

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

**DİKLOFENAK İLE İNDÜKLENMİŞ HT-29 HÜCRE HATTI ÜZERİNDE  
KRİSİN'İN MOLEKÜLER VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SEDA NUR ÖZBOLAT**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Dr. Öğr. Üyesi Adnan AYNA**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI  
Dr. Öğr. Üyesi Ekrem DARENDELİOĞLU**

**BİNGÖL-2020**

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca benden yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Adnan AYNA ve eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ekrem DARENDELİOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BÜBAP) Birimi'ne teşekkür ederim. (Proje Kodu :BAP-FEF.2019.00.006)

Deneyisel çalışmalarım esnasında benimle kıymetli deneyimlerini paylaşan sayın Arş. Gör. Gürkan AYKUTOĞLU hocama, Dr. Öğr. Üyesi Abdullah TUNÇ hocama, Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ hocama çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Eğitimim boyunca laboratuvar çalışmalarımı aksatmadan yürütebilmeme olanak sağlayan Kimya Bölümü Bölüm Başkanlığı'na ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bölüm Başkanlığı'na teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, kişisel ve mesleki gelişimime katkıda bulunan Doç. Dr. Hakan İNCİ hocama, Kimya Anabilim Dalı bölüm hocalarıma ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Anabilim Dalı bölüm hocalarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak bende büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve dualarını esirgemeyen anneme ve kıymetli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

**Seda Nur ÖZBOLAT**  
**Bingöl 2020**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	İİ
İÇİNDEKİLER .....	İİİ
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	Vİİ
TABLolar LİSTESİ .....	İX
ÖZET .....	X
ABSTRACT .....	Xİ
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hücre Döngüsü ve Apoptozis .....	1
1.2. Kanser .....	6
1.2.1. Kolon Kanseri.....	7
1.2.1.1. Tedavi Yöntemi.....	9
1.3. Non Steroidal Antiinflatuar İlaçların Kullanımı .....	10
1.3.1. Diklofenak .....	12
1.3.1.1. Fizikokimyasal Özellikleri.....	12
1.3.1.2. Farmakolojik Özellikleri.....	13
1.4. Serbest Radikaller .....	13
1.4.1. Süperoksit Anyonu .....	14
1.4.2. Hidrojen Peroksit.....	14
1.4.3. Hidroksil Radikalleri .....	15
1.4.4. Lipid Peroksid .....	15
1.5. Antioksidan Savunma Sistemleri .....	16
1.6. Krisin .....	17
1.6.1. Krisin'in Etki Mekanizması.....	18
1.6.2. İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	18

2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	20
3. MATERYAL-METOD .....	22
3.1. Hücre Ekimi.....	22
3.2. Hücre Canlılık Testi (WST-1) .....	22
3.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Salıverilmesi Testi.....	23
3.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) DCFH Ölçümü .....	24
3.5. Lipit Peroksidasyonu (LPO) Malondialdehit (MDA) Ölçümü.....	25
3.6. Total Antioksidan (TAS) Ölçümü .....	26
3.7. Katalaz Aktivite Tayini.....	27
3.8. QRT- PCR .....	28
3.9. Tunel Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).....	32
3.10. Caspase-3 Aktivite Testi.....	33
3.11. İstatiksel Analiz .....	34
4. BULGULAR .....	35
4.1. Hücre Canlılık Testi (Wst-1) .....	35
4.2. Laktat Dehidrogenaz (Ldh) Salıverilmesi Testi .....	37
4.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) DCFH Ölçümü .....	38
4.4. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Ölçülmesi.....	39
4.5. Total Antioksidan (TAS) Ölçümü .....	40
4.6. Katalaz Aktivite Tayini.....	41
4.7. QRT-PCR Analiz Sonuçları .....	42
4.8. Tunel Assay .....	46
4.9. Caspase-3 Aktivite Testi.....	47
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	53
KAYNAKLAR .....	54
ÖZGEÇMİŞ .....	59

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

WCRF: World Cancer Research Fund International

5 FU: 5-Fluorouracil

NSAİ: Non-Steroidal Antiinflatuar İlaçlar

COX: Siklooksijenaz

PG: Prostaglandin

DS: Diklofenak Sodyum

HPLC: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

ETS: Elektron Taşıma Sistemi

SOD: Süperoksit Dismutaz

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

GPx: Glutasyon Peroksidaz

OH: Hidroksil Radikali

MDA: Malondialdehit

CAT: Katalaz

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

HCC: Hepatoselüler karsinoma

HK-2: Hekzokinaz-2

HT-29: Kolon Kanseri Hücre Hattı

FBS: Fetal Bovine Serum

CO<sub>2</sub>: Karbondioksit

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

WST-1: Water-Soluble Tetrazolium Salt

DCFH-DA: 2',7'-Dikhlorofluorescein Diacetate

$\mu$ l: Mikrolitre

ml: Mililitre

nm: Nanometre

LPO: Lipit Peroksidasyonu

TBA: Tiyobarbütürik Asit

TCA: Trikloro Asetik Asit

%: Yüzde

Dk: Dakika

Rpm: Revolutions per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)

C°: Santigrat derece

TAS: Total Antioksidan Seviyesi

PBS : Phosphate-Buffered Saline

U/ml: Units per millilitre (U/mL)

LDH: Laktat Dehidrogenaz

TUNEL: Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling

$\mu$ M: Mikromolar

mM: Milimolar

Kr: Krisin

Dik: Diklofenak

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Hücre döngüsü kontrol noktaları .....	2
Şekil 1.2. Apoptozisin dışsal ve içsel yollarında rol alan genler.....	3
Şekil 1.3. P53 bağımlı apoptoziste görev alan genler .....	5
Şekil 1.4. NSAİ ilaçların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması .....	11
Şekil 1.5. Diklofenak Sodyum(sodyum;2-[2-(2,6-dikloroanilino)fenil]asetat) .....	12
Şekil 1.6. Antioksidanların sınıflandırılması.....	16
Şekil 1.7. Krisin'in kimyasal yapısı .....	18
Şekil 3.1. Hücre canlılık testi uygulamasının şematik görünümü.....	23
Şekil 3.2. Laktat Dehidrogenaz Salıverilmesi testi uygulamasının şematik gösterimi .....	24
Şekil 3.3. Reaktif oksijen türleri ölçümü uygulamasının şematik gösterimi .....	24
Şekil 3.4. Lipit Peroksidasyonu (MDA) ölçülmesi uygulamasının şematik gösterimi.....	25
Şekil 3.5. Total Antioksidan Ölçümü uygulamasının şematik gösterimi.....	27
Şekil 3.6. Katalaz Aktivite Tayini uygulamasının şematik gösterimi.....	28
Şekil 3.7. QRT-PCR uygulaması için c-DNA sentezi aşamalarının şematik gösterimi ...	31
Şekil 3.8. QRT-PCR uygulamasının şematik gösterimi .....	31
Şekil 3.9. TUNEL Assay uygulamasının şematik gösterimi.....	32
Şekil 3.10. Caspase-3 Aktivite Testi uygulamasının şematik gösterimi .....	33
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Dik ile indüklenmiş kolon kanseri (HT-29 hücre hattı) hücrelerinin 24 saat sonraki hücre proliferasyonuna olan etkisi.....	36
Şekil 4.2. Etkin konsantrasyon olarak seçilen (500 µM) Dik ile indüklenen HT-29 hücreleri üzerine 50 µM konsantrasyonda uygulanan Kr'nin hücre proliferasyonuna olan etkisi .....	36
Şekil 4.3. 500 µM Dik, 50 µM Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerindeki Laktat dehidrogenaz kiti kullanılarak ölçülmesi .....	37

Şekil 4.4. 500 µM Dik, 50 µM Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerinde oluşan reaktif oksijen türlerinin ROS Assay kiti kullanılarak ölçülmesi .....	38
Şekil 4.5. 500 µM Dik, 50 µM Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 12 ve 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerinde oluşan lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA'nın (Malondialdehit) LPO Assay kiti kullanılarak ölçülmesi .....	39
Şekil 4.6. 500 µM Dik, 50 µM Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerinde ki total antioksidan durumunun TAS Assay kiti kullanılarak ölçülmesi .....	40
Şekil 4.7. 500 µM Dik, 50 µM Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerindeki katalaz aktivitesinin CAT Assay kiti kullanılarak ölçülmesi .....	41
Şekil 4.8. 500 µM Dik, 50 µM Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan <i>Bax</i> 'ın mRNA ekspresyon düzeyi .....	42
Şekil 4.9. 500 µM Dik, 50 µM Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan <i>Kas-3</i> 'ün mRNA ekspresyon düzeyi .....	43
Şekil 4.10. 500 µM Dik, 50 µM Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında anti-apoptotik gen olan <i>Bcl-2</i> mRNA ekspresyon düzeyi .....	43
Şekil 4.11. 500 µM Dik, 50 µM Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan <i>Kas-8</i> 'in mRNA ekspresyon düzeyi .....	44
Şekil 4.12. 500 µM Dik, 50 µM Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan <i>Cyt-c</i> mRNA ekspresyon düzeyi .....	44
Şekil 4.13. 500 µM Dik, 50 µM Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan <i>p53</i> 'ün mRNA ekspresyon düzeyi .....	45
Şekil 4.14. 50 µM Kr'nin ön tedavisi 500 µM Dik ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik indeks .....	46
Şekil 4.15. (A) Kontrol grubu, (B) 500 µM Dik, (C) 50 µM Kr ve (D) ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattında Caspase-3 enziminin aktive olduğu koyu renkli kısımların ters ışık mikroskobu ile görüntülenmesi .....	47

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması .....	14
Tablo 3.3.1. QRT- PCR analizinde kullanılan genlere ait primer sekans dizileri (R:Reverse: Geri, Ters; F: Forward, İleri) .....	30



# DİKLOFENAK İLE İNDÜKLENMİŞ HT-29 HÜCRE HATTI ÜZERİNDE KRİSİN'İN MOLEKÜLER VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

## ÖZET

Kolon kanseri dünyada akciğer ve meme kanserinden sonra rastlanan en yaygın üçüncü kanserdir ve ikinci en yaygın kanser ölüm nedenidir. Sağlık bakanlığı verilerine göre son yıllarda kolon kanserindeki artış giderek çoğalmaktadır. Yapılan bir çok çalışma, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların (NSAİ) kolon kanserini önleyebileceğini göstermiştir. Diklofenak (Dik) grubu ağrı kesiciler, enflamasyonu ve kolon kanserine bağlı ağrıyı azaltmak için en yaygın kullanılan anti-inflamatuar NSAİ arasındadır. Yüksek konsantrasyonlarda Dik, agresif kolon kanseri hücrelerinde (HT-29, SW480 ve DLD-1) kontrol numunelerine kıyasla hücre canlılığı kaybını arttırabilmiştir. Dik'in sağkalım mekanizmasını inhibe ettiği ve kolon kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü ile birlikte meydana gelen, genellikle aerobik metabolizma sırasında ortaya çıkan Reaktif oksijen türlerinde (ROS) bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. Endojen ve eksojen antioksidanlar, ROS'un neden olduğu hasarı önleyebilir ve onarabilir. Bununla birlikte, son araştırma bulguları, antioksidanların antikanser ilaçlar ile beraber kullanımının faydalı olamayabileceğini veya kanser önleme ve tedavisini olumsuz yönde etkileyebileceğini öne sürmektedir. Bu tez çalışması kolon kanseri üzerinde anti proliferatif etkisi bulunan Dik ile hücreleri indükleyerek Kr'nin hücre proliferasyonuna olan etkisini ve bu etkinin altında yatan biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmaktadır. Dik ile muamelede bulunan HT-29 hücre hattı üzerinde konsantrasyona bağlı olarak (500  $\mu$ M) hücre proliferasyonunda önemli ölçüde azalma görüldü. Bu çalışmada, hücrelerin Dik ile muamele edilmesi sonrasında ROS ve malondialdehit (MDA) seviyelerinde ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzim salınımında artış ve katalazın (CAT) aktivitesinde azalma, apoptotik indeksde artış, apoptotik ve pro-apoptotik genlerin seviyelerinde artış gözlenirken, bu etkilerin tamamı Kr varlığında tersine çevrilmiştir. Yapılan deneyler sonrasında elde edilen bulgular Kr'nin kolon kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklemeye Dik'in etkinliğini azaltabileceğine dair yeni bir açıklama sağlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kolon kanseri, antioksidan, krisin, serbest radikaller, apoptozis

## **MOLECULAR AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF CHRYSIN ON HT-29 CELL LINE INDUCED WITH DICLOFENAC**

### **ABSTRACT**

Colon cancer is the third most common cancer in the world after lung and breast cancer, and the second most common cause of death (WHO 2018). According to the data of the accumulative data, the frequency of colon cancer has been increasing in recent years. Many studies have shown that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can prevent colon cancer. Diclofenac group painkillers are among the most widely used anti-inflammatory NSAIDs to reduce inflammation and pain associated with colon cancer. Diclofenac at high concentrations was able to increase loss of cell viability in aggressive colon cancer cells (HT-29, SW480 and DLD-1) compared to healthy cells. Diclofenac has been shown to inhibit the survival mechanism and lead to an increase in reactive oxygen species (ROS) that usually occur during aerobic metabolism, which causes apoptotic cell death in colon cancer cells. Free radicals cause damage to many biological materials such as protein, lipid and DNA which promotes aging and also causes cardiovascular diseases, various types of cancer and immune system weakening. Endogenous and exogenous antioxidants can prevent and repair damage caused by ROS. Therefore, they are called “free radical scavengers” and can reduce the immune defenses risk of disease and cancer. Antioxidants are widely used as dietary supplements and have been investigated for their effectiveness in preventing diseases such as cancer and coronary heart disease. However, recent research findings suggest that the use of antioxidants in combination with anticancer drugs may not be beneficial or may adversely affect cancer prevention and treatment. The aim of this project is to elucidate the effect of chrysin on cell proliferation by inducing cells with Diclofenac, which has anti-proliferative effect on colon cancer, and to elucidate the biochemical and molecular mechanisms underlying this effect. A significant decrease in cell proliferation was observed on the HT-29 cell line treated with Dic, depending on the concentration (500  $\mu$ M). In this study, after treatment of cells with Dic, increase in ROS and malondialdehyde (MDA) levels and lactate dehydrogenase (LDH) enzyme release and decrease in catalase (CAT) activity, increase in apoptotic index, increased levels of apoptotic and pro-apoptotic genes were observed while all of these effects were reversed in the presence of Kr. Results obtained after experiments provide a new explanation that Kr can reduce the effectiveness of Dic inducing apoptosis of colon cancer cells.

**Keywords:** Colon Cancer, Antioxidant, Chrysin, Free radicals, Apoptosis

# 1. GİRİŞ

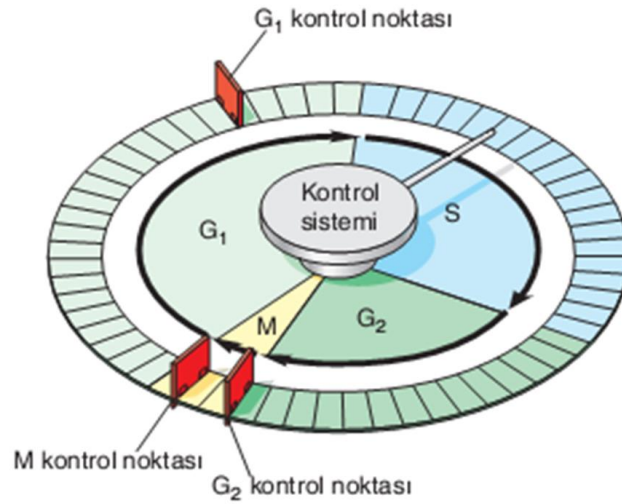
## 1.1. Hücre Döngüsü ve Apoptozis

Organizma, organ ve doku gelişimi, hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını içerdiği gibi ölümlerini de içermektedir. Hücre siklusunun devam etmesi ve hücre çoğalması kontrol mekanizmasında varolan genlerin ekspresyonu ile ilişkilidir. Ökaryot hücre siklusu M(mitoz), G1, S ve G2 fazlarını içeren bir süreçten oluşmakta olup, bu süreç boyunca hücre büyümesi, hücre uyarımı meydana gelmektedir.

**G<sub>1</sub> Kontrol Noktası:** Hücreler kendi çevrelerini kontrol edip, gerekli sinyalleri alıp büyümeyi indükler. Hücre boyutu istenilene ulaşmışsa, DNA bütünlüğünde herhangi bir sorun yoksa “devam et” sinyali verilir.

**G<sub>2</sub> Kontrol Noktası:** DNA sentezinde herhangi bir hata veya hasar oluşumu kontrol edilir. Eğer bir hata var ise bu süreçler tamamlanıncaya kadar “dur” sinyali verilerek hücre döngüsü durdurulur.

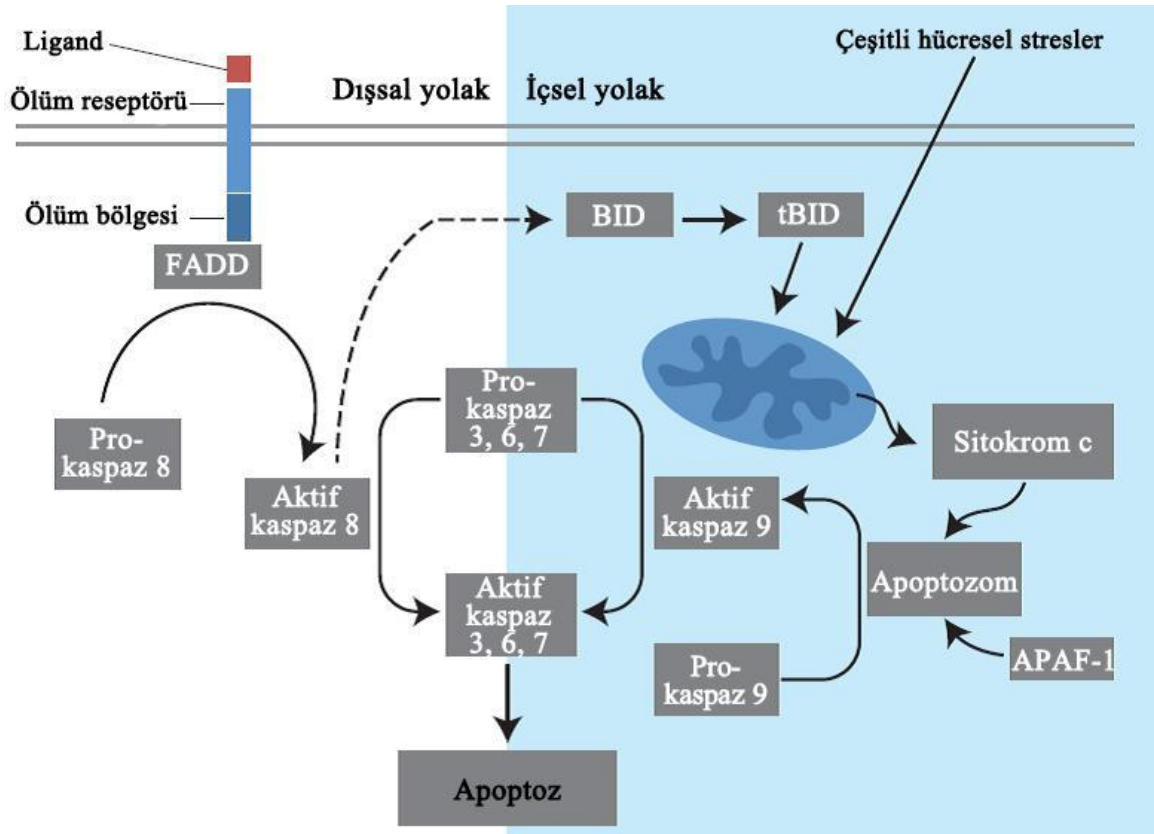
**M Kontrol Noktası:** İğ iğliklerinin oluşumu, kromozomların iğ ipliklerine ve kinetokorlara tutunması kontrol edilir. Bu kontrol, oluşacak yavru hücrelerdeki kromozom sayısının eşit olmasını sağlamak açısından önemlidir (Yokuş ve Ülker 2012).



Şekil 1.1. Hücre döngüsü kontrol noktaları (Yokuş ve Ülker 2012)

Hücre siklusundaki faz geçişlerinde kontrol noktaları bulunmaktadır. Hücre siklusu, siklin bağımlı kinazlar tarafından kontrol edilmektedir. Bu proteinlerin düzeyleri hücre siklusunun farklı fazlarında farklılık gösterir ve hücre homeostazisi, hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve kontrollü ölüm programları ile sürdürülmektedir. Programlı hücre ölüm yollarından biri olan apoptozis hücre döngüsünde ve fizyolojik periyotlarda rol almaktadır. Apoptotik süreçte hücrelerin büzülmesi, kromatinin kondanse olması ve apoptotik cisimlerin oluşumu görülmektedir. Apoptotik cisimcikler ve apoptotik hücre makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir. Yaşamsal işlevini yitiren hücreler programlanmış hücre ölümü ile yok edilmektedirler. Normal hücre büyümesinin düzenlenmesinde işlev gören proteinler protoonkogenler ve onkogenler tarafından sentezlenmektedir. Hücre büyümesinin kontrollü bir şekilde ilerlemesinde rol oynayan proteinler olan protoonkogenlerin onkogen haline dönüşümü hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakta ve kanser hücrelerine dönüşümünü sağlayıp kontrolsüz büyümesine ve çoğalmasına sebep olmaktadır (Yokuş ve Ülker 2012).

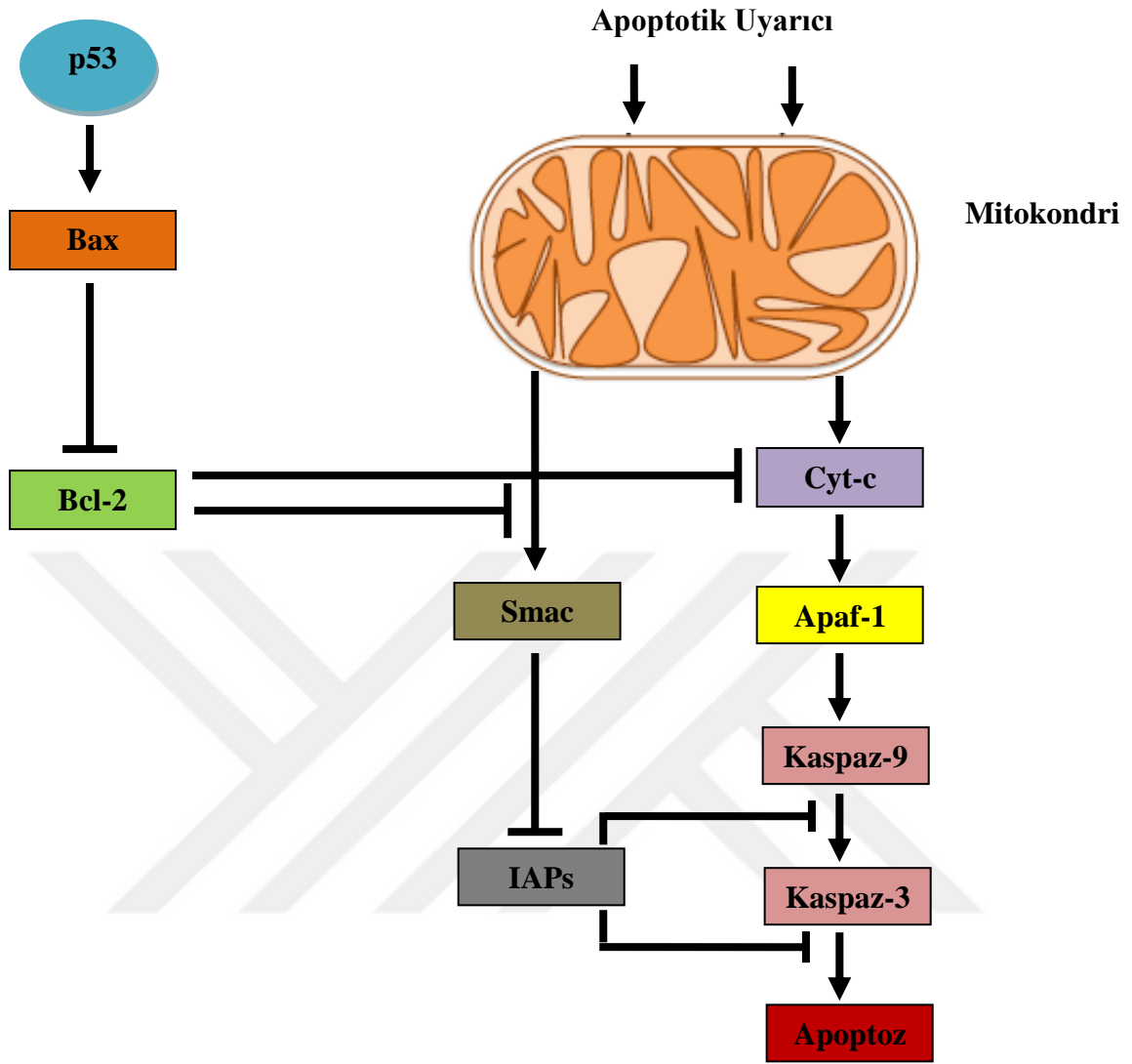
Hücre de apoptozisin düzenlenmesinde sistein proteazlar (kaspazlar; *Kaspaz-8*, *Caspase 9* ve *Caspase-3*) ve *Bcl-2* gen ailesi rol oynamaktadır. Hücrenin varlığı apoptozisi indükleyen ve inhibisyona uğratan genlere (*Bcl-2*, *Bax*, *p53*) bağlıdır. Bu genlerin mutasyonu da kansere yol açmaktadır (Yokuş ve Ülker 2012).



Şekil 1.2. Apoptozisin dışsal ve içsel yollarında rol alan genler (Aşık 2015)

Onkogenlerin aksine tümör süpresör genlere bağlı olarak gerçekleşen kontrolsüz hücre büyümesi genetik olarak resesiftir. Her iki kromozom çifti de defektif olan geni içerirse işlev gösterebilmektedir. pRB, p21, p53 proteinini kodlayan genlerin iki kopyasında olan mutasyonun hücre büyümesini baskılanması sonucu tümör oluşmaktadır (Akça vd. 2018). Tümör baskılayıcı genlerden olan *p53* geni 17p13.1 kromozom bölgesinde yer alıp, 393 aminoasitten oluşan bir protein kodlamaktadır. Yapısal ve fonksiyonel olarak 5 ayrı bölge içeren protein, 1-63. Aminoasitlerin oluşturduğu, N-terminal transaktivasyon domaini (TAD) *p53* ile sıkı ilişki içerisinde olan MDM2 proteininin de bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. *p53* proteini hipoksi durumu, mitotik iğ iplik hasarı, DNA hasarı, ve onkogenler tarafından yüksek düzeyde aktive edilebilen yaklaşık 20 dakikalık yarılanma ömrü olan bir transkripsiyon faktörüdür. Normal koşullarda sentezi hücre içerisinde düşük seviyededir. Aktifleştikten sonra kendi transkripsiyonunu da uyarır. Yapılan çalışmalarca çok fonksiyonlu bir protein olan *p53*'ün, hücre döngüsünün durdurulması, farklılaşma, yaşlanma ve apoptozis de görev aldığı bilinmektedir. Hücre içerisinde DNA'da bir hasar oluştuğu zaman DNA-bağımlı protein kinaz DNA kırıklarını tanıyarak

aktifleşmektedir. DNA kırıklarının oluşturduğu tek iplikli DNA koluna bağlanıp, aktif hale geçer ve p53'ü fosforile eder. Fosforlanarak aktifleşen p53, p21 geninin transkripsiyonunu aktive ederek ekspresyonunu artırır. Hücre içerisinde p21 ekspresyonunun artışı, siklusun G1 evresinde durmasına neden olmaktadır. Hücrenin yaşamsal döngülerinin devam edebilmesi için bu duraksama büyük önem arz etmektedir. Bu safhada hücrenin genomik DNA'sında meydana gelen hasarın onarılması için vakit kazanılmış olur. DNA tamiri başarılı bir şekilde tamamlanırsa DNA'nın kırık uçları tamamlanacağı için, DNA hasarında aktive olan DNA-bağımlı protein kinazında aktivasyonu azalmış olacak ve p53'ünde aktivasyonu düşecektir. Böylece hücre siklusunda p53'ün baskınlığı ortadan kalkacak ve döngü kaldığı yerden devam edecektir. DNA hasarı onarılmayacak kadar büyükse hücre döngüsüne devam edilmesine izin verilmeyeceği için hücre apoptozise yönlendirilecektir. Şekil 1.3.'te gösterildiği gibi bu aşamada da p53 pro-apoptotik genlerden olan Bax'ın transkripsiyonunu sağlayacaktır. Hücre içerisinde konsantrasyonu artan *Kaspaz-* geni, normalde mitokondri porlarında dimerler halinde bulunan ve sitokrom-c salınımını engelleyen Bcl-2'nin Bax ile Bax-Bcl-2 heterodimerinin oluşmasına neden olacaktır. Bax-Bcl-2 dimerlerinin oluşmasıyla mitokondri porları kapatılmaz ve sitokrom-c mitokondriden salınarak sitoplazmaya geçer. Apaf-1'e bağlanarak *Caspase-9*'un da katıldığı apoptozom yapısı oluşur. Kaskad sistemi ile kaspazlar aktif hale geçerek apoptozisin başlaması için gerekli sinyaller oluşturularak hücrenin programlı bir şekilde ölümü gerçekleştirilir (Yokuş ve Ülker 2012).



Şekil 1.3. P53 bağımlı apoptoziste görev alan genler (Akça vd. 2018)

p53'te gerçekleşen fonksiyon bozuklukları sonucunda kanserleşme gerçekleşmektedir. Tüm kanser çeşitlerinin yaklaşık %50'sinde p53 mutasyonu görülmektedir. Mutasyon olmayan allele ise p53 kaybı söz konusu olmaktadır. Çoğunlukla mutasyonlar p53'ün DNA bağlanma domaininde görülmektedir. Bu tür mutasyonlarda, p53 aktive olsa bile hedef genlerin aktivasyonunun önlenmesi ile fonksiyonlarını yerine getirememesini sağlamaktadır. Bazı mutasyonlar ise doğrudan fosforlanma bölgesinde meydana gelmekte olup p53'ün fosforlanmasını engelleyerek aktivasyonunun önlenmesine neden olmaktadır (Akça vd. 2018).

DNA'da ve genlerde gerçekleşen değişiklikler neticesinde hücreler kontrolsüz olarak bölünmeye başlarlar. Sonrasında komşu dokulara ve uzak organlara yayılabilirler. Hücrelerin bu anormal özelliği taşıması ile gelişen büyük bir grup hastalığa kanser adı verilir (Aliustaoğlu 2009).

## **1.2. Kanser**

Kanser, tarih boyunca olduğu gibi yaşadığımız dönemde de varlığını sürdüren habis hastalık türüdür (Atıcı 2007). Kanserın meydana gelmesi için hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesinin yanı sıra hücrenin kanserli olmayan sağlıklı dokularda dolaşım yoluyla yayılma gibi bir takım malign özellikleri de edinmesi gerekmektedir. Bu özellikleri kazanmasını onkogenlerin aktive olması ve tümör süpresör genlerin inaktive olması, kontrolsüz bir şekilde çoğalmaları, kontak inhibisyonun kaybolması gibi çeşitli durumlar sağlamaktadır. Tümörün büyüme hızını ifade etmede kullanılan "doubling time" tümör hücre sayısının iki katına çıkmasını ifade etmektedir. Solid tümör hücreleri, başlangıçta geometrik artışla çoğalırken zamanla büyüme hızı yavaşlar. Bazı durumlarda da çoğalan hücrelerin ve ölen hücrelerin birbirine eşit olduğu bir plato çizmektedir. Bu büyüme eğrisi Gombertz eğrisi olarak adlandırılmaktadır (Aliustaoğlu 2009). Yeterli kan bulanamayan kanserli dokular çap olarak 1 mm' den daha fazla büyümmezler. Başlangıçta tümör hücreleri oluştukları dokunun kapiller damarından difüzyon ile beslenir. Oluştukları doku içerisinde yeni damar oluşturmadan 2-3 mm boyutuna kadar büyüyebilirler. Bu şekildeki hücreler tipik olarak daha hızlı çoğalırlar. Daha fazla büyümek için kan akımı sağlandıktan sonra, hücre ölüm hızı azalarak tümör hızla büyür ve metastaz yapabilir. Damar içerisinde ilerlemeye devam ederken tümör hücreleri belli organlarda damar yüzeyine tutunurlar. Tutundukları bölgede yüzeyinde damar duvarını

tekrar eritmeye başlayan kanser hücresi hedef dokuda yerleşim sağlayarak çoğalmaya devam eder. Kanser hücreleri damar içerisine girdikten sonra tüm vücudu dolaşsada bazı kanser çeşitleri genel olarak belli organlara metastaz yapmaktadır. Bu işlev kanser hücrelerinin organ seçiciliği olarak adlandırılır. Bu seçiciliği belirleyen başlıca faktörler arasında kanser hücrelerinin yüzey özellikleri, yerleşecekleri organın damar yapısı gösterilebilir. Kanser hücresi oluştuğu zaman vücudun immün sistemi bu yabancı hücreyi tanır ve parçalar. Bu sayede birçok kanser hücresi bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. İmmün sistem kanser oluşumunu denetler ve antijenlere karşı immün cevap oluşturmaktadır. İmmün cevap baskılandığı zaman kanser oluşumu artmaktadır (Aliustaoğlu 2009). GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünyada en çok tanı konulan kanser türleri meme, akciğer ve kolon kanseridir (Sharma 2020).

### **1.2.1. Kolon Kanseri**

Kolon kanseri gastrointestinal traktusta en fazla rastlanılan kanser türüdür. WCRF'den edinilen verilere göre 2018'de dünyada en sık görülen kanser türleri arasında 3. Sırada yer alan kolorektal kanser (Anonymous 2020), ABD'de yılda 145.000 üzerinde yeni hasta tanısı konulmakta ve yılda 55.000 üzerinde kişi bu hastalık yüzünden ölmektedir. Bu sebeple kolorektal kanserleri ABD'de ikinci en sık karşılaşılan öldürücü kanser sıralamasına girmektedir (Başpınar 2015). Aynı zamanda GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünyada en çok tanı konulan kanser türleri meme, akciğer ve kolon kanseridir (Sharma 2020). Türkiye'de ise 2015'te güncellemesi yapılan verilere göre sık rastlanılan ölümcül kanser türü olarak yerini almaktadır (Url 1 2020). Kolorektal kanser gelişiminde etkin rol oynayan risk faktörlerinin belirlenmesi, taramaların yapılması ve kontrol programlarının oluşturulması açısından önemlidir. Yaşlanma kolorektal kanser türleri için oldukça baskın bir risk faktörüdür. 40-50 yaşından sonra görülme sıklığı artış göstermektedir. Ancak her yaştaki fert kolorektal kansere yakalanabilmektedir. Bu sebeple barsak alışkanlıklarında önemli değişiklik olanlar, melana, açıklanamayan anemisi olanlar, rektal kanaması olan ve kilo kaybı yaşayan hastaların değerlendirilmesi gerekmektedir. Bir diğer risk faktörü kalıtsal olan faktörlerdir. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %80'i sporadik bir dağılım göstermektedir. Geri kalan kısım ise ailede kolorektal kanser hikayesi olanlarda gelişmektedir. En sık rastlanılan APC geni ile yanlış birleşme onarım genindeki hasarları araştıran testler günümüzde kullanılmaktadır. Kolorektal kanserler lifli gıdaların az tüketildiği toplumlarda daha fazla görülmektedir.

Doymuş yağlar bakımından zengin olan gıda ile beslenenlerde risk artarken oleik asitten zengin gıdalarla beslenenlerde risk artış göstermemektedir. Alkol tüketimi ile kolorektal kanser gelişimi arasında bir ilişki olduğu varsayılmaktadır. Obezite, hareketsizlik kolorektal kanser türlerinin oluşmasını ciddi oranda artırmaktadır. Kalsiyum, Selenyum, A, C, E vitaminleri, bitkisel fenoller ve keroteoidler kolorektal kanser gelişimi riskini azaltmaya yardımcı olmaktadır. Embriyolojik gastrointestinal kanal gelişimi gebeliğin dördüncü haftasına kadar sürmekte olup, ön barsak, orta barsak ve arka barsak olarak üç segmente ayrılmaktadır. Kolon rektum ve anüsü, orta barsak ve arka barsak birlikte oluşturur. Anatomik ve fonksiyonel olarak kolon, rektum ve anal kanaldan oluşmaktadır. Mukoza, submukoza, iç sirküler kas, dış longitudinal kas ve seroza olmak üzere beş ayrı katmandan kolon ve rektum duvarı oluşmaktadır. Kolon terminal ileum ve çekum bileşkesinden başlar, 90-150 cm'de rektuma ulaşır. Çekum kolonun en geniş bölümüdür. Kolonun kan akışı çok değişiklik gösterebilmektedir. Kolorektal kanser, normal dokuda büyümeyi kontrol eden moleküler mekanizmaların bozulmasına yol açan bir seri genetik değişikliklerin birikimi sonucu oluşum göstermektedir. Kolorektal karsinomlar genellikle displazik adenomatöz poliplerden gelişmekte olup çoğu sağ kolon yerleşimlidir. (Fenoglio-Preiser et al. 1999). Karsinogenezde gerçekleşen ilk değişiklikler hücre büyümesi ve programlanmış hücre ölümlerinden biri olan apoptozis arasındaki normal dengeyi etkileyen, histopatolojik testlerle de tesbiti sağlanamayan hassas olaylardır. Neoplazmik sürece giren epitel hücrelerinin genetik değişimleri farklı iki mekanizma ile açıklanmıştır. Bunlardan ilki allelik kayıplar ve kromozomal kararsızlıklardır. Bir diğeri ise DNA mutasyonları ve diploidinin artışı ile açığa çıkan değişimlerdir. Fearon ve Vogelstrein (1990) yapmış oldukları araştırmalar neticesinde kolorektal tümör genезisinde rol oynayan moleküler düzeydeki olayları açıklamak amacıyla oluşturdukları model daha sonraki çalışmalarını aydınlatmıştır. Bu modele göre;

Kolorektal tümörlerin oluşumu, onkogenlerin mutasyona uğraması ve tümör süpresör genlerin mutasyonel inaktivasyona uğraması sonucu olmaktadır. En az 4 veya 5 genin mutasyonu ile malign tümör oluşumu gerçekleşmektedir. Daha az miktarda değişiklikler benign tümör oluşumuna sebep olmaktadır.

Kolorektal kanser gelişimine neden olan genetik değişiklikler üç temel grupta incelenebilir;

- 1- Tümör süpresör gen aktivitesindeki azalma veya kaybolma
- 2- Protoonkogenlerde meydana gelen değişiklikler
- 3- DNA onarımı ile ilgili genlerde olan değişiklikler

Tümör süpresör genler ancak her iki allel gen de mutasyon veya kayıp oluştuğunda aktivitelerini kaybedip apoptozisi engellemektedir. 17. kromozomun kısa kolunda lokalize olan *p53* geni bir hücre fosfoproteini olan p53 proteininin sentezinden sorumludur. *p53*'ün kaybı aynı zamanda hasarlanmış hücrelerin apoptozundaki gecikme ile birliktedir. İnaktive olan *p53* geni adenomun karsinoma dönüşümünü sağlamaktadır. Bu olay kolorektal karsinomun geç dönemlerinde ortaya çıkan önemli bir basamaktır. 17. kromozomun kısa kolunun delesyona uğrayan kısmı kolon kanserinde *p53* geni içeren kısımdır ve genel olarak bir alleli delesyona uğramışken diğer allelinde nokta mutasyonu oluşmaktadır. Kolon kanserinde uzak metastaz varlığında 17. ve 18. kromozomlardaki (17p ve 18q) allellik kayıp ve delesyonlar arasında anlamlı bir birliktelik olduğu yapılan çalışmalarca görülmüştür. *p53* geninin bulunduğu kromozom delesyonuna kolorektal kanserlerin %75'inde rastlandığı halde adenom varlığında çok sık görülmemektedir (Başpınar 2015).

#### **1.2.1.1. Tedavi Yöntemi**

Kolon kanseri tedavilerinde öncelikle tercih edilen tedavi şekli cerrahi yöntemdir. Kolon kanserleri vakalarının yarısından fazlasına cerrahi girişim uygulansa da lokal yayılım nedeniyle hastaların %10'unda tümör çıkarılamamaktadır. Cerrahi tedavi kararı alınabilmesinde varolan hastalığın doğru şekilde evrenmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla tanı ve tarama yöntemleri yapılmakta, Ultrasonografi, PET, MRI ve CT, gibi görüntüleme teknikleri evreleme de kullanılmaktadır. Kolon kanseri tedavilerinde uygulanan kemoterapi, neoadjuvan kemoterapi, adjuvan kemoterapi ve ileri evre hastalık için yapılan kemoterapi olmak üzere üç grupta incelenebilir. Neoadjuvan kemoterapi özellikle rektum tümörlerinde ve genellikle radyoterapi ile birlikte uygulanan bir tedavi yöntemi olup cerrahi operasyon öncesinde tümör hacmini küçültmeye yönelik bir yöntemdir. Adjuvan kemoterapi yöntemi ise lenf nodu tutulumu bulunan hastalarda vücuttaki mikrometastazların erdike edilmesi amacı ile sıklıkla uygulanan bir tedavi

yöntemidir. Uzak metastazları bulunan ileri evredeki kolon kanseri vakalarında sağ kalım süresini uzatabilmek için değişik kemoterapik ajanlar kullanılır. Bu amaçla 5-FU ve 5-FU+Leucovorin+Oxaplatin kombinasyonları kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda kullanılan topoizomeraz inhibitörleri umut verici görünmektedir. Bunlara ek olarak, Dik grubu ağrı kesiciler, enflamasyonu ve kolon kanserine bağlı ağrıyı azaltmak için en yaygın kullanılan anti-inflamatuar NSAİ arasındadır (McGettigan and Henry 2013; Lonapan et al. 2016). Yüksek konsantrasyonlarda Dik, yüksek agresif kolon kanseri hücrelerinde (HT-29, SW480 ve DLD-1) kontrol numunelerine kıyasla hücre canlılığı kaybını arttırabilmiştir (Hixon et al. 1994). Antikanser ajanlar tümör hücrelerinde olduğu kadar normal hücrelerde de apoptozisi arttırmaktadır. Birçok patalog yapmış oldukları tümör hücrelerindeki apoptozis incelemeleri sonucunda apoptotik hücre ölümünün normal dokularda da arttığını ortaya koymuşlardır. Bu sürecin kemoterapi ile ilişkili toksisiteye katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir (Bakır 2018; McGettigan and Henry 2013; Lonapan et al. 2016). Bu bilgiler ışığında apoptotik sinyal yollarının aktive edilmesiyle birlikte büyüme faktör sinyal yollarının inhibe olması ile sadece hedef hücrede etkisini gösterebilen yeni kanser tedavileri ileriye dönük güçlü bir strateji olarak görülmektedir (Bakır 2018).

### **1.3. Non Steroidal Antiinflatuar İlaçların Kullanımı**

Non steroidal antiinflatuvar (NSAİ) ilaçlar dünyada en sık kullanılan ilaçlar olmakla birlikte reçete edilen tüm ilaçların %5'ini oluştururlar (Bakır 2018). Hafif, orta dereceli ağrıların, inflamasyon kaynaklı ağrıların, dejeneratif hastalıkların, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlar iken gastrointestinal ve renal toksisiteleri, bu ilaçların kullanımını kısıtlayan yan etkileri oluşturmaktadır. Ağrıyı, ateşi, inflamasyonu azaltıcı özellikleri siklooksijenaz (COX) enzimi inhibisyonuna sebep olmalarından kaynaklanmaktadır. NSAİ ilaçların kansere karşı koruyucu etkileri ve antikanser etkileri son zamanlarda dikkat çekici bir konu haline gelmiştir. *In vitro* ve *in vivo* olarak yapılan epidemiyolojik çalışmalar, NSAİ ilaçların meme, prostat, pankreas, yumurtalık, akciğer, kolon-rektum, gibi birçok kansere karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Karsinogenezin durdurulmasında veya yavaşlatılmasında Prostaglandin (PG) üretiminin inhibe edilmesinin rolü olabileceği bildirilmiştir (Şentürk 2014). Çünkü birçok kanser hücre hattında PG'ler normal hücre hattında olduklarından daha fazladır. PG'lerin aynı zamanda apoptoziste de görevi vardır

ve yapılan araştırmalara göre kolon kanseri hücre hattında PG E2'nin apoptozisi inhibe ettiği ve antiapoptotik genlerden B hücre lenfoma-2 (BCL-2) ekspresyonunu artırdığı ortaya koyulmuştur. Son yıllarda bu ilaçların apoptozisi indükleyerek ve hücre siklusuna etki edip bloke olmasını sağlayarak antikanser etki gösterdikleri rapor edilmiştir. NSAİ ilaçlar ile indüklenen apoptozis, bu ilaçların yol açtığı gastrik lezyonların antitümör aktivitelerinin anlaşılmasında oldukça önemlidir. Apoptozisi indklemelerinin dışında, anjiyogenezi ve hücre çoğalmalarını baskılamaları da antitümör etkilerini artıran faktörlerdir. NSAİ ilaçların sınıflandırılması, kimyasal yapılarına, plazma yarı ömürlerine ve COX enzimine karşı duydıkları ilgiye göre olmaktadır. Kimyasal yapılarına göre; asidik, asidik olmayan ve koksib olarak 3 grupta incelenmektedirler. Plazma yarı ömürlerine göre kısa ve uzun etkili olarak ayrılırlar. COX enzimi ilgisine göre, COX-1 spesifik, COX nonspesifik, COX-2 selektif ve COX-2 spesifik ajanlar olarak ayrılırlar (şentürk 2014) .

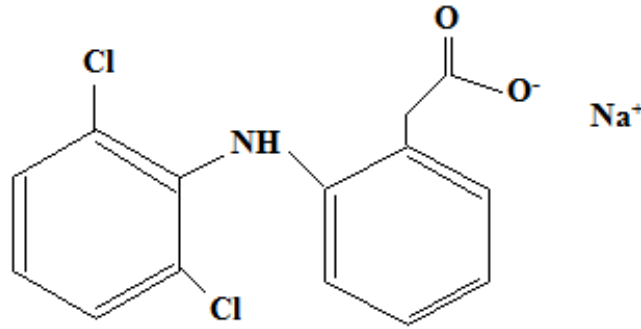
<b><i>I. Asidik Türevler</i></b>	
<b>1. Karboksilik asit türevleri</b>	
1. Salisilik asit ve esterleri	Aspirin diflusinal, dolin salisilat, metil salisilat, magnezyum salisilat, salisil salisilat
2. Fenamik asitler	Flufenamik asit, metafenamik asit, meklofenamik asit, niflumik asit
3. Propiyonik asitler	İbuprofen, naproksen, flurbiprofen, fenbufen, benaksopropfen, fenoprofen, ketoprofen, tiaprofenik asit, soprofen, karprofen, oksaprozin, piroprofen
4. Asetik asit	Diklofenak, indometazin, etodolak, sulindak, tolmetin
<b>2. Enolik asitler</b>	
1. Pirazolonlar	Fenilbutazon, oksifenbutazon
2. Oksikamlar	Azopropazon, piroksikam, pesoksikam, sudoksikam, tenoksikam, isoksikam
<b><i>II. Asit olmayan türevler</i></b>	
<b><i>III. Koksibler</i></b>	

şekil 1.4. NSAİ ilaçların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (şentürk 2014)

### 1.3.1. Diklofenak

Diklofenak Sodyum (DS), fenilasetik asit türevi, nonsteroidal antiinflamatuvar (NSAİ), kolay tölere edilebilen bir ilaçtır. 1974'ten beridir bazı ülkelerde antiinflamatuvar olarak tanımlansa da son yıllarda ABD'de romatoid artrit, osteoartrit ve ankilozan spondilit tedavilerinde de kullanılmıştır. Dejeneratif eklem hastalıklarında da kullanılan ilaç tablet, supozituar ve enjeksiyon şeklinde etkindir. Kuvvetli bir PG sentez inhibitörüdür. Kullanışlı olmasını sağlayan en önemli özelliği yaşlılarda ve renal bozukluğu olan hastalarda doz ayarlaması gerektirmemesidir (Açıkgöz vd. 1994).

#### 1.3.1.1. Fizikokimyasal Özellikleri



Şekil 1.5. Diklofenak Sodyum(sodyum;2-[2-(2,6-dikloroanilino)fenil]asetat) (Açıkgöz vd. 1994)

DS bir fenilasetik asit türevidir. Kimyasal yapısı diğer NSAİ ilaçların yapı-aktivite ilişkileri ile edinilen bilgilere göre geliştirilmiştir. Partisyon katsayısı 13.4'tür ve asitlik sabiti 4.0'dır. Yapısal elementler olarak, fenil asetik grubu, klor atomları, sekonder amino grubu içeren fenil halkası bulundurur. DS kokusuz, beyaz ve bir miktar higroskopik, toz şeklinde bir etken maddedir. Deiyonize su içerisinde ki çözünürlüğü (pH 5,2) oda sıcaklığında > 9 mg/ml'dir. Metanol içerisinde ki çözünürlüğü >24 mg/ml, Asetonitril ve sikloheksandaki çözünürlüğü ise >1 mg/ml'dir. DS, diğer NSAİ ilaçlar gibi yüksek oranda proteinlere bağlanmaktadır. HSA ve serumdaki lipoproteinlere bağlanması *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Proteinlere bağlanma sinovial sıvıda, plazmaya göre daha azdır (Açıkgöz vd. 1994).

### 1.3.1.2. Farmakolojik Özellikleri

DS'nin analjezik, antipiretik ve antienflamatuvar etkiye sahip olduğu ve antienflamatuvar etkinin genel anlamda PG sentezini inhibe ederek sağlandığı bildirilmektedir. NSAİ ilaçların, antienflamatuvar etkisinin araşidonik asidin, dolayısı ile özellikle siklooksigenaz'ın inhibe olması ile sağlandığı belirtilmiştir. DS aynı zamanda lipooksigenaz yolunu regüle etmesi ile çift etkiye sahiptir. Hücresel bazda yapılan çalışmalar DS'nin siklooksigenaz aktivitesini inhibe ederek, enflamasyon mediatörlerinden PG, prostasiklin ve tromboksanın üretimini azalttığını göstermiştir. İntraselüler sıvıdaki serbest araşidonik asit düzeyini de azaltmaktadır. DS'nin iyi tolere edilebilen bir ilaç olmasına rağmen yan etkilerinin incelendiği çalışmalarda hastaların %12'sinde ciddi olmayan ve geçici yan etkiler görülmektedir. Bu yan etkiler uzun süreli tedavilerin ilk ayında gözlenmiştir. Yapılan hayvan deneylerinde DS ve metabolitlerinin plasentaya ve az miktarda anne sütüne geçtiği bulunmuştur. Diklofenak'ın peroksidazlar tarafından katalizlenen oksidasyonu sonucu oluşan nitroksit veya katyon radikallerinin de oksidatif strese ve mitokondriyal hasara neden olduğuna dair farklı bir mekanizma daha mevcut olup, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarca yeteri kadar desteklenememiştir (Erkmen 2017).

### 1.4. Serbest Radikaller

Moleküler yapılarında bir veya daha fazla elektron taşıyan türlere serbest radikaller denmektedir. Hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil, hidrojen peroksit radikali, nitrikoksit, singlet oksijeni, lipid peroksit biyolojik sistemde varolan radikallerden bazılarıdır. Canlı organizmalarda, aerobik koşullar altında tüketilen oksijenin %90'ından fazlası elektron taşıma sistemindeki sitokrom oksidazlar aracılığı ile son elektron akseptörü olarak görev yapmakta ve daha stabil bir bileşik olan suya dönüştürülmektedir. Bu reaksiyon tek elektron redüksiyonu serisi şeklinde devam ettiğinden dolayı, reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri, radikal ve nonradikal olarak ikiye ayrılır (Tunç 2017; Abreu and Cabelli 2010).

Tablo 1.1. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması (Abreu and Cabelli 2010)

Reaktif Oksijen Türlerinin Sınıflandırılması (ROS)
<b>*Oksijen merkezli radikal türleri</b>
Süperoksit
Hidroksil
Peroksil
Lipid peroksil
<b>*Radikal olmayan oksijen türleri</b>
Hidrojen peroksit
Hipokloröz asit
Ozon
Singlet oksijen

#### 1.4.1. Süperoksit Anyonu

Kimyasal ve enzimatik süreçler sonucu yaygın olarak oluşan reaktif oksijen türüdür. Mitekondride ki ETS (elektron taşıma sistemi)'den özellikle de koenzim Q'dan kaçan elektronlar moleküler oksijenle etkileşime girerek süperoksit anyon oluşumuna sebep olmaktadır. Direkt ya da indirekt şekilde hasar meydana getirebilmektedirler. Süperoksit radikallerinin süperoksit dismutaz enzimi tarafından (SOD) dismütasyonu sonucu hidrojen peroksit oluşur (Tunç 2017; Abreu and Cabelli 2010).

#### 1.4.2. Hidrojen Peroksit

Membrana kolaylıkla girebilmesi ve göreceli olarak yüksek dozlarda hücre hasarına yol açması sebebiyle radikal olmamalarına rağmen reaktif oksijen metabolitlerinden kabul edilmektedir. Oluşan hidrojen peroksit  $H_2O_2$ , katalaz enzimi ve glutatyon bağımlı peroksidaz (GPx) gibi farklı peroksidazlar tarafından indirgenmektedir (Tunç 2017; Abreu and Cabelli 2010).

### 1.4.3. Hidroksil Radikalleri

Hidroksil radikali, hidroksit iyonunun nötröl formudur. OH<sup>-</sup> radikali, yüksek reaktiviteye ve çok kısa yarılanma ömrüne sahip olması sebebiyle oldukça tehlikelidir. DNA'ya yakın bölgelerde hidroksil radikalının üretimi sonucu purin ve pirimidinlerde modifikasyonlara ve zincir kırılmalarına neden olabilmektedir (Tunç 2017; Abreu and Cabelli 2010).

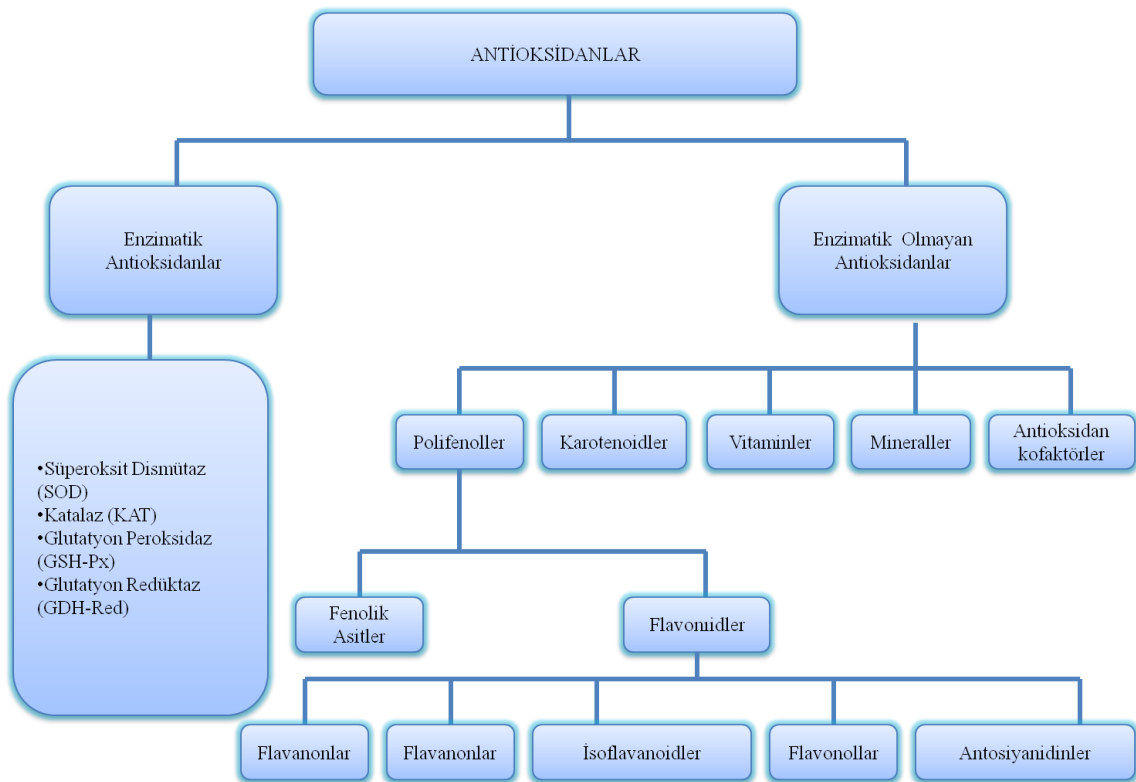
### 1.4.4. Lipid Peroksid

Çoklu doymamış yağ asitlerinin radikaller tarafından oksidasyonu sonucu yağ asidi radikalleri meydana gelip, bu yapıya hızlıca oksijenlerin eklenmesiyle oluşan bileşik başka çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olarak lipid hidroperoksidlerin oluşumuna yol açmaktadır. Lipid hidroperoksidler ise lipid peroksid, lipid alkoksil ve aldehidler (Malondialdehit (MDA)) gibi daha reaktif radikal türlerine parçalanabilmektedir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif tahribatına lipid peroksidasyonu adı verilir. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olup; bilimsel alanda oksidatif stres belirteci olarak dünya çapında kabul görmüştür. Bu ara ürünler membran yapısına direkt olarak zarar verebildikleri gibi DNA, RNA, proteinler ve enzimler gibi hücresel yapılara indirekt şekilde de zarar verebilmektedir. Fizyolojik oksidasyon reaksiyonları ve kaçınılmaz ikincil reaksiyonlar dışında yiyeceklerin içerisindeki birçok madde de oksidan özellikte ya da öncülü olabilmektedir. İlaçların metabolizasyonu sonucunda, toksik etki gösteren reaktif metabolitler oluşabilmektedir. Tüm bunların yanı sıra havayı kirleten maddeler, sigara dumanı, ultraviyole ışınların deride absorpsiyonu da çeşitli oksidanların oluşumuna neden olmaktadır. Hücrede oksidatif strese karşı en savunmasız hedefler enzimler, lipid membranları ve DNA'dır. Fosfatazlar, transkripsiyon faktörleri, kinazlar ve metabolik enzimler gibi proteinler oksidasyona duyarlı olmakla birlikte hücre sinyalizasyonuna, yapısına ve enzimatik süreçlere doğrudan olan etkileri ile hücresel homeostaziyi etkileyebilmektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda ki NSAİ, oksidatif strese yol açabilmektedir. İlaç indüklü oksidatif stres ilk olarak kurtarma yollarına yardımcı olurken; uzun süreli maruz kalan oksidatif stres mitekondriyal hasara, apoptoz ve/veya nekroza sebep olabilmektedir. Organizma stabilitesi olmayan bu gibi durumlarda vücudun antioksidan savunma sistemini devreye sokarak istenmeyen reaksiyonların oluşumunu önleyerek, hasarlı molekül ve dokuların iyileştirilmesini sağlamaktadır. Buna rağmen önlenemeyen az miktardaki hasarlı dokular

uzun dönem içerisinde birikerek zararlı olabilmektedirler (Tunç 2017; Abreu and Cabelli 2010).

### 1.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Endojen ve eksojen antioksidanlar, ROS' un neden olduğu hasarı önleyebilir ve onarabilir. Bu nedenle, “serbest radikal temizleyicileri” olarak adlandırılırlar ve bağışıklık savunmasını geliştirebilir, hastalık ve kanser riskini azaltabilirler. Şekil 1.5.'te antioksidanların sınıflandırılması gösterilmiştir. Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Katalaz (CAT)'ı içeren enzimatik antioksidanlar, süperoksit ve diğer peroksitleri şelatlayarak etki gösterir. ROS aktivitesini ve hücrelerdeki birikimi temizleyen ve redoks dengesini koruyan endojen antioksidan savunma sistemleri olarak işlev görürler. Serbest radikallere karşı ilk savunma hattı, süperoksit anyon radikalının ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksid ( $H_2O_2$ ) 'ye ayrışmasını katalize eden SOD' dir (Abreu and Cebelli 2010). Enzimatik olmayan antioksidanlar E ve C vitaminleri, polifenoller, flavonoidler ve ürik asittir (Haida and Hakiman 2019).

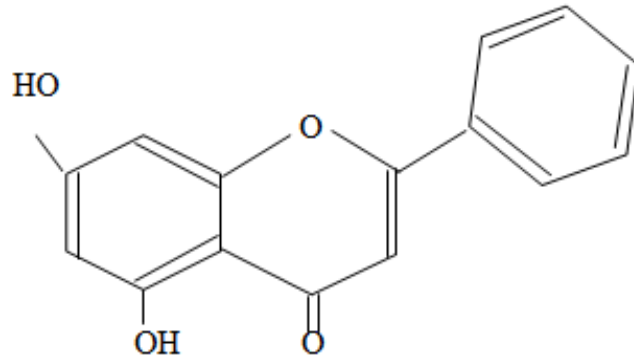


Şekil 1.6. Antioksidanların sınıflandırılması (Haida and Hakiman 2019)

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi serbest radikallerin neden oldukları oksidatif zarara karşı, antioksidan maddeleri içeren gıdalar, insanları korumaktadır. Antioksidan bileşenlerin en önemli kaynakları bitkisel kaynaklı doğal besin maddeleridir. Bu besinlerden alınan antioksidanlar sıklıkla fitokimyasal antioksidanlar olarak bilinmektedirler. Gıdalardaki antioksidanlar, indirgeyici molekülleri, serbest radikal bağlayıcı, singlet oksijen tutucu mekanizmalardan bir ya da birkaçı ile antioksidan özelliklerini göstererek serbest radikalleri nötralize edip hücrelerin hasara uğramasını engellemekte veya kendilerini yenilemelerini sağlamaktadırlar (Güleşci ve Aygöl 2016). Bazı gıda antioksidanlarının oksidasyonu engelleyerek, arteroskleroz, malarya, romatoid artrit, diyabet gibi hastalıklarda faydalı olabileceği, antitümöral, antimitojenik, antimetastatik, antiülser, antikarsinojenik hatta antibakteriyal, antifungal, antiaging ve antiviral etkilerinin olduğu da yapılan *in vivo* çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Yılmaz 2010).

### **1.6. Krisin**

Krisin (Kr), birçok arı ürününde bolca bulunan doğal, biyolojik aktif bir bileşiktir ve güçlü Anti-inflamatuar, antikanser ve antioksidasyon özelliklerine sahiptir (Pushpavalli et al. 2010). Güçlü bir antioksidan özelliğe sahip flavonoiddir. Kr flavonoidlerin alt gruplarından olan bir flavon yapısındadır. Flavonoidler yaprak, çiçek ve meyvelerin renklenmesinden sorumludurlar. Bitkilerde çevresel stres faktörlerine karşı koruma sağlar ve antioksidan aktiviteleri ile serbest radikalleri temizleyerek zararsız hale getirirler (Çuğlan 2012). Ayrıca doymamış yağ asitlerini hücre membranında oksidanlara karşı askorbat gibi korudukları rapor edilmiştir (Güllüoğlu 2018). Çilek, brokoli, kereviz, üzüm, marul, zeytin, maydanoz özellikle bal, propolis ve arı sütünde bol miktarda bulunan Kr'nin oksidatif stres ve apoptotik doku hasarının etkisini düşürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Çuğlan 2012; Güllüoğlu 2018).



Şekil 1.7. Krisin'in kimyasal yapısı (Çuğlan 2012)

### 1.6.1. Krisin'in Etki Mekanizması

Flovonoidler endojen antioksidanların fonksiyonlarını artırarak ve doğrudan radikal süpürücü özellikleri sayesinde reaktif oksijen türlerinin moleküler proteinlerdeki sülfidril bağları, çoklu doymamış yağ asitleri ve DNA'daki nükleotidler ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olmalarını engellemektedirler. Yapılan çalışmalarda Kr'nin 5. ve 7. pozisyonlarında bulunan hidroksil grupları ile serbest radikalleri süpürücü özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Çuğlan 2012).

### 1.6.2. İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Kr'nin vücut üzerinde birden fazla olumlu etkisi bulunmaktadır. Kr'nin en fazla bilinen özelliği antioksidan özelliği olmakla birlikte yapısında bulunan antioksidan potansiyel ile glutatyon S-transferaz, glutatyon redüktaz, GSH-Px, CAT ve SOD gibi antioksidanların etkisine yardımcı olmaktadır. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri önemli inflamatuvar ara bulucudur. Eikosanoidler ise siklooksijenaz ve lipooksijenaz yollarının son ürünüdür ve çeşitli immünolojik yanıtlarda rol alır. Krisin hem siklooksijenaz hem de 5-lipooksijenaz yollarının son ürünüdür ve çeşitli immünolojik yanıtlarda rol almaktadır. Kr'nin birçok kanser üzerinde antikanser özelliği de bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda Kr'nin, HeLa hücrelerinde apoptozisi ve proliferasyonu inhibe ederek servikal kanser türlerine de etki etmektedir. Yine yapılan bir çalışma da Kr'nin Hepatoselüler karsinomaya (HCC) karşı birçok yoldan anti tümör aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. HCC ksenograft modellerinde Krisin uygulaması tümör büyümesini sınırlanmış olup tümör dokularında glikoliz metabolizmasında ve apoptozis

mekanizmasında rol oynayan Hekzokinaz-2 (HK-2) ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Ryu ve arkadaşları tarafından prostat kanseri hücrelerinde yapılan bir başka çalışmanın bulguları ise Kr uygulamasının DNA parçalanması ile birlikte G1 evresinde hücre döngüsünün durmasını indüklediği, çoğalma seviyelerini azalttığı ve bu nedenle apoptozu önemli ölçüde indüklediği yönündedir (Mani and Natesan 2017). Meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir araştırmaya göre %43 oranında hücre proliferasyonunun inhibe olduğu gözlenmiştir. Kr'nin farklı hücre tiplerine karşı antikanser olarak rol gösterdiği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. 250 µM ile 500 µM arasında yapılan uygulamanın hücre ölümünü artırdığı gösterilmiştir. Kolon kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışma Kr'nin, *p53* genini regüle ederek ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklediğini göstermiştir. *Bax* genini up-regüle edip *Sall4*'ü downregüle ederek kanser hücrelerinin hacmini yeterince düşürdüğü rapor edilmiştir (Naz et al. 2019). Yine yapılan bir çalışma Kr ve diğer flavonoidlerin doza bağlı malign glioma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir. Yapılan çalışmalarla flavonoidlerin yüksek dozlarda tüketilmesi insan vücudu üzerinde toksik etki yaratabilecekken düşük dozlarda oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Toksik durumlardan kaçınmak için Kr'nin günlük alınma miktarı 0,5-3 gr olarak kabul edilmektedir (Naz et al. 2019). Bu tez çalışması ile, kolon kanseri üzerinde anti proliferatif etkisi bulunan Diklofenak ile hücreleri indükleyerek Kr'nin hücre proliferasyonuna olan etkisini ve bu etkinin altında yatan biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmaktadır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kolon kanseri üzerinde yapılan birçok çalışma steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçların (NSAID) kolon kanserini önleyebileceğini ortaya koymuştur. (Tomic et al. 2019). Tedavide anti-enflamatuar etkinliğinden yararlanan siklooksijenaz (COOX) enzimi inhibitörleri de literatürde yer almakta olup, kolorektal karsinoma ve diğer karsinoma tipinde COX-2'nin neoplastik büyümeyi indükleyerek apoptoza olan direnci artırdığı bildirilmiştir (Vaish and Sanyal 2011). Birçok çalışma kolorektal karsinomalarda COX-2 ekspresyonunun kolon karsinom patogeneğinde önemli rolü olduğunu göstermiştir (Ota et al. 2002; Vaish 2011). Non steroid anti-enflamatuar ilaçların da COX enzimi izoformları üzerine belirgin etkileri bulunmaktadır (Eminler vd. 2014). Kansere bağlı ağrıyı azaltmak ve enflamasyonu önlemek üzere kullanılan en yaygın anti-enflamatuar ilaçlar arasında Diklofenak yer almaktadır. Diklofenak, yüksek agresif kolon kanseri hücreleri (HT-29, Sw480 ve DLD-1) üzerine yüksek konsantrasyonlarda uygulandığı zaman kontrol hücrelerine kıyasen hücre canlılığını azaltmıştır (Hixon et al. 2019). Yüksek konsantrasyonlarda Diklofenak'ın, yüksek agresif kolon kanseri hücrelerinde (HT-29, SW480 ve DLD-1) kontrol numunelerine kıyasla hücre canlılığı kaybını artırdığı gözlenmiştir (Hixon et al. 1994). Antioksidanlar, kanser, kronik kalp rahatsızlığı gibi hastalıkların önlenmesi, diyet takviyesi olarak kullandığında etkinliğinin araştırılması gibi birçok çalışmada kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırma bulguları ise antioksidanların kanseri önleme ve tedavisini olumsuz yönde etkileme gibi etkilerinin olabileceğini ortaya koymuştur (Tartik vd. 2016; Çiftçi 2017). Arı ürünleri içeriğinde, farklı bitki türlerinde bulunan Kr biyolojik olarak aktif bir bileşik olup güçlü enflamatuar, antikanser ve antioksidasyon özelliklere sahiptir (Pushpavalli et al. 2010; Kaya vd. 2015). Arı ürünleri flavonoidlerinden olan Kr antioksidan özellikleri sıklıkla çalışılan doğal bir flavonoiddir. (Haroun 2006; Kuropatnicki et al. 2013; Lin et al. 2018). Kr kanserli hücrelerin proliferasyonunu durdurarak apoptoza indükler (Khoo et al. 2010). Yapılan çalışmalar Kr'nin kaspaz aktivasyonu ve akt sinyalinin inhibe edilmesi

ile apoptozun uyarıldığını gösterse de tam olarak apoptozisi indükleme mekanizması aydınlatılamamıştır (Woo et al. 2013; Lin et al. 2018).

Bu antioksidan maddeler sayesinde ROS'un vereceği olası hasarlar engellenebildiği gibi oluşan hasarın onarılması da sağlanabilir. Böylece immün sistem savunmasını arttırabilir ve kanser gibi hastalıkları engellemek mümkün hale gelebilir (Çiftçi 2017). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada antioksidan NAC (N-asetilsistein, 200 mg/kg/gün) farelere enjekte edildikten sonra metastatik melanoma hücrelerinin çoğunun hayatta kaldığı ve metastatic hastalık şiddetinin arttığı görülmüştür. Bu durum, oksidatif stresin melanoma hücre metastazını inhibe ettiğini düşündürmüştür (Piskounova et al. 2015). Yine yakın zaman da yapılan bir çalışmada Meme kanseri hücre hattı üzerinde homosisteinin neden olduğu hücre ölümünü propolisin baskıladığı rapor edilmiştir (Tartik vd. 2016). Kr'nin farklı hücre tiplerine karşı antikanser olarak rol gösterdiği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. 250  $\mu$ M ile 500  $\mu$ M arasında yapılan uygulamanın hücre ölümünü artırdığı gösterilmiştir. Kolon kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışma Kr'nin, *p53* genini regüle ederek ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklediğini göstermiştir. *Bax* genini up-regüle edip *Sall4*'ü downregüle ederek kanser hücrelerinin hacmini yeterince düşürdüğü rapor edilmiştir (Naz et al. 2019). Yine yapılan bir çalışma da Kr'nin Hepatoselüler karsinomaya (HCC) karşı birçok yoldan anti tümör aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. HCC ksenograft modellerinde Kr uygulaması tümör büyümesini sınırlandırmış olup tümör dokularında glikoliz metabolizmasında ve apoptozis mekanizmasında rol oynayan Hekzokinaz-2 (HK-2) ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Ryu ve arkadaşları tarafından prostat kanseri hücrelerinde yapılan bir başka çalışmanın bulguları ise Kr uygulamasının DNA parçalanması ile birlikte G1 evresinde hücre döngüsünün durmasını indüklediği, çoğalma seviyelerini azalttığı ve bu nedenle apoptozu önemli ölçüde indüklediği yönündedir (Mani and Natesan 2017).

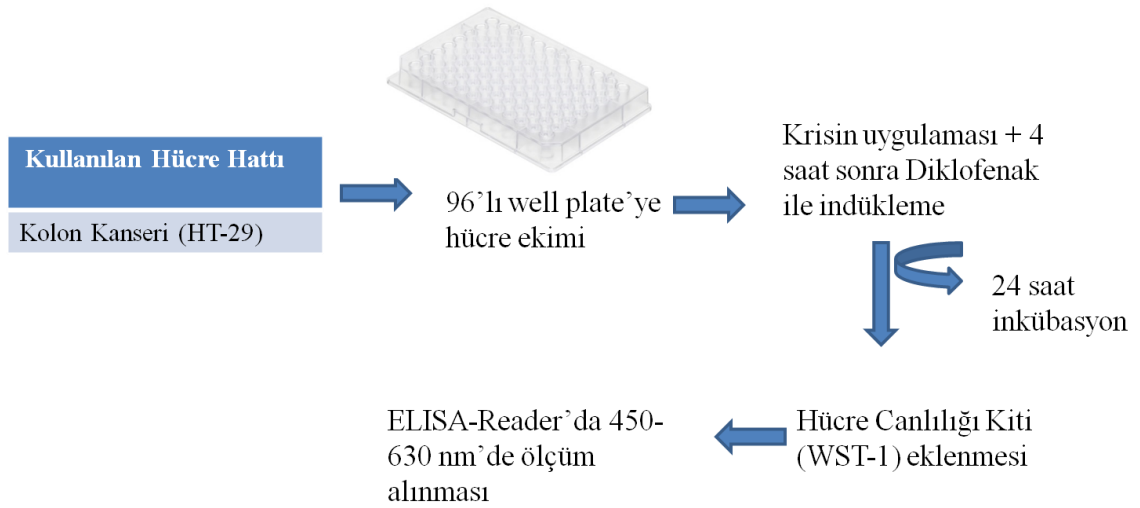
### **3. MATERYAL-METOD**

#### **3.1. Hücre Ekimi**

İnsan Kolon kanseri hücre hattı (HT-29) (ATCC'den temin edilmiştir). %10 oranında Fetal Bovin Serum ve %1 oranında Penisilin/streptomisin içeren DMEM hücre kültürü besiyerinde CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37 C'de 75 cm<sup>2</sup>' lik flasklarda çoğaltılmıştır.

#### **3.2. Hücre Canlılık Testi (WST-1)**

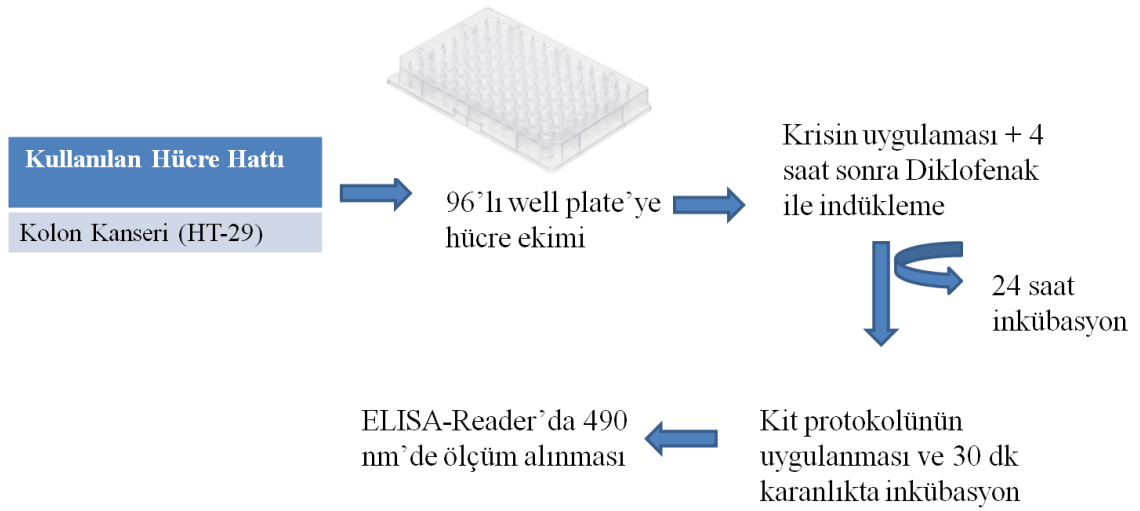
HT-29 hücreleri Tripsin-EDTA ile kaldırılarak thoma lamında tripan blue ile boyandıktan sonra ters mikroskop kullanılarak sayılmıştır, 7x10<sup>3</sup> hücre 96 well plate'lere ekilmiştir. Bir gece inkübasyon sonrasında Kr antioksidanı hücelere belirlenen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Bir gece inkübasyondan sonra WST-1 hücre canlılık kitinden 5 µl her kuyuya koyularak 2-4 saat inkübe edilip ELISA mikro plaka okuyucu cihazında 595 nm'de ölçüm yapılarak hücre proliferasyonunu azaltan ve artıran antioksidan konsantrasyonları belirlenmiştir. Antioksidanların koruyucu etkisine bakmak amaçlı aynı çalışma, kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılan bir ağrı kesici ilacın (Diklofenak) antioksidanlar ile indüklenmiş hücreler üzerine uygulanması ile antioksidanların kanser hücre canlılığını artırıp azaltmadığına bakılmıştır (Özolat and Ayna 2020).



Şekil 3.1. Hücre canlılık testi uygulamasının şematik görünümü

### 3.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Salıverilmesi Testi

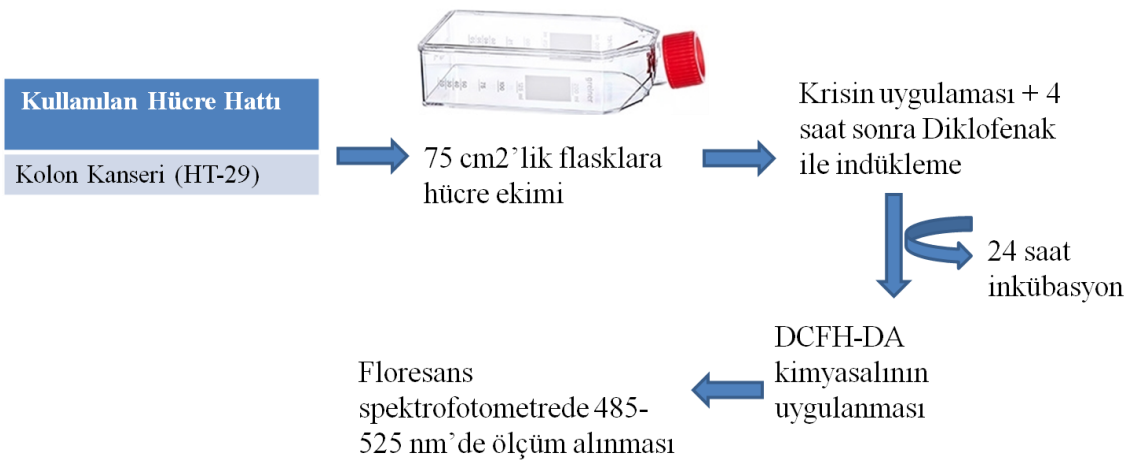
Laktat dehidrogenaz enzimi tüm hücrelerde varolan sitoplazmik bir enzim olup hücreler toksik bir etkiye maruz kaldıklarında plazma membranı bütünlükleri bozular. Hücre canlılığı control parametrelerinden biriside ölü hücrelerden kültür ortamına salınan laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçülerek hücre hasarının değerlendirilmesidir. Bu deney ile HT-29 hücre hattına uygulaması yapılacak 500  $\mu\text{M}$  Dik ve 50  $\mu\text{M}$  Kr'nin hücre ölümüne yol açıp açmadığı vasata salınan laktat dehidrogenaz enziminin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılıp thoma da sayılarak 96 kuyulu  $7 \times 10^3$  hücre ekilmiştir. Gece boyu  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübe ettikten sonra belirlenen konsantrasyonlarda ki 500  $\mu\text{M}$  Dik, 50  $\mu\text{M}$  Kr uygulaması yapılmıştır. 24 saat sonrasında LDH testi için kit içerisinde bulunan Catalyse'dan 250  $\mu\text{l}$  alınıp, üzerine Dye solution dan 11, 25 ml koyularak çözelti hazırlanmıştır. Plate deki hücrelerin üzerinden besiyerleri hücrelere dokunmadan nazikçe çekilip farklı temiz bir plate ye alınmıştır. Hazırlanan kit çözeltisinden her örnek olan kuyuya 100  $\mu\text{l}$  koyulup 30 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Sonrasında 490 nm'de absorbans alınmıştır (Özbolat and Ayna 2020).



Şekil 3.2. Laktat Dehidrogenaz Salıverilmesi testi uygulamasının şematik gösterimi

### 3.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) DCFH Ölçümü

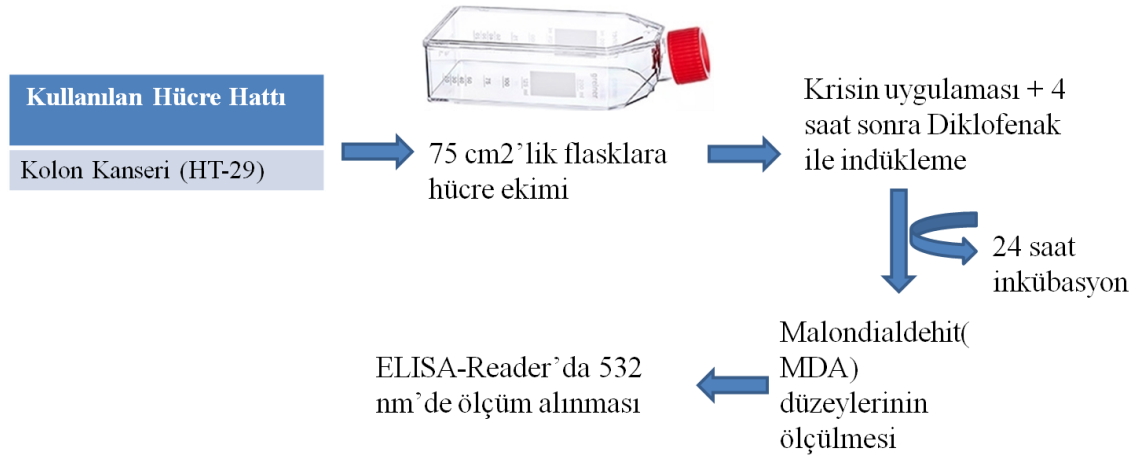
Hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılıp thoma da sayılarak 6 kuyulu platalere  $1 \times 10^6$  ekilmiştir. Gece boyu  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübe ettikten sonra  $500 \mu\text{M}$  Dik,  $50 \mu\text{M}$  Kr uygulaması yapılmıştır. 24 saat sonrasında ölü ve canlı hücreler toplanarak santrifüj edilmiştir. Hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırılıp, 1 ml PBS eklenerek iyice pipetaj yapıldıktan sonra 1 mM DCFH 25-30  $\mu\text{l}$  her tüpe koyulup 1 saat boyunca inkübatörde inkübe edilmiştir. Örnekler falkonlardan 100  $\mu\text{l}$  olarak alınıp testplate ine koyulmuştur. Floresans spektrofotometre cihazında 532 nm absorbans alınmıştır (Özbolat and Ayna 2020).



Şekil 3.3. Reaktif oksijen türleri ölçümü uygulamasının şematik gösterimi

### 3.5. Lipit Peroksidasyonu (LPO) Malondialdehit (MDA) Ölçümü

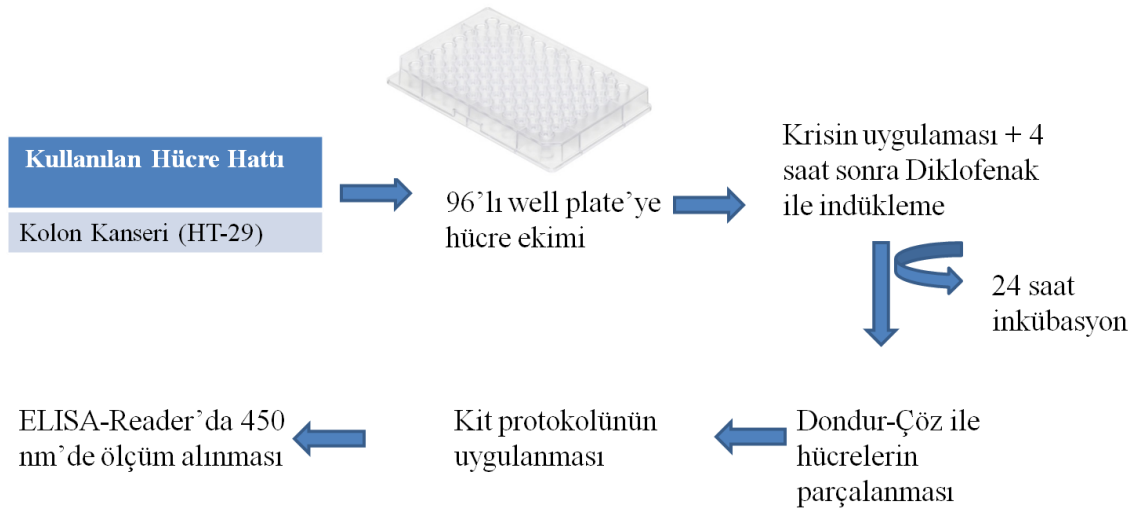
Serbest radikaller hücre membranı yağ asitlerini deforme ederek lipit peroksidasyonunu başlatır. LPO, poli- doymamış yağ asitlerinin radikaller ile okside olması sonucu başlayan, oto katalitik zincir reaksiyonları şeklinde devam ederek hasara neden olan reaksiyonlar dizisidir. Sonucunda ortaya çıkan aldehitlerden en çok bilineni membrana bağlı enzimleri inhibe etmek için membran proteinlerinde hasar oluşturan MDA'dır. Bu deney ile HT-29 hücre hattına uygulaması yapılan 500  $\mu$ M Dik ve 50  $\mu$ M Kr'nin lipid peroksidasyonunu ne ölçüde süpürücü etkide bulunduğu MDA ölçümü ile tespit edilmiştir. Hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılıp thoma da sayılarak 6 kuyulu platelere  $1 \times 10^6$  kadar ekilmiştir. Gece boyu CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe ettikten sonra 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr uygulaması yapılmıştır. 24 saat sonrasında ölü ve canlı hücreler toplanarak santrifüj edilmiştir. Hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırılıp, %0.8'lik TBA'dan 1 ml, TCA'dan da 250  $\mu$ l pellet üzerine eklenecek iyice pipetaj yapılmıştır. 95 C<sup>o</sup>de ki kaynar suya örnekler koyulup 30 dk kaynatılmıştır. 30 dk sonra hücreleri şoklamak maksadı ile tüplerdeki örnekler buzda bekletilmiştir. 2000 rpm de santrifüj edilen hücreler üzerinden supernatant alınıp ölçüm alınacak platelere eklenmiştir. ELISA reader cihazında 432-585 nm de absorbans alınmıştır (Özbolet and Ayna 2020).



Şekil 3.4. Lipit Peroksidasyonu (MDA) ölçülmesi uygulamasının şematik gösterimi

### 3.6. Total Antioksidan (TAS) Ölçümü

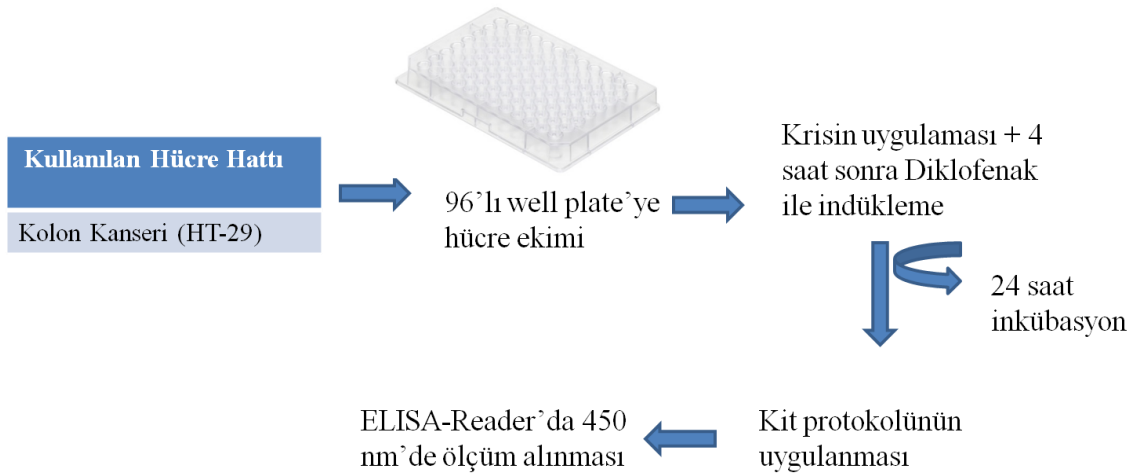
TAS aktivitesi tayini için Sun Red (Cat No: 201-12-7412) Human TAS ELISA Kit Instruction kullanılmıştır. Kit protokolüne göre hücreler 1 ml 'de 1 milyon olacak şekilde 6 kuyulu platelere ekilmiştir. Sonrasında 500 µM Dik, 50 µM K<sub>r</sub> uygulaması yapılmıştır. 24 saat sonrasında hücreler (ölü ve canlı) toplanmıştır. 2000 rpm de santrifüj edilip çöktürüldükten sonra besiyeri atılıp hücreler PBS ile dilüe edilmiştir. Ardından dondurulup çözülerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. 2500 rpm de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrı tüplere alınmıştır. Kit protokolüne uygun olarak standartlar hazırlanmıştır. 72 U/ml, 36 U/ml, 18 U/ml, 9 U/ml, 4,5 U/ml, olacak şekilde standartlar hazırlanıp 50 µl test platelerine koyulmuştur. Blank olarak seçilen kuyulara hiçbir şey koyulmamıştır. Standartların üzerine 50 µl Streptavidin-HRP koyulmuştur. Hazırlanan örneklerin her birinden 40 µl test platelerine koyulup üzerine TAS-antibody den 10 µl koyulacak ardından Streptavidin den 50 µl koyulmuştur. Platenin üzeri şeffaf membran ile kapatılıp 37 C<sup>o</sup> de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. 30X washing buffer 30 kat seyreltildikten sonra 1 saat inkübe olan plate üzerindeki sıvı dökülüp her kuyu en az 5 kere hazırlanan yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. Ardından Chromogen A Solutiondan 50 µl, Chromogen B solüsyonundan 50 µl her kuyuya eklenip 10 dk 37 C<sup>o</sup> de inkübe edilmiştir. Sonrasında Stop Solution dan 50 µl her kuyuya eklenip reaksiyonun durması sağlanmıştır. ELISA reader cihazında 450 nm'de absorbans alınmıştır (Özbolat and Ayna 2020).



Şekil 3.5. Total Antioksidan Ölçümü uygulamasının şematik gösterimi

### 3.7. Katalaz Aktivite Tayini

Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan katalaz enzimi redoks reaksiyonlarını başlatan etkili bir protein katalisti olarak bilinmektedir. SOD enzimi faaliyeti sonucu oluşan, OH<sup>-</sup> radikali gibi daha reaktif oksidanların oluşumunda rol olan hidrojen peroksit, Katalaz enzimi ile su ve oksijene dönüştürülmektedir. Bu deney ile HT-29 hücre hattına uygulaması yapılacak 500 µM Dik ve 50µM Kr'nin Katalaz aktivitesini artırıp artırmadığı tespit edilmiştir. Katalaz Aktivite tayini Elabscience (cat no: E-BC-K031) Catalase (CAT) Assay Kit kullanılarak yapılmıştır. Kit protokolüne göre hücreler toplandıktan sonra santrifüj edilmiştir. Konsantrasyon fazla ise PBS ile dilüe edilmiştir. Kontrol tüpü için EP tüpleri içerisine 1 ml reaktif 1 eklenmiştir. Numune tüpünü hazırlamak için 5 ml EP tüplerine örneklerden eklenip 1 ml reaktif 1 eklenmiştir. 37 C<sup>o</sup> de 5 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında her tüpe 0.1 ml Reaktif 2 eklenip karıştırılmıştır. 37 C<sup>o</sup> de 1 dk boyunca inkübe edilerek numune tüplerine 1 ml Reaktif 3 ve 0.1 ml Reaktif 4 eklenip karıştırılmıştır. Kontrol tüplerine de 1 ml Reaktif 3 ve 0.1 ml Reaktif 4 eklenip örnekler eklendikten sonra karıştırılmıştır. 10 dk oda sıcaklığında bekletilip 405 nm'de ölçüm alınmıştır (Özbolat and Ayna 2020).



Şekil 3.6. Katalaz Aktivite Tayini uygulamasının şematik gösterimi

### 3.8. QRT- PCR

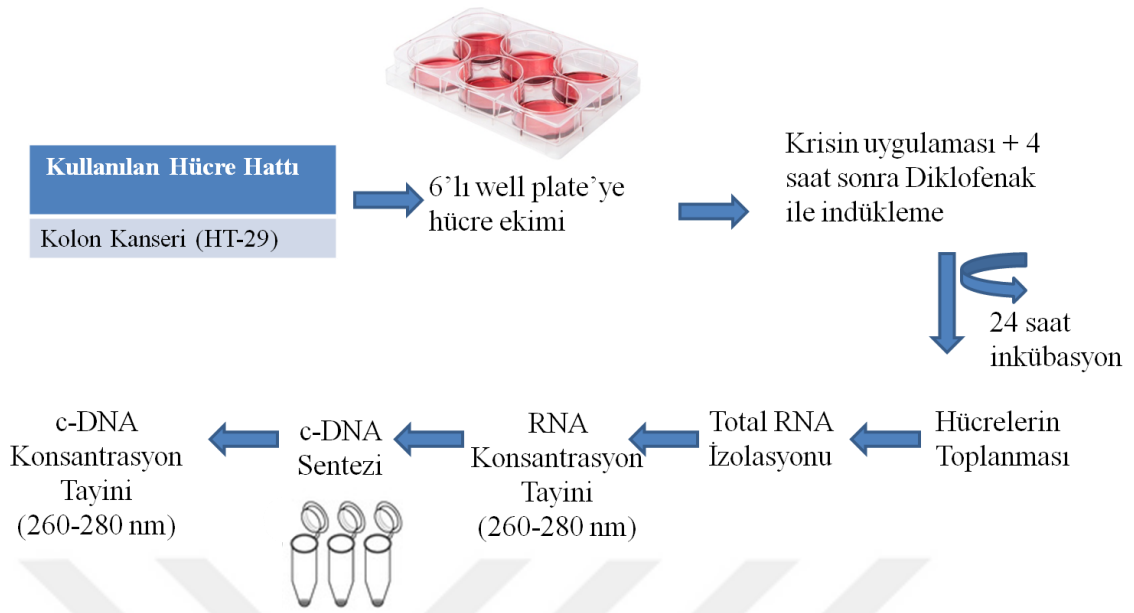
Biyolojik örnekler üzerinden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA düzeylerini sayısal olarak ifade edebilme gibi alanlarda kullanılan Real time PCR tekniği ile HT-29 hücre hattı üzerine uygulanan antioksidan ve ilacın total rna izolasyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezi yapılıp, hücrelerin kontrollü hücre ölüm yolağı olan apoptozda rol oynayan bazı kilit genlerin (*p53*, *Bax*, *Cyt-c*, *Cas3*, *Cas8*) ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda 2-3x10<sup>6</sup> kadar yetiştirilen hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırılıp hücreler üzerine Tripsin-EDTA eklenmiştir. Yüzeyle çıkan hücreler 2000 rpm de çöktürülüp taze besiyeri ile karıştırıldıktan sonra thoma lamında sayılarak 6 kuyulu plate ye hücre ekilmiştir. Hücreler gece boyu 37 C<sup>o</sup> de inkübe edilmiştir. Sonrasında 500 µM Dik, 50 µM Kr uygulaması yapılmıştır. 24 saat sonrasında hücreler (ölü ve canlı) toplanmıştır. 2000 rpm de santrifüj edilip çöktürüldükten sonra besiyeri atılıp Total RNA izolasyon kiti içerisinde bulunan lizis bufferdan 500 µl her örneğe eklenip pipetaj yapılmıştır. 10 sn vorteksledikten sonra kolonlar ependorf tüplerine yerleştirilip kolon aktivasyonu için 100 µl Aktivasyon buffer ı eklenip 10.000 g'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Örnekler üzerine 300 µl izo-propanol eklenip vorteks yapılmıştır. Ardından örnekler kolona aktarılmıştır. 30 sn 10.000 g'de santrifüjlenip alttaki sıvı uzaklaştırılmıştır. Kolona 700 µl first washing buffer dan eklenip 10.000 g de 30 sn santrifüj edilmiştir. Altteki sıvı uzaklaştırılmıştır. Ardından yine kolona 700 µl second washing buffer dan eklenip 10.000 g'de 30 sn santrifüj yapılmıştır. Fazla etanolü uzaklaştırmak için 10.000 g'de 2 dk santrifüj işlemi

yinelenmiştir. DNase/RNase free tüplere kolonlar yerleştirilip 50 µl elution buffer eklenmiştir. 1 dk oda sıcaklığında bekletilip 10.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. RNA konsantrasyon ölçümü ELISA reader cihazında 260-280 nm dalga boylarında yapılmıştır. RNA konsantrasyonları ölçüldükten sonra konsantrasyon eşitlemesi gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonları eşitlenen RNA örnekleri buz üzerine alınıp cDNA sentez kiti protokolüne göre totalde 20 µl'lik bir deney tüpü hazırlanmıştır. Öncelikle alınacak RNA miktarlarına uygun su miktarları deney tüplerine koyulmuştur. 0.5 µl oligo dt tüplere eklendikten sonra konsantrasyonları eşitlenen RNA örneklerinden tüplere koyulmuştur. Öncelikle hazırlanan bu tüpler PCR cihazında 67 C° de 5 dk tutularak ön denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında tüpler üzerine kit içerisinde bulunan SCRIPT RT Buffer Complete 4 µl, dNTP mix 1 µl, DTT stok solution 1 µl, RNase inhibitöründen 0,5 µl ve SCRIPT Reverse Transkriptaz enziminden 0,5 µl koyulup üzeri 20'ye tamamlanacak şekilde RNase free water ile tamamlanmıştır. Sonrasında 42 C° de 10 dk, 50 de 45 dk, 70 de 10 dk olacak şekilde PCR programı ayarlanmıştır. İşlemlerin sonrasında cDNA konsantrasyon ölçümü ELISA reader cihazında 260-280 nm dalga boylarında yapılmıştır. cDNA'ların konsantrasyonları 20ng/ml'de eşitlendikten sonra real time pcr işlemi için 20 µl lik deney mixi hazırlanmıştır. Bunun için kit içerisinde bulunan qPCR syber Master dan 10 µl tüm reaksiyon tüplerine eklenmiştir. Forward ve Reverse primerler (0,6 -0,6 µl) deney tüplerine eklendikten sonra cDNA lar eklenip ve totalde 20 µl olacak şekilde üzeri grade water ile tamamlanmıştır. Tüpler PCR rotoruna yerleştirilip kelepçesi takıldıktan sonra Rotor Gene programı açılıp çalışma şartları programa 95 C° de 2 dk ön denatürasyon ardından 15 sn denatürasyon, 60 C° de 1 dk 45 döngü olacak şekilde girilmiştir.

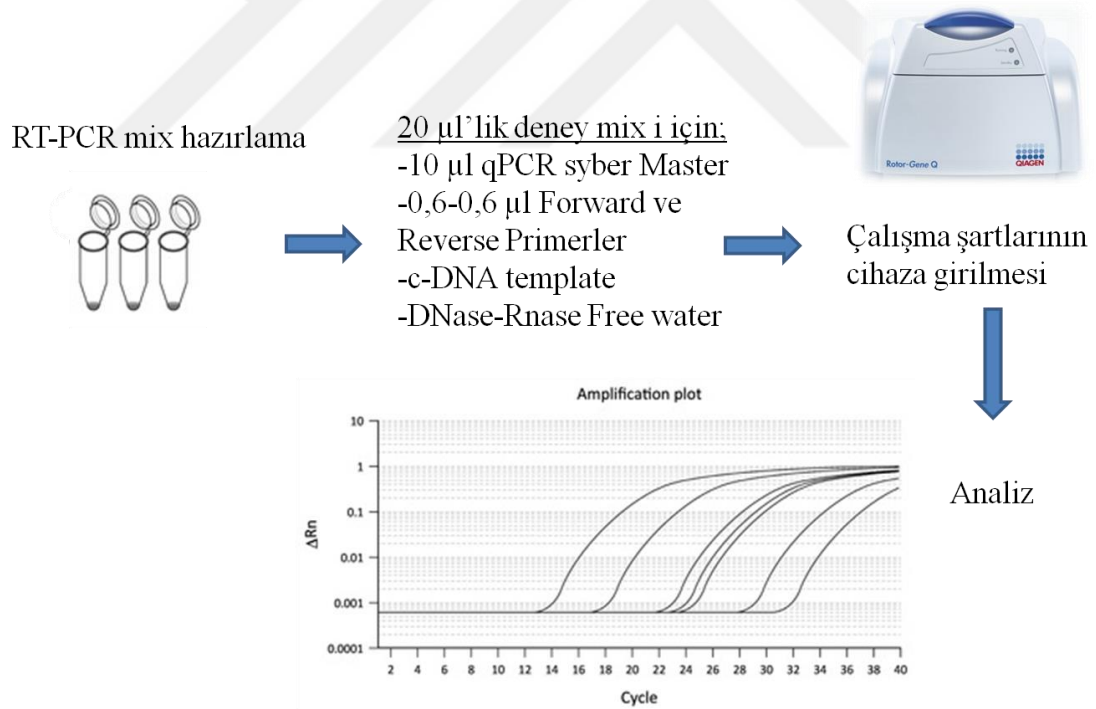
İşlem bittikten sonra alınan ct değerlerine göre hesaplamalar yapıp sonuçlar Ct (Cycle treshold) metodu ile  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanarak analiz edilip grafiklendirilmiştir (Özbolat and Ayna 2020).

Tablo 3.3.1. QRT- PCR analizinde kullanılan genlere ait primer sekans dizileri (R:Reverse: Geri, Ters; F: Forward, İleri)

Bax (F)	GCGAGTGTCTCAAGCGCATC
Bax (R)	TGGAGACAGGGACATCAGTCG
Bcl-2 (F)	TTTAATTGTATTTAGTTATGGCCT
Bcl-2 (R)	CAATAAACAATTCTGTTGACG
Cytchrome C (F)	TCGTTGTGCCAGCGACTAAAA
Cytchrome C (R)	CCTGTCTTCCGCCCAAAGAG
Caspase-8 (F)	GAACTTCAGACACCAGGCAGG
Caspase-8 (R)	AGATGATCGACCCTCCGCC
Caspase-3 (F)	TATTCAGGCCTGCCGTGGTA
Caspase-3 (R)	GGCACAAAGCGAACTGGATGA
P53 (F)	CGACGGTGACACGCTTCC
P53 (R)	TTTCCTGACTCAGAGGGGGC
GAPDH (F)	GCCGCATCTTCTTTTGCCTC
GAPDH (R)	GACGAACATGGGGGCATCAG



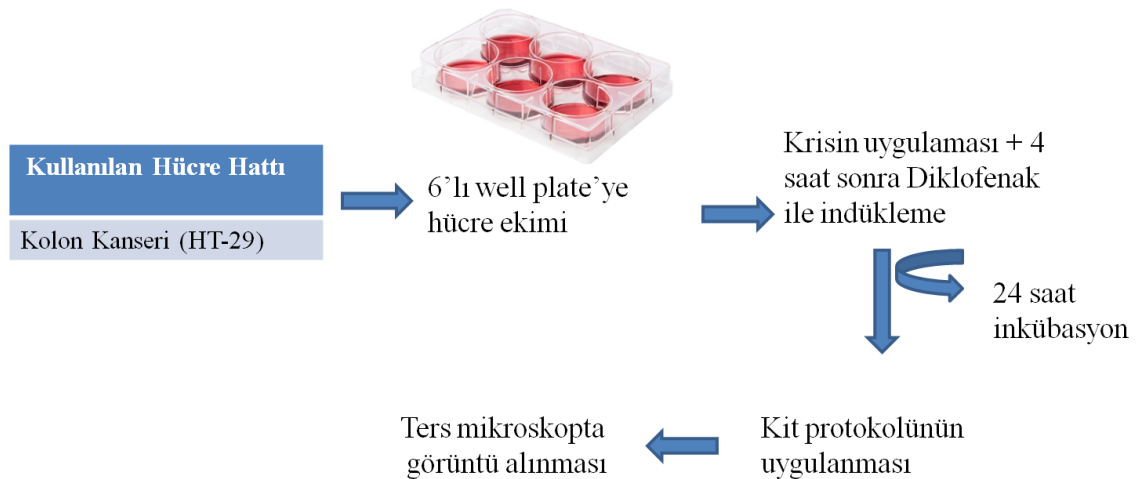
Şekil 3.7. QRT-PCR uygulaması için c-DNA sentezi aşamalarının şematik gösterimi



Şekil 3.8. QRT-PCR uygulamasının şematik gösterimi

### 3.9. Tunel Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

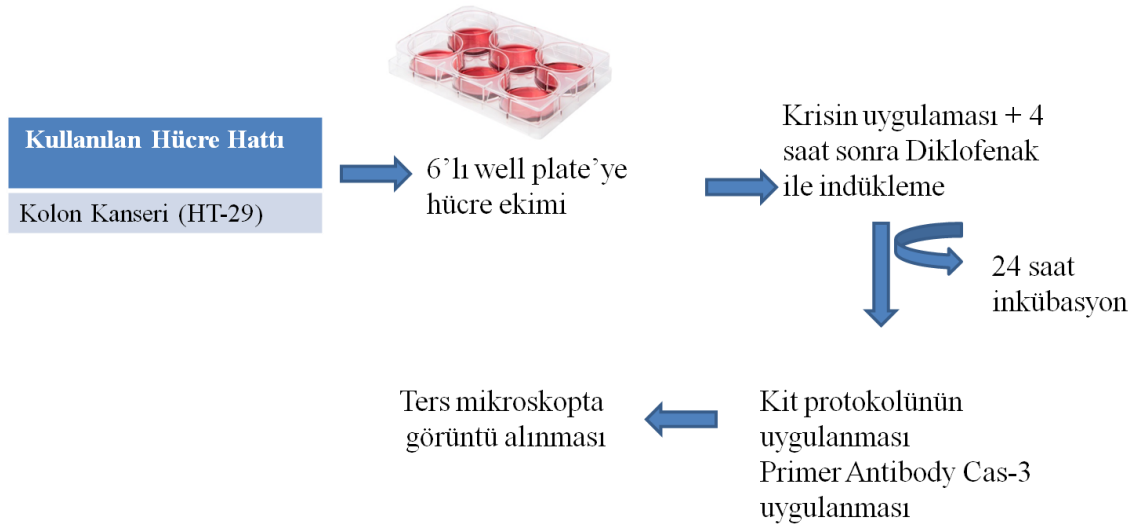
TUNEL testi içinde kit içeriği uygulanıp methyl green ile boyanan hücrelerin çekirdekleri aktivite olması dahilinde koyu renkte gözlenmelidir. Uygulama yapılan hücreler üzerinden besiyeri çekilerek, 1 ml PBS ile her kuyu yıkanmıştır. PBS çekilip uzaklaştırıldıktan sonra yüzeyi kaplayacak kadar % 1 formaldehit eklenmesi yapıp 10 dk beklenmiştir. Formaldehit uzaklaştırılıp PBS ile kuyular yıkanmıştır. 2:1 Etanol: Asetik asitten yüzeyi kaplayacak kadar eklenip 5 dk beklenmiştir. Tüm kuyular PBS ile yıkandıktan sonra %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 5 dk bloklanıp PBS ile yıkanmıştır. Equilibration Bufferdan yüzeyi kaplayacak kadar eklenip, 10 sn beklenmiştir. Tdt enziminden 12 µl wellere eklenip, yaydırılmıştır. 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Stop Wash Buffer yüzeyi kaplayacak kadar eklenip 10 dk beklenip PBS ile yıkanmıştır. Antidioxigenin peroxidase 40-50 µl eklenip 30 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Kuyular PBS ile yıkandıktan sonra. Peroxidase substrate (DAB) eklenerek 5dk beklenmiştir. Saf su ile yıkama yapılmıştır. Saf su ile yıkama yapıp, Counterstain için %0.5'lik methyl green hazırlanmıştır. Tüm wellere eklendikten sonra 10 dk beklenip saf su ile yıkanmıştır. Yüzeyi kaplayacak kadar n-Butanol eklenip atılmıştır. Xylenes eklenerek yüzey kaplanmıştır. Ardından mikroskop altında görüntü alınmıştır (Özbolat and Ayna 2020).



Şekil 3.9. TUNEL Assay uygulamasının şematik gösterimi

### 3.10. Caspase-3 Aktivite Testi

Tüm doku sıvıları, vücut sıvıları, hücre kültürü çalışmalarında uygulanan bu yöntemde hücreler üzerine yapılan 500  $\mu$ M Dik ve 50  $\mu$ M Kr uygulamalarından sonra hücreler fikse edilir. Kit içerisindeki maddelerin uygulaması yapılır. Metil-yeşili ile boyanıp PBS ile iyice yıkandıktan sonra mikroskop altında görüntü alınır. Caspase-3 aktivitesi olan hücrelerin sitoplazmaları daha koyu renkte gözlenmelidir. Uygulama yapılacak olan ortamdaki hücreler üzerinden besiyeri çekilip kuyular PBS ile yıkanmıştır. PBS'ler çekilip, uzaklaştıldıktan sonra UltraVision Hydrogen Peroxide Block yüzeyi kaplayacak kadar eklenmiştir. 10 dk beklenip, çekilip atılmış, PBS ile yıkama işlemi tekrar edilmiştir. UltraVision Protein Block eklendikten sonra 5 dk beklenmiştir. Primary Antibody (Caspase-3) 120  $\mu$ l her kuyuya eklenmiştir. Primary Antibody Amplifier Quanto eklenerek 10 dk beklenip yıkama yapılmıştır. HRP Polymer Quanto eklenerek 10 dk beklenmiştir. Kuyular saf su ile yıkanmıştır. 1ml DAB Quanto Substrate içerisine 30  $\mu$ l DAB Quanto Chromogen eklenip, kuyulara uygulanarak 5 dk beklenmiştir. Yıkama yapıldıktan sonra Counterstain TUNEL'deki gibi methyl green ile yapılarak saf su ile yıkanmıştır. Ardından mikroskop altında görüntü alınmıştır (Özbolat and Ayna 2020).



Şekil 3.10. Caspase-3 Aktivite Testi uygulamasının şematik gösterimi

### 3.11. İstatiksel Analiz

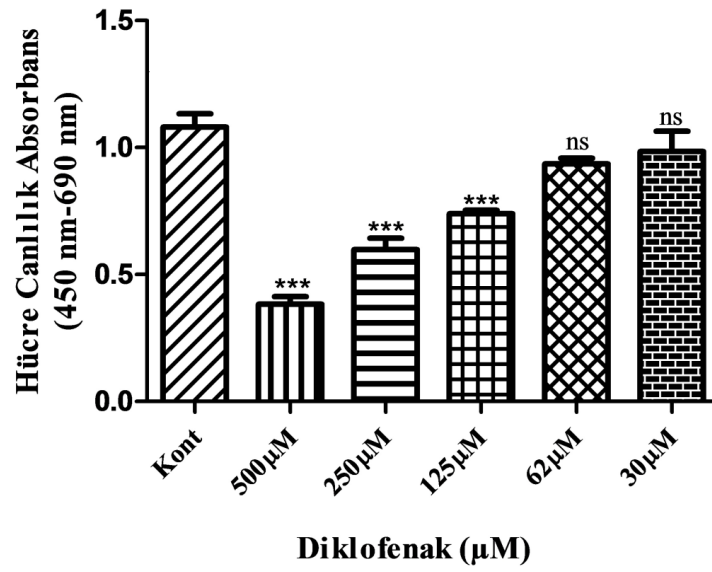
İstatistiksel analiz ve karşılaştırılabilir veri grupları, tek yönlü ANOVA Newman-Keuls Post-Hoc Testi ile GraphPad Prism 5 kullanılarak değerlendirilmiştir;  $p < 0.05$  anlamlı kabul edilmiştir. Tüm deneyler en az üç kez tekrar edilmiştir (Özbolet and Ayna 2020).



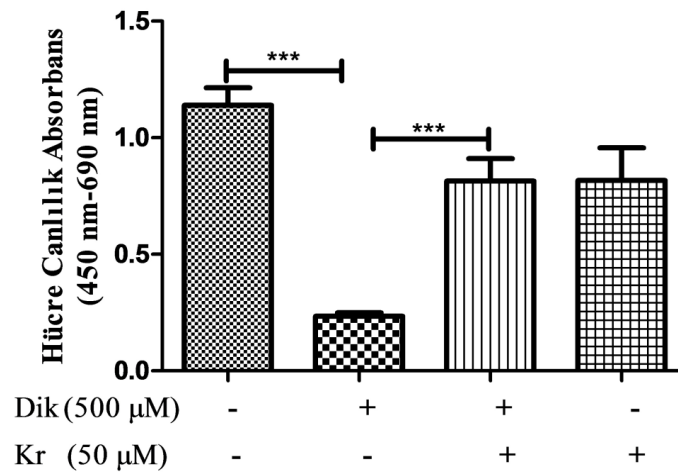
## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Canlılık Testi (Wst-1)

Kr tedavisinin HT-29 hücrelerinde Dik ile indüklenen hücre proliferasyonuna karşı etkisi WST-1 testi ile değerlendirildi. Hücreler, HT-29 hücreleri üzerinde toksik etkiler oluşturmak için Dik maruziyetinin konsantrasyonuna Şekil 1.7.'de ki grafikte görüldüğü gibi 62, 125, 250 ve 500 mM Dik ve süresine karar vermek için 12, 24 ve 30 saat ile muamele edildi. Dik tedavisi 12 (veriler verilmemiştir) ve 24 saat zamanı için, konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunu azaltmış olduğu görüldü. 125 ila 500 uM Dik, konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunda önemli ( $p < 0.001$ ) azalmaya neden oldu. 500 uM Dik varlığında, hücre proliferasyonu, tedavi edilmeyen gruba kıyasla önemli ölçüde ( $P < 0.01$ ) azaldı. Bu nedenle, aşağıdaki deneylerde HT-29 hücrelerini indüklemek için 500 uM Dik'in uygulanması tercih edildi. Şekil 1.8.'de ki grafikte görüldüğü gibi Kr ön muamelesi (50 uM), Dik kaynaklı HT-29 hücrelerinin hücre proliferasyonunu arttırdı. Bu nedenle aşağıdaki deneylerde HT-29 hücre hattını indüklemek için 50  $\mu$ M Kr uygulanması tercih edildi.



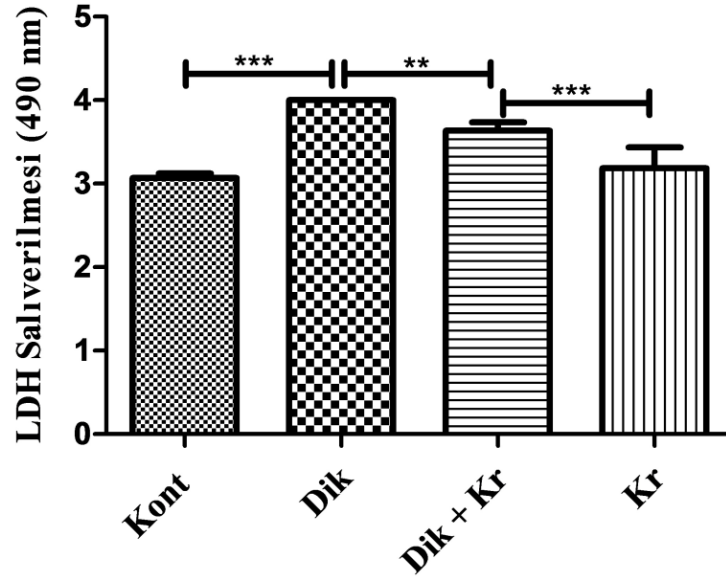
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Dik ile indüklenmiş kolon kanseri (HT-29 hücre hattı) hücrelerinin 24 saat sonraki hücre proliferasyonuna olan etkisi



Şekil 4.2. Etkin konsantrasyon olarak seçilen (500 µM) Dik ile indüklenen HT-29 hücreleri üzerine 50 µM konsantrasyonda uygulanan Kr'nin hücre proliferasyonuna olan etkisi

#### 4.2. Laktat Dehidrogenaz (Ldh) Salıverilmesi Testi

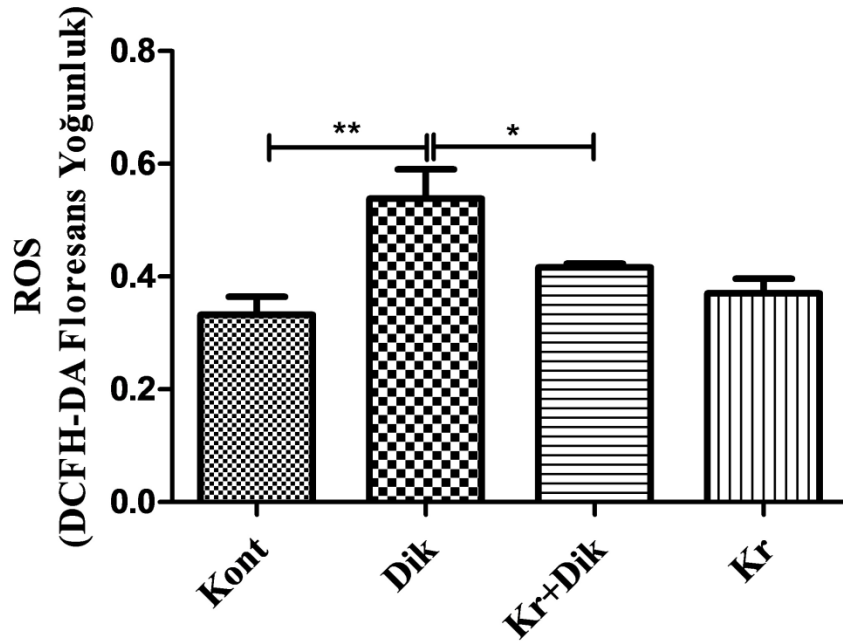
Şekil 4.3.'te ki grafikte görüldüğü gibi Hücrelerin 500  $\mu$ M Dik ile 12 saat inkübasyonu, önemli ölçüde ( $p < 0.001$ ) ölü hücrelerden artan LDH salımından dolayı ortamdaki LDH seviyelerini artırırken, Kr ön muamelesi, Dik kaynaklı LDH salımını inhibe etmiştir.



Şekil 4.3. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerindeki Laktat dehidrogenaz kiti kullanılarak ölçülmesi

### 4.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) DCFH Ölçümü

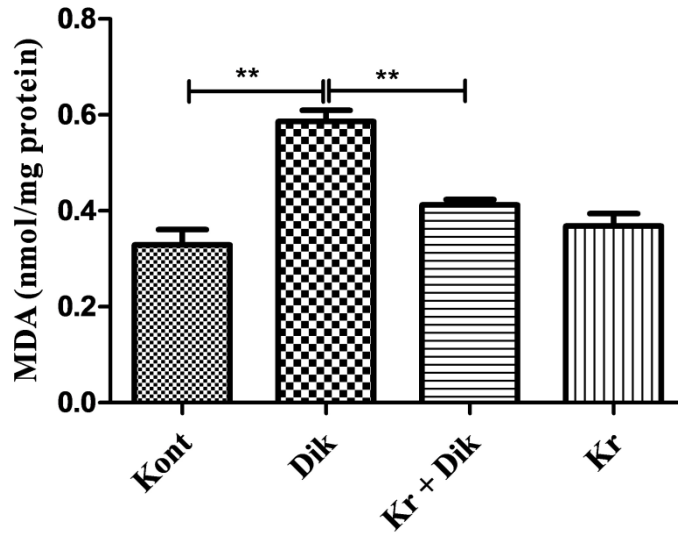
Kr tedavisinin HT-29 hücrelerinde Dik ile tetiklenen ROS üretimi üzerindeki etkilerini değerlendirildi. Sonuçlar, Şekil 4.4.'te ki grafikde görüldüğü gibi Dik tedavisinin ROS üretiminde önemli bir artışa ( $p < 0.01$ ) yol açtığını ortaya koymuştur; bununla birlikte, 50  $\mu$ M Kr ön muamelesi, ROS'u önemli ölçüde azalttığı görülmüştür ( $p < 0.1$ ).



Şekil 4.4. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerinde oluşan reaktif oksijen türlerinin ROS Assay kiti kullanılarak ölçülmesi

#### 4.4. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Ölçülmesi

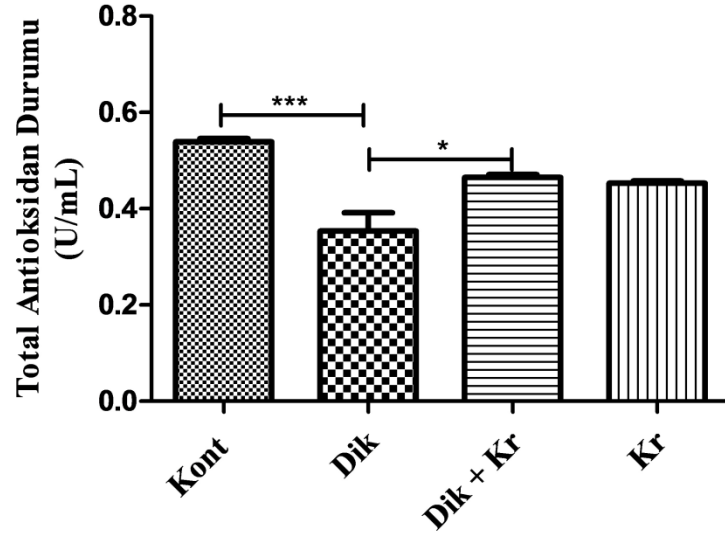
Şekil 4.5.'de ki grafikte görüldüğü gibi hücrelerin 500  $\mu$ M Dik ile 12 saat inkübasyonu, önemli ölçüde ( $p < 0.001$ ) ölü hücrelerden artan LDH salımından dolayı ortamdaki LDH seviyelerini artırırken, Kr ön muamelesi, Dik kaynaklı LDH salımını inhibe etmiştir. Kr'nin, Dik kaynaklı yaralanmadan kolon kanseri hücre ölümünü baskılamaya katkıda bulunup bulunmadığını değerlendirmek ve MDA seviyesini saptamak için 50  $\mu$ M Kr kullanılarak LPO testi yapıldı. Dik ile indüklenen HT-29 hücrelerindeki MDA seviyesi önemli ölçüde artarken ( $p < 0.01$ ), Kr ön muamelesi, Dik ile indüklenen HT-29 hücrelerine kıyasla MDA seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür ( $p < 0.01$ ).



Şekil 4.5. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 12 ve 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerinde oluşan lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA'nın (Malondialdehit) LPO Assay kiti kullanılarak ölçülmesi

#### 4.5. Total Antioksidan (TAS) Ölçümü

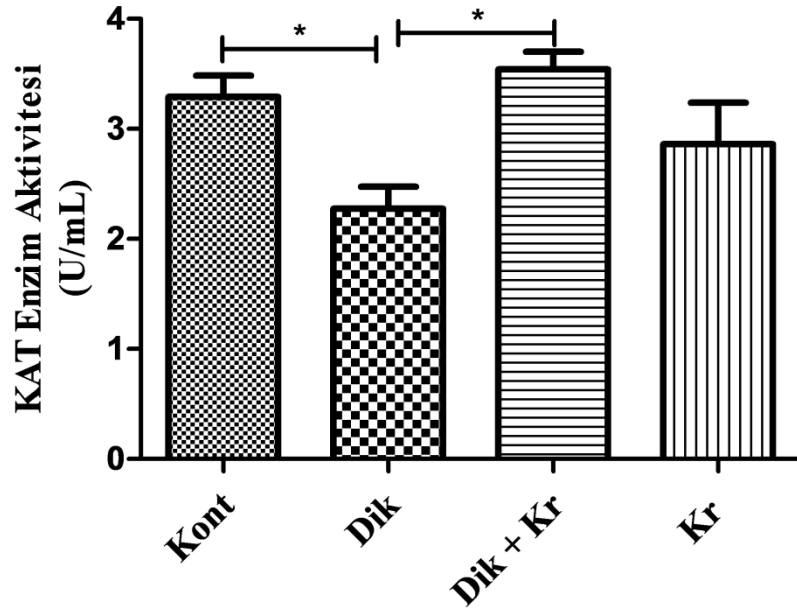
TAS, Şekil 4.6.'de ki grafikte görüldüğü gibi Dik ile tetiklenen HT-29 hücrelerinde önemli ölçüde azalırken ( $p < 0.001$ ) Kr ön tedavisi bu etkileri tersine çevirmiştir ( $p < 0.1$ ).



Şekil 4.6. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerinde ki total antioksidan durumunun TAS Assay kiti kullanılarak ölçülmesi

#### 4.6. Katalaz Aktivite Tayini

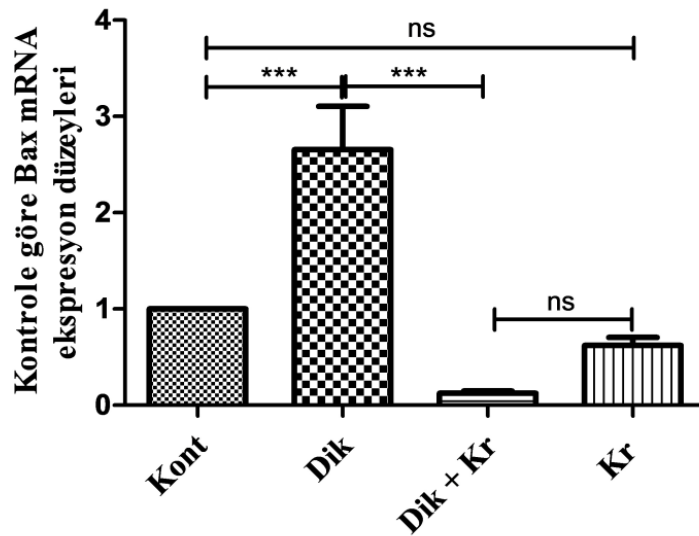
CAT aktivitesi, Şekil 4.7.'de ki grafiğe göre Dik ile indüklenen HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalırken ( $p < 0.1$ ), Kr ön-muamelesi CAT aktivitesini artırmıştır ( $p < 0.1$ ).



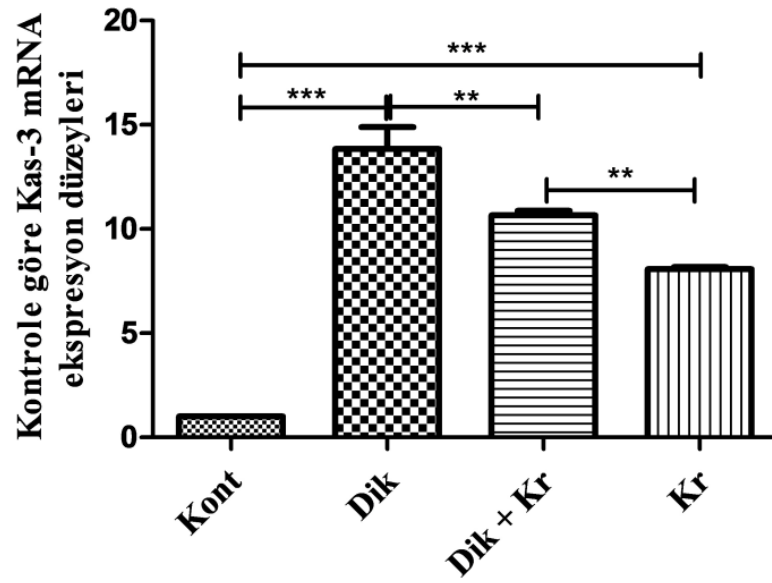
Şekil 4.7. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ve ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattı üzerindeki katalaz aktivitesinin CAT Assay kiti kullanılarak ölçülmesi

#### 4.7. QRT-PCR Analiz Sonuçları

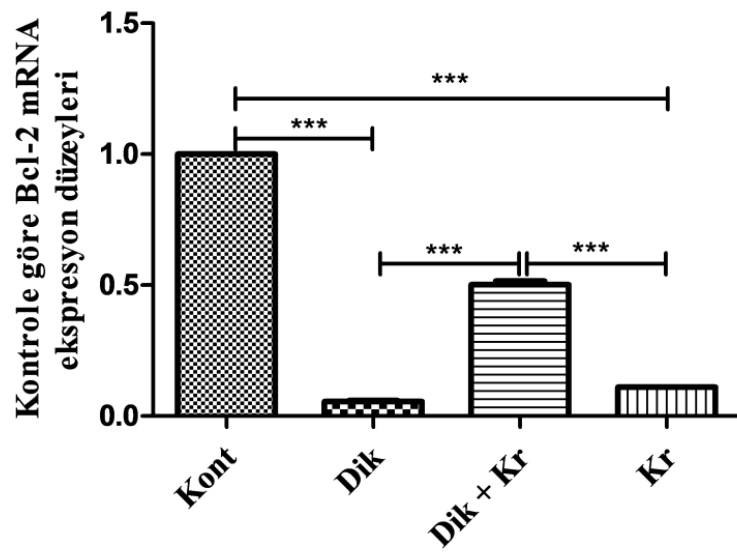
Anti-apoptotik ve apoptotik genlerin mRNA seviyelerinin Dik ve Kr'den etkilenip etkilenmediğini test etmek için, *Bax*, *Bcl-2*, *Sitokrom c*, *P53*, *Cas-8* ve *Cas-3* ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile ölçüldü. Aşağıda her genin mRNA ekspresyon seviyeleri grafiklendirilmiştir. *Bax*, *Sitokrom c*, *P53*, *Cas-8* ve *Cas-3*'ün mRNA seviyeleri önemli ölçüde artmıştır ve *Bcl-2*'nin mRNA seviyeleri, Dik maruziyeti ve kontrol ile karşılaştırıldığında azalmıştır ( $p < 0.001$ ). Kr-ön-muamelesi, *Cas-3*, *Cas-8* ve *P53*'ün ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde tersine çevirirken, *Bcl-2* seviyesini artırmış ve *Sitokrom-c* seviyesini düşürmüştür. *Bcl-2*'nin mRNA seviyeleri de Kr tedavisi ile önemli ölçüde azaldığı görülmüştür ( $p < 0.001$ ). Kr ön muamelesi sırasında *Bax*'ın mRNA seviyesi değişmeden kalırken, *Sitokrom c*, *Cas-8* ve *Cas-3* ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde artmıştır ( $p < 0.001$ ).



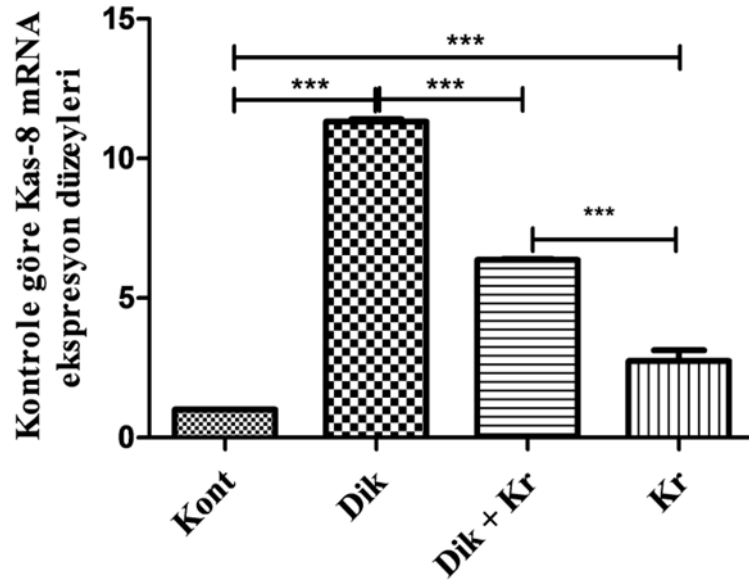
Şekil 4.8. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan *Bax*'ın mRNA ekspresyon düzeyi



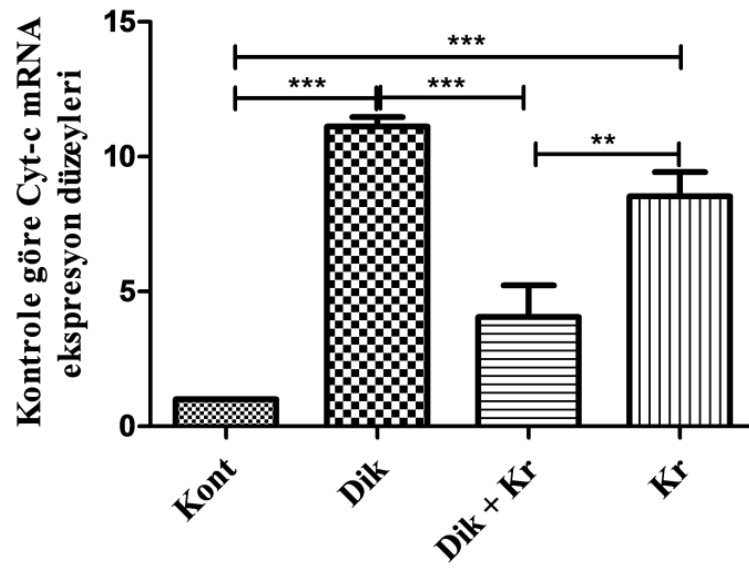
Şekil 4.9. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan Kas-3'ün mRNA ekspresyon düzeyi



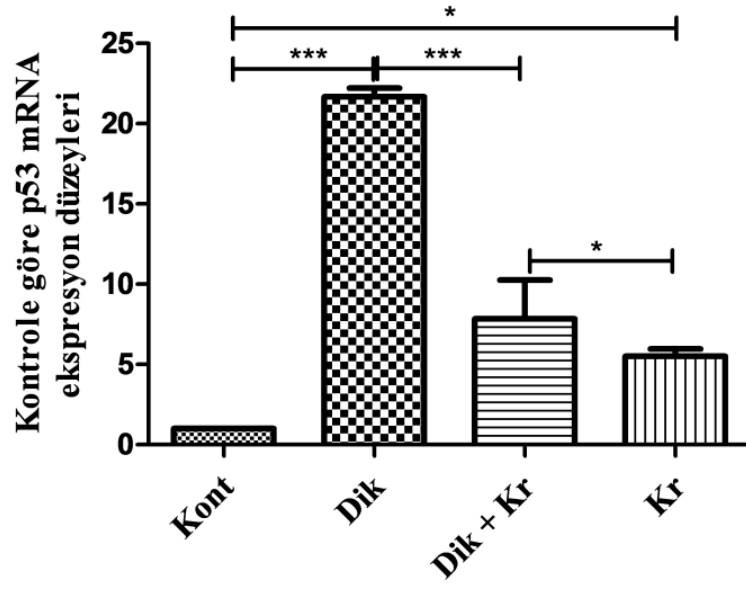
Şekil 4.10. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında anti-apoptotik gen olan Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeyi



Şekil 4.11. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan Kas-8'in mRNA ekspresyon düzeyi



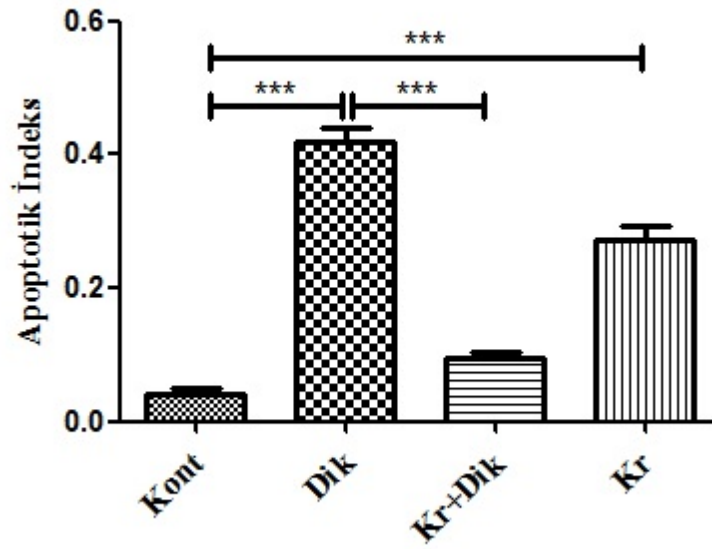
Şekil 4.12. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan Cyt-c mRNA ekspresyon düzeyi



Şekil 4.13. 500  $\mu$ M Dik, 50  $\mu$ M Kr ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik gen olan *p53*'ün mRNA ekspresyon düzeyi

#### 4.8. Tünel Assay

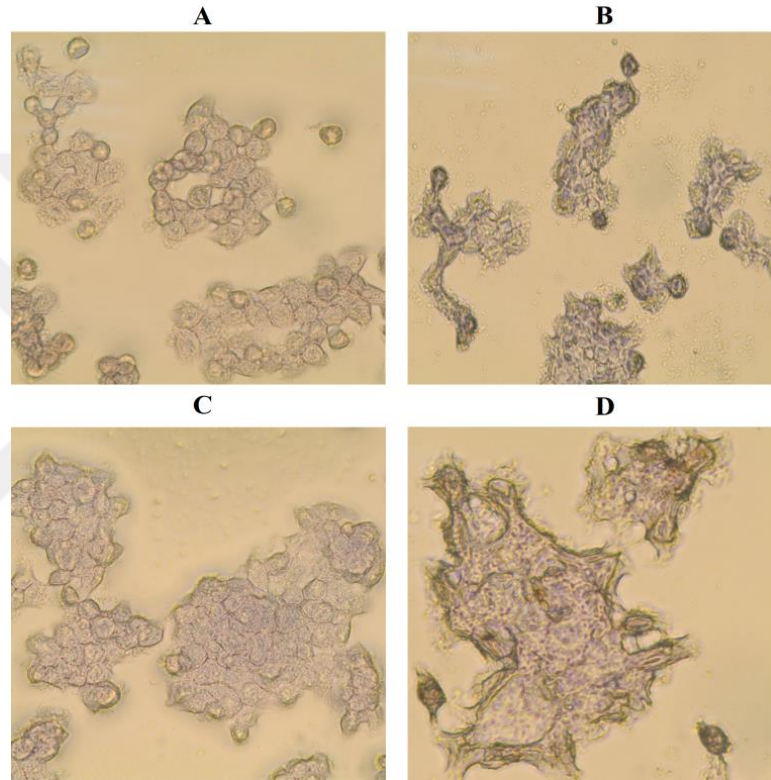
Şekil 4.14.'de ki grafikte görüldüğü gibi Kr ile ön muamelenin, HT-29 hücrelerinde Dik tarafından indüklenen apoptozu önleme üzerindeki etkisi de değerlendirildi. Dik'in, Tünel testi ile belirlendiği Apoptotik İndeks'te önemli artış ( $p < 0.001$ ) ile sonuçlanan bilgilerle apoptozisi indüklediğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.14. 50  $\mu$ M Kr'nin ön tedavisi 500  $\mu$ M Dik ile indüklenen HT-29 hücre hattında apoptotik indeks

#### 4.9. Caspase-3 Aktivite Testi

Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi Kr ile ön tedavi Caspase-3 seviyesini önemli ölçüde zayıflatırken, Dik'e maruz kalmasıyla önemli ölçüde aktive olmuştur. Apoptotik yolun indüksiyonu nedeniyle Dik ile tetiklenen hücre ölümünün gözlemlenip gözlemlenmediğini daha iyi anlamak için, apoptotik yolun anahtar uygulayıcılarından biri olan Caspase-3'ün aktivasyonu araştırıldı.



Şekil 4.15. (A) Kontrol grubu, (B) 500 µM Dik, (C) 50 µM Kr ve (D) ikisinin aynı anda uygulanması ile 24 saat boyunca indüklenen HT-29 hücre hattında Caspase-3 enziminin aktive olduğu koyu renkli kısımların ters ışık mikroskobu ile görüntülenmesi

## 5. TARTIŞMA

Hücre siklusunun devam etmesi ve hücre çoğalması büyümenin kontrolünde olan genlerin ekspresyonu ile ilişkilidir. Bu süreçte hücre büyümesi, hücre uyarımı meydana gelmektedir. Hücre siklusundaki faz geçişlerinde kontrol noktaları bulunmaktadır. Hücre siklusu siklin bağımlı kinazlar tarafından kontrol edilmektedir ve hücre homeostazisi, hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve kontrollü ölüm programları ile sürdürülmektedir. Yaşamsal işlevini yitiren hücreler programlanmış hücre ölümü ile yok edilmektedirler. Normal hücre büyümesinin düzenlenmesinde işlev gören proteinler protoonkogenler ve onkogenler tarafından sentezlenmektedir. Büyümenin kontrollü bir şekilde ilerlemesini sağlayan proteinler olan protoonkogenlerin onkogen haline dönüşümü hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakta ve kanser hücrelerine dönüşümünü sağlayıp kontrolsüz büyümesine ve çoğalmasına sebep olmaktadır (Yokuş ve Ülker 2012). Tümör baskılayıcı genlerden olan *p53* geni 17p13.1 kromozom bölgesinde yer alıp, 393 aminoasitten oluşan bir protein kodlamaktadır (Akça vd. 2018). Hücreler, DNA'sında ve kromozomların işlevsel birimleri olan genlerde gerçekleşen değişiklikler neticesinde kontrolsüz olarak bölünmeye başlarlar. Sonrasında komşu dokulara ve uzak organlara yayılabilirler. Hücrelerin bu anormal özelliği taşıması ile gelişen büyük bir grup hastalığa kanser adı verilir (Aliustaoğlu 2009). Kanser, yüzyıllar öncesinde olduğu gibi günümüzde de varlığını sürdüren habis hastalık türüdür (Atıcı 2007). Hücre de apoptozisin düzenlenmesinde sistein proteazlar (kaspazlar; *Caspase-8*, *Caspase-9* ve *Caspase-3*) ve *Bcl-2* gen ailesi rol oynamaktadır. Hücrenin varolması apoptozisi indükleyen ve inhibisyona uğratan genlere (*Bcl-2*, *Bax*, *p53*) bağlıdır. Bu genlerin mutasyonu da kansere yol açmaktadır (Yokuş ve Ülker 2012).

GLOBOCAN verilerine göre 2012 yılında dünyada toplam 14,1 milyon yeni kanser olgusu gelişmiş olup 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünyada en çok tanı konulan kanser türleri akciğer, meme ve kolon kanseridir (Yalcın and Sarı 2015). Kolon kanseri gastrointestinal traktusta en fazla rastlanılan kanserlerdir. WCRF'den edinilen

verilere göre 2018’de dünyada en sık görülen kanser türleri arasında 3. Sırada yer alan kolorektal kanser (Url 2 2020), Türkiye’de ise 2015’te güncellemesi yapılan verilerine göre sık rastlanılan ölümcül kanser türü olarak yerini almaktadır (Url 1 2020). Kolorektal kanser, normal dokuda büyümeyi kontrol eden moleküler mekanizmaların bozulmasına yol açan bir seri genetik değişikliklerin birikimi sonucu oluşum göstermektedir. Kolorektal tümörlerin oluşumu onkogenlerin mutasyona uğraması ve tümör süpresör genlerin mutasyonel inaktivasyona uğraması sonucu oluşmaktadır. Uzak metastazları bulunan ileri evredeki kolon kanseri vakalarında sağ kalım süresini uzatabilmek için değişik kemoterapik ajanlar kullanılır. Bu amaçla 5-FU ve 5-FU+Leucovorin+Oxaplatin kombinasyonları kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak, Dik grubu ağrı kesiciler, enflamasyonu ve kolon kansere bağlı ağrıyı azaltmak için kullanılan en yaygın kullanılan Anti-inflamatuvar NSAİ arasındadır (McGettigan and Henry 2013; Lonapan et al. 2016). Yüksek konsantrasyonlarda Dik, yüksek agresif kolon kanseri hücrelerinde (HT-29, SW480 ve DLD-1) kontrol numunelerine kıyasla hücre canlılığı kaybını arttırabilmiştir (Hixon et al. 1994).

Antikanser ajanlar tümör hücrelerinde olduğu kadar normal hücrelerde de apoptozisi arttırmaktadır. Non-steroidal antiinflamatuvar (NSAİ) ilaçlar dünyada en sık kullanılan ilaçlar olmakla birlikte reçete edilen tüm ilaçların %5’ini oluştururlar (Bakır 2018). NSAİ ilaçların kansere karşı koruyucu etkileri ve antikanser etkileri son zamanlarda dikkat çekici bir konu haline gelmiştir. *In vitro* ve *in vivo* olarak yapılan epidemiyolojik çalışmalar, NSAİ ilaçların meme, prostat, pankreas, yumurtalık, akciğer, kolon-rektum, gibi birçok kansere karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Karsinogenezin durdurulmasında veya yavaşlatılmasında Prostaglandin (PG) üretiminin inhibe edilmesinin rolü olabileceği bildirilmiştir. Çünkü birçok kanser hücre hattında PG’ler normal hücre hattında olduklarından daha fazladır. PG’lerin aynı zamanda apoptozistede görevi vardır ve yapılan araştırmalara göre kolon kanseri hücre hattında PG E2’nin apoptozisi inhibe ettiği ve antiapoptotik genlerden B hücre lenfoma-2 (BCL-2) ekspresyonunu artırdığı ortaya koyulmuştur. Son yıllarda bu ilaçların apoptozisi indükleyerek ve hücre siklusuna etki edip bloke olmasını sağlayarak antikanser etki gösterdikleri rapor edilmiştir (Bakır 2018). NSAİ’ler ve PG antagonistinin epitel hücre büyümesinin kontrolüne dahil olduğu kanıtlanmıştır, çünkü COX inhibitörünün prostanoidlerin biyosentezini azalttığını göstermiştir, ancak bağırsak epitel hücre proliferasyonunun/apoptozunun kontrolünde içeren lökotrien seviyelerini artırabilir (Reed

2001). Diklofenak Sodyum (DS), fenilasetik asit türevi, nonsteroidal antiinflamatuvar (NSAİ), kolay tölere edilebilen bir ilaçtır. Kuvvetli bir PG sentez inhibitörüdür. Kullanışlı olmasını sağlayan en önemli özelliği yaşlılarda ve renal bozukluğu olan hastalarda doz ayarlaması gerektirmemesidir (Açıkgöz vd. 1994). Hücresel bazda yapılan çalışmalar DS'nin siklooksijenaz aktivitesini inhibe ederek, enflamasyon mediatörlerinden PG, prostasiklin ve tromboksanın üretimini azalttığını göstermiştir. İntraselüler sıvıdaki serbest araşidonik asid düzeyini de azaltmaktadır. Diklofenagin peroksidazlar tarafından katalizlenen oksidasyonu sonucu oluşan nitroksit veya katyon radikallerinin de oksidatif strese ve mitokondriyal hasara neden olduğuna dair farklı bir mekanizma daha mevcut olup, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarca yeteri kadar desteklenememiştir (Erkmen 2017). Biyokimyasal oksidatif yollarla üretilen ROS, kanser dahil çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik hastalıklarla bağlantılıdır (Acharya et al. 2010). ROS üretiminin kolon kanseri hücrelerinde apoptoz ile sonuçlandığı ispat edilmiştir (Ahmed et al. 2017). Hidroksil ve hidroperoksil radikali, lipidleri etkileyebilen en yaygın ROS'dur. Oksidatif hasarın sonucunda, hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna (LPO) yol açar, zar bütünlüğünde bir kayba neden olur ve apoptoz veya nekroza neden olur (Lepara et al. 2020). Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) içeren enzimatik antioksidanlar, süperoksit ve diğer peroksitleri metabolize ederek etki eder ve hücrelerdeki ROS aktivitesini ve birikimini temizleyen ve redoks dengesini koruyan endojen antioksidan savunma sistemleri olarak davranırlar (Lobo et al. 2010). İnsan vücudundaki antioksidan koruma mekanizması, nötralizasyon ve ROS üretimi arasındaki dengeyi korur ve SOD, CAT ve glutatyon içerir (Paulsen and Carroll 2013). ROS üretimi ve antioksidan koruma mekanizması arasındaki dengesizlik, kanser ilerlemesini başlatan oksidatif hasara neden olur (Klaunig et al. 1998). ROS tarafından tetiklenen oksidatif hasar, iyi bilinen sitotoksikite ve apoptoz indükleyicisidir (Thangaraj et al. 2019), (Alhadlag et al. 2019). ROS ayrıca, kanser tedavisinde hasarlı hücrelerin yok edilmesi için çok önemli olan apoptotik yolun aracılığı ile ilişkilendirilmiştir (Jafari et al. 2013). Dik, Anti-inflamatuar ilaç olarak uygulanan tercihli bir siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörüdür (Minotti and Aust 1989). Kansere bağlı ağrıların tedavisinde onkoloji hastalarında umut vaat eden bir ilaç haline gelmiştir (Minotti and Aust 1989). Enflamasyon, kolon kanseri vakalarının kötü prognozunun en önemli nedenlerinden biridir; bu nedenle Dik, kolon kanseri tedavisinde muhtemel terapötik bir ilaçtır (Jain et al. 2017). Anti-inflamatuar aktiviteye sahip olmanın yanı sıra, Dik gibi NSAİ'lerin bazı

hücre hatlarında apoptotik yolları indükleyerek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Hixson et al. 1994; Kaur and Sanyal 2010). Endojen ve eksojen antioksidanlar, ROS'un neden olduğu hasarı önleyebilir ve onarabilir. Bu nedenle, “serbest radikal temizleyicileri” olarak adlandırılırlar ve bağışıklık savunmasını geliştirebilir ve hastalık ve kanser riskini azaltabilirler (Abreu and Cabelli 2010). Antioksidanlar, besin maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve kanseri önlemedeki etkinlikleri açısından incelenmiştir (Fu et al. 2014). Reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi serbest radikallerin neden oldukları oksidatif zarara karşı antioksidan maddeleri içeren gıdalar, insanları korumaktadır (Güleşçi ve Aygül 2016). Belirli koşullar altında flavonoidler pro-oksidan olarak davranabilir ve bu nedenle diğer bileşiklerin oksidasyonunu teşvik edebilir. Flavonoidlerin pro-oksidan özellikleri doza bağlı olduğu görülmektedir (Prochazkova et al. 2011). Flavonoidler arasında Kr, anti-kanser etkileri de dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip çok sayıda bitki özü, bal ve propoliste bulunan doğal bir flavondur (Ryu et al. 2017). Kr; 5,7-dihydroxyflavone), güçlü antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanser aktiviteleri ile çeşitli bitkilerde ve arı ürünlerinde bulunan, umut verici doğal olarak biyoaktif bir flavonoiddir (Naz et al. 2019). Buna ek olarak Kr, yaşlanmanın fizyolojik ve biyokimyasal etkilerine karşı klinik ve terapötik uygulama potansiyeline de sahiptir. Yaygın olarak çeşitli dejeneratif hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır ve sitotoksik ve antiinflamatuar aktiviteler sağlar (Fu et al. 2014). Bununla birlikte, mevcut çalışmalar, antioksidanların besinsel kullanımının avantajlı olmayabileceğini ve hatta kanser ilerlemesinde istenmeyen etkiler yaratabileceğini göstermiştir (Fu et al. 2014).

Bu çalışmanın odak noktası, Kr'nin Dik tarafından tetiklenen HT-29 hücreleri üzerindeki etkisini ve etkisinin öncelikli moleküler mekanizmalarını incelemektir. Dik ile muamelede bulunduğumuz HT-29 hücre hattı üzerinde konsantrasyona bağlı olarak (500 uM) hücre proliferasyonunda önemli ölçüde azalma görüldü. Bu çalışmada, hücrelerin Dik ile tedavi edilmesi, ROS ve LPO seviyelerinde ve LDH enzim salınımında artış, TAS ve CAT enzimlerinin aktivitesinde azalma ve apoptotik indeksde artış, hücre proliferasyonunda azalma ile sonuçlandı.

Mitokondrinin apoptotik yola aracılık etmedeki temel rolü, apoptotik yoldaki Mitokondrinin biyolojik ve yapısal değişikliklerinde mitokondriyal bozulma bulunduğu son yıllarda bildirildiği gibi doğrulanmıştır, mitokondrinin dış zarının bozulması ve sitokrom C salınımı, Apaf1 ve Caspase-9'un etkileşimini tetikleyebilir, bu da Caspase-

9'un Caspase-9 aktivasyonuna yol açar ve daha sonra Caspase-3'ü aktive eder ve bu hücrel ve morfolojik değişikliklere ve sonunda hücrel ölüme yol açan bir reaksiyon olur (Reed 2001). Tümör baskılayıcı genin, *p53*'ün apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Naz et al. 2019). Bax'ın pro-apoptotik proteinlerinin ekspresyonunu arttırır ve dolaylı olarak Caspase-3'ü aktive eder. Membran potansiyelinin depolarizasyonu ve böylece sitokrom c salınımı Dik'in mitokondriyal membran geçirgenliğinin geçişini uyardığı bildirilmiştir. Aktive edilmiş Caspase-8, apoptotik sinyali, mitokondriye bir hasara neden olarak tetikler ve bu da bir proteolitik kademeyi uyarır (Masubuchi 2002). Bu çalışmada, hücrelerin Dik ile tedavi edilmesi sonucunda, Apoptotik genlerin mRNA seviyeleri (*p53*, *cas-3*, *cas-8*, *Bax* ve *sitokrom c*) yükselirken, Antiapoptotik gen *Bcl-2*'nin mRNA seviyeleri azaldı.

Önceki çalışmalar, Kr'nin kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlemedeki etkinliğini işaret ediyordu (Kasala et al. 2015). Çalışılan kanserin çalışmalarının büyük bölümünde, Kr hücre proliferasyonunu önlediğini ve apoptotik yolu tetiklediğini ve lösemi hücrelerinde incelenen diğer fenolik bileşiklerden daha etkili olduğunu, bunun için Kr tahminen kaspaz enzimlerinin aktivasyonu yoluyla hareket ettiğini göstermiştir (Khoo et al. 2010). Bir çalışmada, kemoterapötik ilaç 5-FU tedavisi ile antioksidanların eşzamanlı kullanımının kolon kanseri hücresinde apoptozu azalttığı bildirilmiştir (Fu et al. 2014). Ek olarak farklı kanser hücrelerinin tedavisi, sorafenib Dik ile Huh-7, HepG2 ve PLC-PRF-5 gibi, tek başına sorafenib veya Dik ile karşılaştırıldığında kanser hücresi ölümünü önemli ölçüde artırmıştır. Öte yandan, N-asetil-sistein ve askorbik asit gibi antioksidanlar, Dik ve sorafenib Ko-terapisinin zararlı etkilerini tersine çevirmiştir (Duval et al., 2019). Bu çalışmada, *p53*, *cas-3*, *cas-8*, *Bax* gibi apoptozun iç ve dış yollarında bulunan apoptotik genlerin dokudaki ekspresyon seviyesi, sitokrom c yukarı regüle edilirken anti-apoptotik *Bcl-2* indükte tedavi edilen grup için aşağı regüle edilmiştir. Kr+Dik, bu genlerin mRNA seviyelerini tersine çevirmiştir.

Çalışmamız, Kr'nin dış kaynaklı HT-29 hücrelerindeki etkilerinin muhtemelen kanser çalışmalarına aykırı sonuçlara yeniden döndüğünü göstermiştir. Çalışmamız, Kr'nin Dik kaynaklı HT-29 hücrelerindeki etkilerinin muhtemelen kanser çalışmalarına aykırı sonuçlara yeniden döndüğünü göstermiştir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın yeni önemli verileri, Dik ile antioksidan alımının enzimatik antioksidanların seviyesini ve uyarıcı aktivitesini azaltabileceğini göstermiştir. Tüm bu bulgular ışığında; Dik ile beraber antioksidan kullanımına ROS seviyesini düşürebileceğinden ve dolayısıyla kanser tedavisi için istenmeyen bir durum olan apoptotik hücre ölümünü azaltacağından dikkat edilmelidir sonucuna varılmıştır. Sonuçlarımız, antioksidan besin takviyelerinin ve özellikle Kr'nin, kolon kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklemeye Dik'in etkinliğini azaltabileceğine dair yeni bir açıklama sağlamaktadır.

## KAYNAKLAR

Abreu I A, Cabelli D E (2010) Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2): 263-274

Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T (2010) Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxidative medicine and cellular longevity* 3(1): 23-34

AÇIKGÖZ M, KAŞ H, HINCAL A (1994) Diklofenak Sodyum. *FABAD Farmasötik Bilimler Dergisi* 19: 37-47

Ahmed A Y, Gad A M, El-Raouf O M A (2017) Curcumin ameliorates Diklofenac sodium-induced nephrotoxicity in male albino rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(10): e21951

Akça H, Akgün A, Küçüksayan H (2018) *Kanser Moleküler Biyolojisi*. Editör: Yusuf BARAN, Kısayol Yayıncılık, 12. Bölüm Tümör Baskılayıcı Genler, s. 151-156

Alhadlaq H A, Akhtar M J, Ahamed M (2019) Different cytotoxic and apoptotic responses of MCF-7 and HT1080 cells to MnO<sub>2</sub> nanoparticles are based on similar mode of action. *Toxicology* 411: 71–80

Aliustaoğlu M (2009) *Temel Kanser Fizyopatolojisi*. *Klinik Gelişim* 22(3): 46-49

Aşık A (2015) Juglonun panc-1 pankreas kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkilerinin moleküler ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi, Konya, s. 19-37

Atici E (2007) Cancer and leukemia in the history of medicine. *Turkish Journal Of Oncology* 22(4): 197-204

Bakır E (2018) Flurbiprofenin Sitotoksik, Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, s. 1-42

Başpınar M (2015) Kanserli kolon hücre dizisinde seranib-2 maddesinin apoptoz oluşumuna ve hücre yaşamına olası etkileri. Tıpta Uzmanlık Tezi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, s. 1-56

Çuğlan S (2012) Gebe ratlarda formaldehit maruziyetinin fetusların morfolojik yapıları ile karaciğer dokusunun gelişimi üzerine zararlı etkilerinin araştırılması; chrysin'in muhtemel koruyucu rolünün incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anatomi Anabilim Dalı, İnönü Üniversitesi, Malatya, s. 8-13

Duval A P, Troquier L, de Souza Silva O, Demartines N, Dormond O (2019) Diklofenac Potentiates Sorafenib-Based Treatments of Hepatocellular Carcinoma by Enhancing Oxidative Stress. *Cancers* 11(10): 14-53

Erkmen T (2017) Diklofenak sodyum kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu hepatotoksisite üzerine alfa lipoik asidin koruyucu etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, s. 6-23

Fenoglio-Preiser C M, Noffsinger A E, Stemmermann G N, Lantz P E, Listrom M B, Rilke F O (1999) Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. *Gastrointestinal pathology an atlas and text*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, s. 909-1068

Fu Y, Yang G, Zhu F, Peng C, Li W, Li H, Kim H-G, Bode AM, Dong Z, Dong Z et al. (2014) Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. *Cell Death Dis* 5(1): e983

Güleşci N, Aygül İ (2016) Beslenmede Yer Alan Antioksidan ve Fenolik Madde İçerikli Çerezler. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1): 109-129

Güllüoğlu H (2018) Bakır Sülfat Toksikitesi Oluşturulan Ratlarda Kr ve Flunixin Megluminin Yem Tüketimi, Canlı Ağırlık, Antioksidan Durum, Bazı Kan ve Yangı Parametreleri Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Fırat Üniversitesi, Elazığ, s. 11-14

Haida Z, Hakimian M (2019) A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food science & nutrition*, 7(5): 1555-1563.

Hixson L J, Alberts D S, Krutzsch M, Einsphar J, Brendel K, Gross P H, Pamukcu R (1994) Antiproliferative effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs against human colon cancer cells. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 3(5): 433-438

Jafari M, Rezaei M, Kalantari H, Hashemitabar M (2013) Determination of cell death induced by lovastatin on human colon cell line HT29 using the comet assay. *Nutrition And Cancer* 9 Jundishapur J Nat Pharm Prod.8(4): 187-91

Jain S, Ghanghas P, Rana C, Sanyal S N (2017) Role of GSK-3 $\beta$  in regulation of canonical Wnt/b-catenin signaling and PI3-K/Akt oncogenic pathway in colon cancer. *Cancer Invest.* 35(7): 473-83

Kasala E R, Bodduluru L N, Barua C C, Gogoi R (2015) Chrysin and its emerging role in cancer drug resistance. *Chem Biol Interact* 236: 7-8

Kaur J, Sanyal S N (2010) PI3-kinase/Wnt association mediates COX-2/PGE (2) pathway to inhibit apoptosis in early stages of colon carcinogenesis: chemoprevention by Diklofenac. *Tumour Biol* 31(6): 623-31

Khoo B Y, Chua S L, Balaram P (2010) Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *Int J Mol Sci* 11(5): 2188-99

Klaunig J E, Xu Y, Isenberg J S, Bachowski S, Kolaja K L, Jiang J, Stevenson D E, Walborg E F (1998) The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspec.* 106(1): 289-95

Lepara Z, Lepara O, Fajkić A, Rebić D, Alić J, Spahović H (2020) Serum malondialdehyde (MDA) level as a potential biomarker of cancer progression for patients with bladder cancer. *Romanian Journal of Internal Medicine.* 58(3): 146-152

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews* 4(8): 118

Lonappan L, Brar S K, Das R K, Verma M, Surampalli R Y (2016) Diklofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity-a review. *Environment international* 96: 127-138

Mani R, Natesan V (2018) Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*, 145: 187-196

Masubuchi Y, Nakayama S, Horie T (2002) Role of mitochondrial permeability transition in Diklofenac-induced hepatocyte injury in rats. *Hepatology* 35(3): 544-51

McGettigan P, Henry D (2006) Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *Jama*, 296(13): 1633-1644

Minotti G, Aust S D (1989) The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. *Chem Biol Interact* 71(1): 1–19

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang H G, Lin H K, Liebermann D A, Hoffman B, Reed J C (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6): 1799–805

Naz R, Hussain S M, Ain Q U (2019) Bacteriological Profile of Surgical Site Infections and their Antibiotic Susceptibility Pattern. *Life Sci* 5(2): 2224-2229

Naz S, Imran M, Rauf A, Orhan I E, Shariati M A, et al. (2019) Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life Sciences* 235: 116797

Url1. <https://www.saglik.gov.tr/TR,11587/kanser-istatistikleri-2003-2004-2005.html>  
(Erişim Tarihi: 17.06.2020)

Url2. <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>  
(Erişim Tarihi: 17.06.2020)

Özbolat S N, Ayna A (2020) Chrysin suppresses HT-29 cell death induced by Diklofenac through apoptosis and oxidative damage. *Nutrition and Cancer* s. 1-10

Paulsen C E, Carroll K S (2013) Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev* 113(7): 4633–79

Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*.82(4): 513–23

Pushpavalli G, Kalaiarasi P, Veeramani C, Pugalendi K V (2010) Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. *European journal of pharmacology* 631(1-3): 36-41

Reed J C (2001) Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends in molecular medicine* 7(7): 314-319

Ryu S, Lim W, Bazer F W, Song G (2017) Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress. *J Cell Physiol* 232(12): 3786–97

Sharma R (2020) An examination of colorectal cancer burden by socioeconomic status: evidence from GLOBOCAN 2018. *EPMA Journal* 11(1): 95-117

Şentürk T (2014) Non-Steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ). *İç Hastalıkları Derg* 2: 490-5

Thangaraj K, Balasubramanian B, Park S, Natesan K, Liu W (2019) Orientin Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest and Mitochondria Mediated Intrinsic Apoptosis in Human Colorectal Carcinoma HT29 Cells. *Biomolecules* 9: 418

Tunç A (2017) Hipoksik ve Hiperoksik Stres Uygulamalarının Gökkuşığı Alabalığı'nda Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Gen Ekspresyonları Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, s. 3-13

Yalcın S, Sarı E (2015) A General Overview of Personalized Cancer MeDikine/Kanserde Bireyselleştirilmiş Tedavilere Genel Bakış. In *Nuclear MeDikine Seminars Galenos Yayınevi* 1, 2: 128-136

Yılmaz İ (2010) Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *Journal of Inonu University MeDikal Faculty* 17(2): 143-153

Yokuş B, Ülker Çakır D (2012) Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 1(2): 7-18

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Ad-Soyad: Seda Nur ÖZBOLAT

Doğum Tarihi: 21/07/1995

## İletişim Bilgileri

e-posta: [sedanurozbolat05@gmail.com](mailto:sedanurozbolat05@gmail.com)

## Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans: Bingöl Üniversitesi-20018-2020... /BİNGÖL Biyokimya

Lisans: Bingöl Üniversitesi– 2012-2016/ BİNGÖL Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

## Yabancı Dil Bilgisi

İngilize (İyi)

## Etkinlikler

Bingöl Üniversitesi Öğrenci Konseyi Yönetim Kadrosu Aktif Pozisyon

Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Kulübü

Bingöl Üniversitesi SOS12 Kulübü Aktif Pozisyon

## Kullanılan Teknik Programlar ve Bilgisayar Bilgisi

- Microsoft Office Programları
- Elisa Reader Software
- Image Lab Software (Biorad UV Gel Doc EZ)

### **RealTime PCR**

- Rotor Gene Q- Pure Detection Series Software 2.3.5
- Rotor Gene Q- Pure Detection Screen Clust Analiz Programı

### **Western Blot**

- Graphpad Prism 5.0 Analiz Programı
- İmage J programı

### **Laboratuvar Tecrübesi**

- Hücre Kültürü Uygulamaları (Hücre Proliferasyonu belirleme ve toksisite testleri, Tunnel Assay, IHC Assay, Antioksidan Testler vs.)
- Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP)
- Antioksidan Deneyler
- PCR
- Real Time PCR \*
- Biorad Western Blot Sistemleri \*
- HPLC
- GC-MS
- Nanopartikül Sentezi
- ElisaReader
- Yatay Elektroforez

### **Katılım Sağlanan Eğitim & Kurslar**

1. "RT-PCR: mRNA Ekspresyonu" Kursu Eğitim Sertifikası- 13.05.16
2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası- 08.06.2017/BİNGÖL
3. Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Katılım Belgesi (16 saat)- 05-06.05.17
4. Elocution Education Certificate - 09.04.2015/BİNGÖL
5. Diktion Education Certificate – 09.04.2015/BİNGÖL
6. Body Language Education Certificate - 09.04.2015/BİNGÖL  
Effective Communication Education Certificate - 09.04.2015/BİNGÖL
7. Laboratory Security, Biorisk Assessment & Waste Management

Certification Training- 01.08.2019/ BİNGÖL

8. Geleceğini Uyuşturma Projesi” Madde Bağımlılığı Eğitimi Belgesi- 2014- 2015

### **Projeler**

1. “Bingöl Arı Sütünün Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi” Pikom-Arı.2018.001 kodlu Pikom Projesinde **Bursiyer Öğrenci-** Bingöl Üniversitesi 2018-2020. **(Proje çalışmaları süresince ağırlıklı olarak Western Blot ve RealTime PCR yapılmıştır.)**
2. “Bingöl Yöresinde Farklı Dönemlerde ve Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Propolislerin Verim, Kalite ve İçerik Bakımından Karşılaştırılması” Pikom-Arı.2019.005 kodlu Pikom Projesinde **Bursiyer Öğrenci-**Bingöl Üniversitesi 2019-Devam ediyor. **(Projede Western Blot ve RealTime PCR uygulamaları halen yapılmaktadır.)**
3. “Resveratrol ve Üzüm (Vitis)Ün Mcf-7 Hücre Hattındaki Kaspaz Bağımlı Apoptoz Üzerine Etkisinin ve Oksidatif Stres Düzeylerinin Belirlenmesi” isimli (1919B011601246 kodlu ) TÜBİTAK destekli Proje Çalışmasında **Yürütücü –** Bingöl Üniversitesi 2017-2018. **(Lisans Projesi içerisinde de Western Blot yapılmıştır.)**

**Yüksek Lisans Tez Konusu:** “Diklofenak ile İndüklenmiş HT-29 Hücre Hattı Üzerinde Krisinin Moleküler ve Biyokimyasal Etkileri” **(Tez çalışması aynı zamanda BUP Projesi olarak kabul edilmiştir ve Real Time PCR uygulamaları da yapılmıştır.)**

### **Konferans ve Kongreler**

1. Molecular Science Day Konferansı Katılım Belgesi- 15.12.16/BİNGÖL
2. “INTERNATIONAL DNA-DAY and GENOME CONGRESS 2017” TÜBİTAK PROJESİ Sözlü Sunumu ve Bildiri – 24-28.04.17 Ahi Evran Üniversitesi/KIRŞEHİR
3. Uluslararası Bölgesel Kalkınma Konferansı Katılım Belgesi-15.16.15/BİNGÖL
4. Uluslararası Arıcılık Araştırmaları ve Sürdürülebilir Kırsal Kalkınma Stratejileri Kongresi Sözlü Sunum ve Bildiri 11-13.10.2019-Bingöl

## Bildiriler

1. Ekrem Darendelioğlu, Adna Ayna, **Sedanur Özbolat**, Mehmet Çiftci, Gürkan Aykutoğlu, Aydın Şükrü Bengü, Abdullah Tunç “Content and Apoptotic Effect of Bingol Royal Jelly on Colon Cancer Cells”, Uluslararası Arıcılık Araştırmaları ve Sürdürülebilir Kırsal Kalkınma Stratejileri, 11-13.10.2019-Bingöl
2. Ekrem DARENDELİOĞLU, **Sedanur ÖZBOLAT**, Adnan AYNA “Seconder Metabolite Analysis of Lactobacillus Pentosus Vs. Pediococcus Pentosaceus”, Eurasia 3RD International Congress of Applied Sciences 28-30 June 2019, Sivas
3. Ekrem Darendelioğlu, Aydın Şükrü Bengü, Adnan Ayna, Gürkan Aykutoğlu, Mehmet Çiftci, **Sedanur Özbolat** “Mineral Content And Antimicrobial Activity of Bingol Royal Jelly”, 7<sup>th</sup>. International Conference on Mathematics, Engineering, Natural & Medikal Sciences, 14-16.06.2019- Rome, Italy
4. Adnan Ayna, Aydın Şükrü Bengü, Gürkan Aykutoğlu, Mehmet Çiftci, **Sedanur Özbolat**, Ekrem Darendelioğlu “Anticancer And Antioxıdant Activity of Bingöl Royal Jelly” 7<sup>th</sup>. International Conference on Mathematics, Engineering, Natural & Medikal Sciences, 14-16.06.2019- Rome, Italy
5. Adnan Ayna, **Seda Nur Özbolat** “Protective Effects of Ferulic Acid Against Diklofenac Induced Toxicities in SH-Sy5y Cells”, 3rd International Conferance on Physical Chemistry and Functional Materials PCMF-2020, 22-24.09.20, Malatya

## Yayımlar

1. **ÖZBOLAT, S. N.**, & Ayna, A. (2020). Chrysin Suppresses HT-29 Cell Death Induced by Diklofenac through Apoptosis and Oxidative Damage. *Nutrition and Cancer*, 1-10.
2. BENGÜ, A. Ş., AYNA, A., **ÖZBOLAT, S.**, TUNÇ, A., AYKUTOĞLU, G., ÇİFTCİ, M., & DARENDELİOĞLU, E. (2020).Content and Antimicrobial Activities of Bingol Royal Jelly. *TJANS* 7(2): 480–489,
3. AYNA, A., **ÖZBOLAT, S.N.**, DARENDELİOĞLU, E. (2020) Quercetin, Chrysin, Caffeic acid and Ferulic Acid Ameliorate Cyclophosphamide- induced Toxicities in SH-SY5Y Cells. *Molecular Biology Reports* (Kabul edildi)