods in Enzymology*. 2008; 442: 157–81.
- Vafadar A, Shabaninejad Z, Movahedpour A, Fallahi F, Taghavipour M, et al. Quercetin and cancer: New insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell & Bioscience*. 2020;10(1):1-17
- Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 2016; 27(8): 1386-1422.
- Van der Jeught K, Xu HC, Li YJ, Lu XB, Ji G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2018; 24(34): 3834-48.
- Wang C, Li S, Ren H, Sheng Y, Wang T, et al. Anti-proliferation and pro apoptotic effects of diosmetin via modulating cell cycle arrest and mitochondria-mediated intrinsic apoptotic pathway in MDA-

- MB-231 cells. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2019; 25: 4639-47.
- Wang SY, Sun ZL, Liu T, Gibbons S, Zhang WJ, et al. Flavonoids from *sophora moorcroftiana* and their synergistic antibacterial effects on MRSA. *Phytotherapy Research*. 2014; 28:1071-76.
- Wang Y, Wu H, Dong N, Su X, Duan M, et al. Sulforaphane induces S-phase arrest and apoptosis via p53-dependent manner in gastric cancer cells. *Scientific Reports*. 2021; 11(1): 2504.
- Welch HG, Robertson, DJ. Colorectal cancer on the decline—why screening can't explain it all. *N Engl J Med*. 2016; 374(17):1605-07.
- Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2011;30.1: 1-14.
- Wu H, Chen L, Zhu F, Han X, Sun L, et al. The cytotoxicity effect of resveratrol: Cell cycle arrest and induced apoptosis of breast cancer 4T1 Cells. *Toxins*. 2019; 11(12): 731.
- Yan Y, Liu X, Gao J, Wu Y, Li Y. Inhibition of TGF- β signaling in gliomas by the flavonoid diosmetin isolated from *dracocephalum peregrinum* l. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2020; 25(1): 192.
- Yildizhan H, Barkan N P, Turan S K, Demiralp Ö, Demiralp FDÖ, et al. Treatment strategies in cancer from past to present. In *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*; 2018: 1-37.
- Yoshikawa M, Uemura T, Shimoda H, Kishi A, Kawahara Y, et al. Medicinal foodstuffs. XVIII. Phytoestrogens from the aerial part of *Petroselinum crispum* Mill. (parsley) and structures of 6''-acetylapiin and a new monoterpene glycoside, petroside. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2000; 48(7):1039–44.
- Zarei O, Benvenuti S, Ustun-Alkan F, Hamzeh-Mivehroud M, Dastmalchi S. Strategies of targeting the extracellular domain of RON tyrosine kinase receptor for cancer therapy and drug delivery. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2016; 142(12): 2429-46.
- Zhang Q, Liu J, Liu B, Xia J, Chen N, et al.: Dihydromyricetin promotes hepatocellular carcinoma regression via a p53 activation-dependent mechanism. *Scientific Reports*. 2014;4: 4628.
- Zhao F, Hong X, Li D, Wei Z, Ci X, et al. Correction to: Diosmetin induces apoptosis in ovarian cancer cells by activating reactive oxygen species and inhibiting the Nrf2 pathway. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*. 2021; 38(7): 78.
- Zhao R, Chen Z, Jia G, Li J, Cai Y, et al. Protective effects of diosmetin extracted from *galium verum* L. on the thymus of U14-Bearing Mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2011; 89(9): 665-73.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	MİYASE	Soyadı	YÖRÜK
Doğum Yeri	SELÇUKLU	Doğum Tarihi	1992
E-mail		Uyruğu	T.C

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	SELÇUK ÜNİVERSİTESİ	2014
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.		-
2.		-

Yabancı Dil	İngilizce
--------------------	-----------

9. EKLER

Ek-1: Etik Kurul Kararı

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI	
Toplantı Sayısı:88	Toplantı Tarihi: 17 Mayıs 2019
Karar Sayısı:2019/1873:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. H. Gül DURSUN' un "Diosmetinin kolorektal kanser hücrelerindeki (HCT116) antikarsinojenik etkinliğinin araştırılması" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 13.05.2019 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Miyase YÖRÜK' ün yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. H. Gül DURSUN' un sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir. Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir. Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. H. Gül DURSUN Yardımcı Araştırmacı: Miyase YÖRÜK	